

Postsynthetische, lichtinduzierte Modifikation von tetrazolfunktionalisierten Oligonukleotiden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Stefanie Arndt

aus Mannheim, Baden-Württemberg

Karlsruhe, 2016

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Michael A.R. Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2016

Meinen Liebsten

Mischief Managed

J.K. Rowling, Harry Potter and the Prisoner of Azkaban

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis Dezember 2016 am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Ich bedanke mich im Besonderen bei meinem Doktorvater, Professor Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung, die interessante Themenstellung und sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich bedanken bei:

- Claudia Sommer, für ihre Unterstützung im Verwaltungsdschungel vom allerersten Tag an und ihre freundliche und offene Art, die einen nie das Gefühl haben lässt zum falschen Moment an ihre Tür geklopft zu haben
- Annette Hochgesand, dafür, dass sie meine MALDI-Proben nie aufgegeben hat
- Dr. Andreas Rapp, Tanja Ohmer, Anne-Lena Emmerich, Lennart Oberle und Pia Lang für das Messen zahlreicher NMR-Proben
- Damian, Sergej und David, für die engagierte Messung der „heiklen“ Proben
- Ingrid Roßnagel und Angelika Mösle für das unermüdliche Messen der Molekülmassen
- Richard von Budberg, dafür, dass er unseren „Hercules“ gerettet hat.
- Ciske Faber und Lennart Oberle, für nette Gespräche und die Hilfe beim Abfüllen von Lösungsmitteln
- PD. Patrick Weis für die ESI-Messungen
- Andreas Dittmer für den Nachschub an Tetrazol und seine gute Laune
- Meinen Vertiefer- und Bachelorstudenten Robert, Julian und Ulrike
- Barbara, Marcus und Damian für das Korrekturlesen dieser Arbeit

- Meinen Kollegen Dr. Marcus Merkel, Dr. Philipp Enßlen, Barbara Reiß, Yannic Fritz, Leonora Nurcaj, Nadine Gaß, Dr. Sabrina Sezi, Dr. Claudia Stubinitzky, Dr. Christian Wellner, Anna Petri, Krisana Peewasan, Dr. Effi Bätzner, Jeannine Steinmeyer, Benjamin Lehmann, Andreas Dittmer, David Rombach, Dr. Alexander Penner, Dr. Sebastian Barrois, Ben Chaouis, Nathalie Wagener, Linda Antusch, Samantha Wörner, Tamina Schneider, Larissa Doll, Robert Hofsäß, Dr. Peggy Bohländer, Heidi Walter, Christian Schwechheimer, Ulrike Reisacher, Damian Ploschik, Andrea Bijeljanin, Dr. Martin Weiser, Sergej Hermann und Christoph Bickmann für die Hilfe, eure Unterstützung und eine überragende Zeit
- Meinen Kollegen aus dem Großraum-Technicum für die tolle Atmosphäre, den Spaß an Mottotagen, die musikalische Zusammenarbeit, das perfekte Timing an Hörspieltagen und dafür, dass ich den Kummerkasten nicht allzu oft leeren musste.
- Heidi, für unsere schöne gemeinsame Zeit: Für alle verrückten Aktionen, für lustige, ruhige und fröhliche Momente, die gemeinsamen Ausbruchsversuche und die Zeit in Achterbahnen, Kanus, Hütten, Restaurants und Seilbahnen irgendwo in Deutschland und der Welt und natürlich das kleine Dubbeglas!
- Nadine, für die gute Freundschaft, ihren Humor, ihr Organisationstalent, unsere gemeinsamen Kochsessions und die W'n'Ts
- Barbara, dafür, dass wir uns einfach verstehen, für Gin und Tonic, dafür, dass sie mich als Ehrenmitglied im Labor 203 aufgenommen hat, für die tolle Zeit in Sevilla und den Spaß im Spanischkurs
- Jack for showing me how to cook Pad Thai and being a good friend and lab-neighbour.
- Marcus, dafür, dass ich mich in all den Jahren die wir uns jetzt schon kennen immer auf ihn verlassen konnte
- Jeannine für ihre perfekte Balance aus Gelassenheit, Freundlichkeit und guter Laune
- Philipp, für seine gute Laune, für Miley und dafür, dass er das mit den Biertronen wirklich ernst meint.
- David für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft
- Benny für seinen Humor, die große Hilfe in Computerdingen und dafür, dass wir dann doch noch den richtigen Adapter für meinen Monitor gefunden haben

- Robse por la tiempo estupenda en Sevilla y muchas pausas de café divertidas y las carreras wikipedia
- Damian, für die Gespräche und die Minions 😊
- Christian für die neusten Partyhits und dafür, dass er mir gezeigt hat wie man ordentlich einparkt
- Linda für ihre liebenswürdige, unkomplizierte Art und die lustigen gemeinsamen Bahnen im Schwimmbad
- Barry für die tolle Aufnahme im Arbeitskreis, die Hilfe bei allen Laborproblemen, für die schöne Zeit bei all unseren gemeinsamen Unternehmungen, ob im Schnee, oder sonstwo und dafür, dass er Heidis und meine Zermürbung langmütig erträgt
- Effi, für viele unfassbar schöne gemeinsame Stunden, dafür, dass sie über dieselben Dinge lachen kann und dafür, dass sie für einen da ist, wenn man sie braucht, auch wenn sie noch so weit weg ist
- Sabrina für die tollen, lustigen Gespräche und dafür, dass sie mir beigebracht hat wie ein kleiner Elefant zu tröten
- Tamina, die mit ihrer sympathischen Art und ihrer Energie jedes Treffen zu einem schönen Erlebnis macht.
- Susi für ihre Freundschaft übers ganze Studium hinweg, gemeinsames Lernen, Kaffee trinken und Fußball schauen
- Nicht zuletzt natürlich auch meinen Dank an Rudi, Fritz, Chantal, Schorsch, Stella, Cary, Flouri, Grape, Schmidt und all die anderen, dafür, dass ihr mir beigebracht habt Probleme zu lösen
- Das Beste kommt bekanntlich zum Schluss: Mein Freund Carsten und meine Familie. Ihr wisst, was ihr mir bedeutet und alles aufzuzählen, wofür ich euch dankbar bin würde zu viele Zeilen in Anspruch nehmen. Deshalb zusammengefasst:
Ich liebe euch. Vielen Dank, dass es euch gibt!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Themenstellung	3
3	Theoretischer Teil	5
3.1	Bioorthogonalität	5
3.1.1	Bioorthogonale Reaktionen.....	7
3.2	„Photoclickreaktion“	15
3.2.1	Weitere bioorthogonale, lichtinduzierte Reaktionen	20
4	Lichtinduzierte, bioorthogonale Modifikation von tetrazolmodifizierten Nucleinsäuren	23
4.1	Synthese des Diaryltetrazolnucleosidbausteins	25
4.2	Festphasensynthese und Charakterisierung des Oligonucleotids.....	28
4.3	Durchführung und Ergebnisse der „Photoclickreaktion“	31
4.4	Enzymatische DNA-Synthese	45
4.4.1	Synthese des Triphosphats	47
4.4.2	Durchführung von Primerverlängerungs- und PCR-Experimenten	50
4.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	67
4.5	Untersuchung des Absorptionsverhaltens weiterer Tetrazolgerüste	70
4.5.1	Synthese und spektroskopische Charakterisierung des Coumarintetrazols	72
4.5.2	Synthese und spektroskopische Charakterisierung des Xanthontetrazols	75
4.5.3	Synthese und spektroskopische Untersuchung des Pyrentetrazolnucleosids 34	77
4.5.4	Synthese und spektroskopische Charakterisierung des pyrenmodifizierten Oligonucleotids.....	80

5	Zusammenfassung.....	83
6	Experimenteller Teil	87
6.1	Materialien und Geräte.....	87
6.2	Synthesevorschriften	94
6.2.1	Synthese Diaryltetrazolnukleosid	94
6.2.2	Synthese Coumarintetrazol	115
6.2.3	Synthese Xanthontetrazol	118
6.2.4	Synthese Pyrentetrazolnukleosid	122
6.3	Festphasensynthese der Oligonukleotide.....	131
6.3.1	Synthese.....	131
6.3.2	Aufreinigung, Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung	134
6.4	Enzymatische Synthese der Oligonukleotide.....	136
6.4.1	Durchführung der Primerverlängerungsexperimente (PEX)	136
6.4.2	Auswertung mittels denaturierender PAGE.....	140
6.5	PCR und Silberfärbung	141
6.5.1	Durchführung der PCR-Experimente	141
6.5.2	Durchführung der PAGE und Anfärben der Gele durch Silberfärbung ..	143
6.6	Durchführung der lichtinduzierten Clickreaktion	145
6.7	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der „Photoclickreaktion“	147
7	Literaturverzeichnis.....	149
8	Appendix.....	159
8.1	Publikationen	159
9	Ehrenwörtliche Erklärung	161

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ar	Aryl
a.u.	arbitrary units
bp	basepairs, Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
COMBO	Carboxymethylmonobenzocyclooctyne
CPG	controlled pore glass
CuAAC	Kupfer(I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIPEA	Diisopropylethylamin
DIFBO	Difluorinatedbenzocyclooctyne
DIFO	3,3-Difluorocyclooctin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DV	Deep Vent (-exo)
$\epsilon_{xxx \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient bei xxx nm
EE	Essigsäureethylester
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation
EPR	electron paramagnetic resonance
Äq.	Äquivalente
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
exc	excitation
FAB	fast Atom Bombardement
FC	Flash-Chromatographie
Fluo	Fluorescein
FP	fluorescent protein
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HKT	Hemo KlenTaq

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPA	Hydroxypicolinsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	High Resolution
HSAB	Hard and soft acids and bases
I	Intensität
IdU	5-Iod-2'-desoxyuridin
iEDDA	inverse electron demand Diels-Alder reaction
k	Geschwindigkeitskonstante
kcal	kilo Kalorien
konz.	konzentriert
LED	light-emitting diode
Lsg.	Lösung
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
M	molar
mA	milli Ampere
MALDI	matrix assisted laser desorption / ionization
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
μL	Mikroliter

μM	Mikromolar
n	Stoffmenge
NaP_i	Natriumphosphat
NEt_3	Triethylamin
nm	Nanometer
NMM	N-Methylmaleinimid
NMR	nuclear magnetic resonance
NTP	Nukleosidtriphosphat
OCT	Cyclooctin
p.a.	pro analysi
PA	2-Cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidit
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEX	primer extension
ppm	parts per million
quant.	quantitative
PS	Proton Sponge, <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,8-naphthalenediamine
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverse Phase
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SPAAC	Strain promoted azide alkyne cycloaddition
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)

TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
ThI	Therminator I
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TMTH	Thiacycloheptin
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Vent (-exo)
vis	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
W	Watt

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der IUPAC-IUB-Kommission² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden *kursiv* gedruckt.

¹*Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

²IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Biochemistry* 1971, 10, 3983-4004; *Eur. J. Biochem.* 1971, 21, 455-477.

1 Einleitung

Denkt man über den Anfang der Wissenschaft, wie wir sie kennen nach, so fallen früh große Namen wie Aristoteles, Galilei oder Newton. Doch statt die Wissenschaft über ihre großen Protagonisten zu definieren, soll an dieser Stelle die Frage stehen, was Wissenschaft leisten kann und soll.

Einer der ersten Beweggründe, Dinge genau zu beobachten und Erklärungsversuche zu unternehmen, war es wohl, Ängste und Aberglaube abzubauen und dem Unbekannten einen Namen zu geben. Wissenschaft soll auch Vertrauen und Sicherheit wecken. Sie schafft einen Kontrapunkt zu Mysterien und Mythologie und stützt sich auf klare Beweise und Belege um Sachverhalte zu überprüfen und zu archivieren.

Doch sie hat auch wesentlich greifbarere Ziele. Ihr steht das Ideal voran, das Leben zu verlängern und zu verbessern. Durch Entwicklungen in Medizin, der Forschung an Dünger und Saatgut, Kommunikation und Energietechnik – um nur einige zu nennen - ist das Leben, wie wir es heute kennen, überhaupt erst möglich. Doch diese Entwicklungen bergen auch ihre Schattenseiten. Fast jede Errungenschaft kann in ihr Gegenteil verkehrt werden. Also geht mit dem Schaffen von Wissen auch das Nachdenken über die Frage nach dem Umgang mit der neuen Erkenntnis einher. Die Organisation der Vereinten Nationen für Erziehung, Wissenschaft und Kultur (UNESCO) verabschiedete auf der Weltwissenschaftskonferenz, die 1999 in Budapest abgehalten wurde, eine Erklärung mit folgender Präambel:

„Wir alle leben auf demselben Planeten und sind Teil der Biosphäre. Wir müssen uns immer stärker bewusst machen, dass wir zunehmend voneinander abhängig sind und dass unsere Zukunft unauflöslich mit der Bewahrung globaler lebenserhaltender Systeme und dem Überleben aller Formen des Lebens verbunden ist. Alle Nationen und Wissenschaftler in der ganzen Welt sind aufgerufen, gemeinsam dafür einzutreten, dass Kenntnisse aus allen Bereichen der Wissenschaft verantwortungsvoll genutzt werden und ihr Missbrauch unterbunden wird, damit die Bedürfnisse und Wünsche der Menschen verwirklicht werden können.“^[1]

Aus diesem kurzen Text wird deutlich, dass jeder Zugewinn von Wissen, sei er auch noch so gering, das Potential hat zu unser aller Vorteil genutzt zu werden.

Doch wie kann es überhaupt zu einem solchen Zugewinn von Wissen kommen? Da wir bekanntlich *„Zwerge sind, die auf den Schultern von Riesen stehen“*^[2] muss es unser erstes Ziel sein, den Riesen, egal ob Mathematik, Physik oder Chemie zu erklimmen. Dies bedeutet, weniger metaphorisch gesprochen, einen Überblick über das eigene Forschungsgebiet zu erlangen, um eine Basis für die eigene Forschung zu schaffen und gleichzeitig nicht das große Ganze aus den Augen zu verlieren.

In den Naturwissenschaften ist die Basis für jedes Ergebnis die Beobachtung. Nur durch genaues Hinsehen und exaktes Dokumentieren lassen sich korrekte Schlüsse ziehen. Bestehende Grenzen auszuloten und immer mehr zu erweitern, ist dabei das typische Vorgehen. Während es für manches ausreicht, makroskopische Phänomene zu beobachten und zu vermessen, ist es in der Chemie und Biochemie maßgebend in den mikroskopischen Raum einzusehen. Beginnend bei Lupe und Lichtmikroskop bis hin zum Fluoreszenz- oder Rastertunnelmikroskop wurden Technologien entwickelt, um immer kleinere Dimensionen sauber auflösen zu können. Sind einmal die Prozesse, die in einem System, wie zum Beispiel einer Zelle, ablaufen ausreichend verstanden, so entsteht der Wunsch selbst Einfluss zu nehmen. Durch chemische Modifikationen auf Molekülebene können einzelne Zellstrukturen verändert werden. So werden sie zum Beispiel durch Fluoreszenzmarkierungen besser detektierbar, Abläufe in der Zelle lassen sich so in Echtzeit verfolgen. Gewinnt man ein tiefergehendes Verständnis, lassen sich, Schritt für Schritt, die kompliziert aufeinander abgestimmten Prozesse dergestalt nutzen und verändern, dass möglicherweise Krankheiten verhindert oder geheilt werden können.

Die selektive Modifikation von Biomolekülen kann aber mehr leisten als reine Visualisierung. Denkt man zum Beispiel darüber nach Wirkstoffe kovalent an ihren Wirkort zu binden, ergäben sich viel geringere Anwendungsdosen und Nebenwirkungen könnten in hohem Maße vermieden werden.

Um aber derartige Anwendungen zu planen und auszuführen, muss zunächst einmal das nötige „Werkzeug“ bereitstehen. Chemische Reaktionen, die mit hoher Genauigkeit solche Markierungen auf Zellebene bewirken können, müssen zunächst gefunden und verstanden werden, bevor damit der nächste Schritt getan werden kann. Mit der Erforschung und Bewertung einer dieser Reaktionen wird sich die vorliegende Arbeit beschäftigen.

2 Themenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die „Photoclickreaktion“ an DNA untersucht werden. Dazu soll ein diaryltetrazolmodifiziertes Nucleosid über automatisierte Festphasensynthese in ein Oligonucleotid inkorporiert werden. Dieses soll anschließend in verschiedenen lichtinduzierten „Clickreaktionen“ getestet werden, um so die idealen Bedingungen für die Anwendung der Reaktion an Nucleinsäuren zu finden (siehe Abbildung 1).

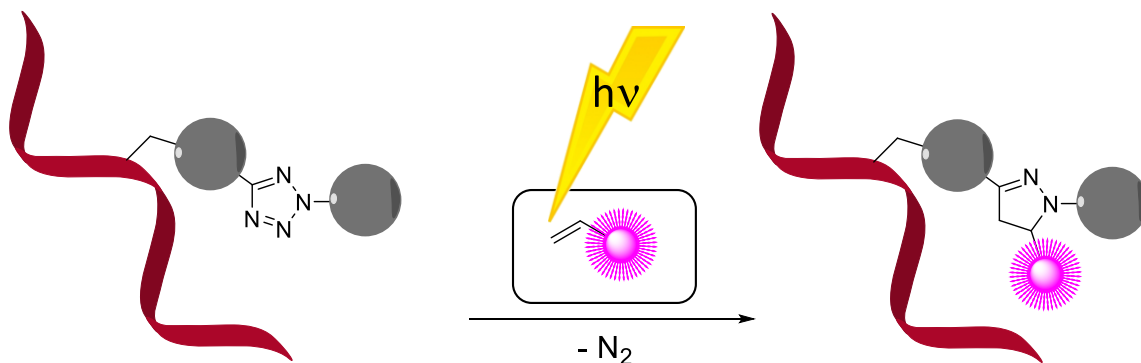


Abbildung 1: Schematische Darstellung der „Photoclickreaktion“ an einem tetrazolmodifizierten Oligonucleotid.

Im Anschluss daran soll ein Tetrazolnucleosid zum Nucleosidtriphosphat umgesetzt werden. Dieses soll, an Stelle des natürlichen Nucleosidtriphosphates dTTP, durch DNA-Polymerasen erkannt und in Oligonucleotide eingebaut werden. Anschließend sollen auch hier Anwendung und Bedingungen der „Photoclickreaktion“ erforscht werden (siehe Abbildung 2). Bei erfolgreichem enzymatischem Einbau soll im nächsten Schritt der Einsatz des tetrazolmodifizierten Nucleosidtriphosphates in der Polymerasekettenreaktion erprobt werden.

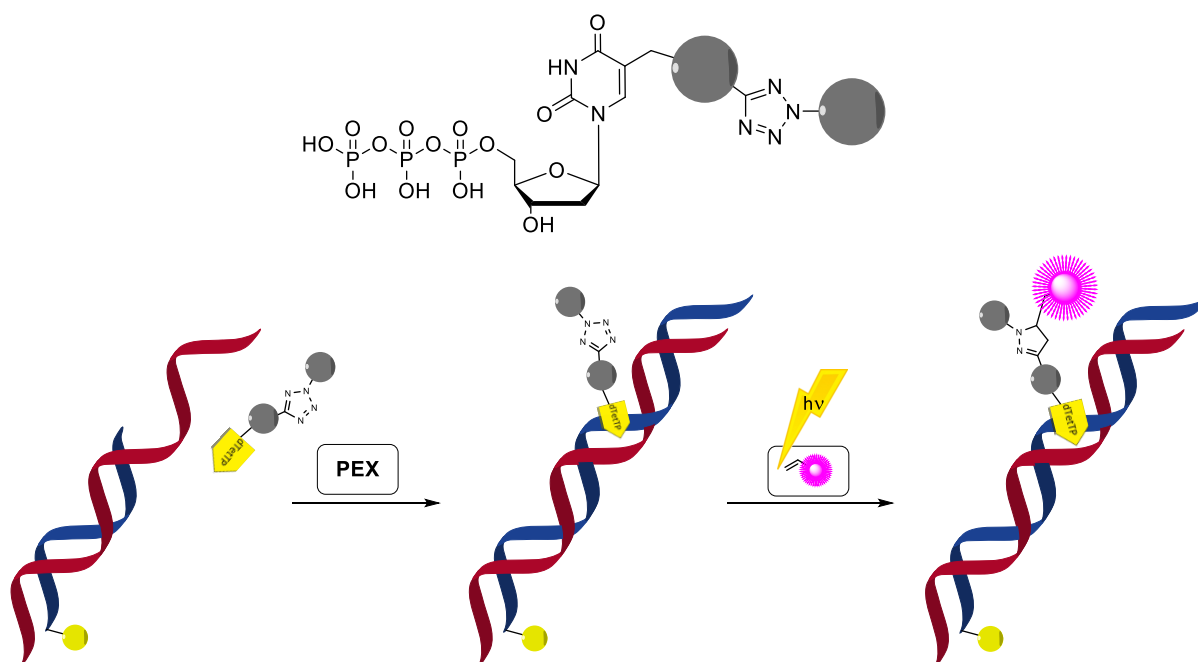


Abbildung 2: Struktur eines tetrazolmodifizierten Nucleosidtriphosphates (oben), sowie schematische Darstellung des Polymerase-gestützten Einbaus in ein Oligonukleotid sowie der postsynthetischen Markierung mit Hilfe der „Photoclickreaktion“ (unten).

Ein weiterer Teil der Arbeit besteht darin, Tetrazolgerüste zu finden, deren Absorption im sichtbaren Bereich des Lichtes liegt, um die „Photoclickreaktion“ mit energieärmerem Licht starten zu können. Dazu sollen verschiedene Tetrazole synthetisiert, deren optischen Eigenschaften untersucht und im Hinblick auf eine Eignung für die Anwendung an Nucleinsäuren bewertet werden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Bioorthogonalität

In der klassischen organischen Synthese entscheiden Kriterien wie Ausbeute, hohe erzielbare Reinheit, optische Reinheit und einfache Durchführbarkeit über die Güte einer Reaktion. In letzter Zeit dagegen spielen, im Zuge des „*Green Chemistry*“ Ansatzes, Anforderungen wie Atomeffizienz und Ersparnis von Lösungsmitteln eine immer größer werdende Rolle.^[3] Sollen chemische Reaktionen allerdings mit Biomolekülen, in lebenden Zellen oder einem Zelllysat, oder gar in lebenden Organismen ablaufen, werden wiederum andere Eigenschaften der Reaktionen und der verwendeten Reagenzien wichtig.

Das erste Kriterium für eine solche Reaktion ist die Chemospezifität. Die funktionellen Gruppen sollten hochselektiv miteinander reagieren, damit Nebenreaktionen mit den Funktionalitäten der natürlichen Biomoleküle möglichst komplett vermieden werden.^[4-5]

Der zweite Punkt betrifft die Kinetik der Reaktionen. Da sie, mit Ausnahme der metallkatalysierten Reaktionen, als bimolekulare Reaktionen mit Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung ablaufen, ist die Konzentration des gewünschten Produktes abhängig von Reaktionszeit und Konzentrationen der Edukte sowie der Geschwindigkeitskonstante.^[6] Naturgemäß ist die Konzentration eines Biomoleküls in einer Zelle, verglichen mit normalen Labormaßstäben, eher gering und auch auf die Zugabe hoher Konzentrationen des Markierungsreagens sollte auf Grund erhöhter Toxizität möglichst verzichtet werden. Da auch der letzte Faktor, die Zeit, nicht unbegrenzt zu verlängern ist, ist es wünschenswert eine Reaktion zu nutzen, die bereits eine möglichst hohe Geschwindigkeitskonstante aufweist.^[6-7]

Der letzte und zugleich wichtigste Punkt ist die Biokompatibilität. Die Reaktion sollte keine zelltoxischen Reagenzien benötigen und unter physiologischen Bedingungen, also bei Raumtemperatur, neutralem pH-Wert und im wässrigen Medium, ablaufen.

Darüber hinaus sollten sowohl die Edukte sowie das Produkt metabolisch stabil im zellulären Umfeld sein.

Reaktionen, die all diese Kriterien erfüllen, werden seit Anfang dieses Jahrtausends unter dem Begriff „Bioorthogonale Reaktionen“ zusammengefasst.^[8] Der Bedarf nach diesen, ursprünglich hauptsächlich in der Protein- und Peptidchemie genutzten Markierungsreaktionen ging daraus hervor, dass die bis dahin oft genutzten genetischen Modifikationen, zum Beispiel mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP),^[9-11] so vielfältig sie auch nutzbar sind,^[12-14] an ihre Grenzen stoßen, wenn es darum geht, sehr kleine Modifikationen, die das Verhalten der Moleküle nicht zu stark beeinflussen, einzuführen oder aber andere Stoffklassen, wie Glykane, Lipide oder Nukleinsäuren zu adressieren.

Das grundsätzliche Vorgehen ist allen bioorthogonalen Reaktionen gemein. Ein mit einem sogenannten „Reportermolekül“ modifiziertes Monomer wird in ein Biomolekül eingefügt, wobei dies entweder vollsynthetisch oder durch Nutzen von biosynthetischen Wegen, z.B. durch Polymerasen oder Ribosomen, in Zellen geschehen kann. Nach dem erfolgreichen Einbau des Reporters kann zum gewünschten Zeitpunkt die Inkubation und kovalente Verknüpfung mit dem „Markierungsmolekül“ erfolgen (siehe Abbildung 3).

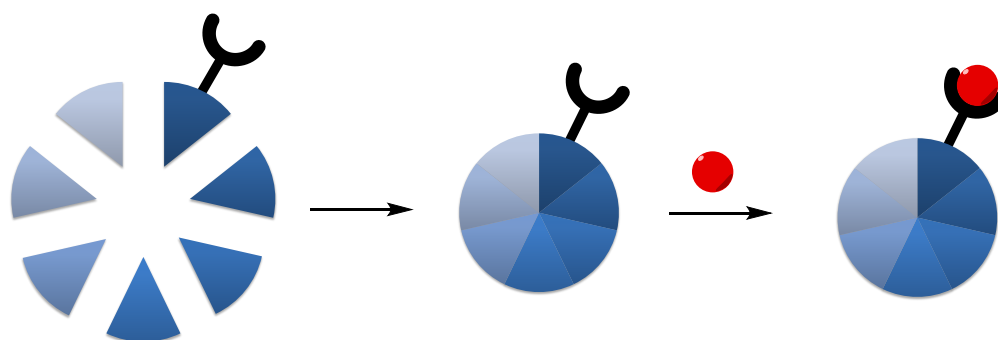
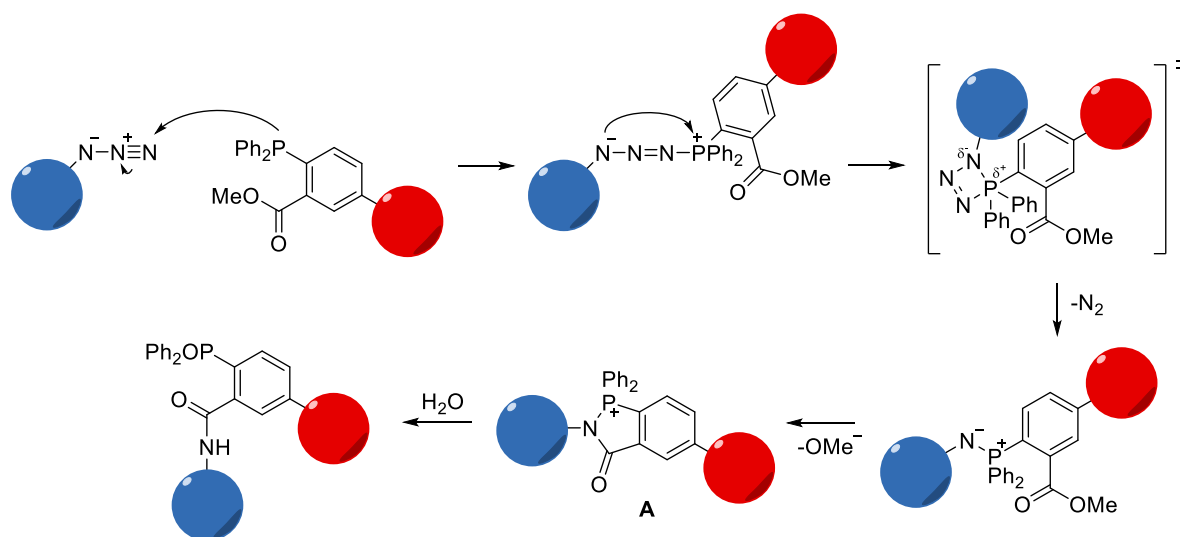


Abbildung 3: Allgemeines Konzept der bioorthogonalen Markierung: Ein Biomolekül wird aus seinen Bausteinen, wovon einer mit einem „Reportermolekül“ modifiziert ist, zusammengesetzt. Anschließend erfolgt die bioorthogonale Reaktion mit dem „Markierungsmolekül“.

3.1.1 Bioorthogonale Reaktionen

3.1.1.1 Staudinger-Ligation

Die Staudinger-Ligation, eine Abwandlung der klassischen Staudinger-Reduktion, wurde im Jahr 2000 von der Gruppe um *Bertozzi* entwickelt.^[15] Bei der Reaktion werden ein Azid und ein Triphenylphosphinderivat im wässrigen Medium miteinander verknüpft (siehe Schema 1). Die kleine Größe der funktionellen Gruppen, die fehlende Toxizität und kinetische Stabilität macht die Reaktion zum ersten Vertreter der bioorthogonalen Reaktionen.^[8] Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal bildet die Weichheit des Elektrophils ($R-N_3$) und des Nucleophils ($PPh_2PhCOOMe$) im Sinne des HSAB-Prinzips nach *Pearson*.^[16] Da die meisten, in biologischen Systemen vorkommenden Nucleophile eher als hart klassifiziert werden, ermöglicht dies eine zusätzliche Ebene der Orthogonalität.



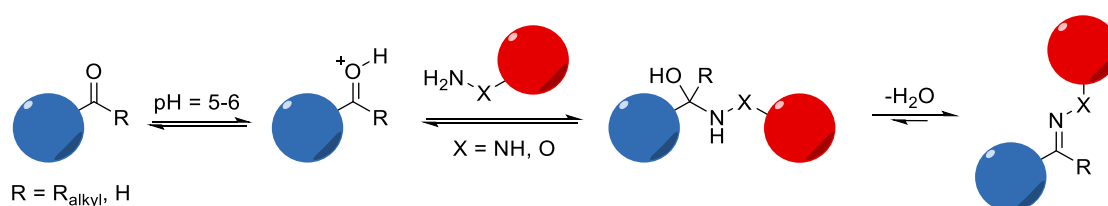
Schema 1: Mechanismus der Staudinger-Ligation. Im Vergleich zur klassischen Staudinger Reduktion wird einer der Phenylringe in ortho-Stellung zum Phosphoratom mit einem Ester modifiziert, um das gebildete Aza-Ylid (A) gegen Hydrolyse zu stabilisieren.^[8]

Mit Hilfe der Staudinger-Ligation gelang die bioorthogonale Modifikation von Glykanen und Proteinen sowohl im Zelllysate wie auch in lebenden Zellen und an Zelloberflächen.^[15, 17-21] Auch zur Modifikation von Nucleinsäuren wurde die Reaktion erfolgreich genutzt.^[22-23] Die Grenze der Nutzbarkeit dieser Reaktion wird jedoch durch ihre Geschwindigkeit gegeben. Die Geschwindigkeitskonstante liegt etwa bei $10^{-3} M^{-1}s^{-1}$,^[4] deshalb werden sehr hohe Konzentrationen des Triphenylphosphinreagens ($> 250 \mu M$) benötigt. Auch Versuche die

Nukleophilität des Phosphoratoms und somit die Geschwindigkeit zu erhöhen, schlugen fehl, da es durch die erhöhte Nukleophilität zur Oxidation an der Luft kam.^[8, 24]

3.1.1.2 Aldehyd-/Keton-basierte Kondensation

Aldehyde und Ketone sind ein attraktiver Angriffspunkt für bioorthogonale Modifikationen, da sie zum einen sehr klein sind und zum anderen recht einfach durch biosynthetische Wege in das gewünschte Molekül eingebracht werden können.^[25-27] Im leicht sauren Milieu (pH = 5-6) bildet sich mit primären Aminen reversibel eine Schiffsche Base aus, wobei das Gleichgewicht im Falle primärer Amine auf der Seite des freien Amins liegt. Verwendet man jedoch ein durch den α -Effekt aktiviertes Amin wie ein Hydrazid oder Alkoxamin wird das Gleichgewicht zu Gunsten des Imins verschoben und es bilden sich stabile Hydrazone bzw. Oxime. Alternativ zur Reaktionsführung im leicht sauren Milieu kann auch unter Basenkatalyse mit Anilin gearbeitet werden.^[6, 28] So konnten Proteine, insbesondere auf der Zelloberfläche, erfolgreich modifiziert werden (siehe Schema 2).^[29-31]

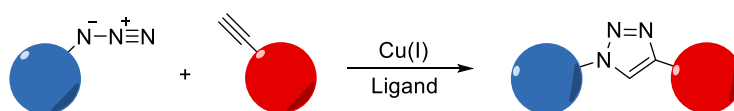


Schema 2: Mechanismus der Aldehyd-/ Keton-basierten Kondensation.^[6]

Doch auch diese Reaktion unterliegt gewissen Einschränkungen. Da im Zellinneren Carbonylfunktionen häufig anzutreffen sind, zum Beispiel in Pyruvat oder Oxalacetat, ist sie für den intrazellulären Einsatz, und damit auch für Nukleinsäuren, nicht geeignet. Außerdem liegt die erreichte Geschwindigkeitskonstante nur bei $1\text{-}10\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ^[32], weshalb auch hier hohe Konzentrationen zur Markierung benötigt werden.

3.1.1.3 Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)

Unter einer 1,3-dipolaren Cycloaddition versteht man nach *Huisgen* eine Reaktion zwischen einem 1,3-Dipol und einem Mehrfachbindungssystem, dem sogenannten Dipolarophil.^[33] Die Reaktion zwischen Azid und Alkin schien lange Zeit als ungeeignet für biologische Systeme, da sie nur bei erhöhter Temperatur und unter erhöhtem Druck effizient abläuft. Erst als 2002 *Sharpless* und *Meldal* herausfanden, dass durch Kupfer(I)-Katalyse signifikante Erhöhungen der Reaktionsgeschwindigkeiten möglich sind und außerdem eine Regioselektivität erreicht wird,^[34-35] stellte sich die Reaktion als nahezu ideal für die Markierung von Biomolekülen heraus (siehe Schema 3). Da die Reaktion alle von *Sharpless* aufgestellten Kriterien für die „Clickchemie“, wie einfache Durchführung, gute Ausbeuten und spezifische Reaktivität in hohem Maße erfüllt, wurde sie auch schlicht als die „Clickreaktion“ bekannt.^[36-37]



Schema 3: Die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Clickreaktion

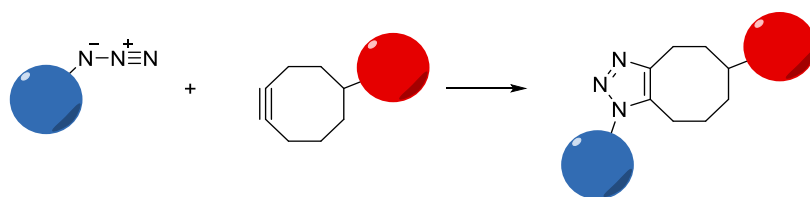
Der große Nachteil, den die kupferkatalysierte Reaktion beim Einsatz in biologischen Systemen mit sich bringt, ist jedoch die Zytotoxizität des eingesetzten Kupfers. Die toxische Wirkung auf Organismen ist zwar abhängig vom jeweils eingesetzten Kupferkomplex,^[38-40] dennoch sterben Säugerzellen bei einer Konzentration von 500 μM Cu^{I} bereits nach einer Stunde und bei höheren Konzentrationen fast sofort. Dennoch existieren einige Beispiele, bei denen die *in vivo* Modifikation mit Hilfe der CuAAC erfolgreich umgesetzt wurde.^[6, 41-43] Außerhalb der lebenden Zelle aber, stellt die CuAAC eine der etabliertesten Möglichkeiten zur Modifikation von Biomolekülen und Nukleinsäuren dar, zum Beispiel zur Erzeugung langer DNA-Stränge^[44], spinmarkierter DNA Stränge zur EPR Spektroskopie^[45], Mehrfachmodifikationen^[46] oder zur Synthese von DNA-Aptameren.^[47] Dabei muss allerdings auf die Wahl eines geeigneten Liganden für das Kupferatom geachtet werden, um DNA-Strangbrüche zu vermeiden.^[48-49] Einer der am häufigsten genutzten ist TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)) dieser stabilisiert das Cu(I)-Atom und schützt so vor Strangbrüchen^[50-51].

Die Alkinmodifikation kann dabei entweder an verschiedenen Positionen der verschiedenen DNA- bzw. RNA-Basen oder aber an der Zuckereinheit des Rückgrates erfolgen.^[46, 52-54] Auch der umgekehrte Fall, also die Azidmodifikation des DNA-Bausteins, ist möglich.^[55-58] Dabei kann der modifizierte Baustein allerdings nicht als Phosphoramidit in die Nukleinsäure eingebaut werden, da das Azid durch das verwendete Phosphor(III) bei der Synthese des Phosphoramidits reduziert würde.^[59] Aus diesem Grund wurde in den bekannten Fällen die Phosphoramiditmethode vor dem modifizierten Baustein unterbrochen und das azidmodifizierte Nucleosid zum Beispiel mit der Phosphordiestermethode angebunden.^[55-56]

Eine Möglichkeit zum Einsatz eines mit der CuAAC markierten Biomoleküls im Inneren einer Zelle wäre es, die Reaktion durchzuführen und anschließend das Biomolekül in die Zellumgebung zu bringen, wobei vorher das restliche Kupfer sorgfältig durch Komplexation entfernt werden muss. Alternativen zu dieser recht umständlichen und nicht immer zielführenden Variante sind die im Folgenden beschriebenen kupferfreien Varianten der Azid-Alkin-Cycloaddition.

3.1.1.4 Ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC)

Ließe man im Gegensatz zur kupferkatalysierten Variante in den metallfreien Reaktionen das Kupfer einfach weg, würde, wie bereits beschrieben, erst bei erhöhten Temperaturen und vergrößertem Druck das gewünschte Produkt mit guten Ausbeuten gebildet. Ziel war es also, die Aktivierungsbarriere der Reaktion zu senken. Dafür griff die Gruppe um *Bertozzi* auf eine Beobachtung von *Blomquist* und *Liu* zurück, die bereits 1953 beobachtet hatten, dass Cyclooctin mit Phenylazid „explosionsartig“ reagiert.^[60] *Bertozzi* entwickelte davon ausgehend die „strain promoted azide alkyne cycloaddition“, kurz SPAAC, die die Ringspannung des Cycloalkins von ~18 kcal/mol im Vergleich zu 4.2 kcal/mol^[61] für cis-Cycloocten ausnutzt (siehe Schema 4). Damit gelangen erste Zell-Markierungsexperimente.^[62]



Schema 4: Prinzip der ringspannungsgesteuerten Azid-Alkin Cycloaddition

Die Reaktionsführung war nun zwar kupferfrei möglich, allerdings bildete die beobachtete Geschwindigkeitskonstante keine Verbesserung im Vergleich zur Staudinger-Ligation. Um die Reaktion weiter zu beschleunigen, wurde die Struktur des Cyclooctins optimiert (siehe Abbildung 4).

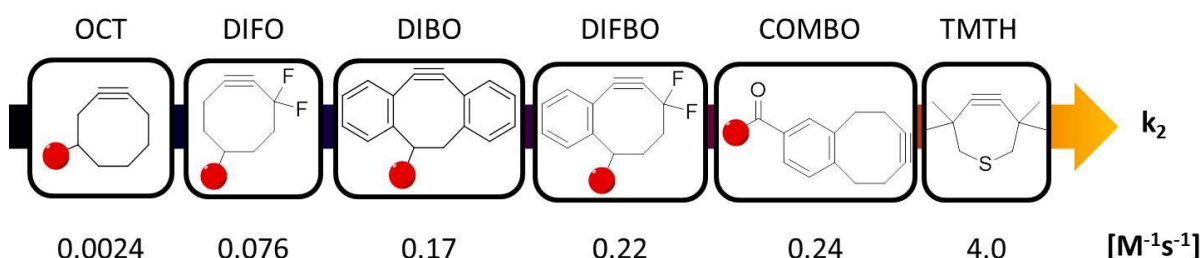


Abbildung 4: Cyclooctinderivate (*Cyclooctyne* (OCT); *difluorinated cyclooctyne* (DIFO); *dibenzocyclooctyne* (DIBO); *difluorinatedbenzocyclooctyne* (DIFBO); *carboxymethylmonobenzocyclooctyne* (COMBO); *thiacycloheptyne* (TMTH)) und ihre Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung (jeweils bestimmt in MeCN).^[8, 29, 63]

Durch die Einführung annellierter Benzolringe an das Cyclooctin wird die Bindungslänge verkürzt und die Ringspannung nochmals erhöht. Dadurch sinkt die Energiedifferenz zwischen Grund- und Übergangszustand, was zu einer Beschleunigung der Reaktion führt. Stark elektronegative Fluorsubstituenten in α -Stellung zur Alkinfunktion verringern außerdem die Elektronendichte und senken das LUMO energetisch ab, was den Angriff des Azids erleichtert. Außerdem erfolgt dadurch eine Stabilisierung des Übergangszustands.^[64] Durch geschickte Kombination dieser Faktoren war es möglich, die ursprüngliche Reaktionsgeschwindigkeit um das 100-fache zu steigern (TMTH (siehe Abbildung 4) wird hierbei ausgenommen, da das Molekül im wässrigen System nur eine begrenzte Stabilität aufweist^[65]).

Auf diese Art gelang die Modifikation von Glykoproteinen auf Zelloberflächen sowohl *in vitro* wie auch *in vivo*.^[66-68] Auch in der Nukleinsäurechemie konnten viele der vorgestellten Cyclooctinderivate zur Biokonjugation genutzt werden. Die Cyclooctinmodifikation wird dabei entweder mit dem Phosphatrückgrat oder der DNA-Base verknüpft.^[63] Durch die kovalente Verknüpfung des Cyclooctinderivats COMBO mit 2'-Desoxyuridin und anschließender Festphasen-DNA-Synthese gelang in unserem Arbeitskreis die Markierung mit verschiedenen Fluoreszenzlabels außerhalb und innerhalb der Zellumgebung (siehe Abbildung 5).^[69-70]

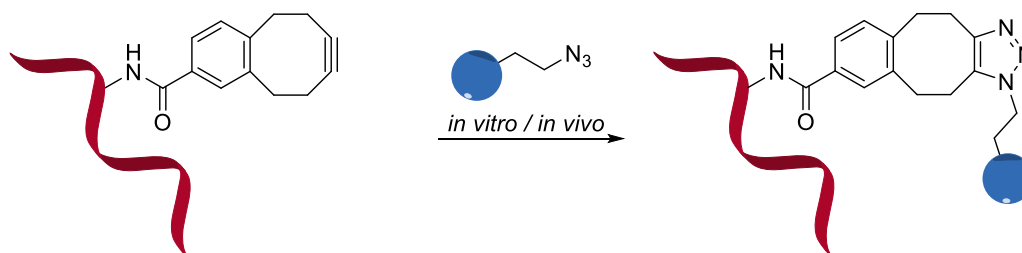
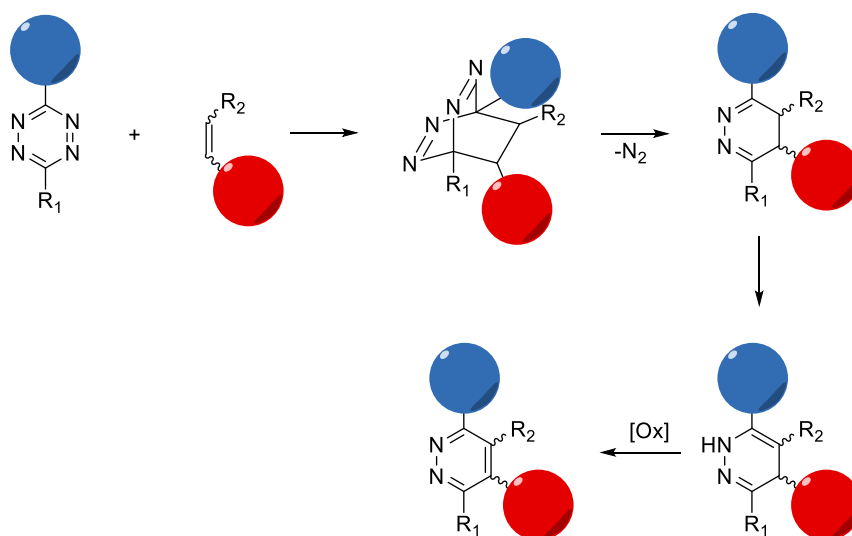


Abbildung 5: SPAAC eines COMBO-modifizierten Oligonukleotids mit einem Azid-modifizierten Farbstoff. Dies gelang *in vitro*, sowie *in vivo*, in HeLa-Zellen, die zuvor mit COMBO-modifizierter DNA transfiziert wurden.^[69-70]

Weitere Cyclooctine, basierend auf der Grundstruktur des DIBO, konnten von *Filippov et al.* in RNA und von *Brown et al.* in DNA als Basensurrogate eingebaut und erfolgreich postsynthetisch modifiziert werden.^[71-72] Auch 5'-terminale Modifikationen, basierend auf der OCT-Struktur wurden in den Gruppen von *Heaney et al.* und *Madder et al.* erfolgreich in DNA und RNA durchgeführt.^[73-74]

3.1.1.5 Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA)/ Tetrazin-Ligation

Die soeben vorgestellten Cyclooctine sind nicht nur in der Lage im Sinne einer 1,3-dipolaren Cycloaddition als Dipolarophil zu reagieren, sondern können auch als Dienophil in einer Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf eingesetzt werden (siehe Schema 5). Die Struktur des Reaktionspartners, einem 1,2,4,5-Tetrazin, muss mit Bedacht gewählt werden, um einen idealen Kompromiss aus Stabilität und Reaktivität zu finden.^[75]



Schema 5: Prinzip der Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf zwischen einem geeigneten Alken bzw. Alkin und einem 1,2,4,5-Tetrazin.

Die, abhängig vom gewählten Tetrazin und jeweiligem Reaktionspartner, enorm hohe Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (10^0 - $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) scheint diese Reaktion zur idealen, bioorthogonalen Modifikation zu machen. Dennoch sind, gerade im Bereich der Nucleinsäurechemie, nicht viele Beispiele bekannt. Der Grund dafür liegt in der Labilität der Tetrazineinheit unter den Bedingungen der DNA-Festphasensynthese und bei leicht veränderten Standardbedingungen (Basenlabilität). Daher konnte der Einbau der Tetrazineinheit bisher nur über geschickte Abänderung der Standard-Phosphoramiditmethode erfolgreich realisiert werden.^[76-77] Eine Alternative hierzu bildet der Einbau der Tetrazineinheit als Triphosphatbaustein über enzymatische Methoden. Dieser Ansatz wurde kürzlich in unserem Arbeitskreis erfolgreich realisiert.^[78] Dazu wurden die in Abbildung 6 gezeigten, tetrazinmodifizierten Triphosphate synthetisiert und über Primerverlängerungsexperimente in Oligonukleotide eingebracht. Anschließend erfolgte die

postsynthetische Modifikation durch Inkubation mit COMBO-modifizierten Rhodaminderivaten.^[78]

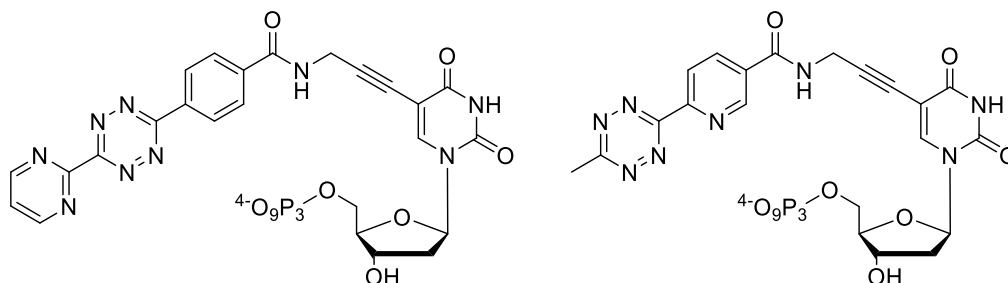


Abbildung 6: Tetrazinmodifizierte Nucleosidtriphosphate.^[78]

Um dieses Problem zu umgehen, wurde vielfach der inverse Ansatz gewählt, also die kovalente Verknüpfung eines Dienophils mit dem DNA-Baustein, die anschließende Umsetzung zum Oligonucleotid und die postsynthetische Markierung mit einem Tetrazin als Reaktionspartner.^[79-84] Neben vinyl- und norbornenmodifizierter DNA oder RNA,^[79-82] werden dabei auch cyclopropenmodifizierte Nucleinsäuren eingesetzt. Cyclopropen reagiert mit Tetrazinen, auf Grund der hohen Ringspannung, mit hohen Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $278 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und eignet sich daher optimal zur bioorthogonalen Markierung (siehe Abbildung 7).^[85]

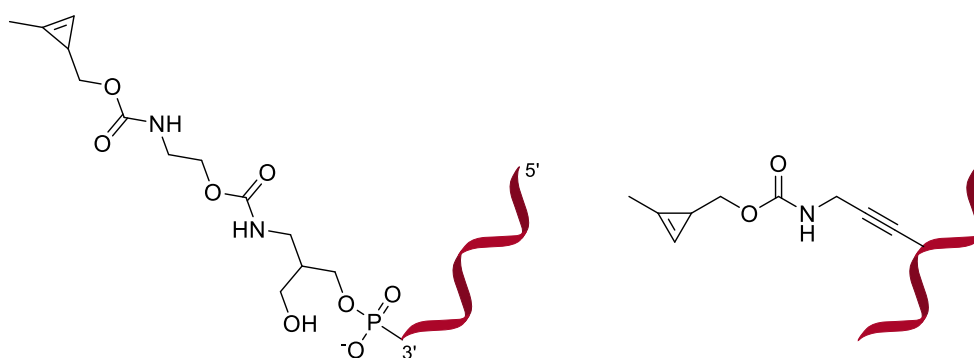
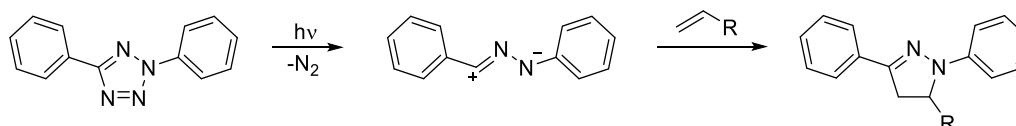


Abbildung 7: Cyclopropenmodifizierte Oligonucleotide zur postsynthetischen Modifikation mit Tetrazinkonjugaten. In der Gruppe um *Devaraj* wurde das links gezeigte Cyclopropen über einen flexiblen Linker am 3'-Ende des Oligonucleotids angebracht.^[77] Das rechts gezeigte Cyclopropen wurde von *Wagenknecht et al.* als Nucleosidtriphosphat synthetisiert und über Primerverlängerungsexperimente in Oligonucleotide eingebaut.^[78]

3.2 „Photoclickreaktion“

Ähnlich wie bei der kupferkatalysierten und der ringspannungsgesteuerten Azid-Alkin Cycloaddition waren auch im Falle der „Photoclickreaktion“ die zu Grunde liegenden Reaktionen schon längere Zeit bekannt. Bereits in den Sechzigerjahren wurde von *Huisgen et al.* über die Cycloaddition eines substituierten Nitrilimsins mit geeigneten Dipolarophilen berichtet (siehe Schema 6). Das Nitrilimin wurde entweder durch Erhitzen auf 150 °C oder Bestrahlung mit einer Quecksilberdampfampe aus einem Diphenyltetrazol dargestellt.^[86] Beide Wege der Reaktionsführung, große Hitze oder harte UV-Strahlung, führten dazu, dass die Reaktion für den Einsatz in Biomolekülen zunächst nicht in Frage kam.



Schema 6: Prinzip der lichtinduzierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Diphenyltetrazol und einem olefinischen Dipolarophil. Bei Belichtung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge durchläuft das Tetrazol eine Cycloreversion und molekularer Stickstoff wird freigesetzt. Das gebildete Nitrilimin kann anschließend in einer Cycloaddition an geeignete Dipolarophile addieren und bildet dabei das 5-substituierte Pyrazolin.

Zwischenzeitlich wurde die Reaktion kaum genutzt. Erst als die Gruppe um *Lin* 2007 eine Pyrazolinsynthese, basierend auf der Cycloaddition eines methoxysubstituierten Diaryltetrazols, das bei 302 nm bestrahlt wurde, vorschlug, schien eine Anwendung an Biomolekülen möglich.^[87] Den entscheidenden Schritt machte *Lin* 2008, als er eine Reihe von Diaryltetrazolen vorstellte, die, je nach Substituent, bei Wellenlängen von 254-336 nm angeregt werden konnten.^[88] Es zeigte sich, dass elektronenschiebende oder konjugierte *para*-Substituenten am *N*-Phenylring das Absorptionsmaximum bathochrom verschieben, während die Substitution in *ortho*-Position eine hypsochrome Verschiebung bewirkt. Dies liegt daran, dass bei *para*-Substitution alle aromatischen Ringe in einer Ebene liegen, wodurch eine optimale Delokalisation der Elektronen möglich ist. Durch die verstärkte Delokalisation bewegen sich die Grenzorbitale aufeinander zu und die zur Anregung benötigte Energie wird kleiner. Noch größere bathochrome Verschiebungen können erreicht

werden, wenn die Verschiebung der Elektronendichte durch Einbindung in ein *push-pull*-System erzwungen wird.^[88] In der Zwischenzeit wurden weitere Struktur motive untersucht, die ein Absorptionsmaximum über 360 nm, 390 nm bis hin zu 700 nm über einen 2-Photonenanregungspfad mit Hilfe eines gepulsten Femto-Sekunden Lasers, aufweisen (siehe Abbildung 8).^[89-92] Eine weitere Möglichkeit die „Photoclickreaktion“ mit Licht im nahen IR-Bereich zu induzieren, ist die Verwendung sogenannter *Upconversion Nanoparticles*. Diese bestehen aus einer kristallinen Trägermatrix (z.B. NaYF₄, LaF₃), die mit Lanthaniden (z.B. Yb³⁺) zur Sensitivierung (*sensitizer*) und sogenannten Aktivatoren (z.B. Er³⁺) dotiert ist. Bei Bestrahlung mit Licht aus dem nahen IR-Bereich wird dieses von den *sensitizer* Ionen absorbiert und auf die Aktivatoren übertragen. Diese wiederum emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Dieses kann dann für die Anregung eines Tetrazols genutzt werden. So gelang es der Gruppe um *Barner-Kowollik*, durch Anregung von *Upconversion Nanoparticles* mit Licht einer Wellenlänge von 974 nm ein pyrenmodifiziertes Tetrazol anzuregen und zur Reaktion mit verschiedenen Dipolarophilen zu bringen.^[93]

Somit lässt sich die Reaktion außerhalb der für Proteine und Nukleinsäuren typischen Absorption von 260-280 nm starten.

Da die Anregungswellenlänge nun keine entscheidende Rolle mehr spielte, kamen die Vorteile einer lichtinduzierten Reaktion im Allgemeinen und der „Photoclickreaktion“ im Speziellen zum Tragen. Der Reaktionsstart durch Lichteinstrahlung bietet den Vorteil, dass sowohl Zeitpunkt wie auch Ort der Reaktion nahezu beliebig genau bestimmt werden können. Beide Reaktanden können dazu vorher gemischt werden ohne dass eine Reaktion eintritt. Die „Photoclickreaktion“ bietet darüber hinaus den Vorteil hoher Ausbeuten, hoher Regioselektivität und einer Beschleunigung der Reaktion im wässrigen Medium.^[87, 94] Da als Dipolarophil grundsätzlich alle elektronenarmen Alkene in Frage kommen,^[87-88, 95] konnte die Bandbreite der Reaktion in verschiedensten *in vitro* und *in vivo* Experimenten getestet werden.

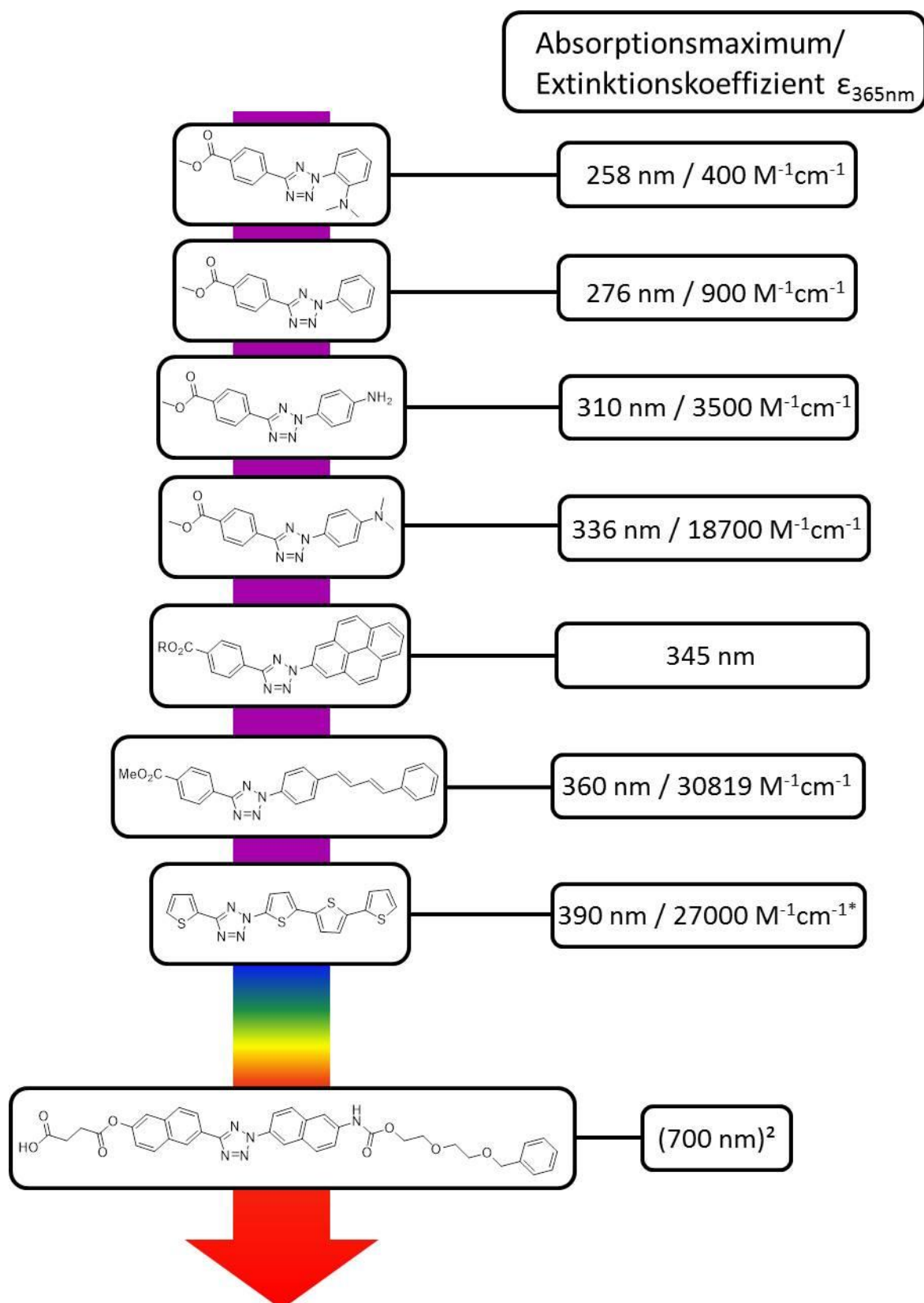


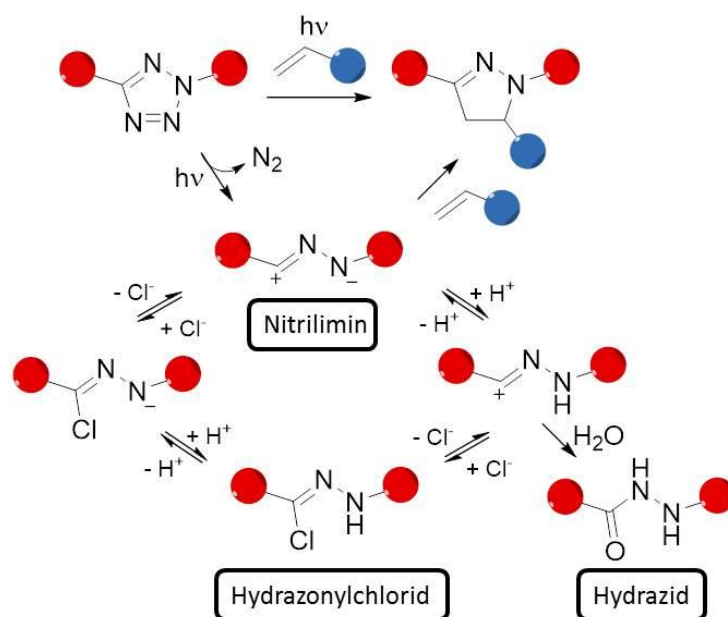
Abbildung 8: Auswahl unterschiedlich substituierter Diaryltetrazole und ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima sowie Extinktionskoeffizienten. Die Anregung bei 700 nm erfolgt über einen Zwei-Photonen-Prozess.^[88-91]

*) Hier wurde ϵ_{max} angegeben

Grundsätzlich ist es möglich, entweder das Tetrazol oder aber die Alkeneinheit kovalent am Biomolekül zu verankern. Beide Möglichkeiten wurden in der Gruppe von *Lin* untersucht. So wurde zum Beispiel eine cyclopropenonmodifizierte Aminosäure in ein Protein eingebracht und anschließend, durch Bestrahlung bei 302 nm mit einem Diaryltetrazol zur Reaktion gebracht.^[96] Analoge Experimente gelangen auch in menschlichen Zellen.^[96] Der umgekehrte Fall bietet nicht nur die Möglichkeit der Modifikation mit einem extern eingebrachten Dipolarophil, sondern kann, bei entsprechendem Molekülaufbau, auch intramolekular erfolgen. Dabei wird die intrinsische Steigerung der Fluoreszenz des Pyrazolins im Vergleich zum Tetrazol ausgenutzt.^[97] Der kovalente Einbau der Tetrazoleinheit in Proteine wurde zwar erfolgreich realisiert, jedoch immer erst in einem auf die Protein (Bio- oder Voll-) Synthese folgenden Schritt.^[94, 98] Dies belegt zwar die Funktion, ist aber, eine mögliche Anwendung betreffend, nicht sehr zielführend.

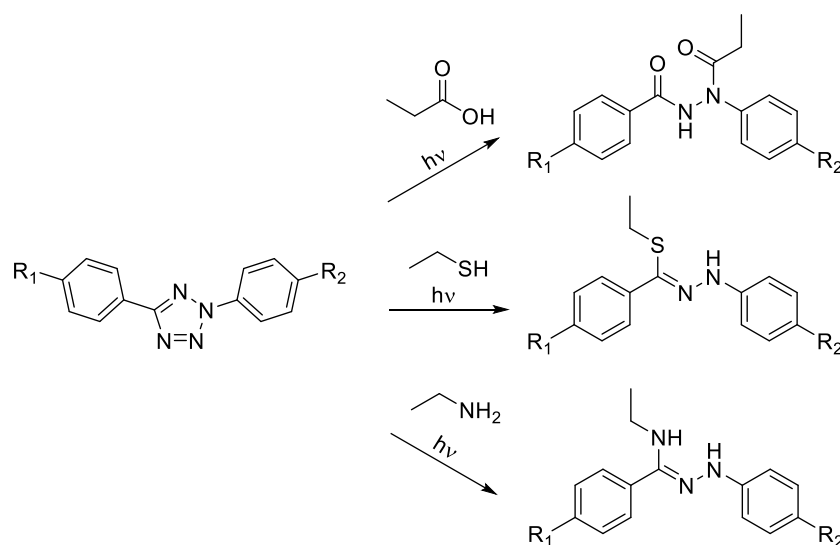
Im Feld der Nukleinsäurechemie ist außer der vorliegenden Arbeit nur ein weiteres Experiment aus der Gruppe von *Rentmeister* bekannt, bei dem allerdings ein alkenmodifiziertes 5'-Ende eines RNA-Stranges mit einem Tetrazol nach Anregung bei 254 nm verknüpft wurde.^[79]

Betrachtet man die „Photoclickreaktion“ unter denen für eine bioorthogonale Reaktion genannten Kriterien, so erfüllt sie diese fast lückenlos. Weder werden toxische Edukte genutzt, noch entstehen toxische Produkte. Die Reaktion ist in Wasser durchführbar und weist hohe Geschwindigkeitskonstanten von $5\text{-}58\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf.^[95-96] Werden spezielle, gespannte Spiropropene als Dipolarophil genutzt, so kann eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von mehr als $10'000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gemessen werden.^[99] Der einzige Punkt, bei dem durch weitere Nachforschungen klarere Verhältnisse geschaffen werden müssen, ist das Kriterium der Chemoselektivität und, damit einhergehend, der Ausbeute. Betrachtet man die Reaktion *in vitro*, so werden bei geeigneter Wahl von Reaktionspartner und Lösungsmittel quantitative Ausbeuten erzielt.^[87] Verändert man die Bedingungen jedoch nur dahingehend, dass statt Wasser eine Pufferlösung eingesetzt wird, so entstehen weitere mögliche Reaktionspfade, die 2014 von *Lin* beschrieben wurden (siehe Schema 7).^[89]



Schema 7: Mögliche Reaktionspfade des Nitrilimins in chloridhaltiger Pufferlösung.^[89] Eine weitere Möglichkeit ist die Dimerisation des Nitrilimins.^[95]

Geht man noch einen nächsten Schritt weiter und setzt das Nitrilimin der Zellumgebung aus, stellt man fest, dass neben dem gewünschten Alken als Dipolarophil auch andere Nucleophile zur Reaktion mit dem Nitrilimin befähigt sein können.^[100-101] So können zum Beispiel auch Thiole, Amine und Carbonsäuren, unter den gleichen Bedingungen, mit dem durch Photolyse generierten Nitrilimin reagieren. Die Reaktion mit Carbonsäuren läuft dabei, wie *Levkin et al.* zeigen konnten, bei gleichen stöchiometrischen Verhältnissen, je nach verwendetem Lösungsmittel, sogar bevorzugt ab.^[100]

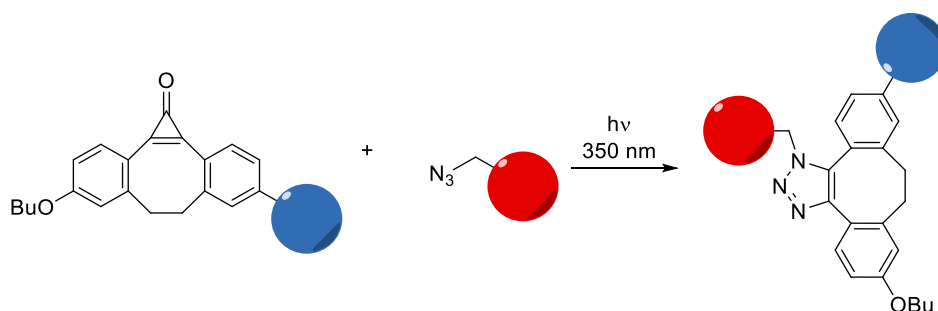


Schema 8: Reaktionen eines belichteten Diaryltetrazols mit verschiedenen Nucleophilen.^[100, 102-103]

3.2.1 Weitere bioorthogonale, lichtinduzierte Reaktionen

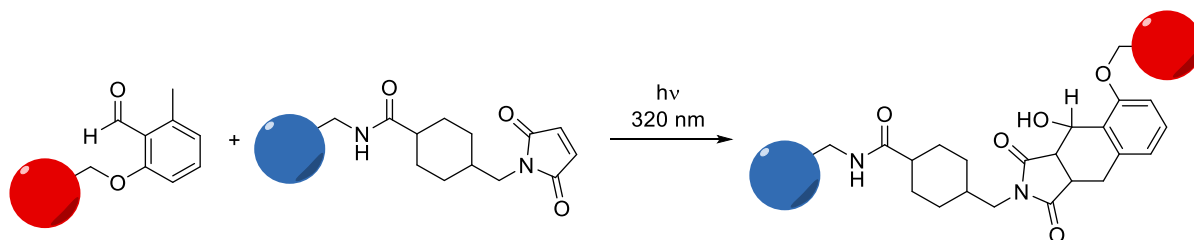
Die Vorteile, die sich daraus ergeben, dass die reaktive Spezies *in situ* durch Licht generiert wird, werden nicht nur von der „Photoclickreaktion“ ausgenutzt. Durch die Kombination der klassischen Vorteile einer thermisch geführten „Clickreaktion“ mit den Vorteilen eines photochemischen Prozesses, also der extrem hohen zeitlichen wie räumlichen Auflösung, der genau definierbaren Reaktionszeit und Variation der Lichtintensität, können chemische Synthesen, bioorthogonale Modifikationen oder aber genau zugeschnittene Materiale effektiv umgesetzt werden.^[104]

Ein zielgerichteter Ansatz ist es, die bereits bestehenden bioorthogonalen Reaktionen so zu variieren, dass ein lichtgesteuerter Start der Reaktion möglich ist. Auf diese Weise gelang es *Popik et al.* das Cycloalkin der ringspannungsgesteuerten Azid-Alkin Clickreaktion als Cyclopropenon zu maskieren und nach Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 350 nm wieder freizusetzen (siehe Schema 9). Das daraufhin entstandene Alkin kann anschließend mit einem Azid reagieren. So waren sowohl eine Funktionalisierung von Oberflächen wie auch die Markierung auf lebenden Zellen möglich.^[105-106]



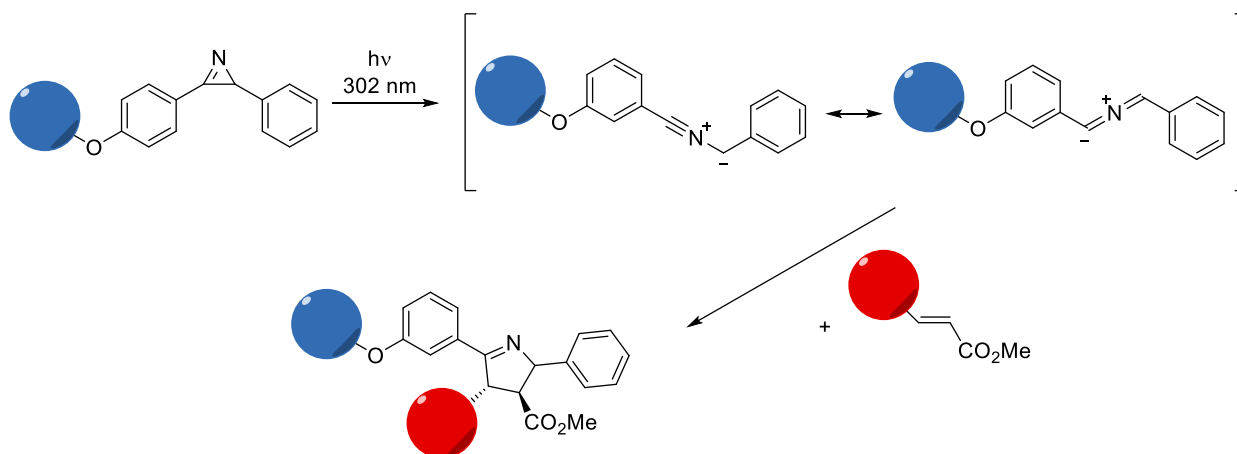
Schema 9: Lichtinduzierte Variante einer SPAAC. Das Cyclopropenon-maskierte Alkin wird durch Bestrahlung angeregt, CO wird freigesetzt und das freigewordene Alkin kann im Sinne einer 1,3-dipolaren Cycloaddition reagieren.

Auf ähnliche Art kann auch die Diels-Alder-Reaktion so modifiziert werden, dass, durch Licht gestartet, die Verknüpfung eines Proteins mit einer Nukleinsäure gelingt.^[107] Dies realisierte die Gruppe um *Fruk*, indem ein speziell entworfenes Photo-Enol, das bei Bestrahlung mit hohen Ausbeuten zu einem hochreaktiven *ortho*-Xylylen-Intermediat reagiert, eingesetzt wurde (siehe Schema 10).^[108-109]



Schema 10: Lichtinduzierte Variante der Diels-Alder Reaktion. Ein *caged diene* wird durch Bestrahlung mit Licht angeregt. Auf eine intramolekulare H-Abstraktion folgt eine Reorganisation der Bindungen und ein *ortho*-Xylylen-Intermediat entsteht. Dieses kann mit Dienophilen entsprechend einer [4+2] Cycloaddition weiterreagieren.

Neben der „Photoclickreaktion“ zwischen Nitrilimin und Dipolarophil arbeitete die Gruppe von *Lin* noch an einer weiteren lichtinduzierten 1,3-dipolaren Cycloaddition.^[110] 2H-Diarylazirine erfahren bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge eine Ringöffnung, wobei ein Nitrilylid entsteht. Dieses kann wiederum mit Dipolarophilen zu einem Pyrrolin weiterreagieren (siehe Schema 11).^[111] Damit gelang die schnelle Markierung eines Azirinmarkierten Lysozyms mit Dimethylfumarat bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert mit einer Ausbeute von 41 %.^[110]



Schema 11: Lichtinduzierte Azirin-Ligation. Durch Ringöffnung eines 2H-Azirins wird ein Nitrilylid generiert, das mit einer großen Auswahl an Alken-Dipolarophilen weiterreagieren kann und dabei ein Δ^1 -Pyrrolin bildet.

Durch Modifikation von Pyren mit einer Azirineinheit gelang es in der Gruppe von *Barner-Kowolik* die Reaktion mit einer LED einer maximalen Emissionswellenlänge von 410 nm zu starten. So ließen sich schnell und effizient verschiedene elektronenarme Olefine zur organischen Synthese und zur Ligation von Polymeren nutzen.^[112]

4 Lichtinduzierte, bioorthogonale Modifikation von tetrazolmodifizierten Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren schnell und einfach postsynthetisch zu modifizieren zu können, sollte ein entsprechend aufgebautes Diaryltetrazol in DNA eingebaut werden, um anschließend mit der „Photoclickreaktion“ markiert zu werden.

Bei der Wahl des geeigneten Diaryltetrazols musste bedacht werden, dass die Absorption des entsprechenden Nukleosids außerhalb des für DNA typischen Absorptionsbereichs liegen sollte. Dies dient dazu, einerseits eine effektive Anregung zu gewährleisten, andererseits aber auch um photoinduzierte DNA-Schäden zu vermeiden.^[113-115] Deshalb fiel die Wahl auf ein am *N*-Phenylring *para*-dimethylamino- und am *C*-Phenylring carboxymethylmodifiziertes Diaryltetrazol **1** (siehe Abbildung 9). Dieses hat ein Absorptionsmaximum bei 336 nm^[88] und im Nukleosid bei 338 nm^[37] und sollte daher, auch in die Oligonukleotidkette eingebettet, unabhängig der DNA anzuregen sein (siehe Abbildung 10). Um das Diaryltetrazol **1** an der DNA-Base zu verankern, wurde 2'-Desoxyuridin als Ausgangspunkt gewählt, weil dieses, abgesehen von günstiger Verfügbarkeit und bekannter Reaktivität, über keine weiteren funktionellen Gruppen verfügt, die für eine Festphasensynthese geschützt werden müssten.

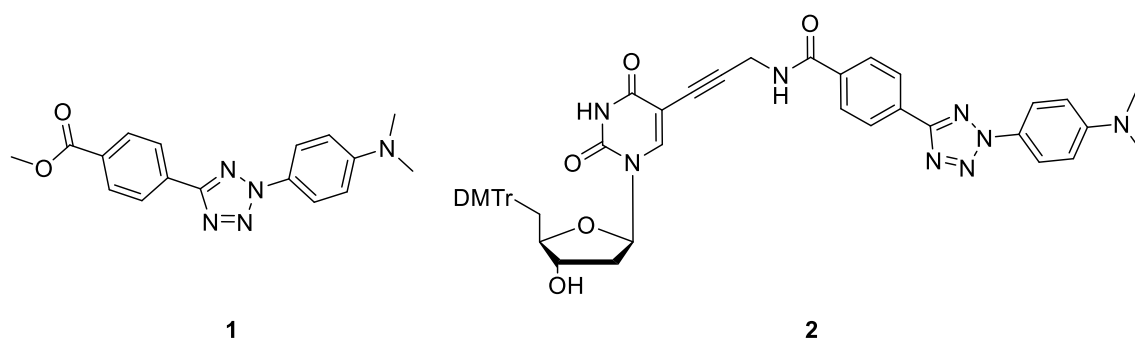


Abbildung 9: Struktur des gewählten Diaryltetrazols **1** (links) und des zu synthetisierenden Nukleosids **2** für die Oligonukleotidfestphasensynthese (rechts).

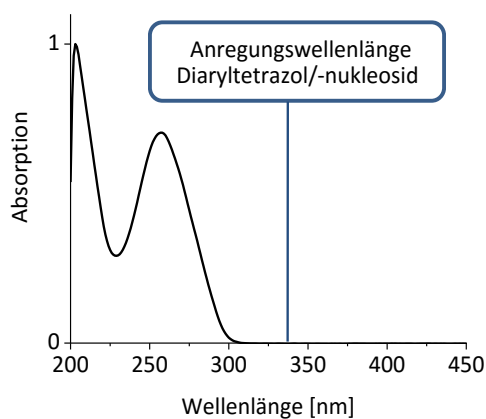


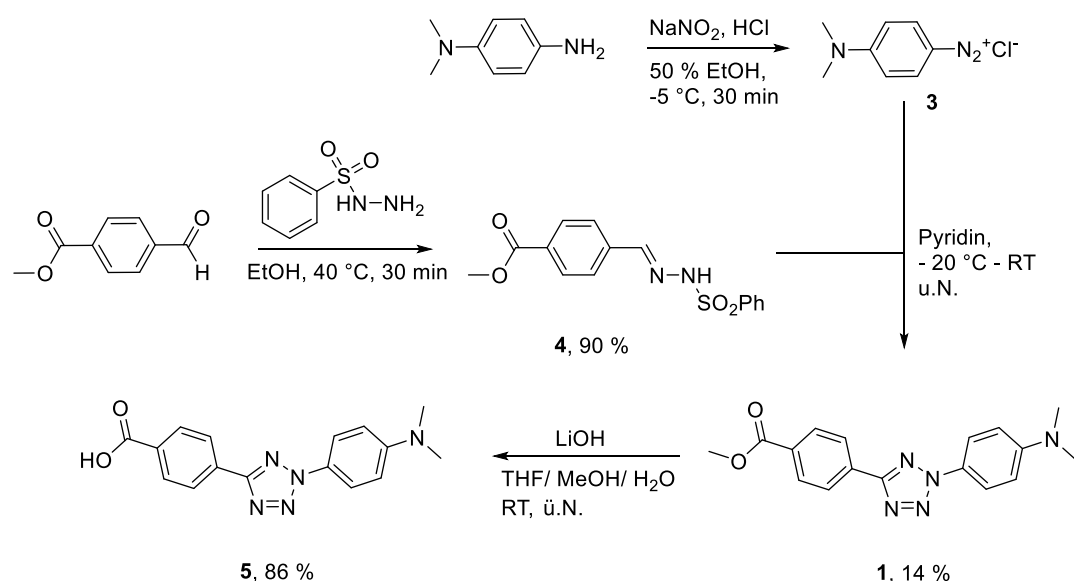
Abbildung 10: UV-vis Absorptionsspektrum von unmodifizierter DNA. Markiert ist die Absorptionswellenlänge des Diaryltetrazols.

Im nächsten Schritt sollte das Nucleosid über die automatisierte Festphasensynthese in einen DNA-Strang eingebaut werden. Das aufgereinigte und vollständig charakterisierte Oligonucleotid sollte im Folgenden dann mit verschiedenen elektronenarmen Olefinen belichtet und Verlauf sowie Ergebnisse der „Photoclickreaktion“ beobachtet werden.

Eines der wichtigsten Kriterien einer bioorthogonalen Reaktion ist die hohe Geschwindigkeitskonstante, daher sollte auch diese im Oligonucleotid bestimmt werden.

4.1 Synthese des Diaryltetrazolnucleosidbausteins

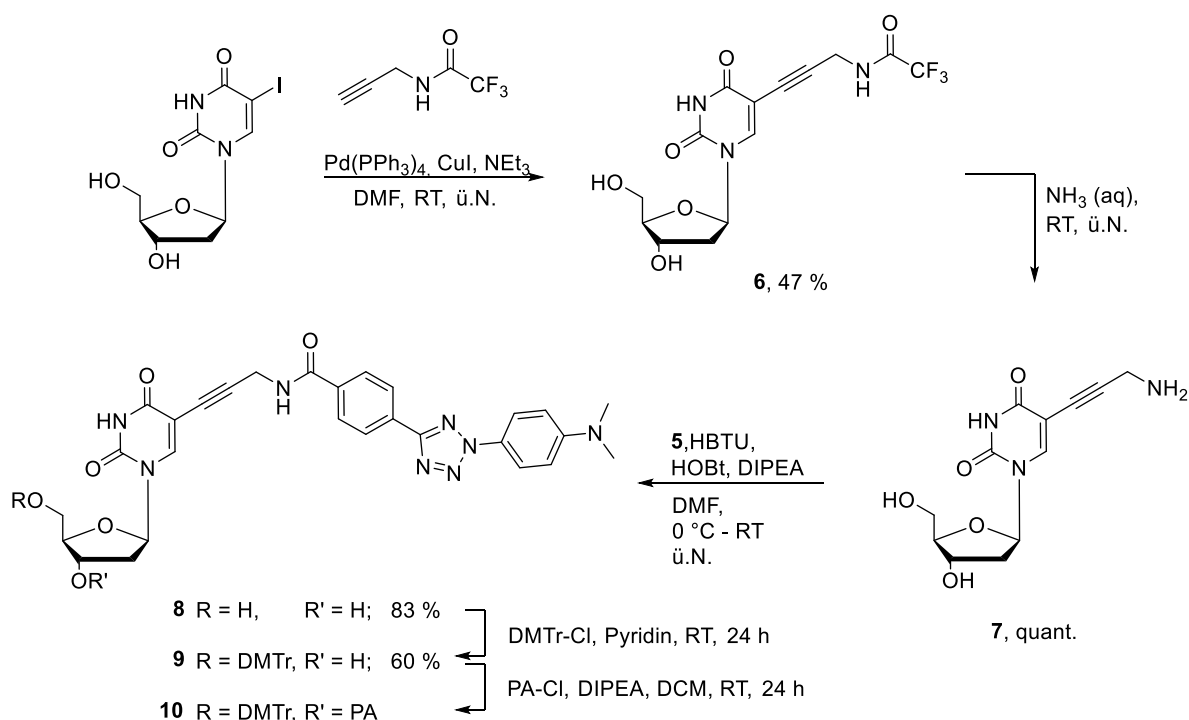
Zur Synthese des Diaryltetrazol-Nucleosids wurden zunächst das säuregruppenmodifizierte Diaryltetrazol **5** und das aminmodifizierte Uridinderivat **7** synthetisiert.



Schema 12: Synthese des Diaryltetrazolbausteins.

Die Synthese des Diaryltetrazols **5** gelang in drei konsekutiven Stufen mit einer Gesamtausbeute von 11 %. Dazu wurde zunächst kommerziell erhältliches Methyl-4-formylbenzoat in Ethanol gelöst und bei 40°C mit Benzylsulfonylhydrazid, das in der gerade notwendigen Menge EtOH gelöst wurde, versetzt und für 30 min bei 40°C gerührt. Dabei fiel nach wenigen Sekunden ein leicht gelblicher Feststoff aus, der nach Beendigung der Reaktion abgesaugt, mit kaltem EtOH gewaschen und getrocknet wurde. Dabei wurden 90 % des Produktes **4** erhalten. Anschließend erfolgte die Synthese des Tetrazol-Heterozyklus **1** basierend auf einer Vorschrift von *Kakehi et al.*^[116-117] Dieser Syntheseschritt und alle auf ihn Folgenden wurden so gut wie möglich unter Lichtausschluss durchgeführt. Um dies bestmöglich umzusetzen, wurden Reaktionsgefäße, Chromatographiesäulen und Reagenzgläser, sowie der Rotationsverdampfer mit Aluminiumfolie abgedeckt. Zur Tetrazolsynthese wurde zunächst *para*-Dimethylaminoanilin mit NaNO_2 und HCl in einem 50 %igen Ethanol/Wasser Gemisch bei -5°C zum Diazoniumsalz **3** umgesetzt und dieses

anschließend zu einer auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung von **4** in Pyridin über einen Zeitraum von 30 min hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde weitere 4 h bei tiefer Temperatur und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem durch Aufarbeitung mit verdünnter Essigsäure das verwendete Pyridin aus der Mischung entfernt wurde, wurde das Rohprodukt getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt. Dabei wurde **1** in einer Ausbeute von maximal 14 % erhalten. Der Grund für diese vergleichsweise niedrige Ausbeute liegt in der Art der Substitution des Diazoniumsalzes **3**. Durch den Dimethylaminosubstituenten wird Elektronendichte über den Ring zum terminalen Stickstoff verschoben. Dadurch wird der nukleophile Angriff des Sulfonylhydrazons erschwert. Zum Schluss erfolgt noch die basische Verseifung des Methylesters in einem Lösungsmittelgemisch aus THF, MeOH und Wasser im Verhältnis 3:1:1 mit einer Ausbeute von 86 %. Durch den Einsatz dieses Lösungsmittelgemisches wird die Aufarbeitung vereinfacht; entfernt man, nachdem der pH-Wert auf 1 eingestellt wurde, die organischen Komponenten, so fällt das Produkt **5** aus und kann abgesaugt werden.



Schema 13: Synthese des aminopropargyllinkermodifizierten 2'-Desoxyuridins.

Zur Synthese des 2'-Desoxyuridins mit Aminopropargyllinker in 5-Position **7** wurde zunächst Propargylamin mit Trifluoressigsäureethylester in Ethanol geschützt. Anschließend wurde 5-Iodo-2'-desoxyuridin in einer Sonogashira-Kreuzkupplung mit dem Alkin umgesetzt. Dazu wurden in einem ausgeheizten Kolben das Nukleosid, die Alkinkomponente, Triethylamin und Kupfer(I)iodid in absolutem DMF gelöst und die Lösung unter Rühren für 15 min mit Argon durchströmt. Nach Zugabe des Palladium-Katalysators wurde die Reaktion durch Rühren über Nacht vervollständigt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt **6** als brauner Schaum in einer Ausbeute von 47 % erhalten werden. Nachdem im nächsten Schritt durch Rühren in wässriger, ammoniakalischer Lösung die Aminschutzgruppe quantitativ entfernt wurde, konnte die Verknüpfung von **7** mit dem Diaryltetrazol erfolgen. Der stark hygroskopische Zucker **7** wurde über Nacht in einem ausgeheizten Kolben im Vakuum getrocknet. In einem zweiten Kolben wurde das Diaryltetrazol **5**, zusammen mit den entsprechenden Mengen 2-(1H-Benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat (HBTU) und 1 Hydroxybenzotriazol (HOBt) ebenfalls über Nacht vorgetrocknet. Diese Mischung wurde schließlich in DMF gelöst, DIPEA wurde hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Erst jetzt erfolgte die Zugabe des ebenfalls in DMF gelösten Zuckers **7**. Durch den zusätzlichen Einsatz von HOBt und das intensive Trocknen vor der Reaktion konnte die Ausbeute des Produkts **8** von 25 % auf 83 % gesteigert werden. Damit der Baustein über die automatisierte Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode in ein Oligonukleotid eingebaut werden konnte, musste zunächst noch die 5'-OH-Gruppe geschützt sowie die 3'-OH-Gruppe in ein reaktives Phosphoramidit umgewandelt werden. Dazu wurde zunächst mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid in Pyridin für 24 h gerührt. Das so in 60 % Ausbeute erhaltene Produkt **9** wurde unter Argon mit DIPEA und danach mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (PA-Cl) versetzt. Nach dem Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt **10** im Hochvakuum getrocknet.

4.2 Festphasensynthese und Charakterisierung des Oligonukleotids

Der wie zuvor beschrieben synthetisierte Phosphoramiditbaustein wurde zu einer 0.1 M Lösung in absolutem Dichlormethan aufgenommen. Der Kupplungsschritt wurde im Vergleich zu den nicht-artifiziellen DNA-Basen um das 15-fache von 40 s auf 600 s erhöht, die zur Reaktion über die feste Phase gepumpte Menge an Phosphoramiditlösung wurde verdoppelt (siehe 6.3).

Auf diese Art konnte der folgende, 17 Nukleotide lange DNA-Strang synthetisiert werden.

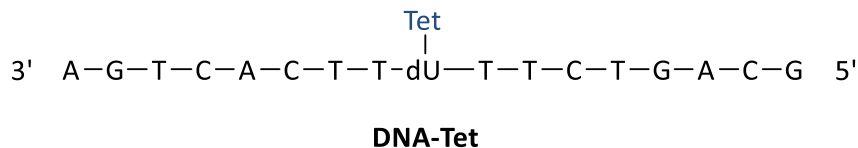


Abbildung 11: Über die automatisierte Festphasensynthese hergestellter DNA-Strang **DNA-Tet**.

Nach Abtrennung von Abbruchsträngen wurde der Erfolg der Synthese durch MALDI-Massenspektrometrie bestätigt. Dabei wurden neben der vollen Molekülmasse auch die Fragmentierungsprodukte **11** und **12** beobachtet, welche durch die Laserbestrahlung während der Messung entstehen (siehe Tabelle 1, Abbildung 12).

Tabelle 1: Berechnete und gemessene Massen des Oligonukleotids **DNA-Tet** und seiner Fragmentierungsprodukte **11** und **12**.

Oligonukleotid	Berechnete Masse [Da]	Gefundene Masse [Da]
DNA-Tet	5479	5482
DNA-Tet / -N ₂ (11)	5451	5455
DNA-Tet / -C ₈ H ₁₀ N ₄ (12)	5317	5321

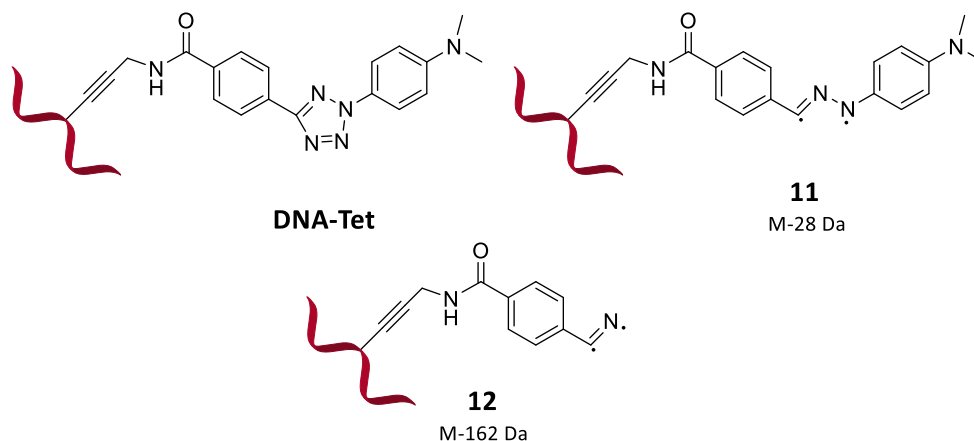


Abbildung 12: Fragmentierungsprodukte des Diaryltetrazols bei Laserbestrahlung im Rahmen von MALDI-Massenspektrometrie.

Anschließend wurde der Schmelzpunkt des Doppelstranges aus **DNA-Tet** und dessen komplementären Gegenstrang bestimmt. Dieser liegt mit 55.2 °C nur um 0.1 K niedriger als der des unmodifizierten Doppelstranges. Dies zeigt, dass die Stabilität der doppelhelikalen Struktur nur unwesentlich durch die Modifikation beeinträchtigt wird.

Zur Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften wurden Absorptions- sowie Fluoreszenzspektren von Einzel- sowie Doppelstrang aufgenommen (siehe Abbildung 13).

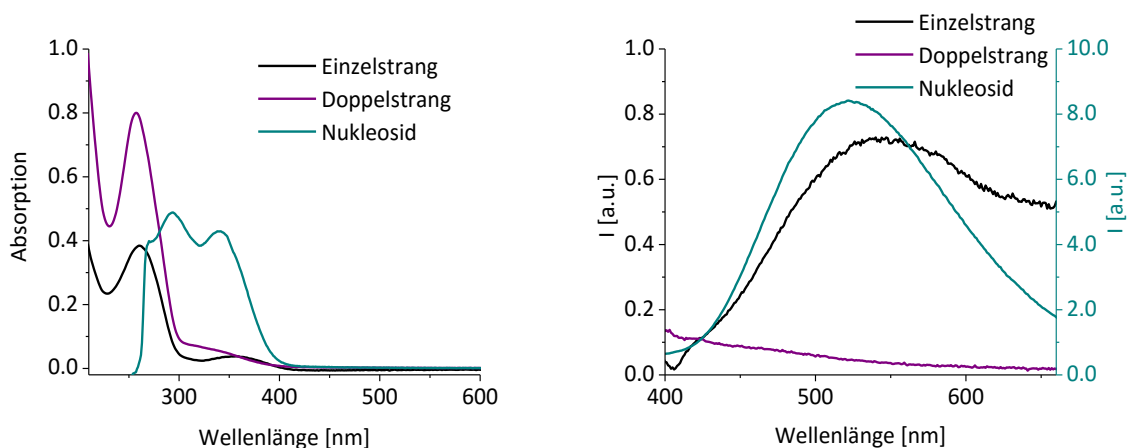


Abbildung 13: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **DNA-Tet** im Einzel- und Doppelstrang und im Tetrazol-Nukleosid (Konzentration 20.82 μM in DMF). Gemessen wurden jeweils Lösungen von 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i Puffer mit 250 mM NaCl bei 20 °C. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei $\lambda = 357$ nm mit einer Spaltweite von 7 nm. Im Fluoreszenzspektrum (rechts) ist auf der linken Y-Achse die Fluoreszenz der DNA im Einzel- sowie Doppelstrang und auf der rechten Achse die Fluoreszenz des Tetrazol-Nukleosides abzulesen.

Neben der Eigenabsorption der DNA ist deutlich das Maximum der Tetrazolabsorption zu sehen, welches sich im Vergleich zum Monomer von 338 nm um 18 nm auf 356 nm bathochrom verschoben hat. Im Doppelstrang verbreitert sich die Absorption des Tetrazols, auf Grund der Wechselwirkungen in der veränderten Umgebung, in einer Schulter in Richtung der DNA-Bande. Dies zeigt, dass eine Anregung des Tetrazols deutlich außerhalb der Eigenabsorption bis hin zu etwa 400 nm möglich sein sollte. Die Fluoreszenz des Einzelstranges ist, im Vergleich mit dem Monomer,^[37] etwa um die Hälfte niedriger und das breite Maximum ist um 22 nm bathochrom auf 544 nm verschoben. Im Doppelstrang zeigt sich, dass die Fluoreszenz nahezu vollständig gelöscht wird. Dies ist wahrscheinlich auf eine Interkalation oder anderweitige Wechselwirkung des Chromophors mit dem DNA-Duplex zurückzuführen, wodurch andere, strahlungslose Übergänge bevorzugt ablaufen.

4.3 Durchführung und Ergebnisse der „Photoclickreaktion“

Im nächsten Schritt sollte nun der hergestellte DNA-Strang in einer „Photoclickreaktion“ mit einem Olefin umgesetzt werden. Dazu musste zunächst einmal ein passendes Olefin gewählt werden und anschließend die geeigneten Reaktionsbedingungen gefunden und optimiert werden.

Als Reaktionspartner für die tetrazolmodifizierte DNA sind allgemein alle elektronenarmen Olefine geeignet.^[87] Die Wahl fiel auf *N*-substituiertes Maleimid, da dieses durch die beiden Carbonylgruppen eine positive Polarisierung der Doppelbindung erfährt und andererseits durch Modifikationen am Stickstoffatom sehr variable Markierungen möglich sind.

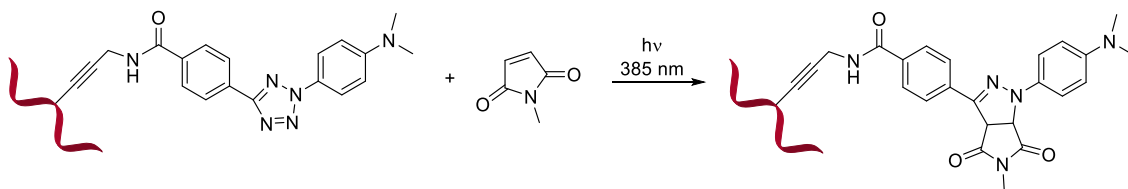


Abbildung 14: „Photoclickreaktion“ von DNA-Tet mit NMM

Die ersten Versuche zur Markierung des Oligonukleotids wurden mit dem kleinsten Vertreter der *N*-substituierten Maleimide, dem *N*-Methylmaleimid (NMM) durchgeführt (siehe Abbildung 14). Dabei stellte die unterschiedliche Löslichkeit der beiden Reaktionspartner ein erstes Problem dar. Um dieses zu umgehen, wurde die Belichtung in einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser:Acetonitril 13:2, bei 2.5 μ M DNA und 12.5 μ M NMM (5 Äquivalente), durchgeführt. Belichtet wurde für verschiedene Zeitintervalle mit einer LED einer Wellenlänge von 386 nm bei 20 °C.

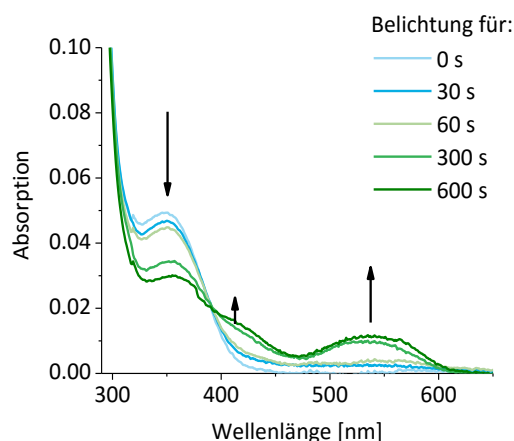


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Absorption der „Photoclickreaktion“ DNA-Tet/NMM.

Bei Betrachtung der Absorptionsspektren, die nach verschiedenen Belichtungsintervallen aufgenommen wurden, ist deutlich zu sehen, dass die Tetrazolabsorption bei 350 nm schwächer wird, und zwei neue Banden, eine bei etwa 411 nm und eine bei 537 nm entstehen (siehe Abbildung 15). Dies belegt eine Umsetzung des Tetrazols. Eine massenspektrometrische Analyse der belichteten Reaktionsmischung zeigte jedoch, dass nicht das erwartete NMM-Addukt, sondern das Hydrazon, also das Additionsprodukt einer Reaktion mit Wasser, entstanden war. Da die Bildung von Nebenprodukten aus Tetrazol und Wasser bzw. chloridhaltigen Lösungen zum damaligen Zeitpunkt noch nicht bekannt war,^[89] konnte das Nebenprodukt erst im Nachhinein als Hydrazon identifiziert werden. Dies gilt auch für alle folgenden „Photoclick“-Experimente.

Tabelle 2: Mögliche Reaktionsprodukte der „Photoclickreaktion“ DNA-Tet/NMM.

Reaktionsprodukt	Struktur	Berechnete Masse	Gefundene Masse
DNA-Tet-NMM		5562 Da	-
DNA-Tet-Hydrazon		5469 Da	5472 Da

Fasst man die Erfahrungen aus den oben beschriebenen Versuchen zusammen, so ergeben sich folgende Anforderungen an das Olefin: Gute Löslichkeit in Wasser, einfache Detektion über die Absorption, gute Ionisierbarkeit in der MALDI-Massenspektrometrie und eine Absorption außerhalb derer des Tetrazols und des entstehenden Pyrazolins. All diese Bedingungen werden von dem kommerziell erhältlichen sulfonylmodifizierten Cyanine3 Farbstoff (siehe Abbildung 16) erfüllt. Der Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes als Markierungsreagens ist auch im Hinblick auf eine spätere Anwendung in der Zellbildgebung sehr sinnvoll. Das konjugierte System des Fluorophors ist über einen Alkyllinker mit dem Stickstoffatom eines Maleimids verbunden (Abbildung 16).

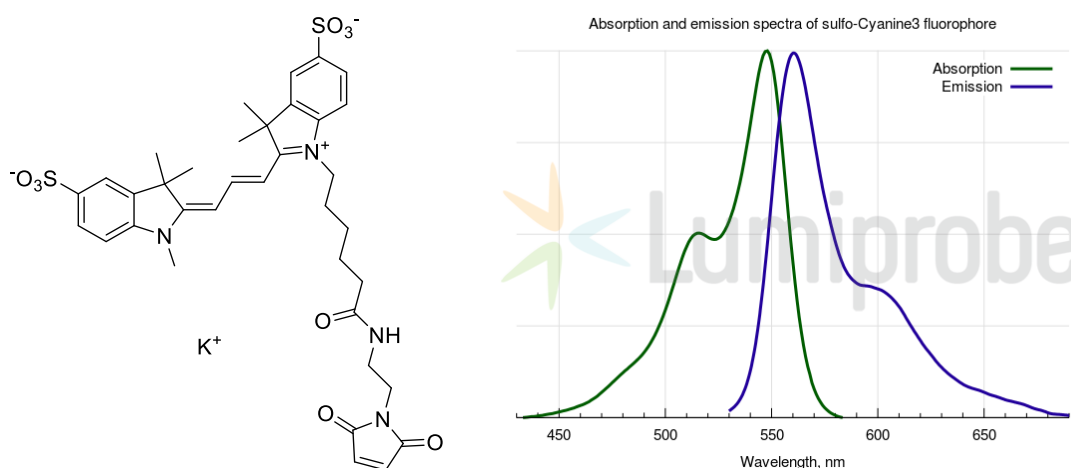


Abbildung 16: Struktur (links) sowie Absorptions- und Fluoreszenzspektrum (rechts) des sulfonylmodifizierten Cyanine3 (**SulfoCy3**) Farbstoffes.^[118]

Im nächsten Schritt erfolgte nun die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die erfolgreiche Markierung von DNA. Um die Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen bestmöglich interpretieren zu können, ist in Abbildung 17 das analytische HPLC-Chromatogramm der eingesetzten Edukte, sowie Strukturen von Produkt und Nebenprodukt dargestellt. Da für die in der Abbildung gezeigten Analytik-Läufe unterschiedliche Stoffmengen eingesetzt wurden, sind die gezeigten Absorptionsintensitäten nicht miteinander vergleichbar.

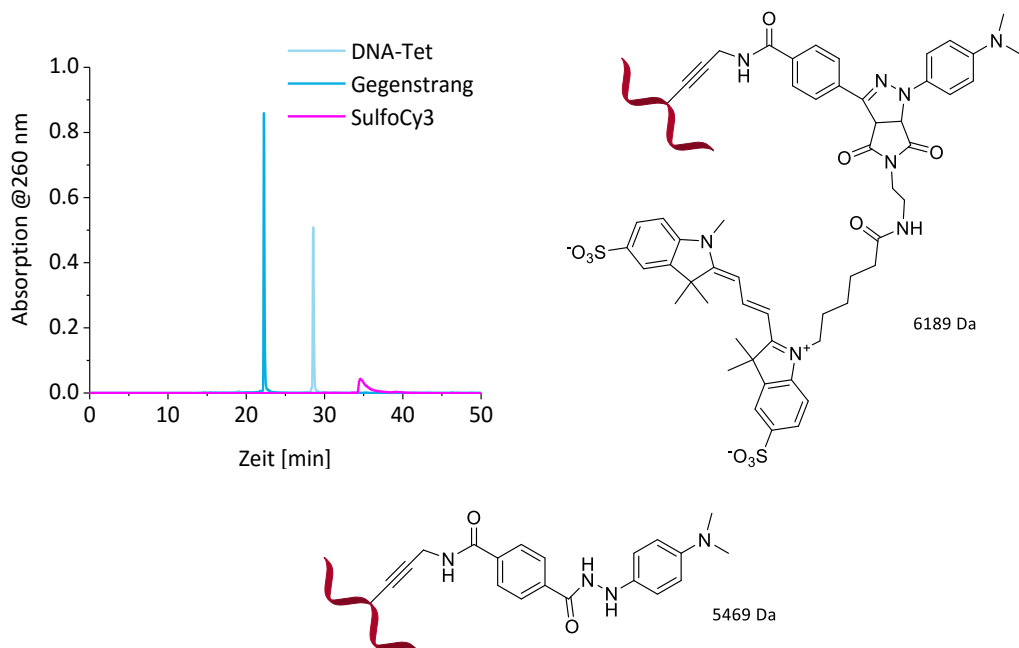


Abbildung 17: Analytisches HPLC-Chromatogramm von **DNA-Tet**, dem komplementären **Gegenstrang** sowie dem zur Markierung genutzten Farbstoff **SulfoCy3**. Weiterhin gezeigt sind die Struktur des gewünschten Produktes (rechts), sowie die des zu erwartenden Nebenproduktes (unten).

Die ersten „Photoclickreaktionen“ wurden, um möglichst nahe an biologischen Systemen zu bleiben in reinem Wasser, mit 1.05 bzw. 10 Äquivalenten **SulfoCy3** durchgeführt. Belichtet wurde mit einer 369 nm LED bei 20 °C für die in Abbildung 18 dargestellten Zeiträume.

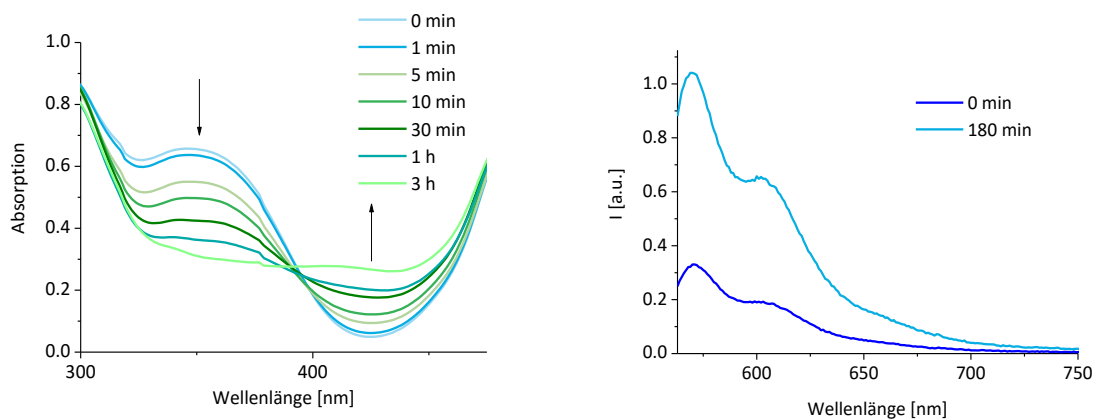


Abbildung 18: Verlauf der Absorption (links) und der Fluoreszenz (rechts) der „Photoclickreaktion“ zwischen **DNA-Tet** und **SulfoCy3** (1.05 Äq) (**DNA-Tet/SulfoCy3 A**) in Wasser bei 20 °C, Belichtung mit einer 369 nm LED.

Im Verlauf des für die Reaktion relevanten Bereichs der Absorption ist deutlich eine Verringerung der Tetrazolabsorption, bei einem gleichzeitigen Anstieg der Absorption um 400 nm, zu sehen. Auch der Anstieg der Fluoreszenz legt eine erfolgreiche Markierungsreaktion nahe. Betrachtet man jedoch das Chromatogramm des analytischen HPLC-Laufes, findet sich kein, dem Produkt zuzuordnendes Signal und auch MALDI-massenspektrometrische Messungen zeigten keine Produktmasse (siehe Abbildung 19).

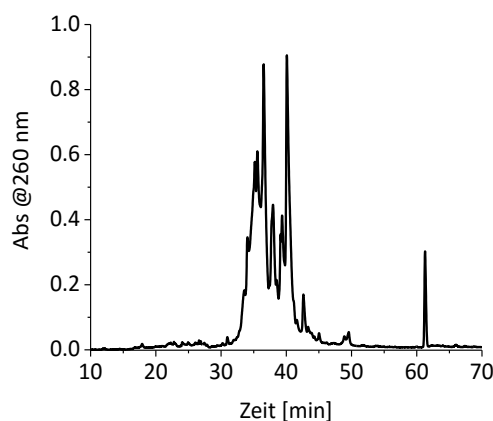


Abbildung 19: Analytisches HPLC-Chromatogramm der „Photoclickreaktion“ DNA-Tet/SulfoCy3 A.

Gradient: 0-30 % MeCN in 90 min.

Um die Tetrazolgruppe besser für das Markierungsreagens zugänglich zu machen, wurden anschließend Experimente mit DMSO als Additiv durchgeführt, welches die gewundene Form des DNA-Einzelstranges öffnen sollte. Doch auch so war eine erfolgreiche Addition des Farbstoffes an die DNA nicht möglich. Erst als die Reaktion nicht in reinem Wasser, sondern in Natriumphosphat-Puffer (10 mM) bei gleichzeitiger Anwesenheit von NaCl (250 mM) durchgeführt wurde, konnte die Bildung eines Produktsignals im HPLC-Chromatogramm beobachtet werden. Dieses entsteht bei einer Retentionszeit von $t = 32.75$ min und weist in der Absorption die Charakteristika von DNA (260 nm), **SulfoCy3**-Farbstoff (548 nm) und Pyrazol (400 nm) auf. Der Nachweis der Produktmasse gelang über ESI-Massenspektrometrie, wobei die passenden Aufspaltungsmuster für das vierfach, fünffach und sechsfach negativ geladene Ion detektiert werden konnten (siehe Abbildung 20).

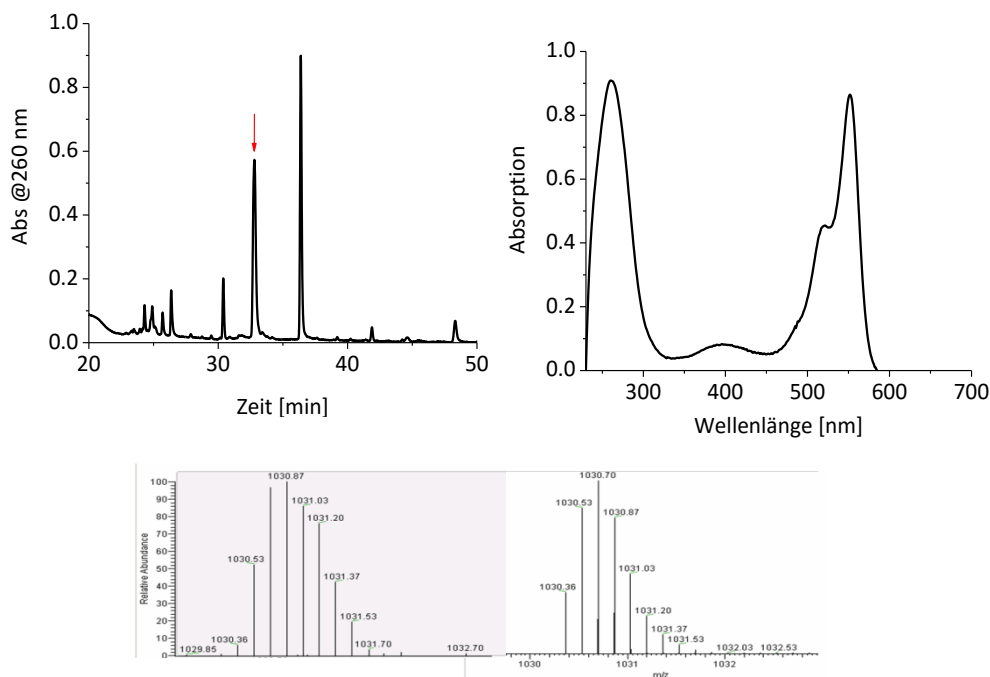


Abbildung 20: Analytischer HPLC-Lauf der „Photoclickreaktion“ **DNA-Tet/SulfoCy3 B** (links), der rote Pfeil markiert das Produktsignal. Gradient: 0-30 % MeCN in 45 min. Korrespondierendes Absorptionsspektrum bei einer Retentionszeit von $t = 32.75$ min (rechts) und experimentelles (unten links), sowie simuliertes (unten rechts) ESI-Aufspaltungsmuster für das sechsfach negativ geladene Molekül.

Da, wie aus dem HPLC-Chromatogramm deutlich wird, immer noch eine Vielzahl an Fragmentierungen und Nebenprodukten aufzutreten schienen, wurde die Strategie, das Tetrazol am DNA-Strang besser zugänglich zu machen, wieder aufgegriffen. Statt der Zugabe von Additiven wurde allerdings der komplementäre DNA-Gegenstrang hinzugegeben und die beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang hybridisiert. Durch die Überführung der ungeordneten räumlichen Struktur des Einzelstranges in die geordnete Doppelhelix des Doppelstranges sollte ein „Umwinden“ der DNA um das, durch die Arylsubstituenten relativ hydrophobe, Tetrazol herum vermieden werden.

Auf diese Art konnte, bei Belichtung mit zwei 369 nm LEDs für 30 min bei 20 °C mit 1.05 Äquivalenten SulfoCy3 (**DNA-Tet/SulfoCy3 C**) ein vollständiger Umsatz von **DNA-Tet** erreicht werden. Wie im Chromatogramm der korrespondierenden HPLC-Analytik zu sehen ist, sind in der Reaktionsmischung nach der Belichtung nur noch drei Hauptkomponenten, zusätzlich zu nicht umgesetzten Farbstoff (minimale Absorption bei 260 nm, deshalb im Chromatogramm nicht sichtbar), vorhanden. Das erste Signal **A**, bei 21.12 min, ist der

unveränderte Gegenstrang zu **DNA-Tet**. Das zweite Signal **B**, bei 27.22 min, weist sowohl Absorption im DNA typischen Bereich bei 260 nm sowie eine breite Bande bei 536 nm auf. Die bestimmte Masse für das Signal liegt bei 5468 Da, dadurch konnte dieses Nebenprodukt später als Hydrazon (berechnete Masse 5469 Da) identifiziert werden.^[89] Das dritte Signal **C** bei 33.57 min ist die durch das gewünschte Produkt hervorgerufene Absorption. Im zugehörigen Absorptionsspektrum sind deutlich DNA-, Pyrazolin-, sowie Farbstoffabsorption zu sehen. Die gemessene Masse entspricht mit 6189 Da exakt der berechneten Produktmasse (siehe Abbildung 21).

Ausgehend von diesen Bedingungen sollten im Folgenden die Zeitabhängigkeit der Produktbildung sowie der Einfluss der eingesetzten Äquivalente von SulfoCy3 bestimmt werden.

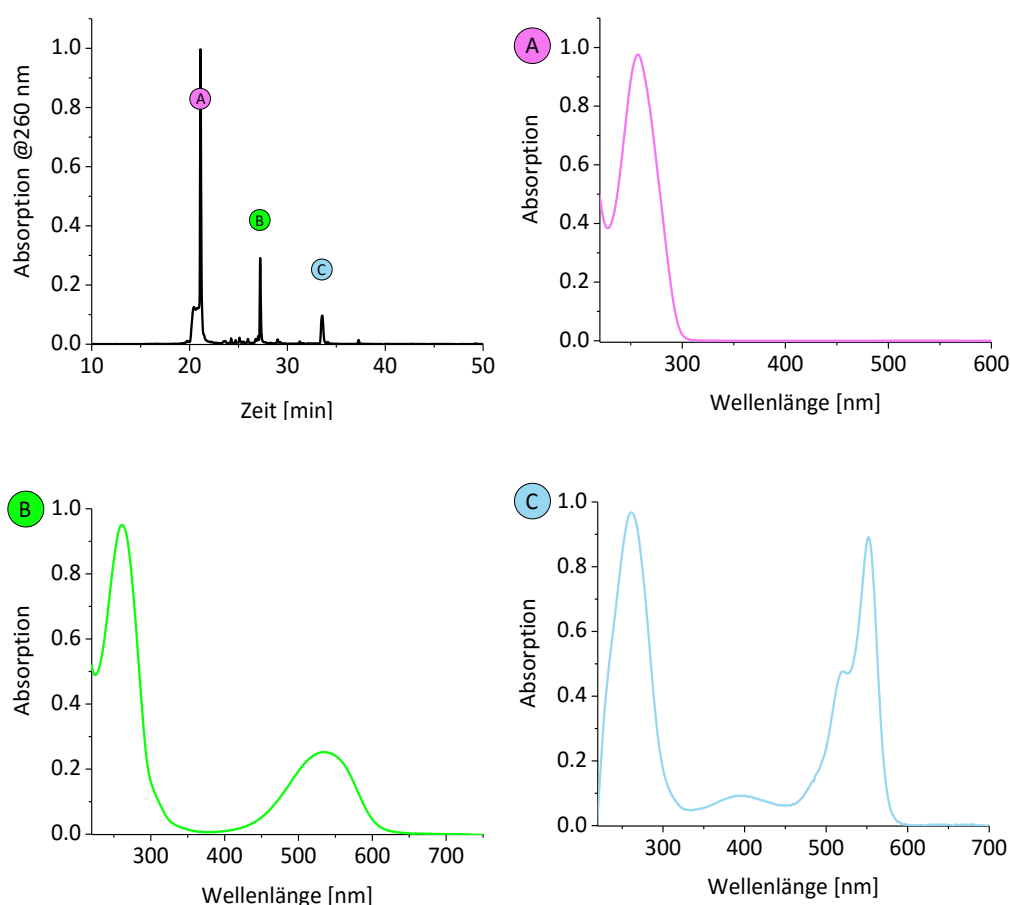


Abbildung 21: Analytisches HPLC-Chromatogramm der „Photoclickreaktion“ **DNA-Tet/SulfoCy3 C** (links oben). Gradient: 0-30 % MeCN in 45 min. Daraus entnommene Absorptionsspektren des unveränderten Gegenstrangs **A** (rechts oben), sowie des Nebenprodukts (Hydrazon) **B** (links unten) und des gewünschten Produktes **C** (rechts unten).

Um den zeitlichen Verlauf zu bestimmen, wurden nacheinander identische Reaktionslösungen für verschiedene Zeitintervalle belichtet und über analytische HPLC-Läufe untersucht.

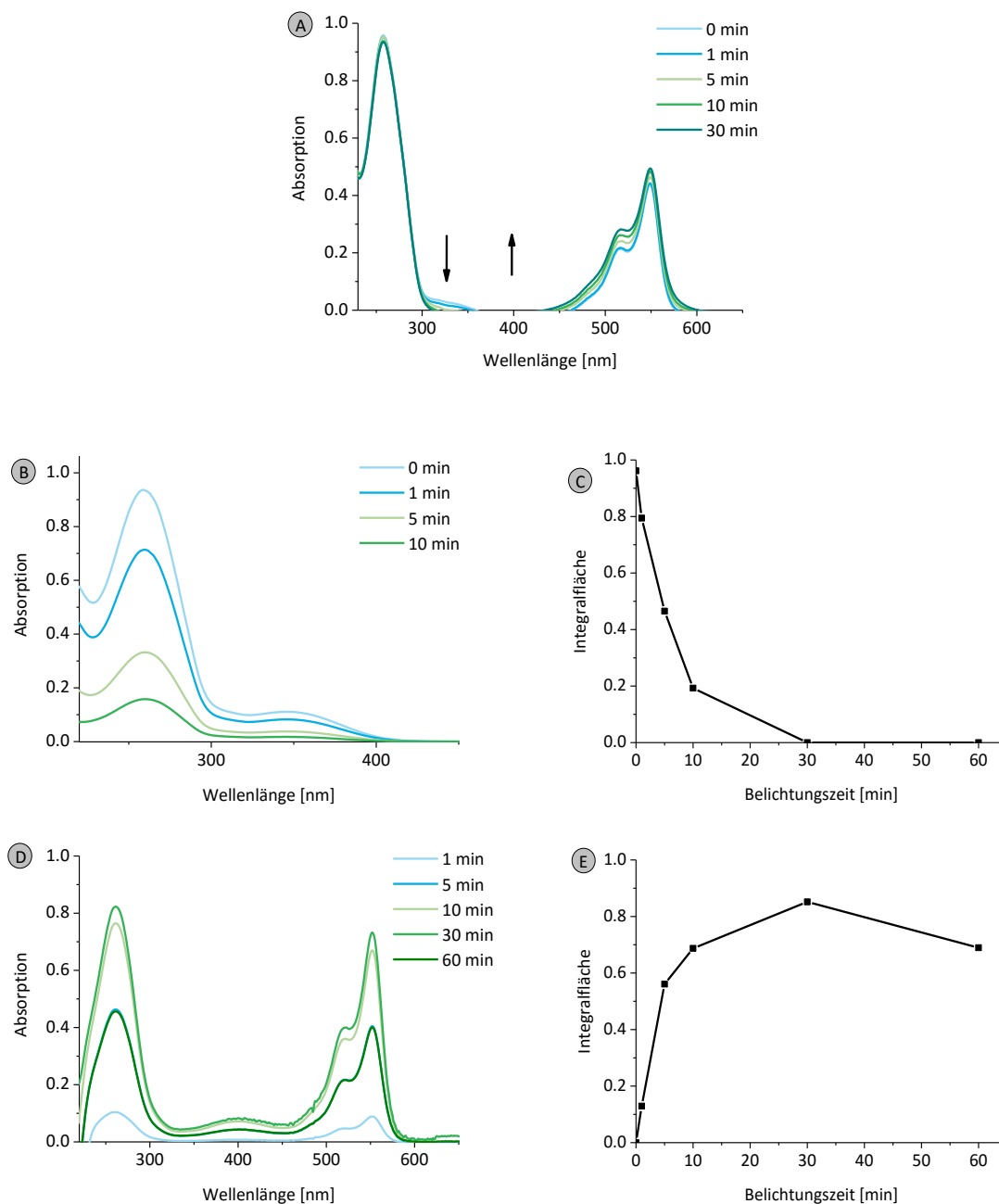


Abbildung 22: Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der „Photoclickreaktion“. A: Komplettes Absorptionsspektrum der Reaktionsmischung; B: Verringerung der Absorption des Oligonukleotids **DNA-Tet**; C: Abnahme Integralfläche des Signals für **DNA-Tet**; D: Zunahme der Absorption des gebildeten Produktes; E: Zunahme der Integralfläche des entstandenen Produktes.

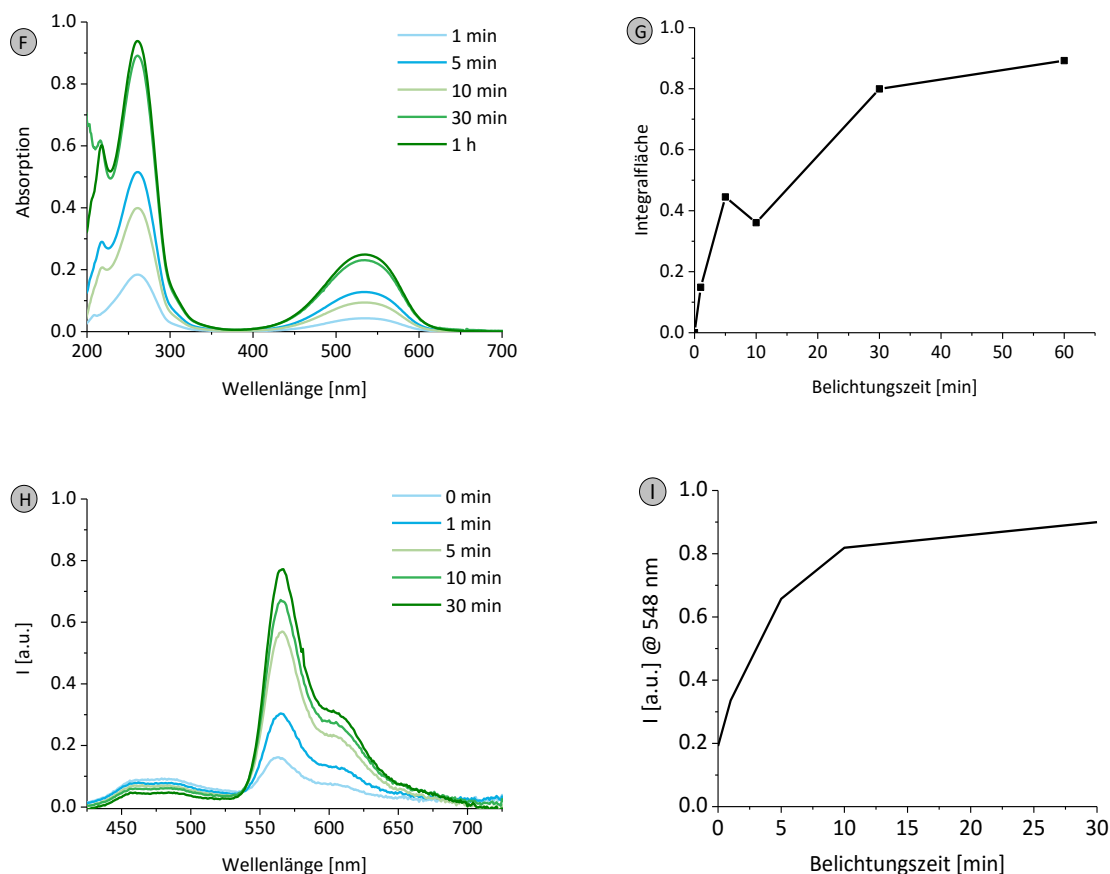


Abbildung 23: F: Absorptionsspektren des entstehenden Nebenproduktes; G: Zunahme der Integralfäche des Signals des entstandenen Nebenproduktes; H: Zunahme der Fluoreszenz bei Anregung bei 400 nm; I: Zunahme des Fluoreszenzmaximums bei Anregung bei 400 nm.

Wie in Abbildung 22 A deutlich zu sehen ist, verschwindet die Absorptionsbande des Tetrazols im Zeitverlauf und es entsteht eine Bande mit einem Maximum bei $\lambda = 400$ nm. Im Einzelnen ist zu beobachten, dass das Edukt, **DNA-Tet**, nach 30 min komplett umgesetzt ist (siehe Abbildung 22 B,C). Für die Produktbildung wird bei einem Zeitpunkt von $t = 30$ min eine maximale Ausbeute beobachtet. Danach verringert sich die Integralfäche wieder, es kommt also zur Zersetzung des gewünschten Produktes. Das schon zuvor betrachtete Nebenprodukt bildet sich, wie in Abbildung 23 F und G zu sehen, kontinuierlich, allerdings ist auch hier nach 30 min auf Grund des vollständigen Umsatzes von **DNA-Tet** eine Sättigung erreicht. Die Fluoreszenz im Laufe der Reaktion zeigt das erwartete Verhalten. Wie in Abbildung 23 H,I zu sehen ist, steigt die bei $\lambda = 400$ nm angeregte Fluoreszenz kontinuierlich an, bis sie bei $t = 30$ min ihre Sättigung erreicht. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass nur bis zu einer Belichtungsdauer von 30 min eine Bildung des gewünschten Produktes zu erwarten ist, danach wird dieses wieder abgebaut.

Bei einigen der durchgeführten „Photoclick“-Experimente fiel auf, dass dem, in vorherigen Experimenten klar isolierten Produktsignal (siehe Abbildung 21) in zeitlich naher Nachbarschaft ein zweites Signal in variablem Größenverhältnis zum ersten Signal folgte (siehe Abbildung 24). Bei näherer Betrachtung zeigte sich, dass in der Absorption des zweiten Signals (siehe Abbildung 24, 2) die Pyrazolinbande bei $\lambda = 400$ nm fehlte und zugleich die DNA-Absorption im Vergleich zu der des Farbstoffes leicht erhöht war. Untersuchte man beide Fraktionen massenspektrometrisch, so zeigte sich, dass Fraktion 1 wie erwartet das gewünschte Produkt enthielt (berechnete Masse: 6189 Da, gefundene Masse: 6189 Da), in Fraktion 2 wurde mit einer Masse von 6193 Da im Rahmen der Messungengenauigkeit nahezu das gleiche Molekulargewicht detektiert. Dies spricht dafür, dass sich vermutlich keine wesentliche strukturelle Änderung vollzogen haben kann.

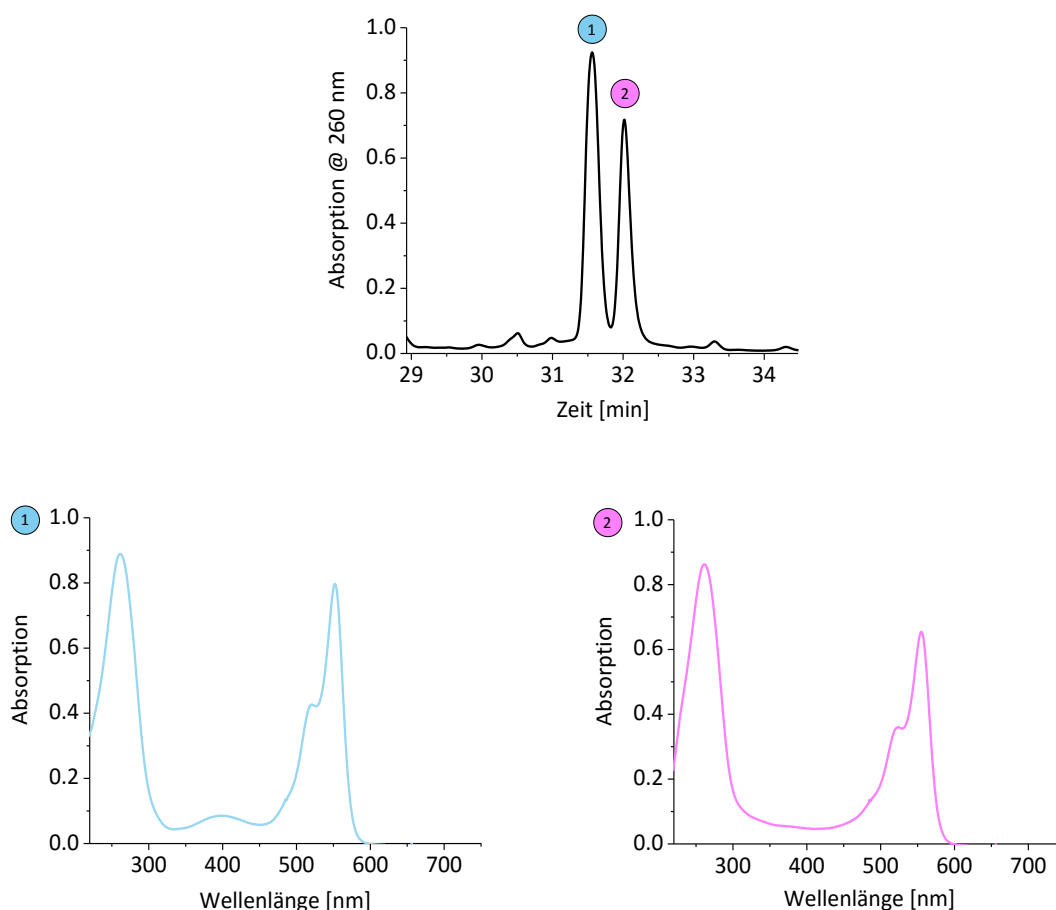


Abbildung 24: In einem Teil der analytischen HPLC-Chromatogramme beobachtete Formation eines zweiten Signals nahe dem des Produktes (oben). Absorptionsspektrum des Produktsignals (links unten) und Absorptionsspektrum des zweiten Signals (rechts unten).

Eine mögliche Folgereaktion des gebildeten Produktes ist die Oxidation des Pyrazolins zum Pyrazol, wie auch von *Lin et al.* in einzelnen Fällen beobachtet (siehe Abbildung 25).^[87] Dafür, dass dies auch hier der Fall sein könnte, spricht, dass die Molekülmasse sich nur marginal ändert und dass die Absorptionsintensität der DNA-Bande im Vergleich zu der des Farbstoffes vergrößert. Durch die Oxidation zum Pyrazol wird die Konjugation der DNA-Base über beide Arylringe wieder hergestellt, dies kann zu einem Anstieg der Absorptionsintensität führen.

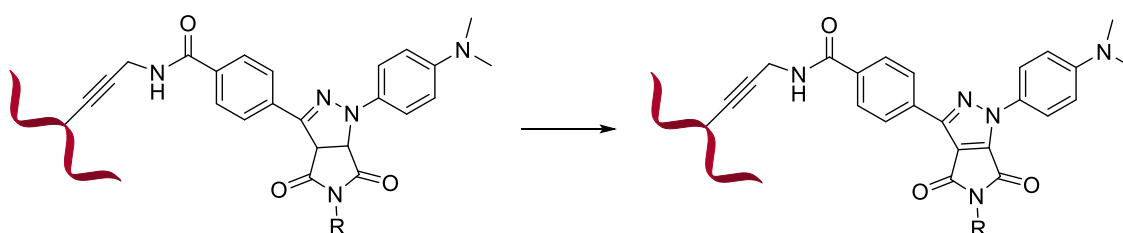


Abbildung 25: Vorgeschlagene Folgereaktion des Pyrazolins zum entsprechenden Pyrazol.

Diese Folgereaktion ist, im Hinblick auf eine Anwendung in der organischen Synthese, störend und müsste, durch Variation der Bedingungen der Reaktionsaufarbeitung, unterbunden werden. Da die hier durchgeführte Reaktion allerdings auf die kovalente Konjugation von Biomolekülen mit Farbstoffen oder anderem abzielt, wird der Ausgang des Experiments durch diese Oxidation nicht beeinflusst.

Als nächstes erfolgte eine Variation der Konzentration des Dipolarophils bei ansonsten gleichbleibenden Reaktionsbedingungen und einer Reaktionszeit von 30 min. Die Produktfraktionen wurden aufgefangen und über die Absorption bei 260 nm die Konzentration und somit die Ausbeute bestimmt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Abhängigkeit der Ausbeute der „Photoclickreaktion“ von der gewählten Dipolarophilkonzentration.

Versuch Nr.	Äquivalente SulfoCy3	Ausbeute Pyrazolin	Ausbeute Pyrazol	Ausbeute Gesamt
1	0.1	1.4 %	-	1.4 %
2	0.5	6.4 %	0.9 %	7.3 %
3	1	4.6 %	9.9 %	14.5 %
4	3	16.7 %	13.2 %	29.9 %
5	5	8.1 %	25.9 %	34 %
6	10	23.9 %	29.8 %	53.7 %
7	50	37.1 %	15.5 %	52.6 %

Anhand der in Tabelle 3 gezeigten Daten wird deutlich, dass die Ausbeute des gewünschten „Clickproduktes“ entscheidend von der Konzentration des zugegebenen Dipolarophils abhängt. Bis hin zu 10 Äquivalenten beobachtet man eine deutliche Steigerung der Gesamtausbeute bestehend aus Pyrazolin-, sowie Pyrazolprodukt. Im Vergleich von 10 Äquivalenten zu 50 Äquivalenten zeigt sich keine weitere Steigerung der Produktausbeute. Ab einer Konzentration von 10 Äquivalenten ist ein Gleichgewicht mit der konkurrierenden Addition von Wasser an das Nitrilimin erreicht.

Um zu vermeiden, dass das durch Belichtung entstandene Nitrilimin mit den, in der Lösung vorhandenen Chloridionen zum Hydrazonylchlorid und auf diese Art zum Hydrazid weiterreagiert (siehe Schema 7), wurde die „Photoclickreaktion“ analog zu den bisherigen Reaktionsbedingungen, jedoch unter Abwesenheit von Chloridionen durchgeführt. Dabei wurde bei Belichtung des Einzelstranges mit 5 Äquivalenten **SulfoCy3** eine Ausbeute von 8 % und bei Belichtung des Doppelstranges eine Ausbeute von 9 % erhalten. Da dies weit unter der zuvor beschriebenen Ausbeute liegt, wurde im Weiteren wieder der chloridionenhaltige Puffer verwendet.

Wie bereits im Abschnitt 2.1.1. dargelegt, entscheidet die Kinetik in einem hohen Maße über Effizienz und Anwendbarkeit einer bioorthogonalen Reaktion. Nur mit einer ausreichenden hohen Geschwindigkeitskonstante kann eine Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden, die

den Einsatz moderater Mengen an Markierungsreagens und realistische Zeitfenster zulässt. Um die Geschwindigkeitskonstante k_{cyc} der Reaktion zu bestimmen, wurden Versuchsreihen mit jeweils der gleichen Dipolarophilkonzentration, aber unterschiedlicher Belichtungsdauer durchgeführt. Durch Ermittlung der Ausbeuten und Anpassung der Daten an das Zeitgesetz Pseudo-Erster Ordnung konnte zunächst die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} und durch Division durch die Dipolarophilkonzentration schließlich k_{cyc} bestimmt werden (siehe Abbildung 26, Abschnitt 6.7.).^[119-120]

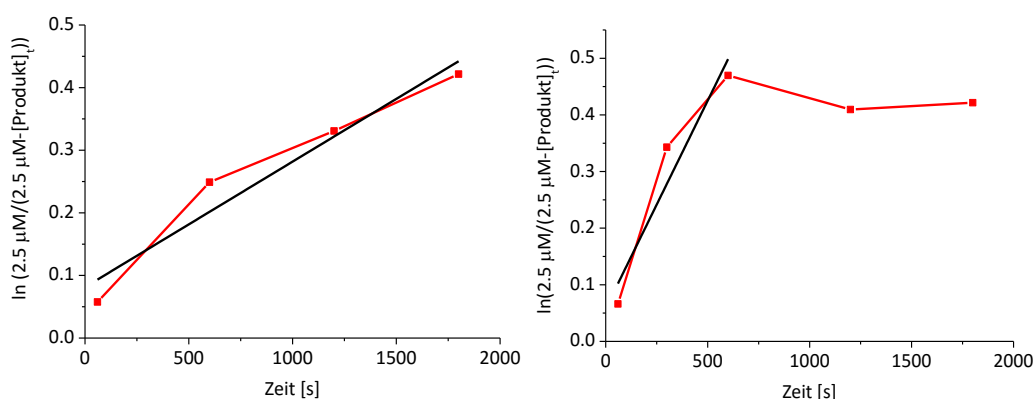
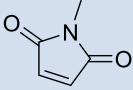
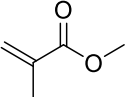
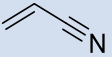


Abbildung 26: Bestimmte Datenpunkte (rot) und linearer Fit (schwarz) für die „Photoclickreaktion“ mit 5 (links) bzw. 10 Äquivalenten (rechts) **SulfoCy3**.

Der so bestimmte Durchschnittswert für die Geschwindigkeitskonstante lag bei $23 \pm 7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert liegt in dem für „Photoclickreaktionen“ zu erwartenden Größenbereich und deckt sich mit denen im Bereich der Proteinmarkierung ermittelten Werten. Somit ist die Geschwindigkeit der „Photoclickreaktion“ vergleichbar mit der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA), oder der kupferkatalysierten Clickreaktion.

Um die Bandbreite der Reaktion auszutesten, wurden „Photoclickreaktionen“ mit **DNA-Tet** und drei weiteren Dipolarophilen durchgeführt. Dabei wurden die zuvor genutzten Bedingungen, also 30 min Belichtung mit zwei 369 nm LEDs bei 20 °C, 2.5 µM **DNA-Tet**, beibehalten.

Tabelle 4: Weitere Dipolarophile für die „Photoclickreaktion“ mit **DNA-Tet**.

Dipolarophil	Berechnete Masse	Gefundene Masse	Ausbeute
 N-Methylmaleimid	5562 Da	5566 Da	42 %
 Methylmethacrylat	5551 Da	5563 Da	23 %
 Acrylonitril	5504 Da	—	—

Wie in Tabelle 4 zu sehen, ist die erfolgreiche „Photoclickreaktion“ auch mit anderen Dipolarophilen möglich. Allerdings müssen in jedem Einzelfall die Umsetzung untersucht, sowie die nötigen Äquivalente des Markierungsreagens bestimmt werden.

4.4 Enzymatische DNA-Synthese

Der Gedanke hinter dem Konzept der bioorthogonalen Reaktionen ist es, die Biosynthesewege der Zelle auszunutzen. Ziel ist es also, ein primär modifiziertes Biomolekül durch die zelleigene Biosynthesemaschinerie zu erhalten und dieses anschließend, wie gewünscht, modifizieren zu können.

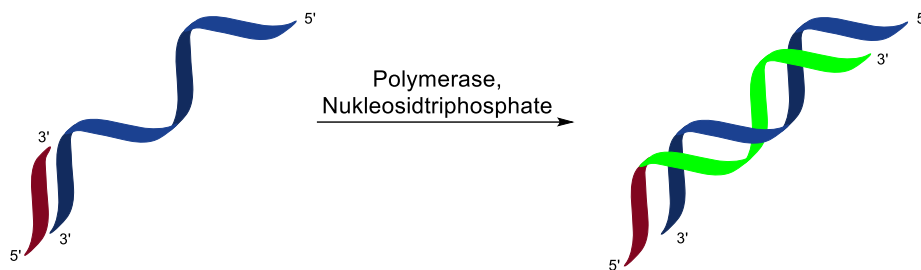


Abbildung 27: Prinzip der enzymatischen DNA-Synthese durch Primerverlängerung. Ein an das Templat (blau) angelagerter Primerstrang (rot) wird durch eine Polymerase und die entsprechenden Nucleosidtriphosphate entlang des Templats in 5'-3'-Richtung, verlängert (grün).

Um Nucleinsäuren aufzubauen, nutzen alle Lebewesen das gleiche Grundprinzip. Die unterschiedlichen Nucleotide werden als Nucleosidtriphosphate entlang eines als Matrix dienenden Einzelstranges aufgereiht und durch eine DNA- oder RNA-Polymerase kovalent, unter Abspaltung von Pyrophosphat, miteinander verknüpft (siehe Abbildung 27). Dabei entstehen Nucleinsäuren, deren Länge von einigen wenigen, bis hin zu 250 Millionen Basen im längsten menschlichen Chromosom reichen kann.^[121] Die Ansprüche an die Genauigkeit einer solchen Synthese sind dabei enorm. Bereits durch den Austausch einer einzigen Base, einer sogenannten Punktmutation, kann die Aminosäuresequenz des Proteins, für welches das Gen kodiert, verändert werden. Dadurch können Struktur und Funktion eines Proteins nachhaltig beeinflusst werden,^[122] Krankheiten, wie zum Beispiel die Sichelzellanämie, oder aber auch der Tod der Zelle können die Folge sein.

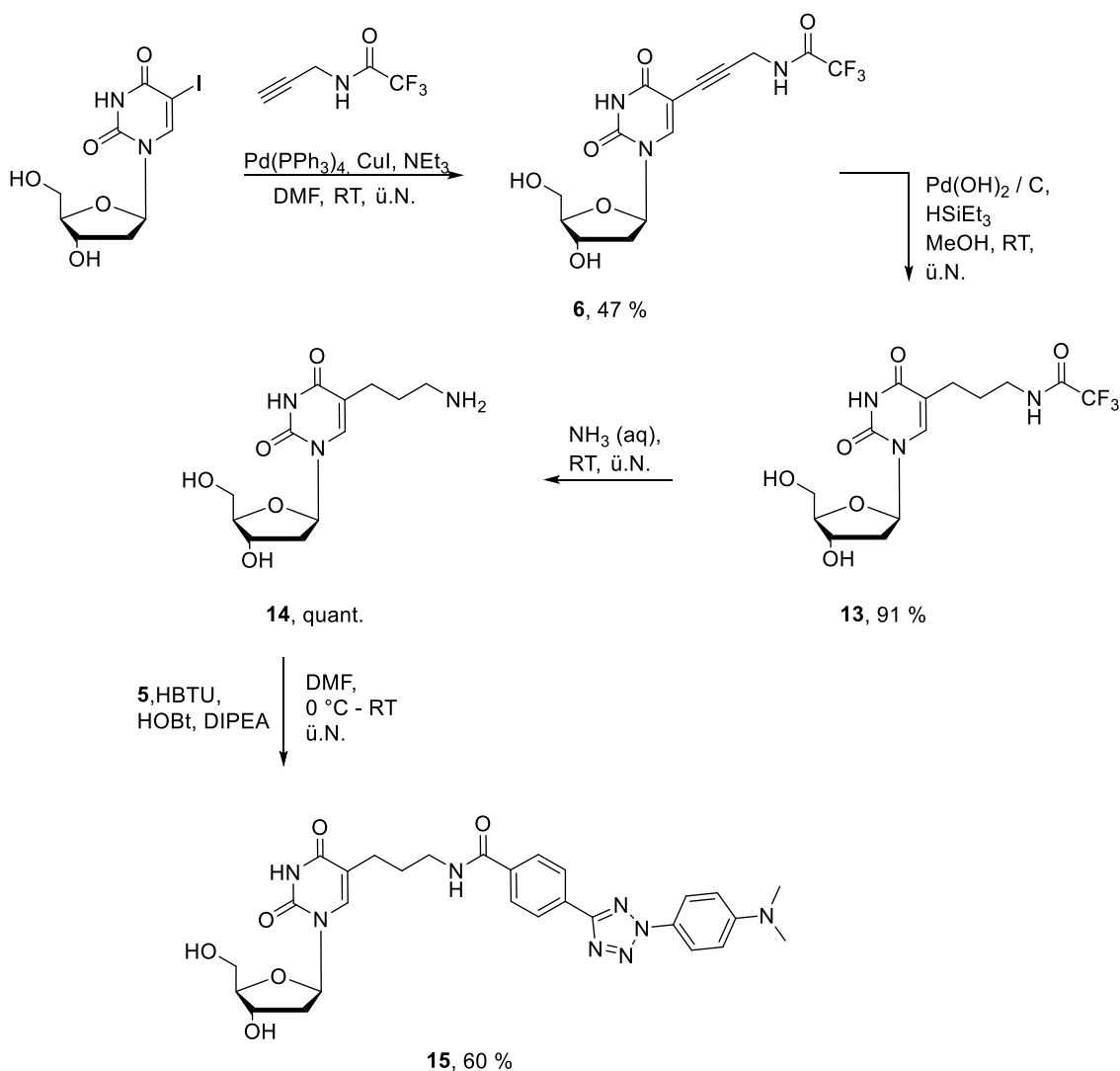
Polymerasen, die eine Synthese mit einer solchen Präzision durchführen können, wurden im Laufe der Evolution mit Kontroll- und Reparaturmechanismen ausgestattet. In der Molekularbiologie werden nahezu ausschließlich hitzestabile Polymerasen genutzt. Die am weitesten verbreitete ist die sogenannte Taq-Polymerase. Diese wurde aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus*, welches in heißen Quellen vorkommt, isoliert.

Ihr Aktivitätsmaximum liegt bei 74 °C und bei einem pH-Wert von 8. Die Taq-Polymerase und die in dieser Arbeit genutzte Hemo KlenTaq-Polymerase, verfügen beide über eine 5'-3' Exonukleaseaktivität und neigen dazu, templatunabhängig, am Ende des Stranges noch ein weiteres Nukleotid, meist Adenosin, anzuhängen und damit sogenannte „sticky ends“ zu erzeugen. Damit gehören sie zu den sogenannten A-Typ Polymerasen. Die Hemo KlenTaq Polymerase ist eine um 280 Aminosäuren verkürzte Version der Taq-Polymerase. Dies macht sie unter bestimmten Bedingungen, zum Beispiel der Anwendung in Blutproben, wesentlich stabiler.^[123-124] Die anderen, in der vorliegenden Arbeit verwendeten, Polymerasen Deep Vent, Vent und KOD gehören zu den Polymerasen des B-Typs. Sie erzeugen keinen Überhang, sondern glatte, sogenannte „blunt ends“. Außerdem verfügen sie über eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die ihnen noch während der Synthese eine Korrektur falsch eingebauter Nukleotide ermöglicht („proofreading“-Funktion). Diese schützt bei der Synthese sehr langer Sequenzen vor Fehleinbauten, kann aber in Primerverlängerungsexperimenten zum Abbau des Stranges aus 3' Richtung führen. Deshalb wurden die sogenannten (-exo) Varianten der Vent und DeepVent Polymerase eingesetzt, die keine 3'-5' Exonukleaseaktivität aufweisen.

Beide Polymeraseklassen unterscheiden sich weiterhin durch eine unterschiedliche Prozessivität. Unter Prozessivität versteht man die durchschnittliche Verweildauer des Enzyms am wachsenden Doppelstrang. Diese liegt bei den Polymerasen der A-Familie bis zu 10 Mal höher als bei denen der B-Familie (etwa 100 im Vergleich zu etwa 10 verknüpfte Basen pro Anlauf). Bedingt durch die unterschiedliche Prozessivität, liegt die Synthesegeschwindigkeit der A-Polymerasen wesentlich höher als die der B-Polymerasen, da seltener neu am wachsenden Strang angesetzt werden muss.^[123]

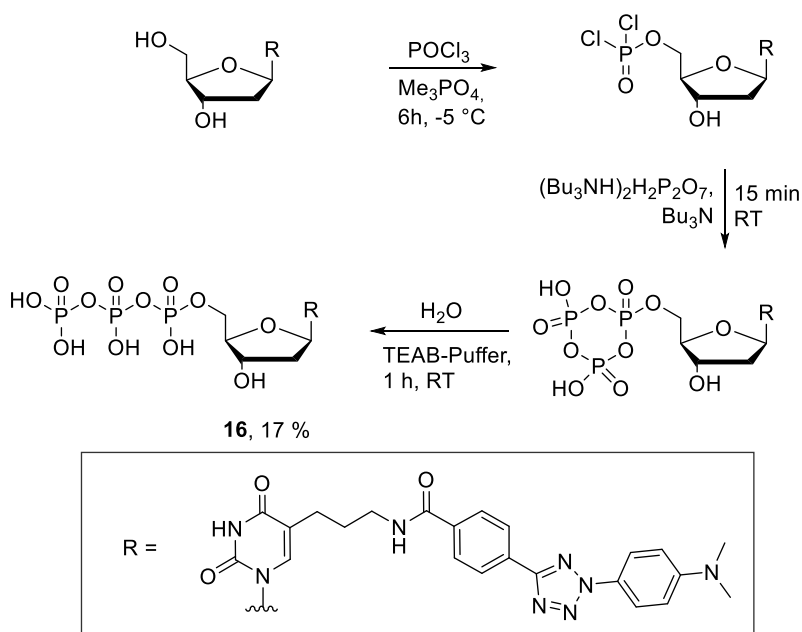
4.4.1 Synthese des Triphosphats

Zur Synthese des Nucleosids, das in einem folgenden Schritt zum Triphosphat umgesetzt werden sollte, wurde grundsätzlich so vorgegangen, wie bereits unter 4.1 beschrieben. Allerdings konnte in der Zwischenzeit gezeigt werden, dass der Austausch der starren Ethinylbrücke zu Gunsten eines flexiblen Propyllinkers die Fluoreszenzeigenschaften verbessert.^[70] Daher wurde im Anschluss an die Sonogashirakupplung der Linker durch Einsatz von Triethylsilan und einem Palladiumhydroxidkatalysator auf Kohle als Trägermatrix in MeOH komplett hydriert.^[125] Das Produkt **13** dieser Reaktion konnte zu 91 % erhalten und anschließend weiter umgesetzt werden. Die Gesamtausbeute dieser Reaktionsfolge liegt, bezogen auf das Nucleosid **15**, bei 26 % über vier Stufen.



Schema 14: Synthese des Diaryltetrazolnucleosids **15** mit Propyllinker.

Die ersten Ansätze zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten starteten ausgehend von den natürlichen 5'-OH-Nucleotidmonophosphaten. Somit umging man das Problem, dass hochreaktive Phosphorylierungsreagenzien wie Dichlorphosphorsäure oder Phosphorylchlorid auch mit der 2' und 3'-Position reagierten. Eine Abhilfe für dieses Problem schaffte *Yoshikawa* 1967, als er herausfand, dass die gleiche Reaktion, durchgeführt in Trialkylphosphaten statt der bisher genutzten Lösungsmittel, eine höhere Regioselektivität für die 5'-OH Gruppe aufwies.^[126-128] Die Trialkylphosphate verbessern zudem die Löslichkeit der genutzten Komponenten. Basierend auf diesen Erkenntnissen schlug *Ludwig* 1981 eine Triphosphatsynthese in drei Schritten vor.^[129] Im ersten Schritt wird das Nucleosid mit Phosphorylchlorid phosphoryliert. Das intermediär gebildete Dichlorophosphat wird mit Pyrophosphatanionen weiter zu einem cyclischen Anhydrid umgesetzt, welches im letzten Schritt zum Triphosphat hydrolysiert wird.



Schema 15: Synthese des Diaryltetrazoltriphosphats **16** basierend auf der Methode von Ludwig.

Basierend auf dieser Methode wurde das Triphosphat des zuvor synthetisierten Diaryltetrazolnukleosids hergestellt. Das Nukleosid und eine entsprechende Menge Protonenschwamm® (PS, *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin) zum Abfangen der bei der Phosphorylierung freiwerdenden Säure, wurde in Trimethylphosphat gelöst. Dazu wurde bei tiefer Temperatur Phosphorylchlorid schnell hinzugegeben, um die Dimerbildung zu unterdrücken. Zur Bildung des Anhydrids wurde das Tributylammoniumsalz des Pyrophosphats zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Zur Hydrolyse der cyclischen Zwischenstufe wurde die Reaktionslösung über einen Zeitraum von einer Stunde in Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Puffer getropft. Nach der Aufreinigung über *reverse-phase* HPLC konnte **16** in, für eine Triphosphatsynthese, sehr guten 17 % Ausbeute erhalten werden.

4.4.2 Durchführung von Primerverlängerungs- und PCR-Experimenten

Um die Eignung eines artifiziellen Triphosphats zum enzymbasierten Einbau in Oligonukleotide zu testen, werden zunächst die sogenannten Primerverlängerungsexperimente (Primer Extension (PEX) Experiments) durchgeführt (siehe Abbildung 27).

Dazu werden stöchiometrische Mengen eines Templats und eines Primers hybridisiert. Anschließend werden Triphosphate sowie eine Polymerase hinzugegeben und die Mischung für einen bestimmten Zeitraum bei einer definierten Temperatur inkubiert, um die Verlängerung des Primers entlang des Templates abzuschließen. Das Ergebnis wird anschließend durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Auf diese Art gelang bereits in verschiedenen Gruppen der enzymatische Einbau und die anschließende bioorthogonale Modifikation von artifiziellen Triphosphaten. So konnte zum Beispiel von *Wang et al.* und von *Brown et al.* ein cyclooxenmodifiziertes Nukleosidtriphosphat erfolgreich in ein Oligonukleotid eingebracht und anschließend in einer iEDDA-Reaktion modifiziert werden.^[130-131] Auch der Einbau von azidmodifizierten Triphosphaten und die anschließende SPAAC wurden von *Brown et al.* umgesetzt. In der Gruppe um *Marx* wurden dagegen vinylmodifizierte Triphosphate nach der enzymatischen DNA-Synthese in einer iEDDA-Reaktion erfolgreich markiert.^[80]

Der hier verwendete Primerstrang ist am 5'-Terminus mit Fluorescein markiert. Dies ermöglicht die Visualisierung auf dem Gel durch Anregung bei 470 ± 20 nm und Auslesen der Emission bei 535 ± 20 nm.

Der erste Schritt sind sogenannte „standing start“ Experimente. Dabei liegt die zum artifiziellen Triphosphat komplementäre Base, in diesem Fall Adenosin, als komplementäre Base zu modifizierten Uridin, direkt nach dem 3'-Ende des Primers auf dem Templat und muss so als erstes von der Polymerase in den Strang eingebaut werden (siehe Abbildung 28).

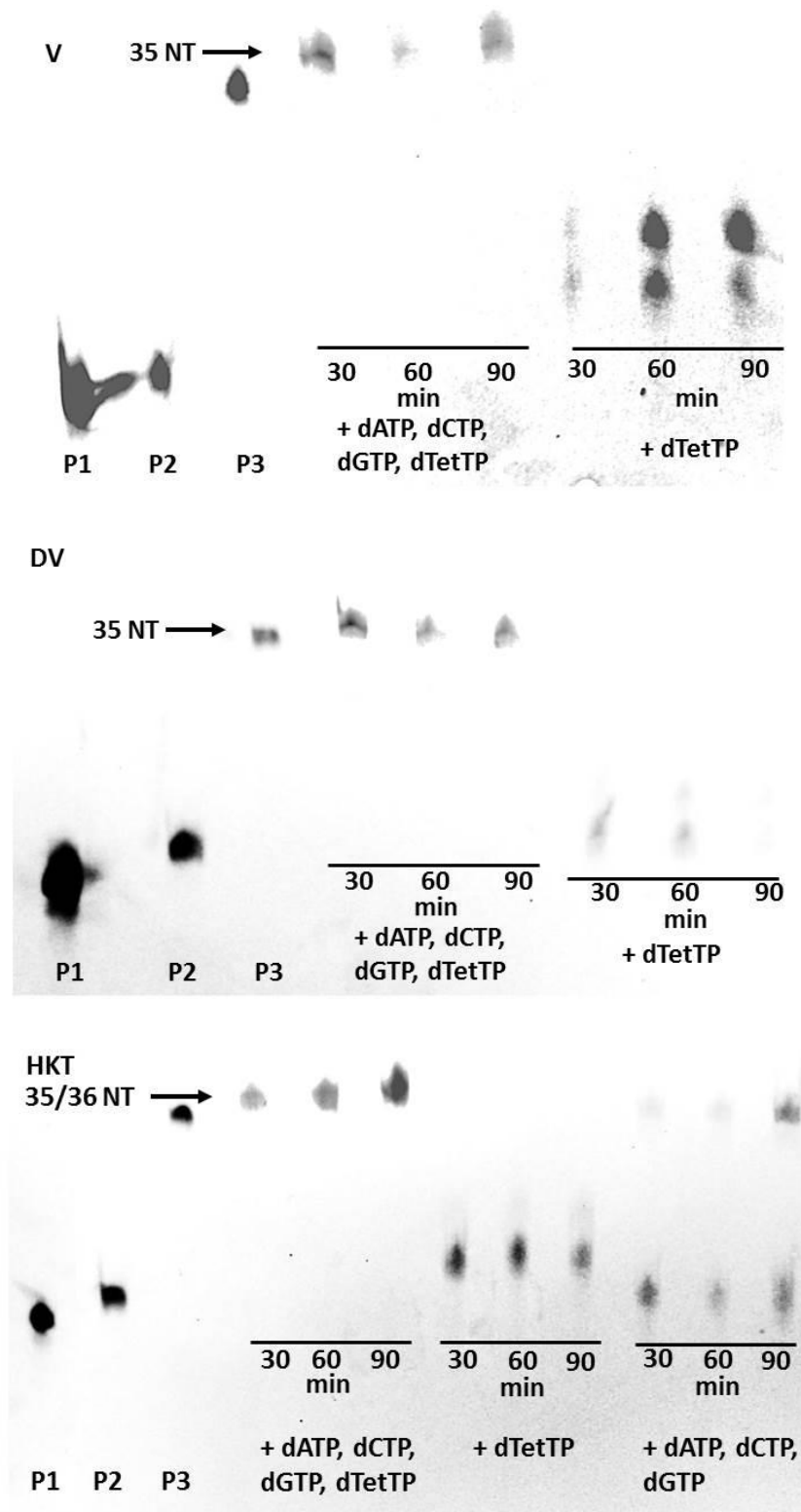


Abbildung 29: „Standing start“ Experimente (T1/P1) mit verschiedenen Polymerasen. Alle Verlängerungsexperimente wurden für 30 Minuten beim jeweiligen Temperaturoptimum der Polymerase inkubiert. Oben: Vent(-exo) Polymerase (V), 72 °C; Mitte: Deep Vent(-exo) Polymerase (DV), 72 °C; Unten: Hemo KlenTaq Polymerase (HKT), 68 °C.

Bei Betrachtung der Polyacrylamidgele wird deutlich, dass alle drei Polymerasen bereits bei 30 Minuten Inkubation bei dem jeweiligen Temperaturoptimum eine vollständige Verlängerung des Primerstranges erwirken. Die Laufweite des mit dem tetrazol-modifizierten Uridintriphosphat (**dTetTP**) modifizierten Stranges ist dabei etwas geringer als die des mit natürlichen Basen vollständig verlängerten Strangs (**P3**). Dies liegt daran, dass die Modifikation im Vergleich zur natürlichen Base sterisch deutlich anspruchsvoller ist und dadurch die elektrophoretische Mobilität beeinflusst wird. Kontrollexperimente, bei denen nur das artifizielle **dTetTP** und keines der natürlichen Triphosphate zugegeben wurde, zeigen neben der um eine Base verlängerten Bande noch einen weiteren, unspezifischen Einbau, jedoch keine vollständige Verlängerung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Basenpaarung zwischen dem modifizierten Uridin und der komplementären Gegenbase Adenosin weitestgehend ungestört ist. Bei einem weiteren Kontrollexperiment (siehe Abbildung 29, unten) wurden ausschließlich die drei natürlichen Triphosphate dATP, dGTP und dCTP zugegeben. Hier beobachtet man eine intensive Bande auf Höhe des unverlängerten Primers und eine schwache Bande in der Höhe des vollständig verlängerten Stranges. Es findet also nur zu einem geringen Teil ein unspezifischer Einbau über Adenosin hinweg statt. Dieser unspezifische Einbau wird mit der Zeit immer mehr, bei 90 Minuten Inkubation ist die Bande der vollständigen Verlängerung deutlich intensiver. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass im Rahmen des „standing start“ Experimentes ein effizienter Einbau des artifiziellen Triphosphates beim jeweiligen Temperaturoptimum der Polymerase in 30 Minuten möglich ist.

Im nächsten Schritt soll **dTetTP** „im Lauf“ der Polymerase erkannt und eingebaut werden. Dazu wird ein „running start“ Experiment durchgeführt, bei dem Adenosin, also die komplementäre Gegenbase zu **dTetTP**, einige Basen vom Ende des Primerstranges entfernt auf dem Templat liegt, so dass zuerst drei natürliche Triphosphate und anschließend das artifizielle Triphosphat an den wachsenden Strang geknüpft werden müssen (siehe Abbildung 30). Als Referenzen dienen auch hier der unverlängerte Primerstrang **P1**, sowie der mit natürlichen Nukleotiden vollständig verlängerte Strang **P4**.

T2/P1

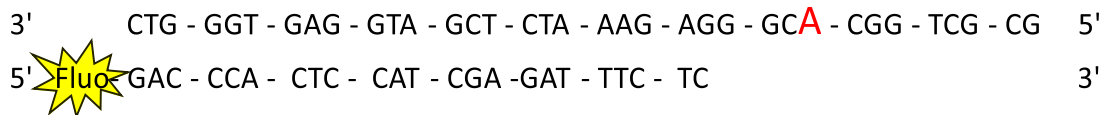


Abbildung 30: Templat (**T2**, 35 Nukleotide) und Primerstrang (**P1**, 23 Nukleotide) für die „running start“ Primerverlängerung. Der Primerstrang trägt am 5'-Terminus eine Fluorescein-Modifikation (Fluo).

Die Experimente wurden jeweils mit den bereits erprobten Polymerasen DeepVent(-exo), Vent(-exo) und Hemo KlenTaq durchgeführt. Wie in Abbildung 31 zu sehen, wird auch im „running start“ Aufbau ein effizienter und vollständiger Einbau des artifiziellen Triphosphates innerhalb von 30 Minuten, unabhängig von der verwendeten Polymerase, erreicht. Die Banden der DeepVent und Vent Polymerase liegen erneut, im Vergleich zu **P4**, etwas nach oben versetzt, was wiederum an den veränderten Laufeigenschaften des Diaryltetrazols liegt. Die Bande der Verlängerung durch Hemo KlenTaq liegt, im Vergleich mit den beiden anderen, ein weiteres Stück nach oben versetzt, was auf den, zuvor beschriebenen, unspezifischen Einbau eines Überhanges zurückzuführen ist.

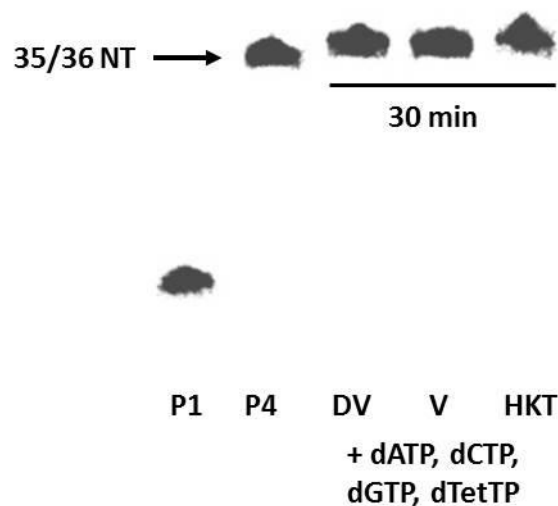


Abbildung 31: PAGE-Analyse der „running start“ Experimente (**T2/P1**) für verschiedene Polymerasen. **P1**: unverlängerter Primerstrang; **P4**: Mit den natürlichen Nukleotiden verlängerter Primerstrang; Alle Verlängerungsexperimente wurden für 30 Minuten beim jeweiligen Temperaturoptimum der Polymerase inkubiert; **DV**: DeepVent Polymerase, Verlängerung bei 72 °C; **V**: Vent Polymerase, Verlängerung bei 72 °C; **HKT**: Hemo KlenTaq, Verlängerung bei 68 °C.

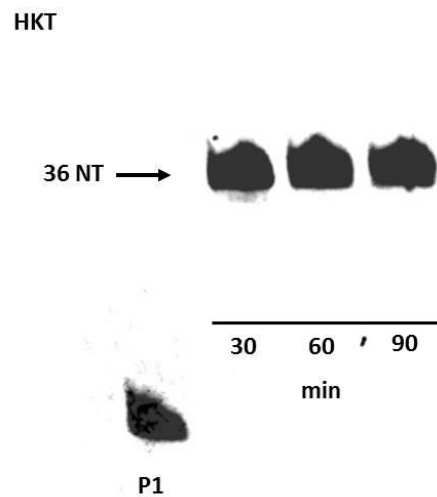
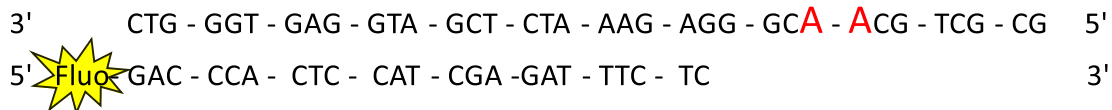


Abbildung 32: PAGE-Analyse eines „running start“ Experiments (**T2/P1**), das unter Verwendung der Hemo KlenTaq (**HKT**) Polymerase bei 37 °C durchgeführt wurde. **P1**: unverlängerter Primer

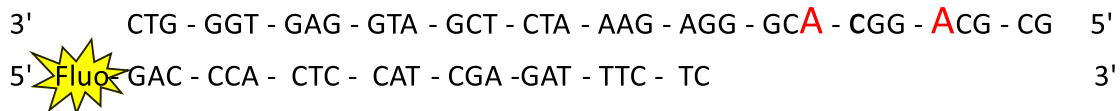
Als nächstes wurde das Triphosphat im Hinblick auf seine Temperaturkompatibilität untersucht. Dazu wurde der „running start“ Experimentaufbau gewählt, aber die Verlängerungsexperimente wurden durch Inkubation bei 37 °C durchgeführt. Ein effizienter Einbau, auch bei niedrigen Temperaturen, ist im Hinblick auf eine mögliche *in vivo* Anwendung oder eine Anwendung in komplexeren biologischen Medien sinnvoll. Abbildung 32 zeigt die PAGE-Analyse eines mit der Hemo KlenTaq-Polymerase durchgeführten Verlängerungsexperiments bei 37 °C. Nach 30 Minuten Inkubationszeit sind weder unverlängerter Primerstrang, noch Abbruchstränge, sondern ausschließlich der vollständig verlängerte Strang zu beobachten. Auch nach längerer Inkubation entsteht ausschließlich das gewünschte Produkt mit einer Länge von 36 Nukleotiden.

Würde an Stelle des speziell geplanten und hergestellten Templatstranges ein, aus einem Organismus stammendes, Oligonukleotid als Matrix zur Primerverlängerung genutzt, so hätte man es nicht mit nur einem einzigen Einbau des artifiziellen Triphosphates zu tun. Ein multipler Einbau, an zufällig über den Strang hinweg verteilten Stellen, wäre nötig. Um Voraussagen über die Einbauleistung von **dTetTP** unter solchen Bedingungen treffen zu können, wurden drei weitere Templatstränge entworfen, bei denen **dTetTP** zweifach, direkt benachbart (**T4**), zweifach mit Abstand (**T5**) oder aber dreifach direkt benachbart (**T6**) eingebaut werden musste (siehe Abbildung 33).

T4/P1



T5/P1



T6/P1

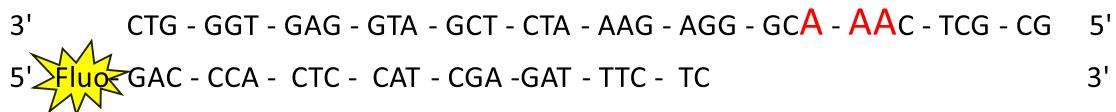


Abbildung 33: Templat- und Primerstränge für die Primerverlängerungsexperimente mit Mehrfacheinbau. Templat 4 (**T4**) entspricht dem direkt aufeinanderfolgenden Zweifacheinbau, Templat 5 (**T5**) dem unterbrochenen Zweifacheinbau und Templat 6 (**T6**) dem direkt aufeinanderfolgenden Dreifacheinbau. Alle Templatstränge haben eine Länge von 35 Nukleotiden (35 NT). Der Primerstrang trägt am 5'-Terminus eine Fluorescein-Modifikation (Fluo).

Die Mehrfacheinbau-Experimente mit **T4**, **T5** und **T6** wurden zunächst alle mit den Polymerasen Hemo KlenTaq und DeepVent (siehe Abbildung 34) bei 37 °C durchgeführt. Die zur Auswertung angefertigten Polyacrylamidgele zeigten, unabhängig vom Templat, keine vollständige Verlängerung, sondern Abbruchstränge mit einer Länge zwischen **P1** und dem kompletten Strang, wie in Abbildung 34 zu sehen ist.

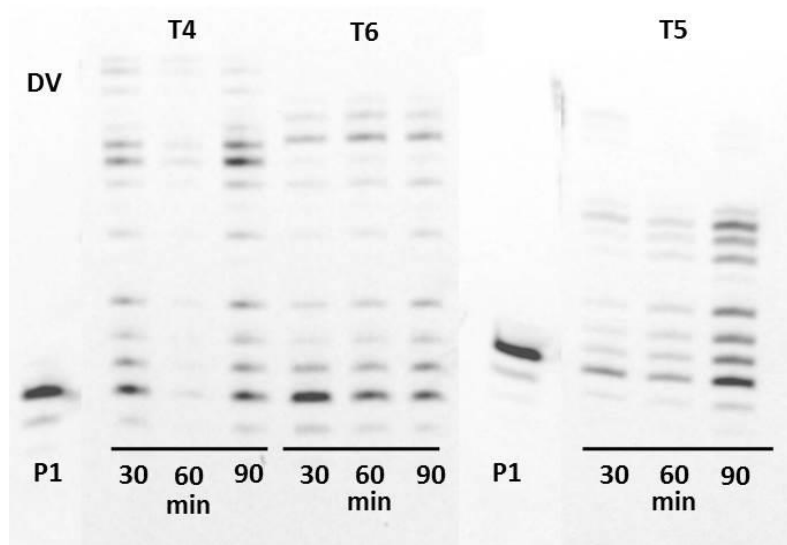


Abbildung 34: PAGE-Analyse der Primerverlängerungsexperimente mit Mehrfacheinbau (**T4/P1**, **T5/P1**, **T6/P1**). Zur Verlängerung wurde die Deep Vent Polymerase bei 37 °C genutzt. **P1**: Unverlängerter Primer

Um eine vollständige Verlängerung des Primerstranges und den Mehrfacheinbau von **dTetTP** zu erreichen, wurden die Verlängerungsexperimente noch einmal bei 70 °C mit den Polymerasen DeepVent, Hemo KlenTaq und KOD durchgeführt. Dabei ergab sich für die Auswertung des DeepVent-Experimentes das in Abbildung 35 gezeigte Ergebnis. Der Referenzstrang **P1** zeigt, zusätzlich zur intensiven Fluoreszenz des gezeigten Primerstranges (Abbildung 33), eine schwächere Bande mit höherer Mobilität. Dies entspricht dem, im kommerziell erhaltenen Strang bereits vorhandenen, um eine Base verkürzten Oligonukleotid als Verunreinigung. Für die Verlängerungsexperimente ergibt sich ein einheitliches Bild. Bereits nach 30 Minuten Inkubationsdauer ist in allen drei Fällen nur die Bande des vollständig verlängerten Oligonukleotids zu beobachten. Auch bei längeren Inkubationszeiten zeigen sich keine Abbauprodukte. Von der relativen Lage der Banden zueinander lässt sich eine Aussage über den erfolgreichen Mehrfacheinbau treffen. Beim Vergleich der Gelbande, für die Verlängerung entsprechend **T6** (Dreifacheinbau), mit der des Produkts der Verlängerung entlang **T4** (Zweifacheinbau), stellt man fest, dass die **T6**-Bande trotz gleicher Länge des Oligonukleotids nach oben versetzt ist. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass statt zwei, drei der sterisch anspruchsvollen Tetrazoleinheiten entlang des wachsenden Stranges aneinandergereiht wurden.

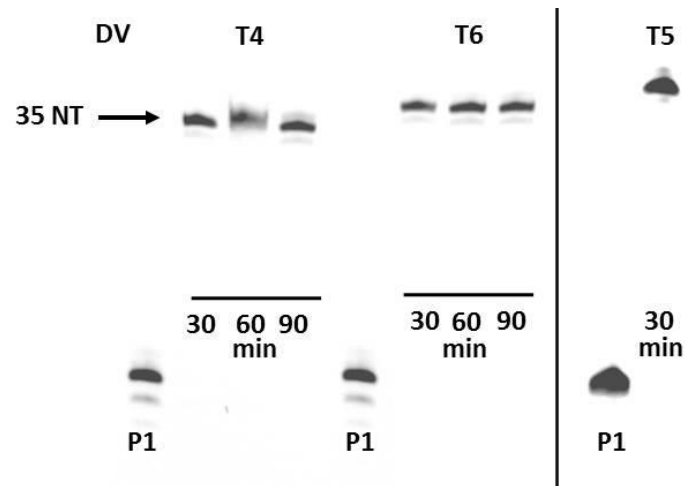


Abbildung 35: PAGE-Analyse der Primerverlängerungsexperimente mit Mehrfacheinbau (**T4/P1**, **T5/P1**, **T6/P1**). Zur Verlängerung wurde die Deep Vent(-exo) Polymerase bei 70 °C genutzt. **P1:** Unverlängerter Primer

Im nächsten Schritt sollte nun die Markierung der enzymatisch hergestellten Oligonukleotide in einem „Photoclick“-Experiment getestet werden. Als Dipolarophil wurde wieder auf den bereits unter 4.3 genutzten sulfonylierten, maleimidmodifizierten Cy3 Farbstoff (**SulfoCy3**) zurückgegriffen. Dieser ließ sich einerseits bereits erfolgreich in der „Photoclickreaktion“ einsetzen und zeigt andererseits einen Absorptionsbereich, der sich ausreichend von dem von Fluorescein unterscheidet, so dass beide Farbstoffe getrennt voneinander auf der Gelmatrix detektiert werden können (siehe Abbildung 36).

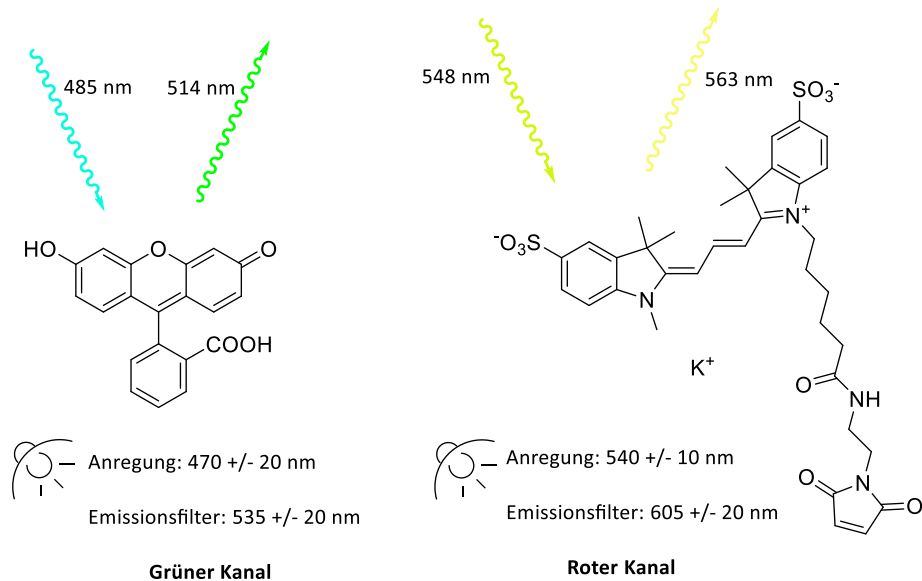


Abbildung 36: Zur Analyse des "Photoclick"-Experimentes auf dem Polyacrylamidgel genutzte Farbstoffe. Fluorescein (links) wird bei 485 nm angeregt und emittiert bei 514 nm, dies wird in den Aufnahmen der Gele als grün dargestellt. **SulfoCy3** (rechts) dagegen, hat sein Absorptionsmaximum bei 548 nm und emittiert bei 563 nm maximal. Dies wird in den folgenden Polyacrylamidgelen rot dargestellt.

Zur Durchführung des „Photoclick“-Experimentes wurde eine Primerverlängerung mit **T2/P1** in 50-fach vergrößertem Maßstab durchgeführt. Dabei wurde die Hemo KlenTaq Polymerase genutzt und die Verlängerung bei 37 °C durchgeführt. Aus der Reaktionsmischung wurden direkt 300 µL entnommen und mit 10 Äquivalenten SulfoCy3 vermischt. Das „Photoclick“-Experiment wurde in der Quarzglasküvette für 30 Minuten mit Licht einer Wellenlänge von 369 nm bestrahlt. Anschließend wurde eine Probe entnommen, mit Ladepuffer versetzt und wiederum eine Gelelektrophorese durchgeführt.

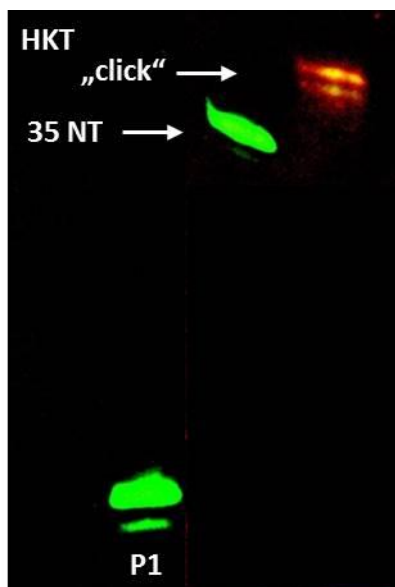


Abbildung 37: PAGE-Analytik des „Photoclick“-Experiments eines mit Hilfe der Hemo KlenTaq (**HKT**) Polymerase enzymatisch verlängerten Stranges (**T2/P1**). Die Belichtung mit 10 Äquivalenten des Farbstoffes **SulfoCy3** wurde bei 369 nm für 30 min durchgeführt. **P1**: unverlängerter Primer. Zur besseren Auswertbarkeit wurden einige der Signale auf dem Gel, die zum freien **SulfoCy3** Farbstoff gehören ausgeblendet.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese in Abbildung 37 zeigt, dass auch im vergrößerten Ansatz die Verlängerung des Primerstranges quantitativ erfolgt. Im Vergleich des Verlängerungsproduktes mit der Reaktionsmischung der „Photoclickreaktion“ zeigt sich, dass durch die Belichtung eine Bande mit verminderter Mobilität entsteht. Die Doppelbande rührt vermutlich von der bereits beschriebenen Verunreinigung der Primers her. Diese fluoresziert sowohl bei Anregung bei 485 nm (grüner Kanal) wie auch bei Anregung mit 548 nm (roter Kanal). Beide Signale liegen direkt aufeinander und belegen, dass sowohl Fluorescein- wie auch **SulfoCy3**-Modifikation vorhanden sind. Da kein Signal auf Höhe des unmodifizierten Stranges sichtbar ist, kann von vollständigem Umsatz ausgegangen werden. Zur postsynthetischen Modifikation der mehrfach tetrazolmodifizierten Oligonukleotide wurde analog vorgegangen. Das Gel für die „Photoclickreaktion“ des zweifach konsekutiv modifizierten Stranges (entsprechend **T4**) zeigt, dass im Falle der Belichtung eine zweite Bande mit geringerer Mobilität entsteht (siehe Abbildung 38). Dies deutet auf eine Reaktion des Tetrazols hin. Bei Betrachtung des Ergebnisses der Verlängerung entlang **T5**, also der zweifachen Modifikation mit Abstand, sind deutlich zwei neu entstandene Banden mit geringerer Mobilität auszumachen (siehe Abbildung 38). Diese können dem einfach- und zweifach abreagierten Tetrazol zugeordnet werden. Im Falle des entlang **T6** verlängerten,

dreifach modifizierten Stranges, ist nur die schwache Formation einer weiteren Bande oberhalb der nicht belichteten Probe zu beobachten (siehe Abbildung 38).

Da allerdings in keinem Fall eine der neu entstandenen Banden eine Fluoreszenz im roten Kanal aufzeigt, kann davon ausgegangen werden, dass lediglich eine unspezifische Reaktion mit dem umgebenden Lösungsmittel, nicht aber mit dem gewünschten Reaktionspartner **SulfoCy3** stattgefunden hat.

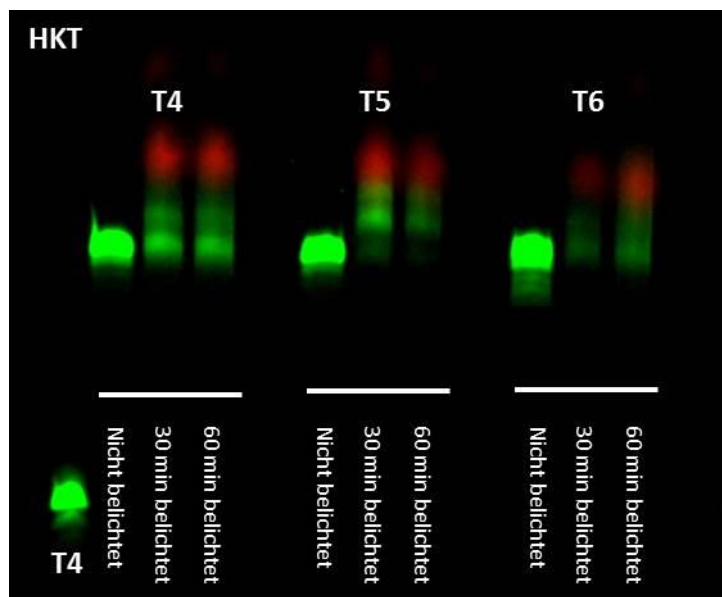


Abbildung 38: PAGE-Analytik der „Photoclick“-Experimente an den verlängerten Strängen mit Mehrfacheinbau (**T4/P1**, **T5/P1**, **T6/P1**). Diese wurden mit Hilfe der Hemo KlenTaq (**HKT**) Polymerase bei 68 °C innerhalb von 30 min synthetisiert. Die Belichtung in der Mischung mit 100 Äquivalenten **SulfoCy3** Farbstoff (bezogen auf $n(\mathbf{P1})$) erfolgte in der unbehandelten Reaktionslösung bei 369 nm für die angegebenen Zeiträume. Zur besseren Auswertbarkeit wurden einige der Signale auf dem Gel, die zum freien **SulfoCy3** Farbstoff gehören ausgeblendet. Die noch zu sehende, rote Fluoreszenz gehört ebenfalls zum freien Farbstoff **SulfoCy3**.

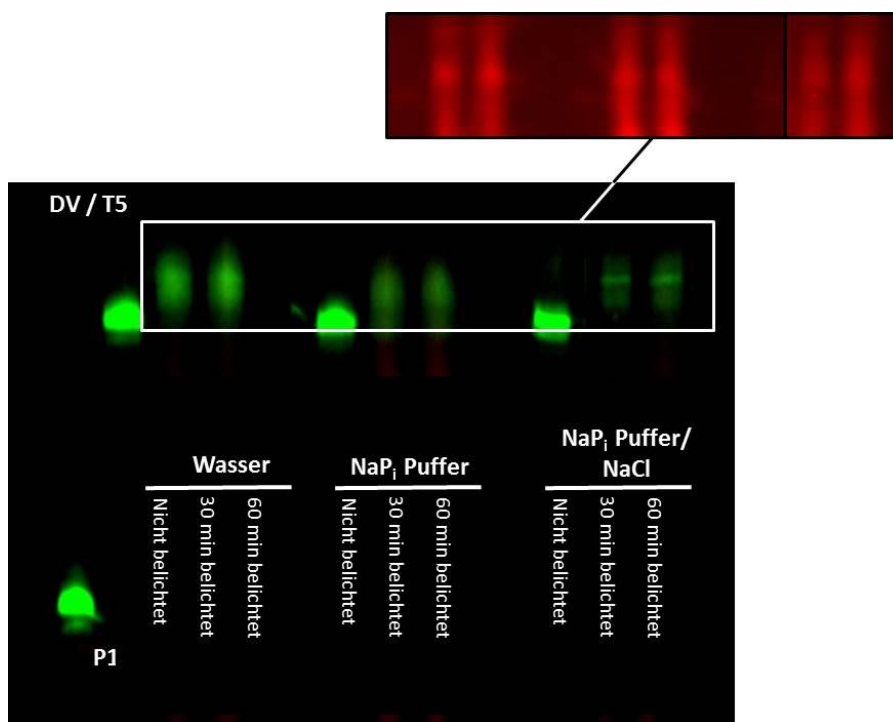
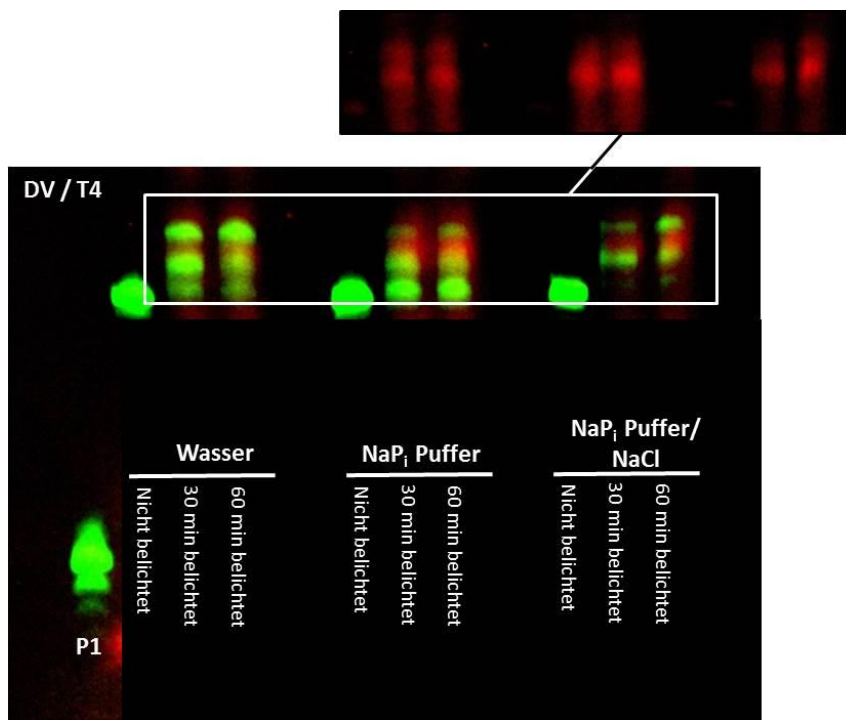


Abbildung 39: PAGE-Analytik der „Photoclick“-Experimente am konsekutiv zweifach modifizierten Strang (**T4/P1**) (oben) und am mit Abstand zweifach modifizierten Strang (**T5/P1**) (unten). Die Synthese erfolgte mit Hilfe der DeepVent Polymerase bei 70 °C für 30 min. Die Reaktionsmischung wurde mit RotiPhenol® und Chloroform extrahiert und die DNA ausgefällt. Die resuspendierte DNA wurde mit 50 Äquivalenten **SulfoCy3** (bezogen auf n(**P1**)) im jeweiligen Lösungsmittel für den angegebenen Zeitraum bei 365 nm belichtet. Hervorgehoben ist der Kanal der Fluoreszenz von **SulfoCy3** bei 535 ±20 nm im markierten Bereich. Zur besseren Auswertbarkeit wurden Signale auf dem Gel, die zum freien **SulfoCy3** Farbstoff gehören ausgeblendet.

Um die Bedingungen, unter denen die „Photoclickreaktion“ abläuft, besser kontrollieren zu können, wurde die DNA aus den Reaktionsmischungen der Primerverlängerungen extrahiert und anschließend ausgefällt. Die isolierte, in Wasser, oder NaP_i -Puffer, oder NaP_i Puffer mit NaCl wieder aufgenommene DNA wurde anschließend mit 50 Äquivalenten des **SulfoCy3** Farbstoffes versetzt und, wie bereits beschrieben, belichtet. Dabei ergaben sich die in Abbildung 39 und Abbildung 40 gezeigten Ergebnisse. Für die konsekutive Zweifachmodifikation (Abbildung 39, oben) zeigt sich, dass bei der gewählten Art der Aufarbeitung in allen drei Lösungsmittelsystemen eine erfolgreiche Modifikation möglich ist. In allen drei Fällen entstehen zwei neue Banden mit verminderter Mobilität, die untere entsprechend dem einfachen und die obere dem doppelten „Clickprodukt“, die sowohl im grünen, wie auch im roten Kanal eine Fluoreszenz zeigen. Unterschiede zeigen sich jedoch bei der Effektivität der Modifikation (siehe Tabelle 5). Darauf wird im Folgenden näher eingegangen.

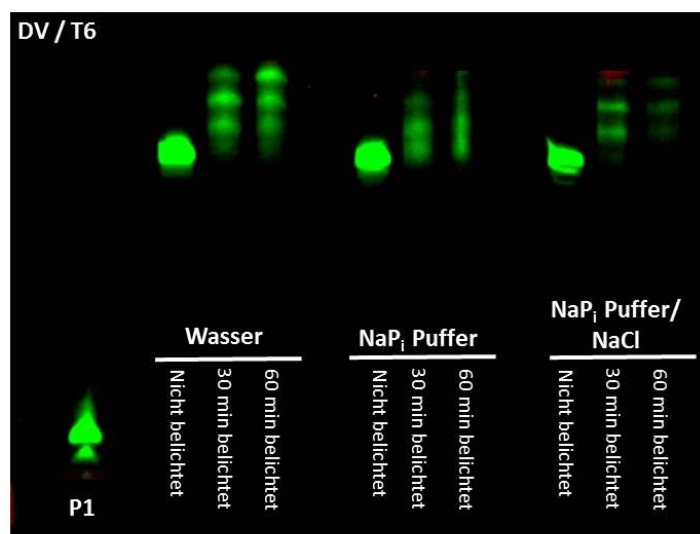


Abbildung 40: PAGE-Analytik der „Photoclick“-Experimente am konsekutiv dreifach modifizierten Strang (T6/P1). Die Synthese erfolgte mit Hilfe der DeepVent Polymerase bei 70 °C für 30 min. Die Reaktionsmischung wurde mit RotiPhenol® und Chloroform extrahiert und die DNA ausgefällt. Die resuspendierte DNA wurde mit 50 Äquivalenten **SulfoCy3** im jeweiligen Lösungsmittel für den angegebenen Zeitraum bei 365 nm belichtet. Zur besseren Auswertbarkeit wurden Signale auf dem Gel, die zum freien **SulfoCy3** Farbstoff gehören ausgeblendet.

Tabelle 5: Über die Integrale des Fluoreszenzsignals im grünen Kanal bestimmte Ausbeuten [%] der "Photoclickreaktionen" mit den verschiedenen Templatsträngen. Mit X markierte Felder konnten auf Grund der Lage der Banden und der Gelbeschaffenheit nicht ausreichend genau integriert werden. Die mit * gekennzeichneten Felder zeigen die Ausbeuten im ausschließlich grünen Kanal. In der mit ** gekennzeichneten Zeile konnte nicht zwischen Einfach- und Zweifachmodifikation unterschieden werden, da die Signale sich zu stark überlappten.

Templat 4 – Ausbeuten bei konsekutivem Zweifacheinbau [%]

	H ₂ O		NaP _i Puffer (10 mM)		NaP _i Puffer + NaCl (10 mM + 250 mM)	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
Belichtungsdauer	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
Unmodifiziert	23	22	47	48	20	19
Einfach modifiziert	42	33	36	31	50	41
Doppelt modifiziert	35	44	17	21	30	40

Templat 5 – Ausbeuten bei Zweifacheinbau mit Abstand [%]

	H ₂ O		NaP _i Puffer (10 mM)		NaP _i Puffer + NaCl (10 mM + 250 mM)	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
Belichtungsdauer	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
Unmodifiziert	0	0	29	22	0	0
Modifiziert**	100	100	71	78	100	100

Templat 6 – Ausbeuten bei konsekutivem Dreifacheinbau [%]

Belichtungsdauer	H ₂ O		NaP _i Puffer (10 mM)		NaP _i Puffer + NaCl (10 mM + 250 mM)	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
Unmodifiziert	13	11	35	X	13	10
Einfach modifiziert	33	23	39	X	39	30
Doppelt modifiziert	36	31	18	X	33	35
Dreifach modifiziert	19	34	8	X	15	25

Während in der gepufferten Lösung nach 60 Minuten 48 % nicht umgesetzt waren und nur 21 % doppelt modifiziert wurden, konnten in Puffer, der NaCl enthielt, und in reinem Wasser 40 bzw. 44 % doppelt modifiziert werden. Der höchste Umsatz kann erreicht werden, wenn im NaCl-haltigen Puffer für 60 Minuten belichtet wird. Dabei verbleiben weniger als 19 % des nicht „geclickten“ Stranges. Dieser Trend zeigt sich auch für den entlang **T5** gebauten, doppelt mit Abstand modifizierten DNA-Strang. Da hier im Gel, auf Grund der diffusen Bande, nicht zwischen einfach- und zweifachmodifiziert unterschieden werden kann, wird nur zwischen nicht „geclicktem“ und nicht umgesetzten Strang differenziert. Es zeigte sich, dass sowohl in Wasser wie auch in NaCl-haltigem Puffer kein unmodifizierter Strang auf dem Gel detektierbar war. Das heißt, dass alles entweder einfach oder doppelt modifiziert worden sein musste. Allein für den NaP_i Puffer zeigte sich, dass nach 30 Minuten 29 % und nach 60 Minuten 22 % nicht umgesetzter Strang zurückblieben. Die Verbesserung von doppelt mit Abstand zu doppelt konsekutiv modifiziertem Strang ergibt sich dadurch, dass den beiden Tetrazoleinheiten, durch drei Nukleotide getrennt, mehr Platz um sich herum zur Verfügung steht. Dadurch wird die Diffusion des sterisch anspruchsvollen **SulfoCy3** Farbstoffes erleichtert und die Reaktion mit der Maleinimidfunktion kann erfolgen. Bei der Analyse des Gels für den entsprechend **T6** synthetisierten Stranges zeigen sich zwar nach der Belichtung sehr deutlich drei neu formierte Banden oberhalb des vollständig verlängerten

Stranges, allerdings weisen diese keine Fluoreszenz im roten Kanal auf, sind also nicht das Produkt der Reaktion mit **SulfoCy3**. Stattdessen ist es wahrscheinlich, dass hier die Reaktion mit Wasser als umgebendem Lösungsmittel stattgefunden hat und so das ein-, zwei- und dreifach modifizierte Hydrazon entstanden ist. Dies ist erneut auf den schlechten Zugang zu den drei benachbarten Tetrazoleinheiten zurückzuführen. Diese liegen einerseits räumlich nahe beieinander und können andererseits, durch die Konjugation mit den planar liegenden Arylringen stark miteinander wechselwirken.

Zusammengefasst lässt sich also folgern, dass die postsynthetische Mehrfachmodifikation mit der „Photoclickreaktion“ möglich ist. Die erzielten Ausbeuten können verbessert werden, wenn die zu modifizierenden Tetrazoleinheiten durch einige Nucleoside getrennt im Strang vorliegen und außerdem in NaCl-haltigem Puffer gearbeitet wird. Durch Verlängerung der Belichtungszeit von 30 auf 60 Minuten lassen sich die Ausbeuten dagegen nur noch wenig steigern.

Alle soeben beschriebenen „Photoclick“-Experimente wurden statt mit der ausgefällten und wieder gelösten DNA auch mit lediglich entsalzten PEX-Lösungen durchgeführt. Bei den dabei erhaltenen Ergebnissen (PAGE-Ergebnisse hier nicht gezeigt) wurde durchweg weniger gewünschtes Produkt erhalten als bei den gezeigten Experimenten.

4.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion, die 1983 von Kary Mullis entwickelt wurde und für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt, ermöglicht es, einen einzigen DNA-Strang innerhalb kürzester Zeit millionenfach zu kopieren.^[132] Die PCR nutzt dabei eine sich wiederholende Abfolge aus Schmelzen des DNA-Doppelstranges, Anlagern von Primersträngen und Primerverlängerung durch eine Polymerase aus (siehe Abbildung 41).

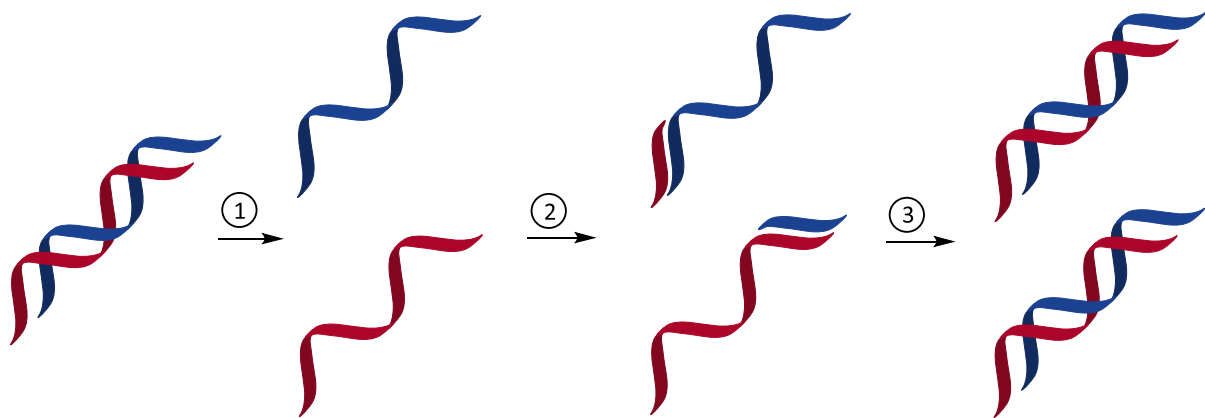


Abbildung 41: Prinzip der Polymerasekettenreaktion: Die, im Doppelstrang vorliegende, zu kopierende DNA wird in Schritt 1 durch Erhitzen auf über 90 °C aufgeschmolzen. Im zweiten Schritt werden zu den 5'-Enden des zu kopierenden DNA-Abschnitts komplementäre Primerstränge im sogenannten „Annealing“ mit den Templatsträngen hybridisiert. Anschließend erfolgt in Schritt 3 die Synthese des neuen DNA-Stranges in 5'-3'-Richtung. Diese Abfolge wird 20-40 Mal wiederholt.

Damit eine, von den fünf natürlichen Basen abgeleitete, artifizielle Base sich nahtlos in die Biosynthese der DNA einfügen kann, ist es wichtig, dass sie nicht nur effektiv selbst von Polymerasen erkannt und eingebaut wird, sondern auch selbst als Matrix dienen kann, um einen neuen Strang aufzubauen.

Um das Verhalten von **dTetTP** in einem PCR-Experiment zu testen, wurde als Templat das 5442 Basenpaare lange Plasmid pET-21b gewählt. Durch die beiden gewählten Primerstränge wurde ein 374 Basenpaare langer, zu kopierender Bereich flankiert. Die gewählten Konzentrationen für Primer und Triphosphate und das Temperaturprogramm wurden aus einer Veröffentlichung, in der erfolgreich ein artifizielles Triphosphat in der PCR verwendet wird, von *Marx et al.* übernommen.^[80] Als Referenz wurde jedes der Experimente

auch mit allen vier natürlichen Triphosphaten dATP, dGTP, dCTP und dTTP durchgeführt. Die Auswertung der Versuche erfolgte durch PAGE und anschließende Silberfärbung der Gele.

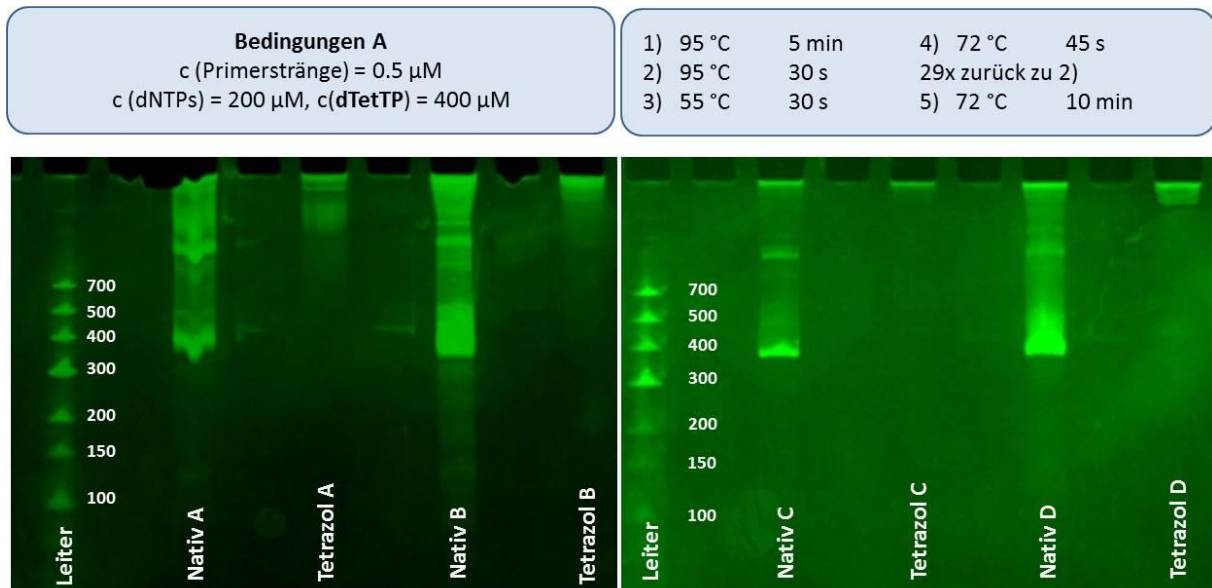


Abbildung 42: Durchgeführte PCR-Experimente. Alle Experimente wurden mit der Hemo KlenTaq Polymerase (HKT) mit den gezeigten Primer- und Triphosphatkonzentrationen (oben links) bei dem gegebenen Temperaturprogramm (oben rechts) durchgeführt. Die ganz links auf den, mit der Silberfärbungstechnik angefärbten, 5 %igen Polyacrylamidgelen aufgetragene DNA-Leiter dient als Referenz zum Vergleich der Größe der DNA-Fragmente. Die Länge ist in Basenpaaren (bp) aufgetragen. Die Konzentrationen und das Temperaturprogramm der gezeigten Experimente sind identisch. Unterschiede gibt es nur bei der Aufarbeitung der Lösungen. „Nativ“ bezeichnet dabei immer das Kontrollexperiment mit nur natürlichen dNTPs und „Tetrazol“ das korrespondierende Experiment mit **dTetTP**. A: Ohne Aufarbeitung; B: Ethanol-Fällung der DNA; C: Extraktion; D: Extraktion und anschließende Fällung.

Um eine optimale Methode zu finden, wurde das Experiment mit den oben gezeigten und unter 6.5.1 beschriebenen Bedingungen mehrfach durchgeführt und die Aufarbeitung variiert. Es zeigte sich, dass, unabhängig von der Art der Aufarbeitung, kein Signal in der Höhe des gewünschten Produktes sichtbar ist. Die Kontrollexperimente (Nativ A-D) zeigen in jedem der Fälle eine deutliche Bande bei 375 bp, was zeigt, dass die PCR grundsätzlich unter diesen Bedingungen möglich ist. Um der Polymerase mehr Zeit für den Einbau des artifiziellen Triphosphats zu geben, wurde als nächstes der Verlängerungsschritt (4) von 45 s auf 5 min verlängert. Doch auch dadurch war keine Produktbildung auf dem Gel zu beobachten. Auch der Einsatz verschiedener Polymerasen (Deep Vent(-exo) (DV), KOD, Terminator I (ThI)) führte nicht zur gewünschten Produktbildung.

In den nächsten durchgeführten Versuchen wurden Additive zur Reaktionsmischung hinzugegeben.^[133] Die Zugabe von DMSO und Betain soll die mögliche Sekundärstruktur der DNA aufbrechen, daher werden diese Zusätze besonders bei Sequenzen mit vielen GC-Paaren häufig eingesetzt. Formamid dagegen bindet in der großen und der kleinen Furche der DNA und destabilisiert somit das doppelsträngige Templat, dadurch sinkt die Schmelztemperatur. Durch die Beigabe von Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) soll wiederum die Hybridisierungsspezifität gesteigert werden.^[134] Doch auch durch Zugabe dieser Additive und Erhöhen der Konzentration an Primer und Triphosphaten (Auszug Bedingungen B: $c(\text{Primer}) = 20 \mu\text{M}$, $c(\text{Triphosphate}) = 5 \text{mM}$, siehe 6.5.1) konnte keine Produktbildung erzielt werden (siehe Abschnitt 6.5.1, Tabelle 16).

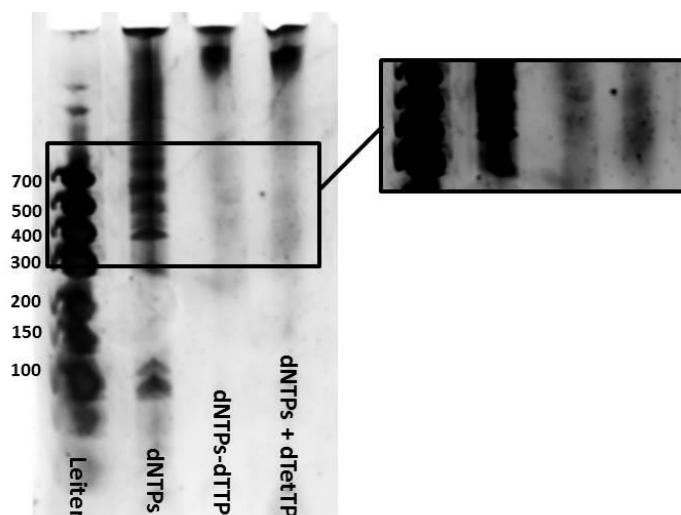


Abbildung 43: PCR-Experiment mit 60 min Verlängerungsschritten (siehe 6.5.1, Tabelle 16, Eintrag 12).

Erst nachdem die im PCR-Temperaturprogramm ablaufenden Verlängerungsschritte auf 30 bzw. 60 min erhöht wurden, ließ sich auf Höhe der erwarteten Produktbande eine schwache Färbung erreichen. Somit gelang zwar keine spezifische Vervielfältigung des gewünschten Abschnittes mit hoher Ausbeute, allerdings zeigt dies, dass der Einbau im Rahmen eines PCR Experimentes wohl prinzipiell möglich ist, falls die Bedingungen in hohem Maße optimiert wurden. Dieses erste, schwache Produktsignal bedeutet den 66-fachen Einbau des artifiziellen Triphosphats, wobei elf Mal zwei **dTetTP** direkt nacheinander eingebaut werden mussten.

4.5 Untersuchung des Absorptionsverhaltens weiterer Tetrazolgerüste

Die potentiellen Vorteile der „Photoclickreaktion“ gegenüber anderen bioorthogonalen Reaktionen zeigen sich, wenn in der Zukunft mögliche Anwendungen betrachtet werden. Durch die Induktion mit Licht könnte sie zum Beispiel in der medizinischen Diagnostik oder Therapie eingesetzt werden. Damit solche Anwendungen denkbar werden, ist es wichtig, dass durch die Reaktion selbst kein Schaden an Gewebe oder DNA hervorgerufen wird. Wie bereits zu Anfang besprochen, wurde die Struktur des bisher genutzten Diaryltetrazols so gewählt, um eine Anregung außerhalb der Eigenabsorption von Nukleinsäuren zu ermöglichen.

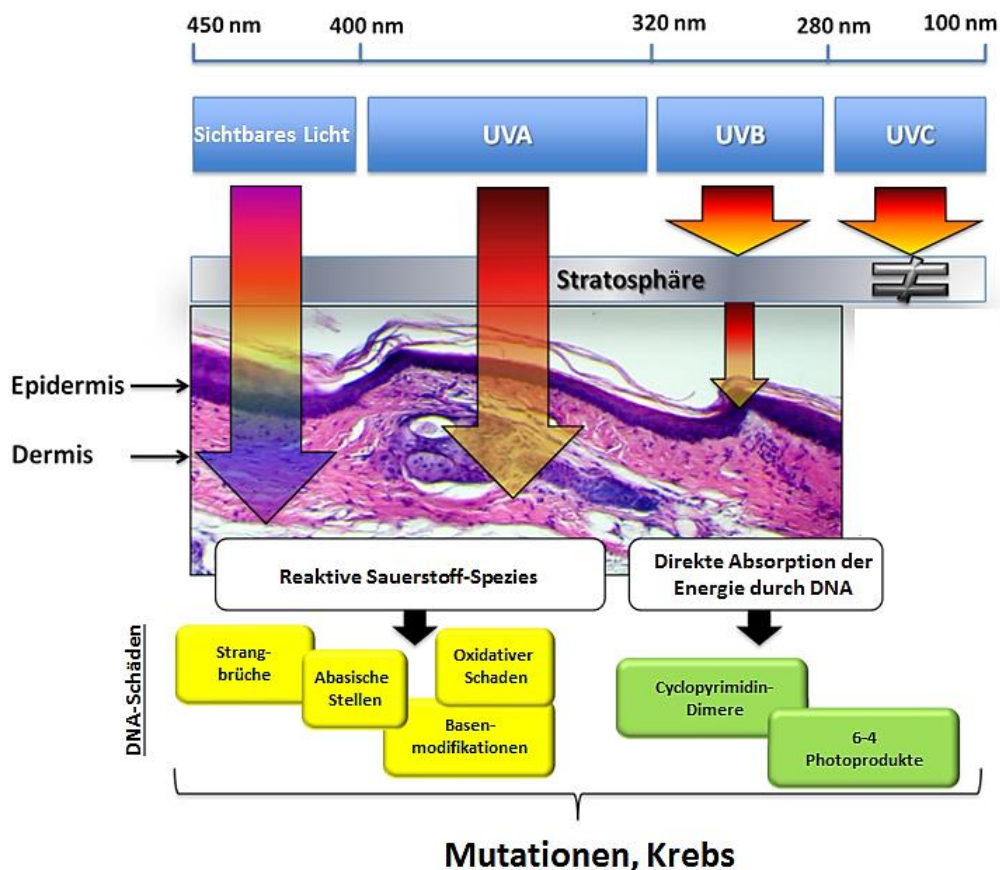


Abbildung 44: Wirkung von Licht verschiedener Wellenlängen auf die DNA.^[135]

Allerdings können, wie in Abbildung 44 zu sehen, Schäden am Erbgut auch bei Einstrahlung von Licht höherer Wellenlängen entstehen. Deshalb ist es wichtig, Tetrazolgerüste zu finden, deren Absorption in einem höheren Wellenlängenbereich liegt. Hierfür wurden Coumarin, Xanthon und Pyren als Chromophore ausgewählt, das entsprechende Tetrazol synthetisiert und auf die Eignung zur Anwendung in DNA hin untersucht (siehe Abbildung 45).

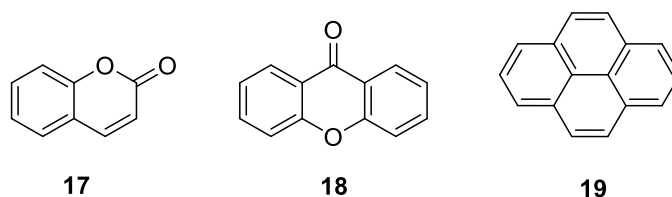


Abbildung 45: Mit Tetrazol zu verknüpfende Grundstruktureinheiten: Coumarin (**17**, links), Xanthon (**18**, Mitte), Pyren (**19**, rechts).

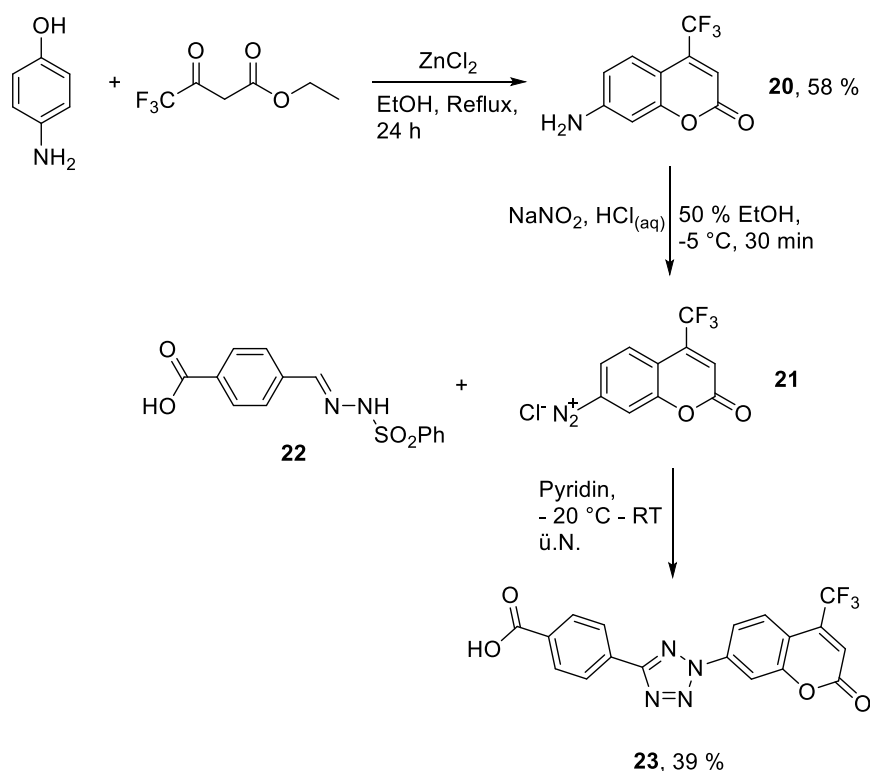
Coumarin kommt als sekundärer Pflanzenstoff zum Beispiel in Waldmeister oder Tonkabohnen vor und hat einen angenehmen, würzigen Geruch.^[136] Durch strukturelle Modifikation lassen sich allerdings die optischen und photochemischen Eigenschaften steuern, so dass Coumarinderivate als Laserfarbstoffe, in Solarzellen oder in der molekularbiologischen Bildgebung ihre Anwendung finden.^[137-140]

Xanثone (siehe Abbildung 45, Mitte) bilden das Grundgerüst der Xanthenfarbstoffe, zu denen viele bekannte Fluoreszenzfarbstoffe, wie Fluorescein oder Eosin, gehören. Xanثone wurden bereits in der Organokatalyse genutzt, um als Sensibilisator Licht zu absorbieren und die Energie auf ein Substrat zu übertragen.^[141]

Pyren findet unter anderem als Fluoreszenzsonde, auch als Basenersatz in DNA, Anwendung.^[142-144] Kürzlich wurde außerdem, wie unter 3.2 beschrieben, in der Gruppe um *Barner-Kowollik* ein pyrenmodifiziertes Tetrazol synthetisiert und erfolgreich zur Verknüpfung von synthetischen Polymeren genutzt.^[93, 145] Daher liegt es nahe, beide Konzepte zu verbinden.

4.5.1 Synthese und spektroskopische Charakterisierung des Coumarintetrazols

Die Synthese des coumarinmodifizierten Tetrazols **23** gelang über drei Stufen mit insgesamt 23 % Ausbeute.



Schema 16: Synthese des mit einem Coumarinderivat modifizierten Tetrazols **23**.

Im ersten Schritt wurden, in Anlehnung an eine literaturbekannte Vorschrift für ein ähnliches Derivat,^[146] die beiden kommerziell erhältlichen Edukte *para*-Aminophenol und Ethyl-4,4,4-trifluoroacetoacetat in absolutem Ethanol gelöst. Dazu wurden 1.2 Äquivalente wasserfreies ZnCl_2 gegeben und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Aufarbeitung wurde im Vergleich zur Literatur allerdings abgewandelt und es wurde auf eine Säulenchromatographie, zu Gunsten einer Aufreinigung durch Ausfällen und anschließendes Waschen, verzichtet. So konnte das trifluormethylierte Coumarin **20** in 58 % Ausbeute erhalten werden. Zur Synthese des Tetrazols nach der *Kakehi*-Methode wurde zunächst die Aminofunktion zu einem Diazoniumsalz (**21**) umgesetzt. Nachdem die Diazoniumsalzlösung über einen Zeitraum von 30 Minuten zu einer, auf -20 °C gekühlten, Lösung des Sulfonylhydrazons (**22**) in Pyridin gegeben wurde, wurde 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die

Reaktionsmischung auf vierprozentige Salzsäure gegeben, wodurch das Produkt **23** mit einer Ausbeute von 39 % erhalten werden konnte.

Als Nächstes wurden die optischen Eigenschaften des Coumarintetrazols **23** und des Coumarins **20** vermessen und miteinander verglichen (siehe Abbildung 46).

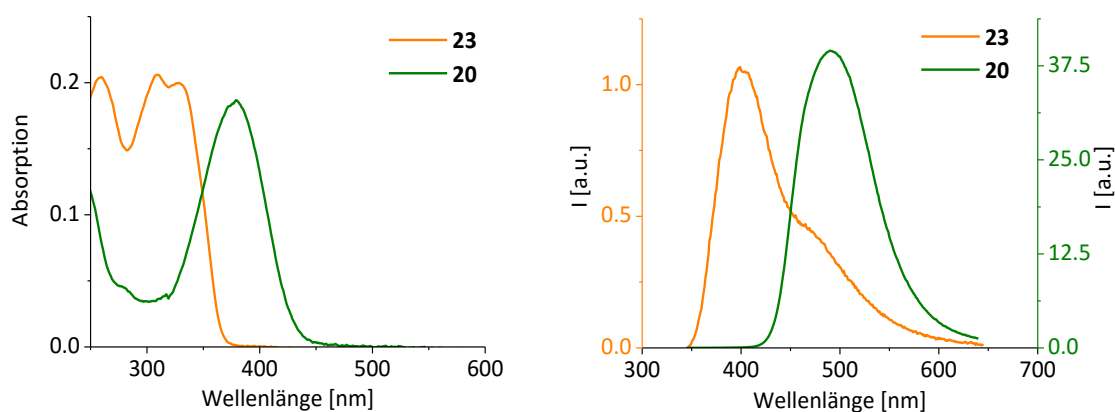


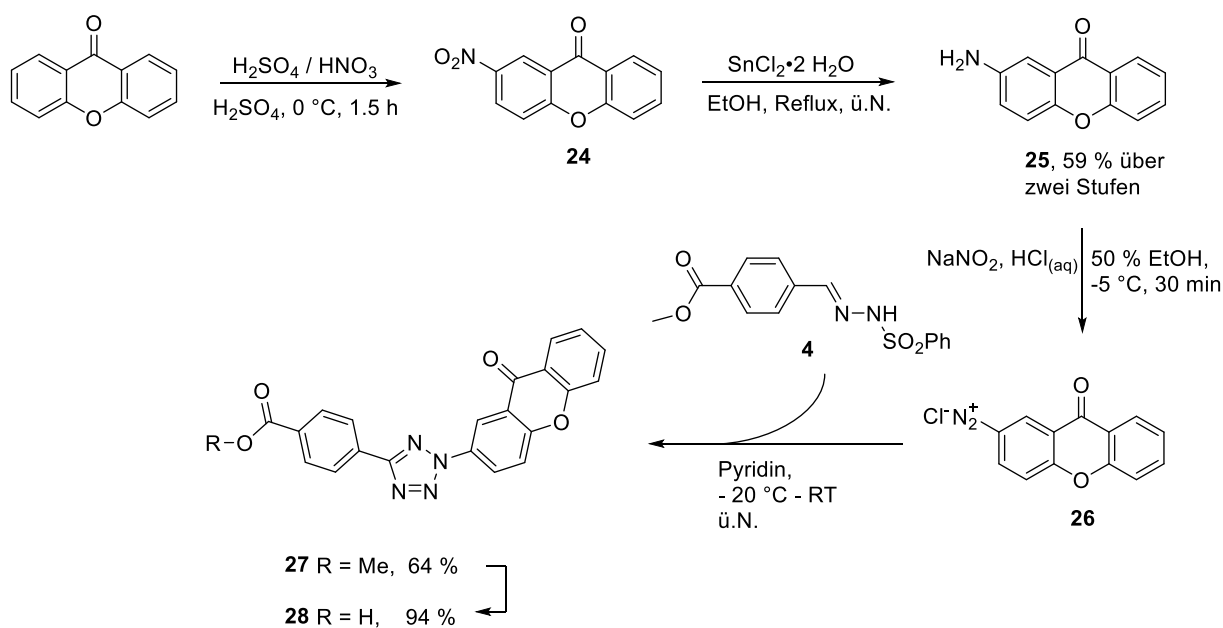
Abbildung 46: Absorptionsspektrum (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) von Coumarin **20** und Coumarintetrazol **23**. Es wurden jeweils 10 μM Lösungen in Methanol (für **20**) bzw. in Methanol + 10 % DMSO (für **23**) vermessen. Die Anregung erfolgte bei 330 nm und einer Spaltweite von 5 nm. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Betrachtet man die Absorption von **23** im Vergleich zu **20**, so zeigen beide einen ähnlichen Extinktionskoeffizienten an ihrem Absorptionsmaximum. Die Wellenlänge des Maximums ist im Falle des Tetrazols um 49 nm von 379 nm auf 330 nm hypsochrom verschoben. Ein ähnliches Verhalten zeigen die gemessenen Fluoreszenzspektren. Das Maximum der Tetrazolfluoreszenz ist hier wiederum von 490 nm auf 399 nm um 91 nm hypsochrom verschoben. Die Intensität des Coumarins beträgt außerdem das 37-fache der Intensität des Tetrazols. Die Verschiebungen von Absorptions- und Fluoreszenzmaxima liegen wahrscheinlich darin begründet, dass dem Coumaringerüst durch das kovalent verknüpfte Tetrazol Elektronendichte entzogen wird. Dadurch wird das HOMO energetisch abgesenkt und der relative Abstand der Grenzorbitale vergrößert sich. Optimale spektroskopische Eigenschaften zeigen Coumarinfarbstoffe, wenn das Amin in 7-Position mit elektronenschiebenden Substituenten, zum Beispiel Alkylresten, modifiziert wird. Im Falle des Tetrazols allerdings wird durch den Benzoessäuresubstituenten sogar ein Elektronenzug ausgeübt. Eine Anregung der „Photoclickreaktion“ wäre im Falle von **23** bis zu einer

Wellenlänge von 374 nm hin möglich. Da dies keine Verbesserung zum zuvor besprochenen Diarytetrazol **5** darstellt, wurde auf die Umsetzung zum Nukleosid und den Einbau in DNA verzichtet.

4.5.2 Synthese und spektroskopische Charakterisierung des Xanthontetrazols

Die Synthese eines xanthonmodifizierten Tetrazolderivats **28** gelang in fünf aufeinanderfolgenden Stufen in einer Gesamtausbeute von 35 %.



Schema 17: Übersicht über die Synthese des xanthonmodifizierten Tetrazols **28**.

Die Synthese begann ausgehend von unmodifizierten Xanthon. Dieses wurde an der 2-Position nitriert.^[147] Eine Mehrfachsubstitution wurde einerseits auf Grund des deaktivierenden Effekts der Nitrogruppe aber andererseits auch durch den Einsatz von nur 0.5 Äquivalenten der Nitriersäure vermieden. Da die Abtrennung des Produkts **24** sich als nicht trivial darstellte und das verbliebene Edukt im nächsten Schritt nicht störte, wurde nach der Nitrierung nur neutral gewaschen und anschließend mit der Reduktion fortgefahren. Diese erfolgte mit Zinn(II)chlorid-Dihydrat in Ethanol mit einer Ausbeute von 59 % (bezogen auf Nitrierung und Reduktion). Mit dem so erhaltenen aminmodifizierten Xanthon **25** konnte entsprechend der bereits beschriebenen *Kakehi*-Methode das Tetrazol synthetisiert werden. In diesem Fall fällt das Produkt direkt aus der Reaktionslösung aus, so dass nach 3 h das feste Produkt **27** mit 64 % Ausbeute aus der Lösung abgesaugt werden konnte. Anschließend wurde der Ester **28** durch 17 h Rühren mit LiOH und anschließende, saure Aufarbeitung zur freien Säure umgesetzt.

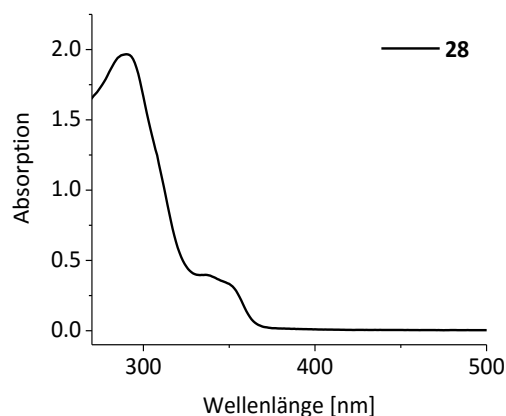
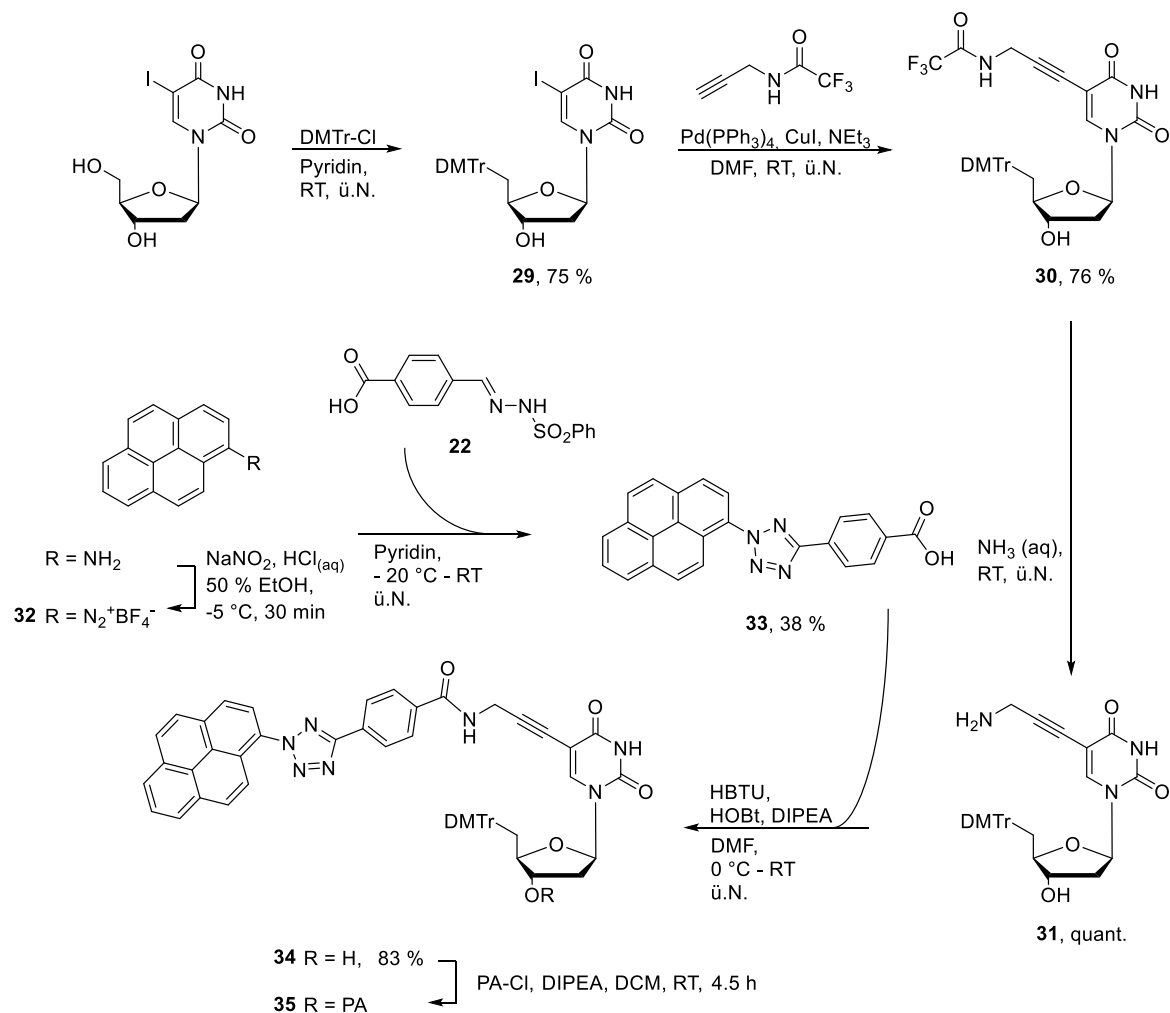


Abbildung 47: Absorptionsspektrum des Xanthontetrazols **28**. Es wurde eine 56 μM Lösung in DMSO bei 20 °C vermessen.

Im Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 47) des hergestellten Xanthontetrazols **28** ist zu sehen, dass dieses ein Maximum bei einer Wellenlänge von 290 nm aufweist. Außerdem existiert ein weiteres, lokales Maximum bei einer Wellenlänge von 336 nm, welches in einer Schulter in Richtung des sichtbaren Bereiches bis zu einer Wellenlänge von ungefähr 370 nm ausläuft. Da auch hier der Bereich der Absorption nicht den des Diaryltetrazols **5** übersteigt, wurde auch hier auf die kovalente Verknüpfung mit der DNA-Base und den Einbau in DNA verzichtet.

4.5.3 Synthese und spektroskopische Untersuchung des Pyren-tetrazolnukleosids **34**

Die Synthese eines pyrenmodifizierten Tetrazolnukleosids **34** gelang in vier konsekutiven Stufen mit einer Gesamtausbeute von 34 %.



Schema 18: Synthese des pyrenmodifizierten Tetrazolnukleosids **34**.

Die Synthese des ethynyllinkermodifizierten 2'-Desoxyuridins entspricht der in 3.1 beschriebenen, mit der Ausnahme, dass in einem ersten Schritt die 5'-Hydroxyfunktionalität von 2'-Desoxyuridin trityliert wurde (**29**). Auf diese Art ließ sich die Ausbeute der folgenden Sonogashirakupplung von 47 % auf 76 % steigern. Zur Darstellung des pyrenmodifizierten Tetrazols **33** wurde wiederum zunächst das Diazoniumsalz **32** des kommerziell erhältlichen Aminopyrens hergestellt. Allerdings wurde dieses nicht wie zuvor beschrieben mit Chlorid, sondern mit Tetrafluoroborat als Gegenion synthetisiert, was dazu führte, dass das Diazoniumsalz aus der Lösung ausfällt. Dieses konnte abgesaugt werden und als Feststoff zur

auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung des Sulfonylhydrazons **4** in Pyridin hinzugegeben werden. Da hier, wie im Falle des coumarinmodifizierten Tetrazols, die freie Säure des Sulfonylhydrazons verwendet wurde, fiel das Tetrazol beim Waschen mit verdünnter Salzsäure aus und wurde abgesaugt. So konnte das Produkt **33** als tiefrotes Pulver mit 50 % Ausbeute erhalten werden. Um das Tetrazol mit dem Nukleosid zu verknüpfen, wurde analog zur Synthese des Diaryltetrazolnukleosids vorgegangen (siehe 3.1). Dabei wurde das Pyrentetrazolnukleosid **34** mit einer Ausbeute von 83 % erhalten. Anschließend erfolgte noch die Umsetzung zum Phosphoramidit **35** unter sauerstoff- und wasserfreien Bedingungen in trockenem DCM durch Zugabe von DIPEA und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit. Nach dem Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt aus Benzol lyophilisiert.

Vergleicht man die spektroskopischen Eigenschaften des Pyrentetrazolnukleosids **36** mit denen des freien Pyrentetrazols **33**, so ergeben sich sowohl bei Absorption wie auch Fluoreszenz Unterschiede (siehe Abbildung 48).

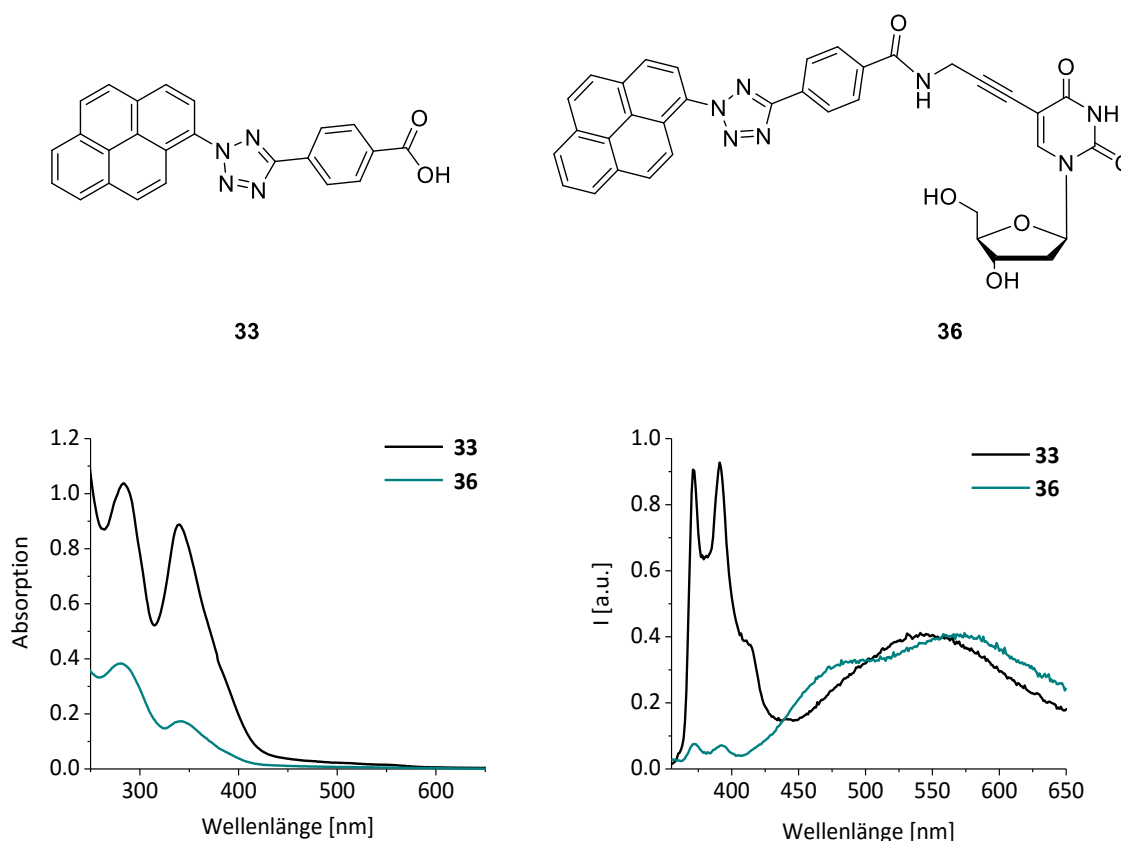


Abbildung 48: Strukturen von Pyrentetrazol **33** und Pyrenmtetrazolnukleosid **36** (oben). Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **33** und **36**. Vermessen wurde eine $88.0\text{ }\mu\text{M}$ Lösung von **33** und eine $88.3\text{ }\mu\text{M}$ Lösung von **36** in DMSO bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Anregungswellenlänge betrug 340 nm und es wurde mit einer Spaltweite von 5 nm für **33** bzw. 6 nm für **36** gemessen.

Betrachtet man das Absorptionsverhalten, so zeigt sich, dass die Intensität am Maximum der Absorption bei 284 nm auf weniger als die Hälfte absinkt, wenn das Tetrazol mit dem Nukleosid verknüpft wird. Das zweite, lokale Maximum bei 340 nm erreicht sogar nur noch etwa 20 % der Intensität des frei vorliegenden Tetrazols. Im Falle der Fluoreszenz beider Stoffe ist der Unterschied sogar noch gravierender. Das Pyrentetrazol **33** zeigt eine, für Pyren charakteristische, Fluoreszenz mit zwei Banden bei 371 nm und 391 nm und einer weiteren, breiteren Bande mit einem Maximum bei 550 nm. Im Spektrum von **36** hingegen ist die Feinstruktur mit Maxima bei 373 nm und 392 nm wesentlich schwächer ausgeprägt und beträgt nur noch etwa 9 % der Intensität von **33**. In gleicher Intensität zeigt sich allerdings die breite Bande, deren Maximum sich um 20 nm bathochrom auf 570 nm verschoben hat, und an deren Seite sich bei 490 nm eine Schulter zeigt. Die Verknüpfung von **33** mit dem Nukleosid **7** führt also zu einem Absinken der Intensität von sowohl Absorption wie Fluoreszenz, sowie dem Verlust der Fluoreszenzfeinstruktur zu Gunsten einer breiteren Emission bei höherer Wellenlänge. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass durch die kovalente Verknüpfung der beiden Moleküle, die Tetrazoleinheit in eine Konformation gezwungen wird, in der die Planarität aufgehoben wird. Die einzelnen, aromatischen Ringe sollten allerdings nicht gegeneinander verdreht vorliegen, denn dies beeinflusst die Delokalisation der Elektronen über das System hinweg und somit auch die optischen Eigenschaften.^[88] Dadurch verringern sich die Intensitäten und der durch einen strahlenden Übergang abgegebene Energiebetrag wird kleiner.

4.5.4 Synthese und spektroskopische Charakterisierung des pyrenmodifizierten Oligonukleotids

Der zuvor synthetisierte Phosphoramiditbaustein **35** wurde zu einer 0.1 M Lösung in absolutem Dichlormethan aufgenommen. Der Kupplungsschritt wurde im Vergleich zu den nicht-artifiziellen DNA-Bausteinen um das 15-fache von 40 s auf 600 s erhöht und die zur Reaktion über die feste Phase gepumpte Menge an Phosphoramiditlösung wurde verdoppelt (siehe 6.3).

Auf diese Art konnte der folgende, 17 Nukleotide lange DNA-Strang synthetisiert werden.

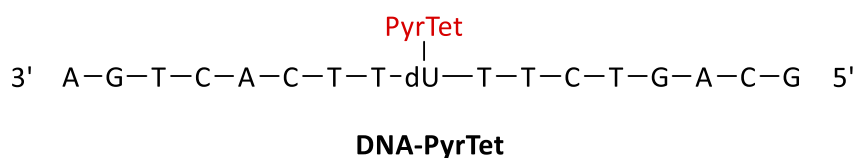


Abbildung 49: Über die automatisierte Festphasensynthese hergestellter DNA-Strang **DNA-PyrTet**

Nach Abtrennung von Abbruchsträngen über RP-HPLC-Chromatographie (siehe 6.3.2) wurde der Erfolg der Synthese durch MALDI-Massenspektrometrie bestätigt.

Anschließend wurde **DNA-PyrTet** absorptions- sowie fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Im Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 50) zeigt sich neben der DNA-Absorption bei 265 nm deutlich die Absorption der Pyrentetrazoleinheit mit einem Maximum bei 361 nm. Dieses liegt im Vergleich mit dem Nukleosid **36** um 21 nm bathochrom verschoben. Da dieses Maximum außerdem bis zu einer Wellenlänge von 415 nm hin ausläuft, sollte mit **DNA-PyrTet** eine Anregung der „Photoclickreaktion“ im sichtbaren Wellenlängenbereich des Lichtes möglich sein.

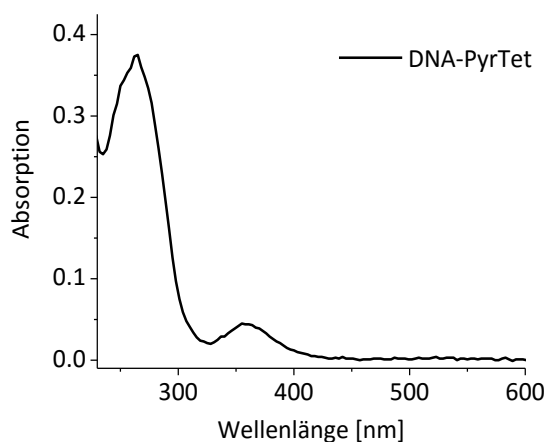


Abbildung 50: Absorptionsspektrum des pyrentetrazolmodifizierten DNA-Stranges **DNA-PyrTet**. Gemessen wurde eine 2.5 μM Lösung in HPLC- H_2O bei Raumtemperatur. Die Messung wurde am ND-1000 Spektrometer der Firma *NanoDrop* durchgeführt.

Bei der Messung der Fluoreszenzspektren (siehe Abbildung 51) fiel auf, dass sich bei wiederholter Messung die Intensität der Fluoreszenzintensität stark änderte. Deshalb wurde eine Messreihe durchgeführt, in der dieselbe Probe mehrfach hintereinander ohne Unterbrechung vermessen wurde. Die Anregung erfolgte dabei bei 350 nm. Die Belichtungsintensität und -dauer während der Messung, waren dabei ausreichend um die Freisetzung von Stickstoff aus dem Tetrazol zu starten. Bei genauer Betrachtung der Fluoreszenzspektren erkennt man neben dem Abfall der Intensität außerdem die Bildung einer zweiten Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei etwa 550 nm. Da die Messung in einer wässrigen Pufferlösung ohne Anwesenheit von weiteren Dipolarophilen durchgeführt wurde, ist diese Bande der Fluoreszenz des gebildeten Hydrazons zuzuordnen.

Bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung des **DNA-PyrTet**-Doppelstranges zeigte sich ein analoges Verhalten. Allerdings erfolgte die Abnahme der Fluoreszenzintensität weitaus langsamer. Während die Intensität im Einzelstrang nach der ersten Messung bereits auf 9 % des Ausgangswertes abgesunken ist, beträgt sie im Doppelstrang noch 66 % des Ausgangswertes. Dies bietet einen Erklärungsansatz dafür, dass im hybridisierten Doppelstrang immer mehr gewünschtes Produkt gebildet wurde, als im Einzelstrang. Da im Einzelstrang die Photolyse des Tetrazols schneller erfolgt, ist früher eine höhere Nitriliminkonzentration vorhanden. Da aber die Diffusionsgeschwindigkeit des Dipolarophils begrenzt ist, reagiert ein größerer Anteil der Nitriliminmoleküle mit den omnipräsenten Lösungsmittelmolekülen. Da im Doppelstrang die Photolyse eine größere Zeitspanne in

Anspruch zu nehmen scheint, ist mehr Zeit für die Diffusion der Dipolarophile. So kann anteilmäßig mehr von dem gewünschten Produkt im Vergleich zum Hydrazon gebildet werden.

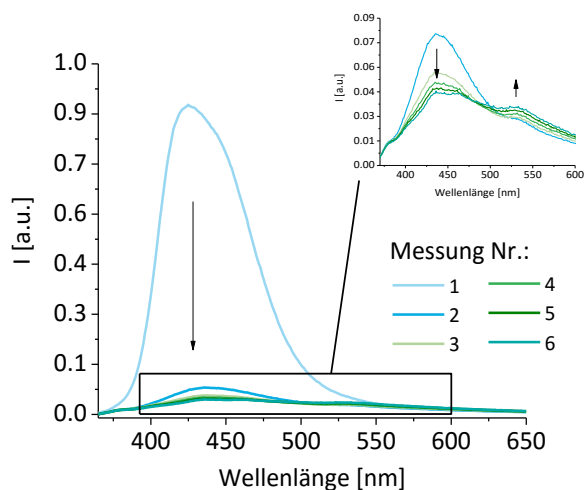


Abbildung 51: Mehrfach direkt hintereinander gemessene Fluoreszenzspektren von **DNA-PyrTet** im Einzelstrang. Gemessen wurde eine 2.5 μM Lösung in H_2O bei 20 °C. Die Anregung erfolgte bei 350 nm und einer Spaltweite von 10 nm.

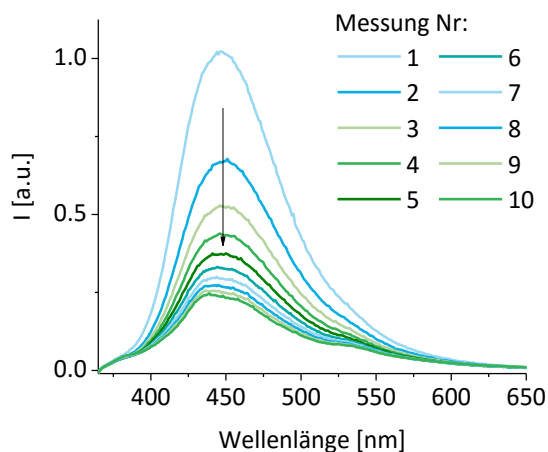


Abbildung 52: Mehrfach direkt hintereinander gemessene Fluoreszenzspektren von **DNA-PyrTet** im Doppelstrang. Gemessen wurde eine 2.5 μM Lösung in H_2O bei 20 °C. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 350 nm und einer Spaltweite von 10 nm.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendung der „Photoclickreaktion“ an Nukleinsäuren erprobt. Dazu wurde das Diaryltetrazolnukleosid **8** synthetisiert und anschließend über automatisierte Festphasensynthese in ein Oligonukleotid eingebracht. Danach wurden die Bedingungen für die „Photoclickreaktion“ untersucht und optimiert. So gelang es zum ersten Mal eine Nukleinsäure durch die lichtinduzierte Reaktion zwischen Tetrazol und Alken postsynthetisch zu modifizieren.

Als Reaktionspartner wurde ein kommerziell erhältlicher, sulfonylierter Cy3-Farbstoff (**SulfoCy3**) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass mehr Produkt gebildet wird, wenn der tetrazolmodifizierte DNA-Strang mit seinem komplementären Gegenstrang hybridisiert eingesetzt wird. Außerdem zeigte sich eine effektivere Reaktion, wenn ein Natriumphosphatpuffer anstatt von reinem Wasser als Lösungsmittel verwendet wurde. Die höchste Produktausbeute wurde erzielt, wenn 30 Minuten mit einer 368 nm LED belichtet wurde.

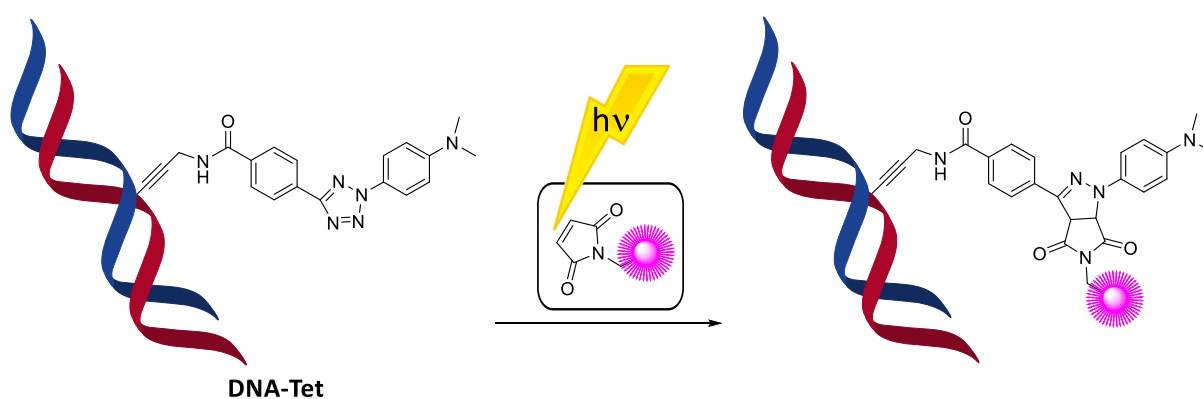


Abbildung 53: Schematische Darstellung der "Photoclickreaktion" am tetrazolmodifizierten Oligonukleotid.

Da das Fernziel die *in vivo* Anwendung der „Photoclick“-Technik ist und die Biosynthese von Nukleinsäuren auf Nukleosidtriphosphaten als Monomeren basiert, wurde als nächstes das diaryltetrazolmodifizierte Nukleosidtriphosphat **15** synthetisiert. Dieses konnte, als einzelne Modifikation, erfolgreich im Rahmen von Primerverlängerungsexperimenten in

Oligonukleotide inkorporiert werden. Die verwendeten Polymerasen Deep Vent(-exo), Vent(-exo) und Hemo KlenTaq wurden bei ihrem jeweiligen Temperaturoptimum bei 72 °C bzw. 68 °C eingesetzt. Bei Verwendung der Hemo KlenTaq Polymerase war ein erfolgreicher Einbau des artifiziellen Triphosphats auch bei 37 °C möglich. Alle Experimente zeigten bereits nach 30 Minuten eine vollständige Synthese des gewünschten Strangs. Anschließend wurde ein mehrfacher Einbau von **15** in Primerverlängerungsexperimenten getestet. Es konnte erfolgreich ein zweifach- sowie dreifach konsekutiv modifizierter Strang sowie ein zweifach mit Abstand modifizierter Strang hergestellt werden. Dazu wurden die Polymerasen Deep Vent(-exo), Vent(-exo), Hemo KlenTaq und KOD bei ihrem jeweiligen Temperaturoptimum für wiederum 30 Minuten, eingesetzt. Als nächstes wurde die „Photoclickreaktion“ auch an den enzymatisch synthetisierten Oligonukleotiden erprobt. Es gelang die erfolgreiche Modifikation der einfach und zweifach modifizierten Stränge. Der dreifach konsekutiv modifizierte Strang konnte auf Grund des großen sterischen Anspruchs von einerseits Tetrazoleinheit und andererseits **SulfoCy3** Farbstoff nicht erfolgreich markiert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass eine mehrfache Markierung problemlos möglich sein sollte, sofern genügend räumlicher Abstand zwischen den einzelnen Tetrazolmodifikationen liegt.

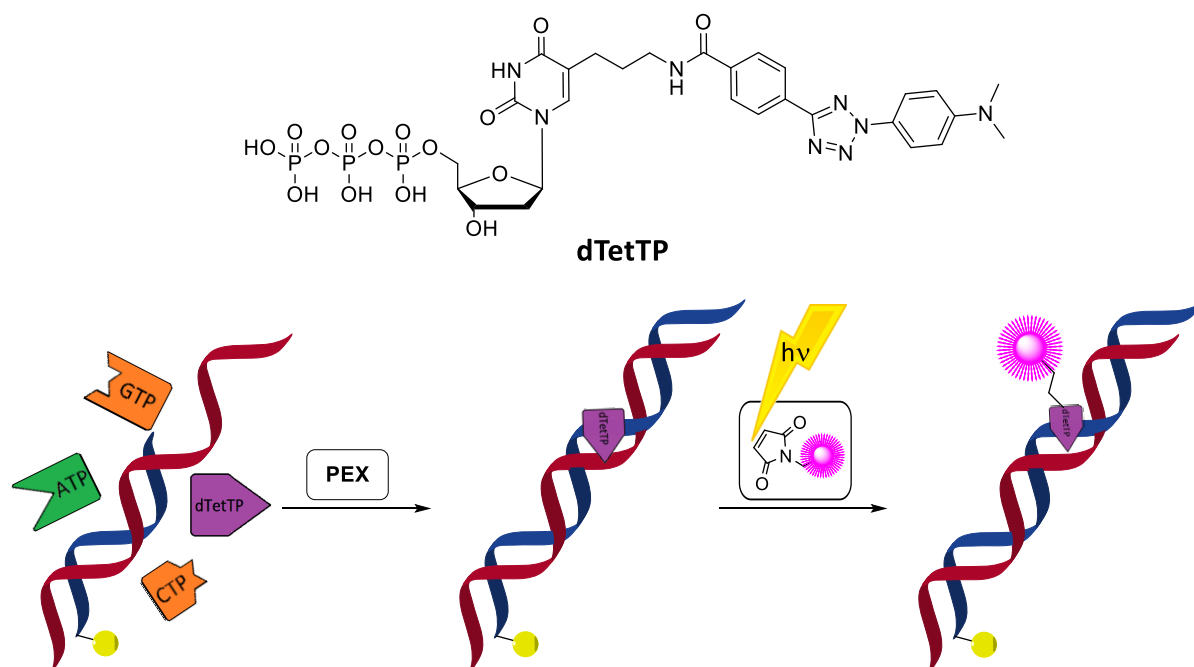


Abbildung 54: Struktur von **dTetTP** (oben) und schematische Darstellung der polymerasegestützten Primerverlängerungsexperimente sowie des "Photoclickexperiments" (unten).

Der nächste Schritt ist die Anwendung von **15** in der Polymerasekettenreaktion. Dabei muss es nicht nur von der Polymerase erkannt werden, sondern dient auch selbst als Matrix für die Synthese neuer Stränge. Es zeigte sich, dass **15** deutlich schlechter als sein natürliches Analogon dTTP erkannt und eingebaut wird. Nach umfangreichem Screening ergab sich erst bei Vervielfachung der Verlängerungszeit ein schwaches Produktsignal.

Außerdem sollten weitere Tetrazolgerüste synthetisiert und ihre optischen Eigenschaften untersucht werden. So sollte ein Tetrazol gefunden werden, dessen Anregung im sichtbaren Bereich des Lichtes möglich ist. Es wurden die Tetrazole **23**, **28** und **33** erfolgreich synthetisiert. Auf Grund der optischen Eigenschaften wurde **33** ausgewählt, zum Nucleosid **36** umgesetzt und über automatisierte Festphasensynthese in DNA inkorporiert.

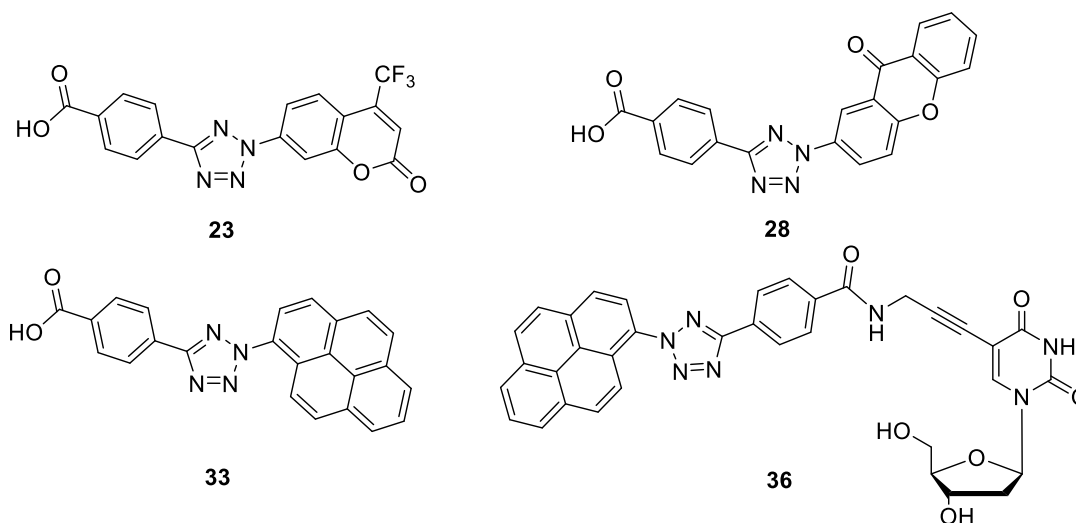


Abbildung 55: Weitere synthetisierte Tetrazole **23**, **28** und **33** sowie pyrentetrazolmodifiziertes Nucleosid **36**.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien und Geräte

Reagenzien

Die zur Synthese benötigten Reagenzien wurden von den Firmen *ABCR*, *Sigma Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Acros*, *VWR* und *Fluka* bezogen und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Lagerung und Handhabung erfolgte nach Herstellerangaben.

Lösungsmittel

Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel wurden mindestens in der Reinheitsstufe p.a. verwendet. Wurden für die Synthese trockene Lösungsmittel benötigt, so wurden diese von *Acros*, bereits über Molekularsieb und unter Argon gelagert, bezogen. Die Entnahme erfolgte ebenfalls unter Argon. Zur Aufarbeitung und Aufreinigung wurden, sofern nicht anders angegeben, technische Lösungsmittel verwendet.

Die deuterierten Lösungsmittel wurden von der Firma *euriso-top* bezogen.

Inertgas

Bei Reaktionen, die unter Luft- sowie Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt werden sollten wurde unter Argonatmosphäre (Argon 4.6) gearbeitet. Die benötigten Glasgeräte wurden außerdem zuvor evakuiert und mit dem Heißluftfön ausgeheizt.

Lichtausschluss

Bei Reaktionen, die unter Lichtausschluss durchgeführt wurden, wurde der Reaktionskolben mit Aluminiumfolie umwickelt und so vor eindringendem Licht geschützt. Ebenfalls durch Umwickeln mit Aluminiumfolie gegen eindringendes Licht geschützt wurden Chromatographiesäulen, Reagenzgläser sowie der Rotationsverdampfer. Des Weiteren

wurde darauf geachtet, alle Schritte bei denen ein Abschirmen gegen Licht nicht möglich war, möglichst schnell durchzuführen um die Expositionszeit zu minimieren.

Entionisiertes Wasser

Entionisiertes Wasser wurde durch eine Milli-Q® Direct 8/16 Anlage von *Merck Millipore* aus Leitungswasser generiert.

Dünnschichtchromatografie (DC)

Es wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten mit einer Schichtdicke von 0.25 mm der Firma *Merck* genutzt. Die optische Detektion erfolgte mit Hilfe einer UV-Handlampe über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder Fluoreszenzanregung bei 366 nm. Angefärbt wurde je nach erwartetem Produkt, entweder mit einer Kaliumpermanganatlösung (450 mg KMnO₄, 630 mg K₂CO₃, 45 mL H₂O, 750 µL 5 % NaOH) oder einer Lösung von H₂SO₄ in MeOH (3 %) und anschließendem Erhitzen mit dem Heißluftfön.

Flash-Chromatografie (FC)

Für die Säulenchromatografie wurde Kieselgel der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Porengröße von 60 Å und einer Partikelgröße von 40 – 63 µm verwendet. Die stationäre Phase wurde nass gepackt und die zu reinigende Substanz wurde entweder gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen. Der nötige Überdruck wurde mit einer Handpumpe erzeugt.

Hochdruck Flüssigkeitschromatografie (HPLC)

Zur analytischen Auftrennung wurden verschiedene HPLC-Systeme verwendet. Zum einen, je nach Verfügbarkeit, eines von zwei HPLC-Systemen von *Shimadzu* (Entgaser, Pumpeneinheit *LC-10AT*, Autosampler *SIL-10AD*, Diodenarraydetektor *SPD-M10A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Steuersoftware *Class-VP* bzw. Entgaser *DGU-14A*, zwei Pumpeneinheiten *LC-10AD*, Autosampler *SIL-10AD*, Säulenofen *CTO-10AS*, Diodenarraydetektor *SPD-M20A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Steuersoftware *Lab solutions*), und, zum präparativen Auftrennen der

Triphosphate ein HPLC-System von *Varian ProStar* (Autosampler 410, zwei Pumpeneinheiten 210, UV/Vis Detektor 325, Steuersoftware Galaxy) verwendet. Die Proben wurden entweder mit Hilfe des Autosamplers, beziehungsweise, im Falle der Triphosphate durch direkte Einspritzung über eine 1 mL Probenschleife aufgetragen. Zur analytischen Trennung wurde eine Supercosil LC-318 (25 cm x 4.6 mm, *Supelco*) und zur präparativen Trennung eine *Supercosil LC 318* Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße) verwendet. Zur Elution wurde ein Gradient von Acetonitril (Eluent B) und einem 50 mM Ammoniumacetatpuffer in HPLC-H₂O (Eluent A) genutzt. Zur Elution der Triphosphate wurde ein Gradient von Acetonitril (Eluent A) und TEAB-Puffer (Eluent A, 50 mM, pH = 7) verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1-2.5 mL/min. Die Detektion erfolgte bei der jeweils für das zu betrachtende Molekül charakteristischen Wellenlänge.

Tabelle 6: Detektionswellenlängen des DAD für die verschiedenen DNA-Modifikationen/ Chromophore

Chromophor	Detektionswellenlänge λ
Unmodifizierte DNA	260 nm
Diaryltetrazol	340 nm
Pyrentetrazol	350 nm
SulfoCy3	548 nm

Lyophilisation

Zur Sublimationstrocknung wurde eine *Alpha 1- 2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage von *Christ* benutzt. Vor der Trocknung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909* Syntheseautomat der Firma Applied Biosystems. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Als Träger dienten mit CPG gepackte Säulen (1 μmol Belegung (500 Å)) von *Proligo Reagents*. Weitere Chemikalien für die Festphasensynthese stammen von *Applied Biosystems (ABI)* und *Sigma Aldrich*.

Thermocycler

Zur Durchführung der Primerverlängerungs- sowie PCR-Experimente wurde ein Thermocycler der Firma *biometra/ Analytik Jena*, Modell TGradient 96 mit beheizter Deckeinheit genutzt.

Hybridisierung

Um einen der DNA- Einzelstränge mit dem jeweils komplementären Gegenstrang zu hybridisieren wurde dieser, zusammen mit 1.2 Äquivalenten des Gegenstranges in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaP_i , pH = 7) mit 250 mM NaCl für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Gelelektrophorese

Die denaturierenden Polyacrylamidgele wurden entsprechend der verschiedenen Experimente in verschiedenen Größen gegossen und verwendet. Insgesamt wurden folgende Gelkammersysteme verwendet:

- Sequenzierkammer (38 cm x 50 cm) von *BioRad* mit einem *PowerPac HV* von *BioRad* (für Primerverlängerungsexperimente)
- *Sequi-Gen GT Sequencing Cell* (21 cm x 40 cm) mit einem *PowerPac HV* von *BioRad* (für Primerverlängerungsexperimente)
- *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (10 cm x 10 cm) von *BioRad* mit einem *Electrophoresis Power Supply EPS 301* von *amersham pharmacia biotech* (für PCR-Experimente)

Fluoreszenzimager

Die Auswertung der Polyacrylamidgele erfolgte mit dem Fluoreszenzimager Stella 8300 von *Raytest*. Die Anregungswellenlängen wurden entsprechend des jeweiligen Chromophors gewählt. Die Emission wurde mit einer auf -20 °C gekühlten CCD-Kamera aufgenommen, wobei ein jeweils passender Emissionsfilter gewählt wurde. Gele, die zuvor mittels Silberfärbung angefärbt wurden, wurden auf einem Leuchttisch bei sichtbarem Licht abfotografiert. Die Belichtungszeit variierte zwischen 1-5 min, der gewählte Abstand wurde größtmöglich gewählt (Stage 4). Zur Auswertung der Bilder wurde die Aida Image Analyzer v.450 von *Raytest* genutzt.

Tabelle 7: Belichtungswellenlänge und gewählter Emissionsfilter für die Auswertung der Polyacrylamidgele.

Chromophor	Belichtungswellenlänge λ	Emissionsfilter
Fluorescein	$470 \pm 20\text{ nm}$ (Lamp 1)	Em Cy2/ $535 \pm 20\text{ nm}$
SulfoCy3	$540 \pm 10\text{ nm}$ (Lamp 2)	Em Cy3 / $605 \pm 20\text{ nm}$

Nanodrop

Um die Konzentrationen von Oligonukleotidlösungen in Wasser zu bestimmen wurde die Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines ND-1000 Spektrometers der Firma *NanoDrop* bestimmt.

NMR-Messungen

Die 300 MHz ^1H - sowie die 75 MHz ^{13}C -Spektren wurden am NMR-Spektrometer Bruker B-ACS 60 gemessen, die 500 MHz ^1H -, 126 MHz ^{13}C -, sowie die 202 MHz ^{31}P -Spektren an einem Bruker Avance DRX 500 Spektrometer sowie einem Bruker Ascend 500. Die chemische Verschiebung der Signale wurde in ppm bezogen auf Tetramethylsilan als Nullpunkt angegeben. Die Kalibrierung erfolgte dabei über das Signal des nicht vollständig deuterierten Lösungsmittels im Falle von ^1H Spektren bzw. des Lösungsmittels selbst für ^{13}C Messungen.

CDCl₃: ¹H-NMR: δ = 7.26 ppm ¹³C-NMR: δ = 77.16 ppm

DMSO-d₆: ¹H-NMR: δ = 2.50 ppm ¹³C-NMR: δ = 39.52 ppm

CD₃OD: ¹H-NMR: δ = 3.31 ppm ¹³C-NMR: δ = 49.00ppm

Die Kopplungskonstanten *J* wurden in Hz angegeben. Die Multiplizität der ¹H-Signale wurde wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett), dd (Dublett von Dublett) und m (Multipllett).

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden durch die Analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie aufgenommen. Bei dem dabei verwendeten Gerät handelte es sich um ein *Finnigan* Modell MAT 95. Die genutzten Ionisationstechniken waren Elektronenstoßionisation (EI) und *Fast Atom Bombardement* (FAB).

MALDI-Massenspektren wurden an einem Biflex IV von *Bruker Daltronics* aufgenommen. Oligonukleotidstränge wurden in ein 3-Hydroxypicolinsäurematrix (HPA) und Triphosphate in einer 2',4',6'-Trihydroxyacetophenonmatrix (THAP) aufgetragen.

Die Angaben erfolgen in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

Optische Spektroskopie

Die optischen Messungen wurden in Quarzglasküvetten der Firma *Starna* durchgeführt. Diese hatten einen Durchmesser von 1 cm sowie ein Volumen von 1 ml. Die Messung von sehr kleinen Probenmengen erfolgte in 50 µL *High Precision Cell* Quarzglasküvetten von *Hellma* mit einem Lichteinlass von 3 x 3 mm.

Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden entweder an einem Cary 100 Bio Spektrometer der Firma *Varian* mit Temperatureinheit (*Cary 100 temperature controller*, Steuersoftware *Cary WinUV Scan Application*) oder einem UV/vis Spektrometer *Lambda 750* der Firma *PerkinElmer* mit PTP-6+6 Peltier System (Steuersoftware *Lambda 750*) bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden gegen die Absorption des reinen Lösungsmittels hintergrundkorrigiert. Die genutzten Aufnahmeparameter waren: SBW: 2,0 nm; Average Time 0,1 s; Data Interval 1,0 sowie Light Source Changeover 350 nm bzw. 390 nm.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahmen der Fluoreszenzspektren wurden bei 20 °C entweder an einem Fluoromax-3 oder einem Fluoromax-4 von *Jobin-Yvon* mit Peltier-Element durchgeführt. Zur Aufnahme der Spektren wurde die Steuersoftware *FluorEssence* genutzt. Es erfolgte eine Korrektur der Spektren gegen die Ramanstreuung des reinen Lösungsmittels. Die genutzten Einstellungen waren: Increment 0,1 nm; Increment time 0.2 s; Slits 4 nm.

Messung der Quantenausbeute

Die Quantenausbeute wurde an einem Quantaaurus QY C11347 der Firma *Hamamatsu* bestimmt. Gemessen wurde im *Single*-Modus. Die genutzte Anregungswellenlänge lag bei 400 nm.

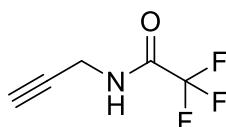
Belichtungsexperimente

Die Belichtungsexperimente wurden mit Hilfe von Hochleistungs-UV-LEDs der Firma *Nichia* bei 365 nm und 405 nm durchgeführt. Der durch die zentrale feinmechanische und elektronische Abteilung der Universität Regensburg gefertigte Belichtungsreaktor verfügt über zwei Peltier-Elemente zur Steuerung der Temperatur und einen Rührmotor.

6.2 Synthesevorschriften

6.2.1 Synthese Diaryltetrazolnukleosid

2-Trifluor-N-(propyn-1-yl)acetamid



$C_5H_4F_3NO$
151.09 g/mol

Es wurden 8.00 mL Trifluoressigsäureethylester (9.50 g; 67.0 mmol; 1.2 Äq.) langsam unter Argon in eine eisgekühlte Lösung von 3.50 mL Propargylamin (3.00 g; 54.5 mmol; 1.0 Äq.) in 30 mL abs. Methanol getropft. Nach 30 Minuten Rühren bei 0 °C wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion für 24 h bei Raumtemperatur vervollständigt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand in 30 mL DCM aufgenommen. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 25 mL DCM extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen mit 50 mL Wasser gewaschen. Daraufhin wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt, eine orangefarbene, klare Lösung wurde mittels Säulenchromatografie (Hexan:EE; 5:1) aufgereinigt. Dabei wurden 4.90 g (60 %) einer klaren, farblosen Flüssigkeit erhalten.

DC (SiO₂; Hexan:EE 5:1):

$$R_f = 0.26$$

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) 6.60 (s, 1H, NH), 4.16 (dd, ³J=5.4 Hz, ⁴J=2.5 Hz, 2H, CH₂), 2.35 (t, ⁴J=2.6 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD):

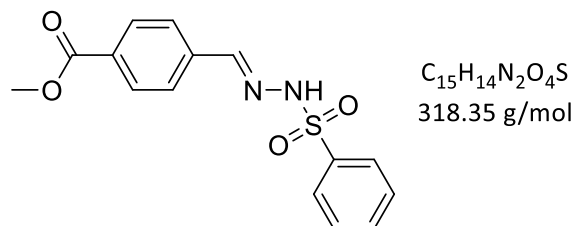
δ (ppm) 158.6 (d, $^2J=36.9$ Hz, CO), 117.3 (q, $^1J=286.5$ Hz, CF₃), 79.0 (C_{quart.}), 73.0 (CH), 29.7 (CH₂).

EI-MS:

m/z (%) = 151.1 [M⁺] (100 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 151.0239 [M]⁺, berechnet: 151.0240

Benzoessäure-4-[[2-(phenylsulfonyl)hydrazinyliden]methyl]-methylester (4)

Es wurden 3.10 g Phenylsulfonylhydrazid (18.3 mmol; 1.0 Äq.) in 10 mL Ethanol unter erwärmen auf 45 °C gelöst. Daraufhin wurden 3.00 g Methyl-4-formylbenzoat (18.3 mmol; 1.0 Äq.) in 5 mL heißem Ethanol gelöst und zum Hydrazid gegeben. Nach einer halben Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit Eis gekühlt und mit 30 mL Wasser verdünnt. Das kristalline Produkt wurde abfiltriert und mehrfach mit warmem Ethanol gewaschen. Es wurden 5.20 g eines hellgelben Pulvers erhalten (90 %).

DC (SiO₂, DCM):

$$R_f = 0.1$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) 11.83 (s, 1H, NH), 8.00-7.87 (m, 5H, Aryl-H), 7.72-7.58 (m, 5H, Aryl-H), 3.84 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO):

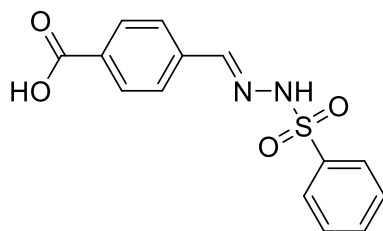
δ (ppm) 165.7 (CO), 145.7 (CNNH), 139.0 (Aryl-C), 138.0 (Aryl-C), 133.2 (Aryl-C), 130.5 (Aryl-C), 129.6 (2C, Aryl-C), 129.3 (2C, Aryl-C), 127.1 (2C, Aryl-C), 126.9 (2C, Aryl-C), 52.2 (OCH₃).

EI-MS:

$$m/z (\%) = 318.1 [M^+] (55 \%)$$

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 319.0745 [MH]⁺, berechnet: 319.0747

4-((2-(Phenylsulfonyl)hydrazono)methyl)benzoesäure (22)

$C_{14}H_{12}N_2O_4S$
304.32 g/mol

Es wurde 1.0 g Phenylsulfonylhydrazid (6.67 mmol; 1.0 Äq.) in 10 mL Ethanol unter erwärmen auf 45 °C gelöst. 1.15 g 4-Formylbenzoesäure (6.67 mmol; 1.0 Äq.) wurden in 5 mL heißem Ethanol gelöst und zum Hydrazid gegeben. Das Produkt fiel bereits nach kurzer Zeit aus der Lösung aus. Nach einer halben Stunde Rühren wurde die Reaktionsmischung mit Eis gekühlt und mit Wasser verdünnt. Das kristalline Produkt wurde abfiltriert und mehrfach mit warmem Ethanol gewaschen. Es wurden 1.20 g eines beigen Pulvers erhalten (59 %).

DC (SiO₂, DCM:MeOH 10:1):

R_f = 0.4

¹H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ(ppm) 13.09 (s, 1H, NH), 11.8 (s, 1H, COOH), 8.01-7.85 (m, 5H, Aryl-H, CHN), 7.71-7.57 (m, 5H, Aryl-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃):

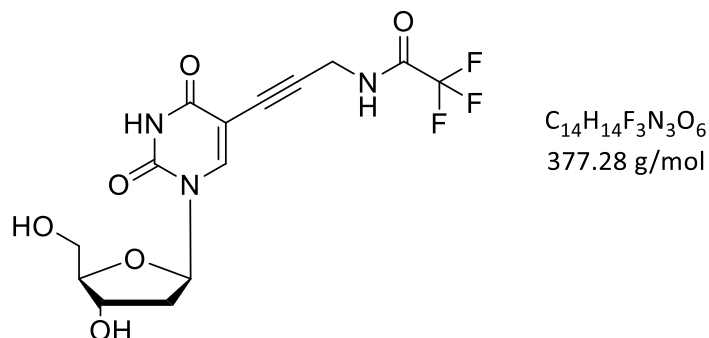
δ(ppm) 166.8, 145.9, 139.0, 137.6, 133.2, 131.8, 129.7, 129.3, 127.1, 126.8.

EI-MS:

m/z (%) = 304.1 [M⁺] (12 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 305.0590 [MH]⁺, berechnet: 305.0591

5-(2,2,2-Trifluor-prop-2-yn-1-yl)acetamid)-2'-desoxyuridin (6)

Es wurden 500 mg 5-Iod-2'-desoxyuridin (1.41 mmol; 1.0 Äq.) und 60.0 mg Kupfer(I)-iodid (0.310 mmol; 0.2 Äq.) unter Argon in 10 mL absolutem DMF suspendiert, dazu wurden 490 µL 2-Trifluor-N-(propyn-1-yl)acetamid (640 mg, 4.24 mmol, 3.0 Äq.), 390 µL Triethylamin (290 mg; 2.83 mmol; 2.0 Äq.) gegeben und die Lösung durch Einleiten von Argon bei gleichzeitigem Röhren für 10 min entgast. Anschließend erfolgte die Zugabe von 160 mg Pd(PPh₃)₄ (0.140 mmol; 0.1 Äq.). Die Reaktion erfolgte über 17 h bei Raumtemperatur.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und mit 150 ml Methanol nachgespült. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über Flash-Chromatografie (DCM:MeOH; 10:1). Es wurden 250 mg (47 %) eines hellbraunen Feststoffes erhalten.

DC (SiO₂, DCM:MeOH 10:1):

$$R_f = 0.2$$

¹H-NMR (500 MHz, MeOD):

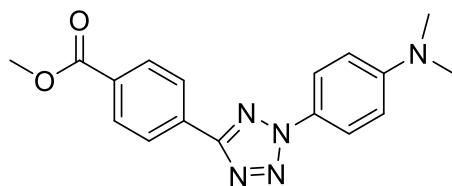
δ(ppm) 8.32 (s, 1H, 6-H), 6.22 (t, ³J= 6.5 Hz, 1H, 1'-H), 4.42-4.37 (m, 1H, 3'-H), 4.26 (s, 2H, CH₂), 3.91 (q, ³J=3.3 Hz, 1H, 4'-H), 3.83-3.71 (m, 2H, 5'-H), 2.35-2.19 (m, 2H, 2'-H).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD):

δ(ppm) 163.2 (4-C), 157.1 (COCF₃), 149.7 (2-C), 144.3 (6-C), 116.0 (CF₃), 98.1 (5-C), 87.8 (1'-C), 86.9 (alkinyl-C), 85.7 (4'-C), 74.7 (3'-C), 70.6 (alkinyl-C), 61.2 (5'-C), 40.3 (2'-C), 29.3 (CH₂).

FAB-MS:

m/z (%) = 378.2 [MH⁺] (100 %)

Methyl 4-(2-(4-(dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)benzoate (1)

$C_{17}H_{17}N_5O_2$
323.36 g/mol

Es wurden 800 mg 4-(Dimethylamino)anilin (5.89 mmol; 1.0 Äq.) in 8 mL Lösungsmittel (Ethanol:Wasser; 1:1) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zur Lösung wurden zunächst langsam 540 µL konz. HCl (650 mg; 17.7 mmol; 3.0 Äq.) und anschließend eine Lösung von 550 mg $NaNO_2$ (7.01 mmol; 1.2 Äq.) in 2 mL Wasser hinzugegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg.

In einem zweiten Kolben wurden 2.25 g **4** (7.07 mmol; 1.2 Äq.) in 30 mL Pyridin gelöst und auf -15 °C gekühlt. Hierzu wurde die Lösung des Diazoniumsalzes über einen Zeitraum von 30 min langsam hinzugegeben. Nach dem Ende der Zugabe wurde die Reaktion unter Lichtausschluss für weitere 6 h bei -15 °C und anschließend bei RT über Nacht gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL Wasser verdünnt und dreimal mit je 50 mL $CHCl_3$ extrahiert, danach die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 50 mL 0.5 M Essigsäure, dann je einmal mit 50 mL gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das schwarze Rohprodukt über Flash-Chromatografie (DCM:MeOH; 50:1) aufgereinigt. Das erhaltene, noch nicht vollständig reine Produkt wurde mit 20 mL warmem Methanol gewaschen, abfiltriert und getrocknet. Es wurden 272 mg (14 %) eines hellgelben Feststoffs erhalten.

DC (SiO_2 , DCM:MeOH 50:1):

$R_f = 0.7$

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$):

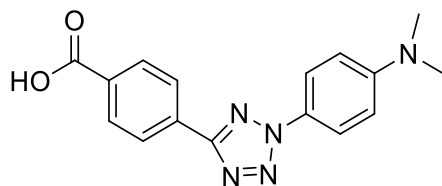
δ (ppm) 8.32 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, Aryl-H), 8.18 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H, Aryl-H), 8.02 (d, $^3J = 9.2$ Hz, 2H, Aryl-H), 6.80 (d, $^3J = 9.2$ Hz, 2H, Aryl-H), 3.96 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.07 (s, 6H, NMe_2).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃):

δ(ppm) 166.6 (CO), 163.7 (Tetrazol-C), 151.2 (Aryl-C), 131.7 (Aryl-C), 131.5 (Aryl-C), 130.2 (2C, Aryl-C), 126.8 (2C, Aryl-C), 126.5 (Aryl-C), 121.1 (2C, Aryl-C), 111.9 (2C, Aryl-C), 52.3 (OCH₃), 40.4 (2C, NMe₂).

FAB-MS:

m/z (%) = 324.1 [MH⁺] (100 %)

4-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)benzoesäure (5)

$C_{16}H_{15}N_5O_2$
309,33 g/mol

Zu einer Lösung von 117 mg **1** (0.362 mmol; 1.0 Äq.) in 10 mL Lösungsmittel (THF:MeOH:H₂O; 3:1:1) wurden 43.4 mg LiOH (1.81 mmol; 5.0 Äq.) hinzugegeben und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde der pH-Wert mit 2 N HCl auf 1 eingestellt und THF sowie Methanol unter vermindertem Druck entfernt. Der entstandene, gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Es wurden 96 mg (86 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC (SiO₂, DCM:MeOH 50:1):

$R_f = 0.1$

¹H-NMR (300 MHz, DMSO):

δ (ppm) 13.25 (s, 1H, COOH), 8.27 (d, ³J=8.1 Hz, 2H, Aryl-H), 8.14 (d, ³J=8.0 Hz, 2H, Aryl-H), 7.96 (d, ³J=8.7 Hz, 2H, Aryl-H), 6.93 (d, ³J=8.8 Hz, 2H, Aryl-H), 3.03 (s, 6H, NMe₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃):

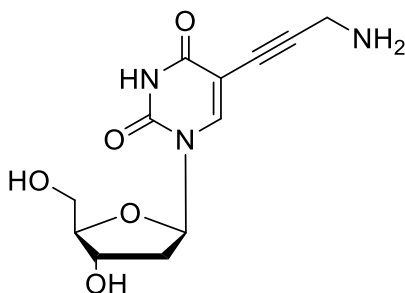
δ (ppm) 167.2 (COOH), 163.2 (Tetrazol-C), 151.7 (Aryl-C), 132.9 (Aryl-C), 131.1 (Aryl-C), 130.7 (2C, Aryl-C), 127.1 (2C, Aryl-C), 125.8 (Aryl-C), 121.5 (2C, Aryl-C), 112.5 (2C, Aryl-C). (Signal für NMe₂ direkt unter Lösungsmittelsignal)

EI-MS:

m/z (%) = 309.3 [M⁺] (55 %), 281.2 [M-N₂] (100 %)

HR-MS (EI):

gefunden: m/z 309.1222 [M]⁺, berechnet: 309.1220

5-(3-Aminoprop-1-yn-1-yl)-2'-desoxyuridin (7)

C₁₂H₁₅N₃O₅
281.27 g/mol

Es wurden 82.0 mg **6** (0.220 mmol; 1.0 Äq.) in 10 mL konzentrierter NH₃-Lösung für 17 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit EtOH coevaporiert.

Es wurden 61.1 mg (99 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

DC (SiO₂, DCM:MeOH 5:1)

R_f = 0.06

¹H-NMR (300 MHz, MeOD):

δ(ppm) 8.39 (s, 1H, 6-H), 6.27-6.16 (m, 1H, 1'-H), 4.38-4.30 (m, 1H, 3'-H), 3.96-3.86 (m, 3H, 4'-H; CH₂NH₂), 3.81-3.65 (m, 2H, 5'-H), 2.36-2.10 (m, 2H, 2'-H).

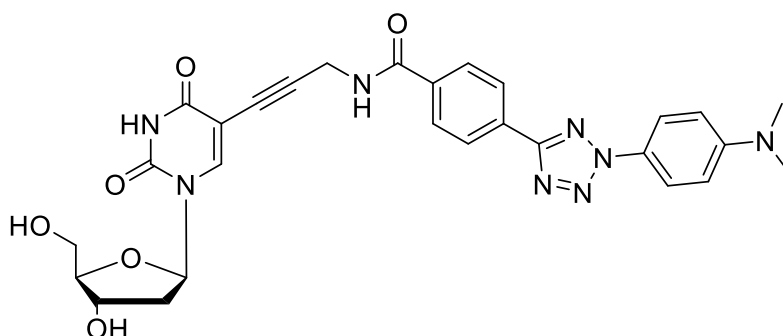
¹³C-NMR (126 MHz, MeOD):

δ(ppm) 164.5 (4-C), 150.9 (2-C), 146.5 (6-C), 98.5 (5-C), 89.4 (1'-C), 87.4 (CCCH₂NH₂), 85.5 (4'-C), 80.0 (CCH₂NH₂), 72.0 (3'-C), 62.6 (5'-C), 41.9 (2'-C), 30.8 (CH₂NH₂).

FAB-MS:

m/z (%) = 281.3 [M⁺] (24 %)

5-4-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamidyl-2'-desoxyuridin (8)



$C_{28}H_{28}N_8O_6$
572.58 g/mol

Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. 43.0 mg **5** (0.140 mmol; 1.0 Äq.) wurden zusammen mit 130 mg HBTU (0.340 mmol; 1.6 Äq.) und 1.89 mg HOBt (0.014 mmol, 0.1 Äq.) über Nacht im Hochvakuumgetrocknet. In einem separaten Kolben wurde 60.0 mg **7** (0.213 mmol, 1.5 Äq) getrocknet. Das Gemisch aus **5**, HBTU und HOBt wurde in 5 ml absolutem DMF gelöst, 72.6 μ L DIPEA (55.2 mg; 0.430 mmol; 2.0 Äq.) wurden hinzugefügt und es wurde für 15 min gerührt. Anschließend wurde **7**, gelöst in 3 ml abs. DMF hinzugegeben.

Es wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 mL H₂O abgestoppt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt an einem Säulenautomaten (*IntelliFlash 310; AnaLogix*) mit einem Gradienten von DCM:MeOH 100:0 bis 80:20 aufgereinigt. Dabei konnten 66.5 mg (83 %) eines beigen Pulvers isoliert werden.

DC (SiO₂, DCM:MeOH 10:1):

R_f = 0.3

¹H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm) 11.64 (s, 1H, 3-NH), 9.21 (t, $^3J=5.5$ Hz, 1H, NH), 8.24 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H, Aryl-H), 8.19 (s, 1H, 6-H), 8.09 (d, $^3J=8.3$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.95 (d, $^3J=9.1$ Hz, 2H, Aryl-H), 6.92 (d, $^3J=9.2$ Hz, 2H, Aryl-H), 6.12 (t, $^3J=6.7$ Hz, 1H, 1'-H), 5.24 (d, $^3J=4.2$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.10 (t, $^3J=5.1$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.33 (d, $^3J=5.5$ Hz, 2H, CH₂NH), 4.23 (m, 1H, 4'-H), 3.80 (q, $^3J=3.3$ Hz, 1H, 3'-H), 3.59 (m, 2H, 5'-H), 3.03 (s, 6H, NMe₂), 2.11 (m, 2H, 2'-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) 165.2 (CONH), 163.3 (Tetrazol-C), 161.7 (4-C), 151.2 (2-C), 149.4 (Aryl-C), 143.7 (6-C), 135.5 (Aryl-C), 129.4 (Aryl-C), 128.4 (2C, Aryl-C), 126.4 (2C, Aryl-C), 125.4 (Aryl-C), 121.1 (4C, Aryl-C), 112.1 (2C, NMe₂), 98.1 (5-C), 89.6 (1'-C), 87.6 (Alkynyl-C), 84.7 (4'-C), 74.4 (3'-C), 70.3 (Alkynyl-C), 61.0 (5'-C), 29.4 (CH₂NH).

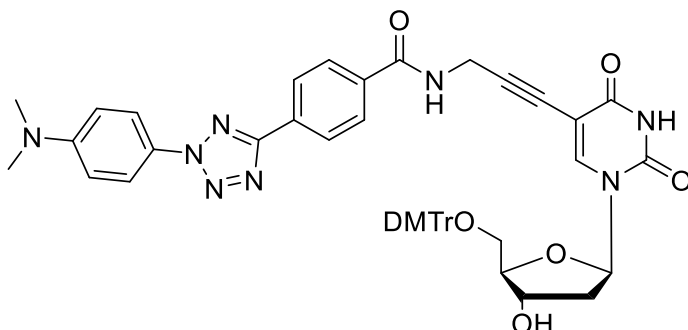
FAB-MS:

m/z (%) = 573.2 [M⁺] (95 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 573.2204 [M]⁺, berechnet: 573.2205

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,5-(prop-2-yn-1-yl)-4-(2-(4-(dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)benzamidyl-2'-desoxyuridin (9)



$C_{49}H_{46}N_8O_8$
874,34 g/mol

Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. In einem ausgeheizten, abgedunkelten Kolben wurden 114 mg (0.200 mmol, 1.0 Äq) **8** in 10 mL absolutem Pyridin gelöst. Dazu wurden 81.0 mg (0.240 mmol, 1.2 Äq) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wurden erneut 1.2 Äq DMT-Cl hinzugegeben. Nach insgesamt 48 h wurde die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (DCM : MeOH 100:1+0.1 % NEt_3) aufgereinigt. Es wurden 103 mg (60 %) eines hellgelben Pulvers erhalten.

DC (SiO_2 , DCM:MeOH 10:1+0.1 % NEt_3):

$R_f = 0.31$

1H -NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm) 11.68(s, 1H, 3-NH), 9.10 (t, $J=5.5$ Hz, 1H, NH), 8.24 (d, $J=7.9$ Hz, 2H, arom.), 8.07 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, arom.), 7.95 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, arom.), 7.92 (s, 1H, 6-H), 6.87 – 7.41 (m, 15 H, Trityl-H), 6.84 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, arom.), 6.10 (t, $J=6.7$ Hz, 1H, 1'H), 5.33 (d, $J=4.6$ Hz, 1H, 3'OH), 4.23 – 4.28 (m, 1H, 4'OH), 4.16 – 4.20 (m, 2H, CH_2NH), 3.89 – 3.93 (m, 1H, 3'H), 3.72 (s, 6H, $(OMe)_2$), 3.03 (s, 6H, NMe_2), 2.14 – 2.31 (m, 2H, 2'H), 1.20 – 1.28 (m, 2H, 5'H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

δ(ppm) 165.1, 163.3, 161.6, 158.1, 157.8, 151.2, 149.6, 144.8, 143.4, 140.2, 135.7, 135.5, 129.8, 129.6, 128.9, 128.3, 127.9, 127.6, 127.5, 127.4, 126.4, 121.1, 113.3, 113.2, 112.8, 112.1, 98.3, 89.5, 85.8, 85.0, 79.9, 74.1, 70.5, 63.8, 55.0, 29.4.

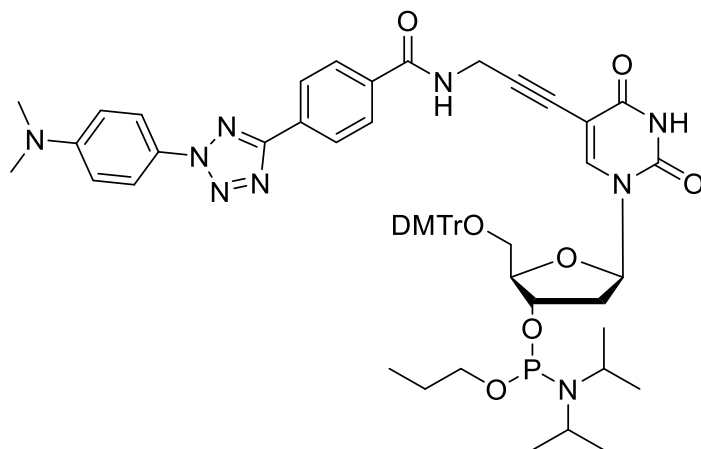
FAB-MS:

m/z (%) = 875.4 [MH^+] (43 %); 846.3 [MH^+-N_2] (77 %)

HR-MS (EI):

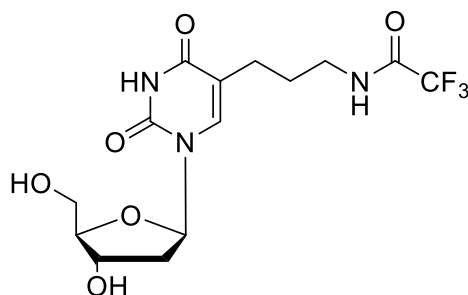
gefunden: m/z 875.3510 [MH^+], berechnet. 875.3511.

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,5-(5-(3-(4-(2-(4-(dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)benzamido)prop-1-yn-1-yl)- 2'-desoxyuridin-3-propyl diisopropylphosphoramidit (10)



$C_{58}H_{66}N_9O_9P$
1063,47 g/mol

Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. In einem ausgeheizten, abgedunkeltem Kolben wurden 40.0 mg (0.046 mmol, 1.0 Äq.) **9** in 10 mL absolutem DCM gelöst und mit 23.5 μ L (0.138 mmol, 3.0 Äq.) DIPEA und 20.5 μ L (0.092 mmol, 2.0 Äq) 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt. Es wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach jeweils zwei und vier Stunden wurden noch einmal dieselben Mengen an DIPEA und 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit hinzugefügt. Nach dem Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der verbliebene Rückstand aus Benzol lyophilisiert. Es wurde ein hellgelber Schaum erhalten. Es wurde von vollständigem Umsatz ausgegangen.

5-(2,2,2-Trifluoro-propylacetamid) -2'-desoxyuridin (13)

$C_{14}H_{18}F_3N_3O_6$
381.31 g/mol

Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. In einem trockenen Kolben wurden über Nacht 100 mg **6** (0.27 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 20.0 mg Pd(OH)₂/C (20 wt%) im Hochvakuum getrocknet. Das Gemisch wurde in 5 ml absolutem Methanol suspendiert und mit 0.42 mL Triethylsilan (308 mg, 2.65 mmol, 10.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung über Celite filtriert und mit 100 mL Methanol nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM:Aceton 1:1) aufgereinigt. Dabei wurden 94 mg (91 %) eines hellbeigen Schaumes erhalten.

DC (SiO₂, DCM:Aceton, 1:1):

$R_f = 0.21$

¹H-NMR (400 MHz, DMSO):

δ (ppm) 11.31 (s, 1H NH), 9.41 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 7.69 (s, 1H, 6-H), 6.16 (t, 1H, J = 6.8 Hz, 1'H), 5.23 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 3'OH), 5.02 (t, 1H, J = 5.2 Hz, 5'OH), 4.24 (s, 1H, 4'H), 3.76 (q, 1H, J = 3.4 Hz, 3'H), 3.57 (m, 2H, 5'H), 2.13 (m, 6H, alkyl-H), 1.64 (m, 2H, 2'H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

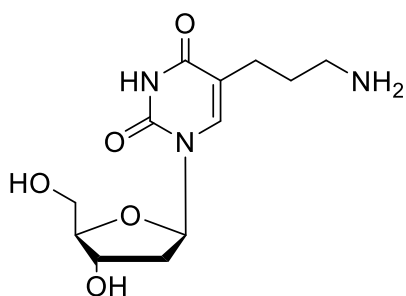
δ (ppm) 163.3 (4-C), 156.8 (q, CO-CF₃), 150.8 (2-C), 136.9 (6-C), 117.6 (CF₃), 113.1 (5-C), 87.8 (1'-C), 84.4 (4'-C), 70.9 (3'-C), 61.8 (5'-C), 46.2 (2'-C), 39.2 (alkyl-C), 27.6 (alkyl-C), 24.3 (alkyl-C).

FAB-MS:

m/z (%) = 382.2 [MH⁺] (18 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 382.1221 [M]⁺, berechnet.382.1220

5-(3-Aminopropyl)-2'-desoxyuridin (14)

$C_{12}H_{19}N_3O_5$
285.30 g/mol

Es wurden 100,0 mg **13** (0,262 mmol; 1 Äq.) in 10 mL konzentrierter NH_3 -Lösung für 17 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 74 mg (99 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

1H -NMR (600 MHz, DMSO):

δ (ppm). 7.73 (s, 1 H, Aryl-H), 6.16 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H, 1'H), 5.27 (br, 1 H, 3'OH'), 4.28 – 4.21 (m, 1H, 3'H), 3.78 (q, $J = 3.5$ Hz, 1H, 4'H), 3.63 – 3.52 (m, 2H, 5'H), 2.76 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, NCH_2), 2.26 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $-CH_2$), 2.09 (td, $J = 6.1, 5.6, 3.2$ Hz, 2H, 2'H), 1.71 (pd, $J = 7.3, 1.7$ Hz, 2H, Alkyl-H)

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO):

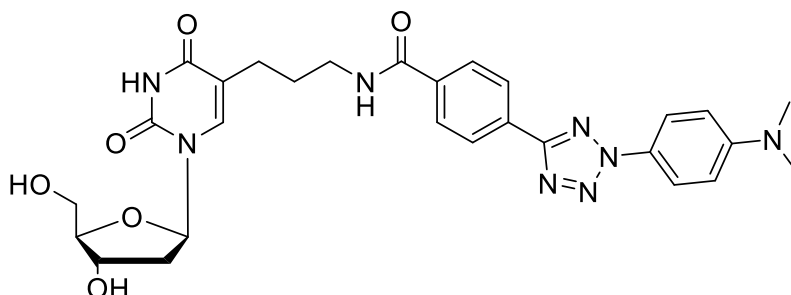
δ (ppm) 163.5, 150.3, 136.8, 128.3, 112.2, 87.4, 84.0, 70.4, 61.3, 38.4, 26.2, 23.5.

FAB-MS:

m/z (%) = 286.2 [M^+] (68 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 286.1399 [MH^+], berechnet.286.1397.

5-(4-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-N-propyl)benzamid)-2'-desoxyuridin**(15)**

$$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_6$$

$$576.61 \text{ g/mol}$$

Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. 214 mg **5** (0.69 mmol; 1.0 Äq.) wurden zusammen mit 289 mg HBTU (0.760 mmol; 1.1 Äq.) und 9.38 mg HOBt (0.070 mmol, 0.1 Äq.) über Nacht im Hochvakuum getrocknet. In einem zweiten Kolben wurde separat 198 mg **14** (0.690 mmol, 1.0 Äq) getrocknet. Das Gemisch aus **5**, HBTU und HOBt wurde in 5 ml absolutem DMF gelöst, 240 µL DIPEA (180 mg; 1.39 mmol; 2.0 Äq.) wurden hinzugefügt und es wurde für 15 min gerührt. Anschließend wurde **14**, gelöst in 3 ml abs. DMF hinzugegeben. Es wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 mL H₂O abgestoppt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 15:1) aufgereinigt. Dabei konnten 241 mg (60 %) eines beigen Pulvers isoliert werden.

DC (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1):

$R_f = 0.27$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm) 11.3 (s, 1H, NH), 8.65 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Aryl H), 8.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Aryl H), 7.95 (d, J = 9.1 Hz, 2H, Aryl H), 7.74 (s, 1H, 6-H), 6.92 (d, J = 9.2 Hz, 2H, Aryl H), 6.18 (t, J = 6.8 Hz, 1H, 1'-H), 5.23 (d, J = 4.3 Hz, 1H, 3'-H), 5.04 (t, J = 5.2 Hz, 1H, 5'-OH), 4.25 (m, 1H 3'-OH), 3.77 (q, J = 3.6 Hz, 1H, 4'-H), 3.65-3.52 (m, 2H, 5'-H), 3.17-2.92 (m, 8H, NMe₂, CH₂), 2.33-2.19 (m, 2H, 2'-H), 2.19-2.01 (m, 2H, CH₂), 1.77-1.62 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

δ (ppm) 165.9, 163.9, 151.7, 150.8, 136.9, 129.5, 128.6, 128.3, 127.6, 126.8, 125.9, 124.9, 121.6, 119.6, 113.5, 112.5, 110.2, 87.8, 84.4, 70.9, 61.8, 54.0, 46.1, 42.2, 28.4, 24.5, 19.3, 18.6.

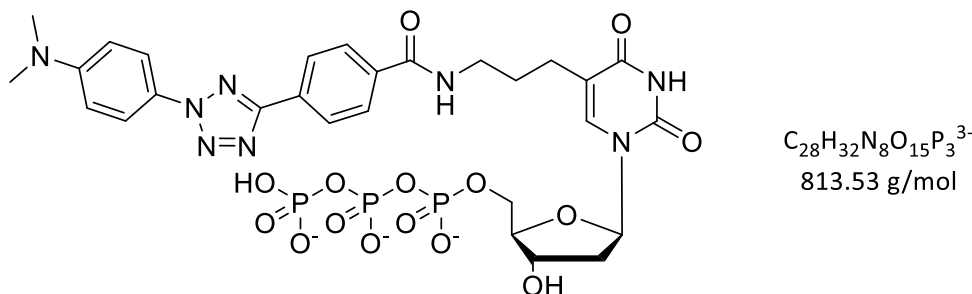
FAB-MS:

m/z (%) = 577.1 [M^+] (25 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 577.2518 [M]⁺, berechnet 577.2518.

5-(4-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-N-propyl)benzamid)-2'-desoxyuridin-Triphosphat (16)



In einem trockenen, mit Septum und eingesteckter Kanüle bestücktem Kolben wurden 50 mg **15** (0.09 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 28.0 mg Protonenschwamm (0.130 mmol, 1.5 Äq.) über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 1.20 ml Trimethylphosphat hinzugegeben und die Mischung auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, bevor 8.47 μL Phosphorylchlorid (14.0 mg, 0.09 mmol, 1.05 Äq.) schnell hinzugegeben wurden. Nach 4 h Rühren bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden erneut 0.4 Äq. POCl_3 hinzugegeben und weitere 2 h bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nun wurde eine Mischung aus 90.7 μL Bu_3N (70.8 mg, 0.38 mmol, 4.4 Äq) und 339 mg (0.62 mmol, 6.0 Äq) $(\text{nBu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 1.04 mL absolutem DMF (0.4 M) auf einmal hinzugegeben. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wird die gesamte Reaktionslösung langsam, über einen Zeitraum von 40 min, zu 6.00 mL 1.0 M TEAB-Puffer hinzugegeben. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt, wobei TEAB Puffer (0.05 M, pH = 7) und Acetonitril als Eluenten verwendet wurden. Die Produktfraktionen wurden gefriergetrocknet. Es wurden 0.015 mmol (17 %) des Produktes als hellgelber Feststoff isoliert.

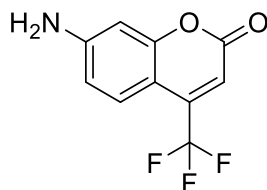
^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O)

$\delta = -10.58$ (d, 1P, $J = 20.8$ Hz), -11.66 (d, 1P, $J = 20.6$ Hz), -23.28 (t, 1P, $J = 20.0$ Hz).

MALDI-MS:

m/z (%) = 814.3 [MH^+], 787.0 [M-N_2]

6.2.2 Synthese Coumarintetrazol

7-Amino-3-chloro-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-on (20)

$C_{10}H_6F_3NO_2$
229.16 g/mol

Zu einer Lösung von 1.00 g 3-Aminophenol (9.16 mmol, 1.0 Äq.) und 1.68 g Ethyl-4,4,4-trifluoroacetoacetat (9.16 mmol, 1.0 Äq.) in 15 ml Ethanol wurden 1.50 g wasserfreies $ZnCl_2$ (11.0 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben und die Mischung für 24 h refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde die Hälfte des Lösungsmittels unter vermindertem Druck entfernt und die entsprechende Menge Wasser hinzugegeben, dabei fiel das Produkt als gelber Niederschlag aus. Zur vollständigen Kristallisation wurde die Suspension über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dabei wurden 1.22 g (58 %) eines gelben Pulvers erhalten.

DC (SiO_2 , DCM:MeOH 100:1):

$R_f = 0.55$

1H -NMR (300 MHz, DMSO):

δ (ppm) 7.35 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.0$ Hz, H-5), 6.65 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6), 6.53 (s, 2H, NH_2), 6.50 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.43 (s, 1H, H-3).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO):

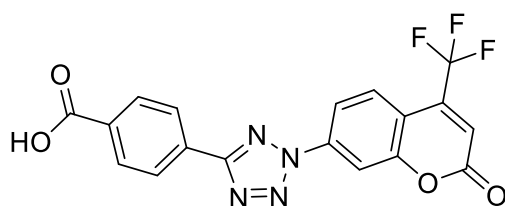
δ (ppm) 159.9, 157.0, 154.6, 140.7 (q), 126.2, 122.4 (q), 112.7, 107.9 (q), 102.2, 99.4.

EI-MS:

m/z (%) = 229.2 [M^+] (68 %)

HR-MS (EI):

gefunden: m/z 230.0423 [MH^+], berechnet.230.0423.

4-(2-(2-Oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-yl)-2H-tetrazol-5-yl)benzoesäure (23)

C₁₈H₉F₃N₄O₄
402.29 g/mol

500 mg **20** (2.18 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 10 ml einer 50 % Ethanol/ Wasser Mischung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 0.90 mL konzentrierte HCl-Lösung (397.9 mg, 10.9 mmol, 5.0 Äq.) langsam hinzuge tropft. Zu dieser Lösung wurden langsam, so dass die Temperatur 5 °C nicht überstieg, 151 mg NaNO₂, gelöst in 1 ml H₂O, (2.18 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. In einem zweiten Kolben wurden 797 mg **22** (2.62 mmol, 1.2 Äq.) in 30 mL Pyridin gelöst und auf – 15 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde nun über eine halbe Stunde hinweg die Diazoniumsalzlösung hinzuge tropft. Nach 30 Minuten wurde das Eisbad entfernt und weitere 5 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach dem Ende der Reaktion wurde die Reaktionsmischung auf 100 mL 4 % HCl gegeben. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Der dabei zurückbleibende Niederschlag wurde im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 272 mg (39 %) eines altrosa Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO):

δ(ppm) 13.30 (s, 1H, COOH), 8.40-8.23 (m, 4H, Aryl-H), 8.22-8.11 (m, 2H, Aryl-H), 8.04 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Aryl-H), 7.25 (s, 1H, Aryl-H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

δ(ppm) 166.7, 164.2, 158.0, 154.5, 138.2, 133.0, 130.4, 129.8, 127.0, 126.9, 118.8, 116.4, 114.5, 108.7, 108.6.

FAB-MS:

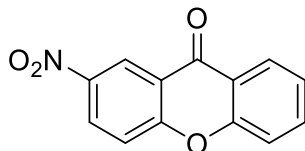
m/z (%) = 403.2 [MH⁺] (68 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 403.0648 [MH]⁺, berechnet.403.0649.

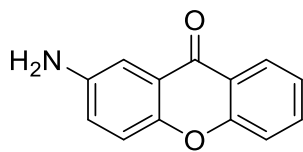
6.2.3 Synthese Xanthontetrazol

2-Nitroxanthon (24)



$C_{13}H_7NO_4$
241.20 g/mol

2.50 g Xanthon (12.8 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 7 mL konzentrierter Schwefelsäure gelöst und auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. In einem zweiten Kolben wurde aus 0.27 mL rauchender HNO_3 (0.40 g, 6.38 mmol, 0.5 Äq.) und 1.50 mL konzentrierter Schwefelsäure (2.75 g, 28.1 mmol, 2.2 Äq.) Nitriersäure hergestellt. Die Nitriersäure wurde so zugegeben, dass die Temperatur im Kolben unterhalb von $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ blieb, anschließend wurde bei 0°C für 1.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Eis gegossen und der entstandene Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit kaltem Wasser gewaschen bis die Waschlösung den $\text{pH} = 7$ hatte. Das so gewonnene Rohprodukt wurde, wie in der entsprechenden Literatur angegeben ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.^[147]

2-Aminoxanthon (25)

$C_{13}H_9NO_2$
211.22 g/mol

1.00 g **24** (4.15 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 30 ml p.a. Ethanol gelöst. Dazu wurden 2.81 g Zinn(II)chlorid Dihydrat (12.45 mmol, 3.0 Äq.) gegeben und über Nacht refluxiert. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, in einen 500 mL Kolben überführt und das Lösungsmittel entfernt. Zum erhaltenen Feststoff wurden 50 mL gesättigte $NaHCO_3$ Lösung gegeben, für 5 min gerührt und abfiltriert. Um das Produkt aus dem Feststoffgemisch herauszulösen wurden 100 mL Aceton hinzugegeben, 2 min im Ultraschallbad inkubiert, von unlöslichen Zinnsalzen abfiltriert und das Aceton entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (Hexan:EE, 5:1) aufgereinigt. Dabei wurden 795 mg (30 %, bzw. 59 % bezogen auf die Äquivalente an Salpetersäure) eines gelben Feststoffes erhalten.

DC (SiO_2 , Hexan: EE, 1:1):

$$R_f = 0.51$$

1H -NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm) 8.15 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, aryl-H), 7.80 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz, aryl-H), 7.58 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aryl-H), 7.44-7.36 (m, 2H, aryl-H), 7.28 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, aryl-H), 7.15 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.8$ Hz, aryl-H), 5.46 (s, 2H, NH_2).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO):

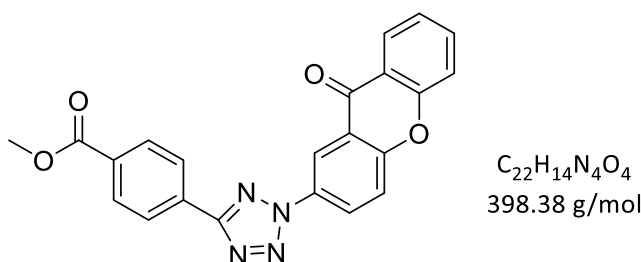
δ (ppm) 176.0, 155.5, 147.7, 145.7, 134.8, 125.9, 123.6, 123.3, 121.7, 120.5, 118.6, 118.1, 106.1.

FAB-MS:

m/z (%) = 211.1 [M^+] (62 %), 212.2 [MH^+] (100 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 212.0708 [M] $^+$, berechnet 212.0706.

Methyl 4-(2-(4-(dimethylamino)phenyl)-2H-tetrazol-5-yl)benzoat (27)

410 mg **25** (1.96 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 20 ml einer 80 % Ethanol/ Wasser Mischung suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 0.81 mL konzentrierte HCl-Lösung (360 mg, 9.82 mmol, 5.0 Äq.) langsam hinzuge tropft. Zu dieser Lösung wurden langsam, so dass die Temperatur 5 °C nicht überstieg, 140 mg NaNO₂, gelöst in 1 ml H₂O, (1.96 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. In einem zweiten Kolben wurden 750 mg **4** (2.36 mmol, 1.2 Äq.) in 30 mL Pyridin gelöst und auf – 40 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde nun über eine halbe Stunde hinweg die Diazoniumsalzlösung hinzuge tropft. Nach 30 Minuten wurde das Eisbad entfernt und weitere 3 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Produkt fiel aus der Reaktionslösung aus, wurde abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Es wurden 498 mg (64 %) eines rosafarbenen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO):

δ(ppm) 9.13 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-Aryl), 8.60 (dd, J = 9.1 Hz, 2.5 Hz, 1 H, H-Aryl), 8.38 (d, J = 8.0 Hz, 2 H, H-Aryl), 8.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-Aryl), 8.01 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-Aryl), 7.39-7.87 (m, 4 H, H-Aryl), 3.97 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

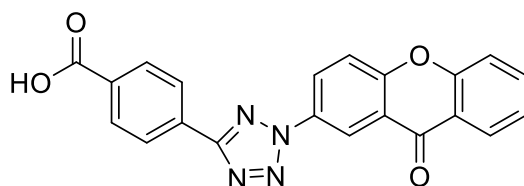
δ(ppm) 145.7, 145.0, 143.5, 139.5, 138.3, 133.2, 130.9, 130.4, 129.9, 129.3, 127.9, 127.5, 127.1, 127.0, 125.9, 52.4.

EI-MS:

m/z (%) = 399.2 [MH⁺] (68 %)

HR-MS (EI):

gefunden: m/z 399.1089 [MH⁺], berechnet.399.1088.

4-(2-(9-Oxo-9H-xanthen-2-yl)-2H-tetrazol-5-yl)benzoesäure (28)

$C_{21}H_{12}N_4O_4$
384.35 g/mol

Zu einer Lösung von 408 mg **27** (1.025 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL Lösungsmittel (THF:MeOH:H₂O; 3:1:1) wurden 158 mg LiOH (6.59 mmol, 6.4 Äq.) hinzugegeben und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde der pH-Wert mit 2 N HCl auf 1 eingestellt und THF sowie Methanol unter vermindertem Druck entfernt. Der entstandene, Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Es wurden 370 mg (94 %) eines Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm).12,94 (s, 1H COOH), 7.11-8.97 (m, 11H, H-Aryl).

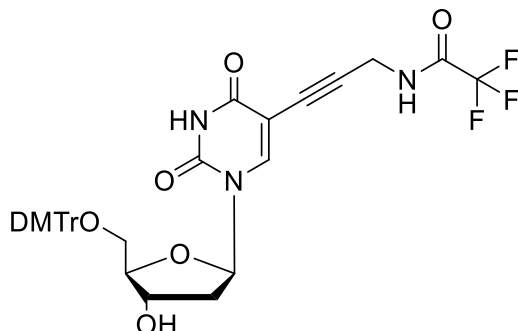
FAB-MS:

m/z (%) = 385.3 [MH⁺] (29 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 385.0929 [MH⁺], berechnet 385.0931.

6.2.4 Synthese Pyrentetrazolnukleosid

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,-5-(3-Trifluoracetamidpropyn-1-yl)-2'-desoxyuridin (30)

$C_{35}H_{32}F_3N_3O_8$
679,21 g/mol

Es wurden 1.00 g DMT-geschütztes 5-Iod-2'-desoxyuridin (1.56 mmol, 1.0 Äq.) und 70.0 mg Kupfer(I)-iodid (0.340 mmol, 0.2 Äq.) unter Argon in 10 mL absolutem DMF suspendiert, dazu wurden 0.54 mL 2-Trifluor-N-(propyn-1-yl)acetamid (0.71 g, 4.68 mmol, 3.0 Äq.), 430 μ L Triethylamin (320 mg; 3.12 mmol; 2.0 Äq.) gegeben und die Lösung durch einleiten von Argon bei gleichzeitigem Rühren für 10 min entgast. Anschließend erfolgte die Zugabe von 160 mg $Pd(PPh_3)_4$ (0.140 mmol, 0.1 Äq.). Die Reaktion erfolgte über 17 h bei Raumtemperatur.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und mit 150 ml Methanol nachgespült. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über Flash-Chromatografie (DCM:Aceton; 10:1). Es wurden 787 mg (76 %) eines hellbraunen Feststoffes erhalten.

DC (SiO_2 , DCM:Aceton 10:1):

$R_f = 0.16$

1H -NMR (300 MHz, DMSO):

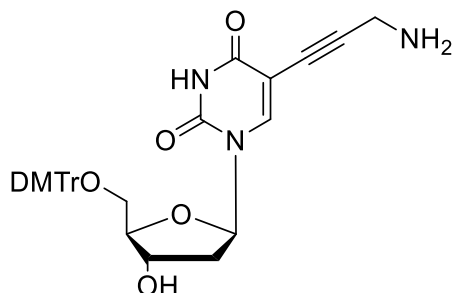
δ (ppm) 11.68 (s, 1H, NH), 9.99 (t, 1H, J = 5.5 Hz, NH), 7.93 (s, 1H, 6-H), 7.43-7.19 (m, 9 H, Aryl-H), 6.89 (dd, 4 H, J = 9.0, 2.6 Hz, Aryl-H), 6.09 (t, 1H, J = 6.6 Hz, 1'-H), 5.32 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3'-OH), 4.29-4.24 (m, 1H, 3'-H), 4.06 (d, 2 H, J = 5.4 Hz, CH_2), 3.93-3.89 (m, 1H, 4'-H), 3.74 (s, 6H, CH_3), 3.30-3.23 (m, 2H, 5'H), 2.33-2.14 (m, 2H, 2'H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

δ(ppm) 162.2, 158.6, 156.6, 149.8, 145.3, 144.3, 136.1, 135.7, 130.2, 128.4, 128.0,
127.1, 113.7, 98.3, 87.9, 86.3, 85.6, 75.6, 70.9, 64.3, 55.5, 46.3, 30.1, 29.9, 9.1.

FAB-MS:

m/z (%) = 679.4 [M⁺] (10 %)

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,5-(3-aminoprop-1-yn-1-yl)-2'-desoxyuridin (31)

$C_{33}H_{33}N_3O_7$
583,23 g/mol

Es wurden 100 mg **30** (0.150 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL konzentrierter NH_3 -Lösung für 17 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Es wurden 85.1 mg (99 %) eines braunen Feststoffs erhalten.

DC (SiO_2 , DCM:Aceton 10:1):

$R_f = 0.06$

1H -NMR (300 MHz, DMSO):

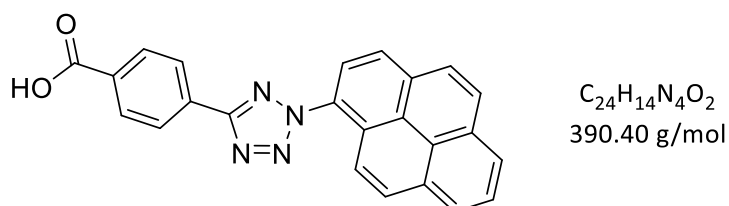
δ (ppm) 7.94 (s, 1H, H-6), 7.42-7.36 (m, 2H, NH_2), 7.34-7.19 (m, 10H, Aryl-H, NH), 6.93-6.86 (m, 4 H, Aryl-H), 6.08 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, 4'-H), 5.33 (d, 1H, $J = 4.7$ Hz, 1'-H), 4.26-4.19 (m, 1H, 3'-OH), 3.95-3.89 (m, 1H, 3'-H), 3.74 (s, 6H, CH_3), 3.72-3.64 (m, 2H, 5'H), 3.25-3.09 (m, 2H, CH_2), 2.32-2.12 (m, 2H, 2'H).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO):

δ (ppm) 161.9, 158.5, 158.3, 149.7, 145.4, 144.6, 136.0, 135.8, 130.16, 128.4, 128.0, 127.2, 113.7, 97.9, 86.3, 85.8, 70.8, 64.2, 55.5, 31.2, 30.0.

FAB-MS:

m/z (%) = 584.3 [M^+] (4 %)

4-(2-(Pyren-1-yl)-2H-tetrazol-5-yl)benzoesäure (33)

Unter Argonatmosphäre wurden 257 mg Aminopyren (1.18 mmol, 1.0 Äq.) in 30 ml THF gelöst und auf -21 °C gekühlt. Dazu wurde eine Lösung von 1.04 g $NaBF_4$ (9.46 mmol, 8.0 Äq.), 10.5 mL 50% HBF_4 und 4.5 ml Wasser hinzugegeben. Nach 20 minütigem Rühren bei -21 °C wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und zu einer Lösung von 431 mg **22** (1.42 mmol, 1.2 Äq.) in 8 ml Pyridin bei 0 °C hinzugegeben. Anschließend wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Mischung auf 80 mL verdünnte Salzsäure gegossen. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. Dabei wurden 174 mg (38 %) eines braunroten Feststoffes erhalten.

1H -NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm) 13.26 (s, 1H, COOH), 9.06-7.34 (m, 13 H, Aryl-H).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO):

δ (ppm) 167.2, 164.4, 146.1, 142.0, 133.25, 133.0, 131.1, 130.93, 130.8, 130.0, 127.8, 127.5, 127.4, 127.0, 125.7, 125.0, 124.5, 124.0, 121.4.

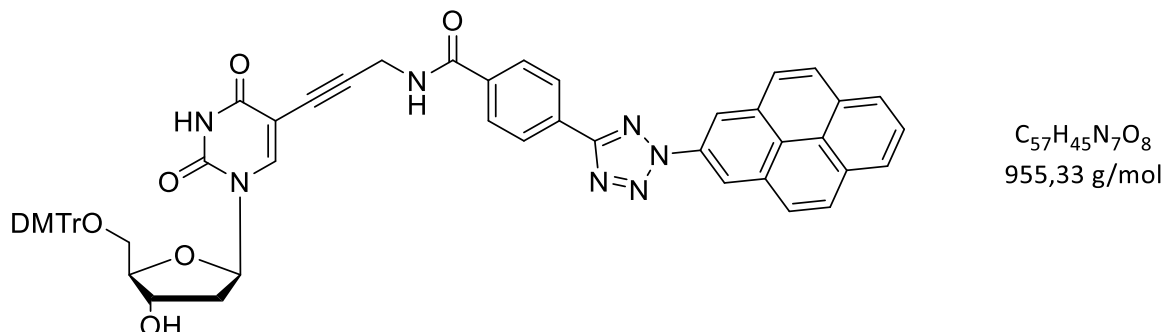
FAB-MS:

m/z (%) = 391.2 [MH^+] (4 %)

HR-MS (FAB):

gefunden: m/z 391.1190 [MH^+], berechnet 391.1190.

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,5-(3-((4-(2-(pyren-2-yl)-2H-tetrazol-5-yl)benzyl)amino)prop-1-yn-1-yl)-2'-desoxyuridin (34)



Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. 172 mg **33** (0.44 mmol; 1.0 Äq.) wurden zusammen mit 184 mg HBTU (0.49 mmol; 1.1 Äq.) und 5.97 mg HOBt (0.04 mmol, 0.1 Äq.) über Nacht im Hochvakuum getrocknet. In einem zweiten Kolben wurde separat 250 mg **31** (0.44 mmol, 1.0 Äq) getrocknet. Das Gemisch aus **33**, HBTU und HOBt wurde in 5 ml absolutem DMF gelöst, 150 μ L DIPEA (114 mg; 0.88 mmol; 2.0 Äq.) wurden hinzugefügt und es wurde für 15 min gerührt. Anschließend wird **31**, gelöst in 3 ml abs. DMF hinzugegeben. Es wurde für 20 h gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 mL H₂O abgestoppt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (DCM:Aceton, 1:1) aufgereinigt. Dabei konnten 315 mg (83 %) eines beigen Pulvers isoliert werden.

DC (SiO₂, DCM:Aceton, 1:1):

$$R_f = 0.6$$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ (ppm) 11.69 (s, 1H, NH), 9.15 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH), 8.09-8.27 + 8.35-8.61 (m, 14H, H-Aryl + 4'H), 7.93 (s, 1H, 6-H), 7.16-7.46 (m, 9H, Aryl-H), 6.86-6.96 (m, 4H, Aryl-H), 6.11 (t, J = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 5.33 (d, J = 4.5 Hz, 1H, 3'-OH), 4.20 (m, 2H, CH₂), 3.92 (m, 1H, 3'-H), 3.73 (s, 6H, (OMe)₂), 3.22-3.30 (m, 2H, 5'-H), 2.14-2.33 (m, 2H, 2'-H).

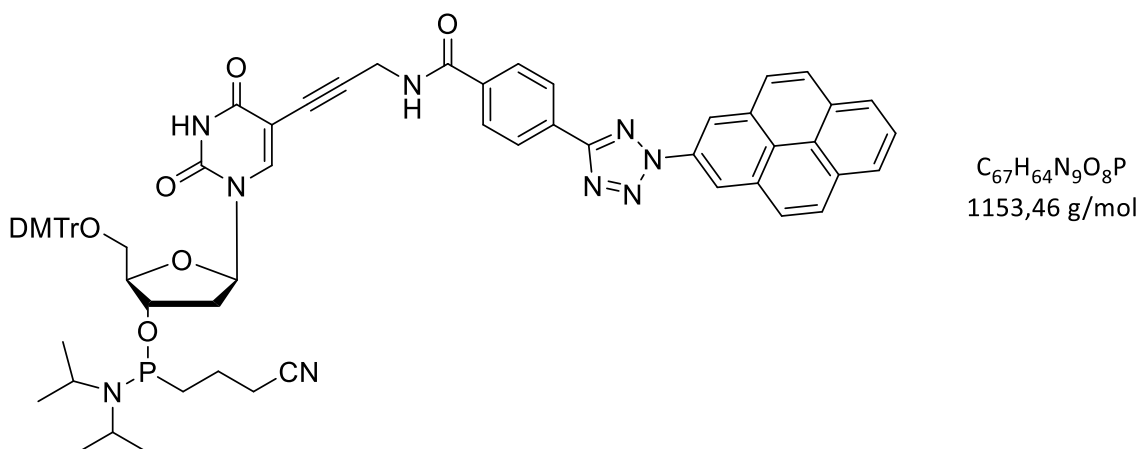
¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

δ(ppm) 165.6, 164.5, 162.1, 158.6, 149.8, 145.3, 143.9, 136.3, 136.2, 135.7, 133.0, 131.1, 130.8, 130.8, 130.5, 130.3, 130.1, 130.0, 129.4, 128.4, 128.0, 127.8, 127.6, 127.2, 127.0, 125.8, 125.1, 124.5, 124.0, 123.6, 121.4, 113.7, 113.3, 98.9, 90.0, 86.3, 85.5, 70.9, 64.3, 55.5, 42.3, 18.6.

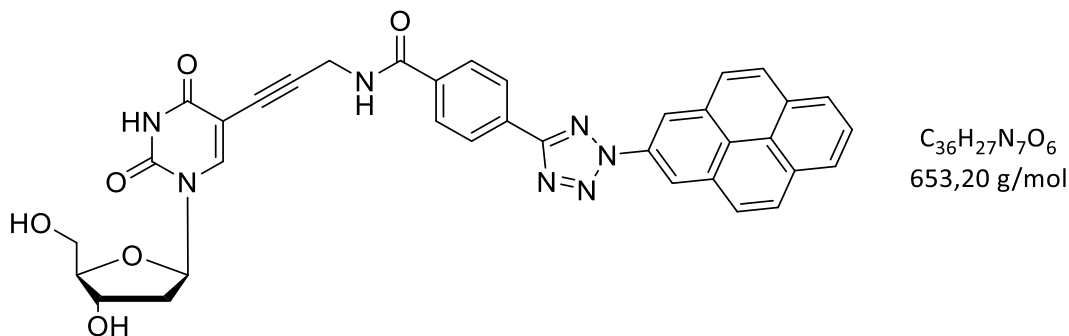
FAB-MS:

m/z (%) = 927.5 (35) [M⁺-N₂] (%)

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,5-(3-((4-(2-(pyren-2-yl)-2H-tetrazol-5-yl)benzyl)amino)prop-1-yn-1-yl)-2'-desoxyuridin-3-propyl diisopropylphosphoramidit (35)



Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. In einem ausgeheizten, abgedunkelten Kolben wurden 100 mg **34** (0.10 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL absolutem Dichlormethan gelöst und mit 53.0 μ L (0.31 mmol, 3.0 Äq.) DIPEA und 47.0 μ L (0.21 mmol, 2.0 Äq) 2-Cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidit versetzt. Es wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde noch einmal die gleiche Menge DIPEA und 2-Cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidit hinzugefügt und für weitere 1.5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand aus absolutem Benzol lyophilisiert. Es wurde ein heller Schaum erhalten. Von vollständigem Umsatz wurde ausgegangen.

5-(3-((4-(2-(Pyren-2-yl)-2H-tetrazol-5-yl)benzyl)amino)prop-1-yn-1-yl)-2'-desoxyuridin (36)

Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. 69.4 mg **33** (0.18 mmol; 1.0 Äq.) wurden zusammen mit 74.4 mg HATU (0.20 mmol; 1.1 Äq.) und 2.40 mg HOBT (0.02 mmol, 0.1 Äq.) über Nacht im Hochvakuum getrocknet. In einem zweiten Kolben wurde separat 50.0 mg **7** (0.18 mmol, 1.0 Äq) getrocknet. Das Gemisch aus **33**, HBTU und HOBT wurde in 5 ml absolutem DMF gelöst, 60 µL DIPEA (46.0 mg; 0.36 mmol; 2.0 Äq.) wurden hinzugefügt und es wurde für 15 min gerührt. Anschließend wurde **7**, gelöst in 3 ml abs. DMF hinzugegeben. Es wurde für 20 h gerührt, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL H₂O abgestoppt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 15:1) aufgereinigt. Dabei konnten 31 mg (26 %) eines beigen Pulvers isoliert werden.

DC (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1):

$$R_f = 0.33$$

¹H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ(ppm) 11.65 (s, 1H, NH), 9.27 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.11-8.61 (m, 14H, Aryl-H), 6.12 (t, J = 6.7 Hz, 1H, 6-H), 5.27 (d, J = 4.1 Hz, 1H, 3'-OH), 5.13 (t, J = 5.0 Hz, 1H, 5'-OH), 4.35 (d, J = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 4.21-4.26 (m, 1H, 3'-H), 3.80 (q, J = 3.3 Hz, 1H, 4'-H), 3.53-3.67 (m, 2H, 5'CH₂), 2.07-2.18 (m, 2H, 2'H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO):

δ(ppm) 165.6, 164.5, 162.1, 149.9, 144.2, 136.2, 133.0, 131.1, 130.8, 130.5, 130.0, 129.7, 128.9, 128.8, 127.8, 127.6, 127.3, 127.1, 125.7, 125.1, 124.5, 124.0, 123.6, 121.4, 98.6, 90.1, 88.1, 85.2, 74.8, 70.8, 61.5, 42.3, 29.9.

FAB-MS:

m/z (%) = 408.1 (18) [M^+ -C₁₆H₉N₃] (%)

6.3 Festphasensynthese der Oligonukleotide

6.3.1 Synthese

Die Festphasensynthese der tetrazolmodifizierten DNA-Strängen wurde nach der Phosphoramiditmethode an einem *Perceptive Expedite 8909* Syntheseautomat der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Die mit den natürlichen Basen A,C,T und G modifizierten, kommerziell erhältlichen Bausteine wurden in Acetonitril (amidite diluent grade) gelöst und als 0.067 M Lösung zur Synthese genutzt. Die selbst hergestellten tetrazolmodifizierten Phosphoramidite wurden in abs. Dichlormethan aufgenommen und als 0.1 M Lösung zur Synthese genutzt. Je nachdem welcher Sonderbaustein in den Oligonukleotidstrang eingebaut wurde, wurden unterschiedliche Syntheseprotokolle genutzt. Die Protokolle unterscheiden sich in der eingesetzten Menge des jeweiligen Reagens (angegeben in Pulsen, 1 Puls = 16 µL) und der Verweildauer auf der festen Phase. Das, zum Einbau der natürlichen Nukleoside genutzte, Protokoll wurde dahingehend verändert, sowie ein zusätzlicher Waschschrift eingefügt um das eingesetzte Dichlormethan wieder aus dem System zu entfernen. Weitere benötigte Reagenzienlösungen sind:

Dblk (Deblock):	3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan
Wsh A (Wash A):	Acetonitril
Wsh (Wash):	Acetonitril
Act (Activator):	0.45 M Tetrazol in Acetonitril
Cap A:	Acetanhydrid in THF/ Pyridin
Cap B:	N-Methylimidazol in THF/ Pyridin
Ox (Oxidizer):	Iod in Wasser/ THF/ Pyridin

Tabelle 8: Syntheseprotokoll für die Festphasensynthese von Oligonukleotiden nach der Phosphoramiditmethode. Die Bereiche die sich für natürliche bzw. artifizielle Bausteine unterscheiden, sind grün (natürlich, hier für Adenin gezeigt) und blau (artifiziert) gekennzeichnet. A = 5'-Dimethoxytrityl-N-benzoyl-3'-desoxyadenosin, 2'-[[2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit, X = artifizielles Phosphoramidit.

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit [s]
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2 / 24	Act / DCM + Act	PULSE	5 / 20	0
18 / 23	A + Act / X + Act	PULSE	5	0
18 / 23	A + Act / X + Act	PULSE	2 / 5	16 / 300
2 / 24	Act / DCM + Act	PULSE	3 / 5	24 / 300
1 / 5	Wsh / DCM	PULSE	7	56 / 100
5	DCM	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	8 / 80	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Nach Ende der Synthese wurden die CPG-gefüllten Säulen entnommen und über Nacht im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Säulen geöffnet und die beladenen Glaspartikel in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0.7 mL konz. Ammoniaklösung (> 25 %, trace select, Fluka) und gutem Durchmischen, wurde die Suspension für 24 h bei 34 °C inkubiert. Durch diesen Vorgang wird einerseits der Oligonukleotidstrang von der festen Phase abgespalten und andererseits die Schutzgruppen an den geschützten Basen entfernt. Um den Ammoniak zu entfernen wurden die Suspensionen bei 35 °C und 100 mbar für eine Stunde zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand durch Filtration vom Rückstand getrennt. Dieser wurde anschließend zweimal mit jeweils 200 µL und einmal mit 100 µL HPLC-reinem Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden lyophilisiert und der trockene Rückstand in 200 µL HPLC-Wasser für die anschließende Trennung wieder aufgenommen.

6.3.2 Aufreinigung, Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung

Um die Retentionszeit des synthetisierten DNA-Stranges abschätzen zu können wurde ein analytischer HPLC-Lauf der Trennung vorangestellt. Dazu wurde eine *Supelcosil* LC 318 Säule (25 cm x 4.6 mm) benutzt und ein Gradient aus 50 mM Ammoniumacetatpuffer (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) angewandt. Die lyophilisierten DNA-Rohprodukte wurden jeweils pro Ansatz in 200 µL HPLC-H₂O gelöst, 5 µL davon entnommen und mit 15 µL HPLC-H₂O verdünnt. Wurde im analytischen Lauf eine gute Trennung von Abbruch- und Produktstrang erreicht, so wurde der Gradient für die präparative Trennung übernommen, wenn nicht wurden der Gradient und die Laufzeit angepasst und der Analytiklauf wiederholt. Für die präparative Trennung wurde eine *Supelcosil* LC 318 Säule (25 cm x 10 mm, Porengröße: 5 µm) verwendet. Während des Laufes wurden die Absorption der DNA ($\lambda = 260$ nm) und die jeweils für das synthetische Nucleosid charakteristische Wellenlänge beobachtet und die Produkt enthaltenden Fraktionen manuell aufgefangen.

Zur Charakterisierung und Reinheitsbestimmung wurden die Fraktionen mit einem MALDI-Tof Massenspektrometer gemessen, die Fraktionen, in denen die korrekte Masse nachgewiesen werden konnte vereinigt und zur Reinheitsbestimmung erneut ein analytischer HPLC-Lauf durchgeführt.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Messung der Absorbanz an einem ND 1000 Spektrophotometer der Firma *Nanodrop*. Dabei wurde je nach zu erwartender Konzentration das *UV/Vis* (für sehr verdünnte Lösungen) bzw. *Nucleic Acids* Programm gewählt. Um aus der gemessenen Absorbanz bei 260 nm die Konzentration zu bestimmen wurde das *Lambert-Beersche* Gesetz angewandt.

Dafür wird der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} benötigt, der sich wie folgt berechnen lässt:

$$\epsilon_{260} = 0.9 (a \epsilon_A + g \epsilon_G + t \epsilon_T + c \epsilon_C + x \epsilon_X)$$

a, g, c, t, x: Anzahl des jeweiligen Nucleotids im Strang (x = Sonderbaustein)

$\epsilon_{A, G, T, C, X}$: Deren jeweiliger molarer Extinktionskoeffizient

Mit dem Faktor 0.9 wird die Basenstapelung im Strang berücksichtigt, die zu Hypochromizität, also verminderter Absorption im Vergleich zur Summe der Absorption der einzelnen Nukleotide, führt.

Die Extinktionskoeffizienten der Sonderbausteine wurden vor dem Einbau bestimmt und sind im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 9: Bestimmte Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{260\text{ nm}}$) der eingebauten Sonderbausteine

Nukleosid	ϵ_{260} [l/mol*cm]
Diaryltetrazolnukleosid 8	12385
Diaryltetrazolnukleosid (reduzierter Linker) 15	12983
Pyrentetrazolnukleosid 36	3700

6.4 Enzymatische Synthese der Oligonukleotide

6.4.1 Durchführung der Primerverlängerungsexperimente (PEX)

Für alle Primerverlängerungsexperimente wurden die im Folgenden aufgelisteten Primer-/ bzw. Templatstränge und entsprechende, markierte Referenzstränge zur besseren Einordnung der beobachteten Banden genutzt.

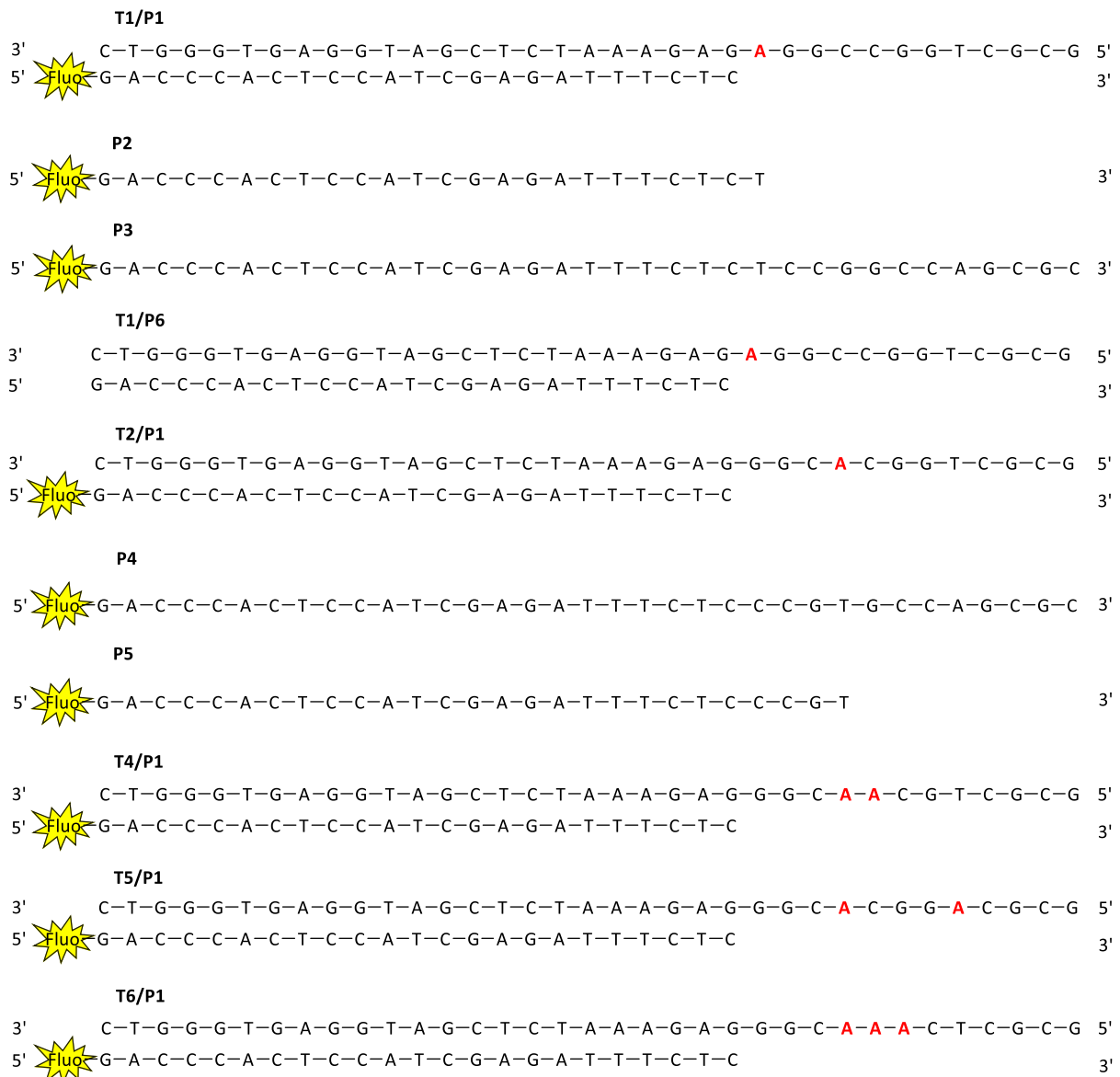


Abbildung 56: Primer-/ Templat- und Referenzstränge für die Primerverlängerungsexperimente. Die mit „Fluo“ markierten Stränge tragen eine 5'-terminale Fluoresceinmarkierung um eine Detektion über die Fluoreszenz bei 514 nm zu ermöglichen.

Hybridisierung

Zunächst wurden, entsprechend der Ansatzgröße entweder im PCR-*via*l oder im Eppendorff-Reaktionsgefäß, Templatstrang, Primerstrang, der für die jeweilige Polymerase spezifische Puffer, sowie die zur vollen Ansatzgröße verbleibende Menge HPLC-H₂O zusammengegeben und diese im Thermocycler, bzw. für große Ansätze im Heizblock für 10 min auf 90 °C erhitzt und danach langsam, innerhalb mindestens einer Stunde, wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Tabelle 10: Die für die PEX-Experimente verwendeten Puffersysteme variieren je nach verwendeter Polymerase.

Polymerase	Puffer	Zusammensetzung (x1)
Hemo Klen Taq	“Hemo Klen Taq Reaction buffer”	60 mM Tricin, 5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3.5 mM MgCl ₂ , 6 % Glycerol, pH = 8.7
Vent(-exo), DeepVent (-exo)	“Thermo Pol Reaction buffer”	20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 0.1 % Triton® X-100, pH = 8.8
KOD	KOD PCR Puffer pH = 8.0	

Für die jeweiligen Primer-/Templatpaare sowie die Mischung der Triphosphate wurden Stammlösungen vorbereitet, so dass ungeachtet der Ausgangskonzentration immer das gleiche Volumen zugegeben werden konnte.

Tabelle 11: Konzentrationen der jeweiligen Primer-/ und Templatstrangstammlösungen.

Primer- /Templatstrang	Konzentration in der Stammlösung
P1 / T1	750 μ M (P1); 900 μ M (T1)
P1 / T2	750 μ M (P1); 900 μ M (T2)
P1 / T4	750 μ M (P1); 900 μ M (T4)
P1 / T5	750 μ M (P1); 900 μ M (T5)
P1 / T6	750 μ M (P1); 900 μ M (T6)

Tabelle 12: Zusammensetzung eines Primerverlängerungsexperimentes

Komponente	Zugabevolumen [Konzentration im Experiment] pro 50 μ L Ansatzgröße
Templatstrang	5 μ L [900 nm Templat / 750 nm Primer]
Primerstrang	
dATP, dGTP, dCTP und dTetTP	10 μ L [200 μ M dNTPs, 400 μ M dTetTP]
Polymerase	4 μ L HemoKlenTaq/ 2 μ L alle anderen
Puffer	10 μ L Hemo Klen Taq Puffer / 5 μ L alle anderen
HPLC-H ₂ O	21 μ L (HemoKlenTaq) / 28 μ L alle anderen

Verlängerung

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die vorbereitete Triphosphat-Stammlösung und zuletzt die jeweilige Polymerase zur Lösung hinzugegeben und für die beschriebenen Zeitintervalle bei den jeweiligen Temperaturen im Thermocycler, bzw. für größere Ansätze im Heizblock inkubiert. Nach erfolgter Verlängerung wurde entweder ohne Aufarbeitung mit dem Click-Experiment fortgefahren oder direkt Proben für die Elektrophorese entnommen, die mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt wurden (Ladepuffer: 20 mM EDTA (Dinatriumsalz), 89 mM TRIS Base; 89 mM Borsäure, 4 % Ficoll, 0.1 % Bromphenolblau,

0.02 % Xylencyanol FF, 7 M Harnstoff) oder aber eine Aufarbeitung durch Entsalzen oder Fällern der DNA wurde angeschlossen.

Entsalzen der PEX-Lösung

Die Reaktionslösungen wurden durch Gelfiltration über eine mit Sephadex G-25 beladene *illustra* NAP-5 Säule von Salzen befreit. Dabei wurde entsprechend der Angaben des Herstellers vorgegangen und die DNA mit HPLC-H₂O eluiert. Anschließend wurden die Proben lyophilisiert, in HPLC-H₂O aufgenommen und entweder mit Ladepuffer versetzt oder mit dem Click-Experiment fortgeföhren.

Fällen der DNA aus der PEX-Lösung

Zum Ausfällen der DNA aus der Reaktionslösung wurde diese zunächst in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und mit HPLC-H₂O auf ein Volumen von 100 µL aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 100 µL Rotiphenol[®] hinzugegeben und für 10 s heftig vermischt. Zur Phasentrennung wurde für 2 min bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach dem Trennen der Phasen wurde zur oberen, wässrigen Phase, die die DNA enthielt 100 µL abs. Chloroform hinzugegeben, vermischt, zentrifugiert und die Phasen abermals getrennt. Die Extraktion mit Chloroform wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde zur wässrigen Phase 10 µL einer 3 M NaOAc Lösung hinzugegeben und zuletzt 200 µL eisgekühltes, absolutes Ethanol hinzugefügt, kurz geschüttelt und über Nacht bei – 32 °C inkubiert.

Zum Sammeln des Niederschlags wurde 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig vom DNA-Pellet abgenommen. Verbliebene Ethanolreste wurden durch Abdampfen aus dem geöffneten Reaktionsgefäß bei 50 °C im Heizblock entfernt.

Der DNA-Rückstand wurde in HPLC-H₂O wieder aufgenommen und entweder in weiteren „Click“-Experimenten genutzt oder direkt mit Ladepuffer versetzt.

6.4.2 Auswertung mittels denaturierender PAGE

Für die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde eine 12 %-ige Gelmischung aus 15.5 mL Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 40 % wässrige Lösung), 12.5 g Harnstoff, 21 mL 8.3 M wässrige Harnstofflösung und 5 mL 10-fach konzentrierter TBE Puffer der ebenfalls 8.3 M Harnstoff enthielt hergestellt. Um die Polymerisation zu starten wurden zunächst 20 μ L TEMED und anschließend 425 μ L einer 10 % APS-Lösung hinzugefügt. Nach dem Gießen wurde die Polymerisation innerhalb einer halben Stunde vervollständigt.

Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel durch Anlegen einer Spannung auf die ideale Trennungstemperatur (mindestens 40 °C) vorgeheizt. Vor dem Auftragen wurden die Geltaschen von ausfallendem Harnstoff durch mehrfaches Einleiten von Puffer gereinigt. Nach dem Auftragen von 6 μ L Probenvolumen pro Tasche wurde die Elektrophorese für eine Stunde bei 3000 V und maximal 45 W durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch Detektion der Fluoreszenz durch Anregung bei entweder 470 \pm 20 nm mit entsprechender Fluorescein-Emission bei 535 \pm 20 nm (*Cy2 Emission filter*) oder bei Anregung der Farbstofffluoreszenz bei 540 \pm 10 nm und einem Emissionsfilter von 605 \pm 20 nm (*Cy3 Emission filter*).

Tabelle 13: Zusammensetzung 10-fach konzentrierter TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer

Komponente	Konzentration
TRIS	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

6.5 PCR und Silberfärbung

6.5.1 Durchführung der PCR-Experimente

Zur Durchführung der PCR-Experimente wurden alle Komponenten in der durch untenstehende Tabelle angegebene Reihenfolge in ein 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäß gegeben und auf ein Volumen von 20 µL mit HPLC-H₂O aufgefüllt.

Tabelle 14: Zusammensetzung und Konzentrationen der jeweiligen PCR-Reaktionsmischungen.¹⁾ Die Konzentration des verwendeten Templates (pET-21b Genvektor) kann nur ungefähr angegeben werden.

Komponente	Variante A	Variante B
HPLC-H ₂ O	-	-
Puffer (entsprechend der verwendeten Polymerase, siehe 5.4.1. Tabelle 5)	1 x	1 x
Forward Primer	0.5 µM	20 µM
Reverse Primer	0.5 µM	20 µM
dATP, dGTP, dCTP(, dTTP)	200 µM	5 mM
dTetTP	400 µM	5 mM
Templat: pET-21b Vektor	1.48 nM ¹⁾	1.48 nM ¹⁾
DMSO	-	1 µL
Betain	-	1 µL (0.75 M Lsg in H ₂ O)
Formamid	-	1 µL (5 % Lsg. In H ₂ O)
TMAC	-	1 µL (50 mM Lsg in H ₂ O)
Polymerase	1 µL	1 µL

Die Reaktionsgefäße wurden mit den passenden Kappen gut verschlossen und im Thermocycler dem folgenden Temperaturprogramm unterworfen, wobei Annealingtemperatur und –zeit sowie Verlängerungstemperatur und –zeit verändert

wurden. Dabei wurde der Deckel des Thermocyclers auf 95 °C beheizt um Kondensation aus der Lösung entgegenzuwirken.

Tabelle 15: Für die PCR-Experimente genutztes Temperaturprogramm des Thermocyclers.

	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturieren	95 °C	3 min
2	Denaturieren	95 °C	1 min
3	Annealing	35 °C	1 min
		51.8 °C	
		55 °C	30 s
64 °C			
4	Verlängerung	72 °C	30 s – 1 h
Zurück zu Schritt 2 für 20-30 Schleifen			
5	Finale Verlängerung	72 °C	5 min

Nach dem beendeten Experiment wurde der Reaktionsmischung entweder direkt 20 µL Ladepuffer hinzugegeben oder die DNA wurde entsprechend 5.4.1. ausgefällt, in 10 µL HPLC-H₂O wiederaufgenommen und mit 10 µL Ladepuffer versetzt.

In Tabelle 16 findet sich ein Auszug aus den durchgeführten PCR-Experimenten.

Tabelle 16: Auszug aus den durchgeführten PCR-Experimenten.

Eintrag	Bedingungen (siehe oben)	Polymerase	Annealing- Temperatur	Verlängerung Temperatur	Verlängerung Dauer	Additive
1	A	HKT	55 °C	72 °C	45 s	-
2	A	HKT	55 °C	72 °C	5 min	-
3	A	DV	55 °C	72 °C	5 min	-
4	A	KOD	55 °C	72 °C	5 min	-
5	A	ThI	55 °C	72 °C	5 min	-
6	A	KOD	51.8 °C	72 °C	0 s	-
7	A	KOD	51.8 °C	72 °C	1 min	-
8	B	KOD	51.8 °C	72 °C	1 min	DMSO, Betain,
9	B	DV	51.8 °C	72 °C	1 min	TMAC, Formamid
10	A	KOD	51.8 °C	72 °C	30 min	-
11	A	DV	51.8 °C	72 °C	30 min	-
12	A	KOD	51.8 °C	72 °C	60 min	-
13	A	DV	51.8 °C	72 °C	60 min	-

6.5.2 Durchführung der PAGE und Anfärben der Gele durch Silberfärbung

Zur Analyse der PCR-Experimente wurden 5 %ige Polyacrylamidgele (Acrylamid: Bisacrylamid 19:1) und die *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* für 8.3 cm x 7.3 cm große Gele, genutzt. Für 10 mL der Gelmischung wurden 1.25 mL Rotiphorese® Gelmischung (40%), 1 mL 10fach konzentrierter TBE-Puffer, 4.98 g Harnstoff gemischt und mit HPLC-H₂O auf 10 mL aufgefüllt. Um die Polymerisation zu starten wurden 4 µL TEMED sowie 85 µL 10%ige APS Lösung hinzugefügt. Nach dem Gießen wurde die Polymerisation innerhalb einer halben Stunde beendet.

Vor dem Beladen wurde für 30 min eine Spannung von 120 V bei 40mA Stromstärke angelegt um das Gel auf ideale Betriebstemperatur zu bringen. Anschließend wurden die Geltaschen durch Spülen mit Laufpuffer von ausfallendem Harnstoff und Gelresten gereinigt.

Nach dem Auftragen von 8-10 µL Probenvolumen (5 µL im Falle der *Low Range DNA Ladder*) wurde die Elektrophorese für 60 min bei 120 V und 40 mA durchgeführt.

Um die DNA-Fragmente durch angelagerte, reduzierte Silberionen sichtbar zu machen wurden die folgenden Schritte durchgeführt, dabei wurde das Gel auf einem Schüttler kontinuierlich in der Lösung bewegt.

Tabelle 17: Arbeitsablauf der Silberfärbung von Polyacrylamidgelen. 1) Das Gel verbleibt in der Entwicklerlösung bis deutliche Banden sichtbar sind. Dann sollte schnell die Entwicklerlösung entfernt und gegen die Stop-Lösung ausgetauscht werden um ein Überfärben des Gels zu vermeiden.

Schritt	Zusammensetzung	Dauer
Fixieren	7.5 % Eisessig in HPLC-H ₂ O	10 min
Waschen	HPLC-H ₂ O	3 x 2 min
Behandlung mit Formaldehyd	15 % Formaldehyd in HPLC-H ₂ O	10 min
Inkubation mit Silbernitrat	0.1 %w AgNO ₃ in HPLC-H ₂ O	20 min
Waschen	HPLC-H ₂ O	10 s
Entwicklung	3 %w Na ₂ CO ₃ in HPLC-H ₂ O 4 °C	1)
Entwicklungsstop	7.5 % Eisessig in HPLC-H ₂ O	1 min

Das gefärbte Gel wurde auf dem Weißlichttisch des Stella 8300 Fluoreszenzimagings von *Raytest* ohne Emissionsfilter und einer Belichtungszeit von 200 ms abfotografiert.

6.6 Durchführung der lichtinduzierten Clickreaktion

Die Durchführung der „Photoclickreaktion“ variierte leicht, je nachdem welche Tetrazoleinheit (Monomer, DNA aus der Festphasensynthese oder DNA aus der enzymatischen Synthese) verwendet und welche Analysemethode (HPLC bzw. Gelelektrophorese) gewünscht war.

Für die Belichtungen des Monomers wurden 600 μL einer wässrigen Lösung hergestellt, die 10 % Acetonitril, 100 μM Nukleosid und 125 μM sulfonylierten Cy3-Farbstoff (**SulfoCy3**) enthielt. Diese Lösung wurde für die gegebenen Zeitintervalle bei 20 °C mit zwei 365 nm *highpower* LEDs belichtet. Zur Analyse wurden entweder Proben entnommen oder das Lösungsmittel komplett entfernt.

Um die mittels Festphasensynthese hergestellten, tetrazolmodifizierten DNA-Stränge zu modifizieren, wurde eine 2.5 μM Lösung des DNA-Stranges mit dem komplementären Gegenstrang in 10 mM NaP_i Puffer/ 250 mM NaCl hergestellt. Die hinzugegebene Menge an HPLC- H_2O wurde dabei jeweils so variiert, dass auch nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an Dipolarophil die Konzentrationen konstant gehalten wurden. Die Lösung wurde im Heizblock für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach erfolgter Hybridisierung wurde das Dipolarophil in der jeweiligen Menge hinzugegeben und die Reaktionsmischung in eine Quartzglasküvette überführt. Die Belichtung erfolgte bei 20 °C bei 365 nm für die gegebenen Zeitabstände. Nach dem Ende der Belichtung wurde ein definiertes Probenvolumen entnommen und lyophilisiert. Nach Wiederaufnahme des Rückstandes in HPLC- H_2O erfolgte die Analyse über eine semi-präparative HPLC Trennung mit einer Supelcosil LC 318 Säule (25 cm x 10 mm, Porengröße: 5 μm) und einem Gradienten von 0-30 % Acetonitril (Eluent B) und NH_4OAc Puffer (Eluent A, 50 mM, pH = 6.5) in 45 Minuten. Während des Laufes wurde die Absorption bei 260, 340 sowie 548 nm beobachtet und Fraktionen, die bei allen drei Wellenlängen eine Absorption aufwiesen aufgefangen. Bei den durch MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesenen Produktfraktionen wurde anschließend die Konzentration über die Absorption bei 260 nm bestimmt. So konnte die Produktausbeute bestimmt werden.

Die Belichtung der aus der enzymatischen Synthese stammenden DNA Stränge erfolgte entweder direkt in der nicht weiter behandelten Synthesemischung, oder aber nach entsprechender Aufreinigung. So wurde entsprechend 5.4.1. entweder Entsalzt oder die DNA extrahiert und anschließend gefällt.

Für die Belichtung wurde der Rückstand in 200 μL des entsprechenden Lösungsmittels wieder aufgenommen und mit der jeweiligen Menge an Dipolarophil versetzt. Die Belichtung erfolgte wiederum bei 20 °C und 365 nm für die entsprechenden Zeitintervalle. Nach dem jeweiligen Zeitabschnitt wurde eine Probe entnommen und mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt. (für Ladepufferzusammensetzung und Gelelektrophorese siehe Abschnitt 6.4.2)

6.7 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der „Photoclickreaktion“

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cyc} der „Photoclickreaktion“ wurden analog zum oben beschriebenen Vorgehen zur Belichtung eines über Festphasensynthese erhaltenen DNA-Strangs die folgenden Belichtungsexperimente durchgeführt:

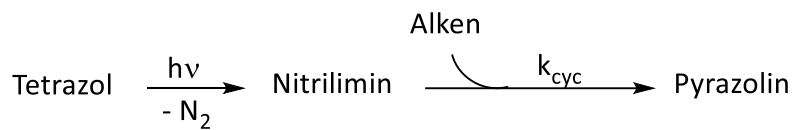


Abbildung 57: Ablauf der "Photoclickreaktion" mit eingezeichnetem, geschwindigkeitsbestimmendem Schritt.^{[119] [120]}

Tabelle 18: Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten durchgeführte Experimente und dabei erhaltene Ausbeuten. Die verwendete DNA-Konzentration betrug für jeden durchgeführten Versuch $c = 2.5 \mu\text{M}$.

Belichtungszeit [s]	5 Äquivalente SulfoCy3	10 Äquivalente SulfoCy3
60	5.6 %	6.4 %
300	26 %	29 %
600	22 %	37.5 %
1200	28.2 %	33.6 %
1800	34.4 %	33.2 %

Die zu ermittelnde Geschwindigkeitskonstante k_{cyc} ergibt sich als Quotient der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} und der eingesetzten Dipolarophilkonzentration.

$$I) \quad k_{\text{obs}} = k_{\text{cyc}} \cdot [\text{Dipolarophil}]$$

Zur Berechnung von k_{obs} wird von einem Zeitgesetz pseudo 1. Ordnung ausgegangen. Es kann folgende Gleichung aufgestellt werden:

$$\text{II)} \quad \frac{d [\text{Nitrilimin}]}{dt} = -k_{\text{obs}} \cdot [\text{Nitrilimin}]$$

Nach Integration von 0 bis t und von $[\text{Nitrilimin}]_0$ bis $[\text{Nitrilimin}]_t$ ergibt sich daraus:

$$\text{III)} \quad \ln \left(\frac{[\text{Nitrilimin}]_t}{[\text{Nitrilimin}]_0} \right) = -k_{\text{obs}} \cdot t$$

Aufgrund des schnellen ersten Reaktionsschrittes können die Ausgangskonzentrationen des Nitrilimins und des Tetrazols gleichgesetzt werden. Außerdem gilt:

$$\text{IV)} \quad [\text{Nitrilimin}]_t = [\text{Nitrilimin}]_0 - [\text{Pyrazolin}]_t$$

Weiterhin kann Gleichung III) umgeformt werden zu:

$$\text{V)} \quad \ln \left(\frac{[\text{Tetrazol}]_0}{[\text{Nitrilimin}]_0 - [\text{Pyrazolin}]_t} \right) = k_{\text{obs}} \cdot t$$

Trägt man nun die bei den Belichtungsexperimenten bestimmten Produktkonzentrationen in einem Plot $\ln(2.5 \mu\text{M}/(2.5 \mu\text{M} - [\text{Produkt}]_t))$ gegen die Zeit in Sekunden auf, so ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die Steigung der Geraden entspricht der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} . Dividiert man diese durch die jeweils eingesetzte Dipolarophilkonzentration, so ergibt sich die absolute Geschwindigkeitskonstante k_{cyc} . Um einen verlässlicheren Wert zu erhalten, wurden die „Photoclickreaktionen“ mit unterschiedlichen Konzentrationen des Dipolarophils durchgeführt und der Mittelwert der Geschwindigkeitskonstanten ermittelt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] UNESCO, *Declaration on Science and the use of scientific knowledge*, Weltwissenschaftskonferenz, Budapest, **1999**, <http://www.unesco.de/infothek/dokumente/konferenzbeschluesse/wwk-erklaerung.html>, abgerufen am 17.10.2016.
- [2] B. v. Chartres, **1120**.
- [3] R. Noyori, *Chem. Commun.* **2005**, 1807-1811.
- [4] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [5] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [6] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589-1600.
- [7] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.
- [8] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [9] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223-239.
- [10] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.
- [11] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217.
- [12] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *Suppl*, S1-7.
- [13] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567-1572.
- [14] V. V. Verkhusha, K. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 289-296.
- [15] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [16] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533-3539.
- [17] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708-4709.
- [18] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E.-J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *PNAS* **2003**, *100*, 9116-9121.

- [19] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3754-3757.
- [20] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.
- [21] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2353-2353.
- [22] S. H. Weisbrod, A. Baccaro, A. Marx, *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52*, 383-384.
- [23] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1828-1830.
- [24] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [25] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Sci. China Chem.* **2010**, *53*, 61-70.
- [26] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125.
- [27] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- [28] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581-7584.
- [29] M. F. Debets, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6439-6455.
- [30] V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8150-8151.
- [31] Z. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735-6746.
- [32] P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9307-9320.
- [33] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.
- [34] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [35] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [36] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

- [37] S. Arndt, Diplomarbeit, Institut für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie, **2013**.
- [38] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolor, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993-18001.
- [39] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [40] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [41] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687.
- [42] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 535-546.
- [43] C. Y. Jao, A. Salic, *PNAS* **2008**, *105*, 15779-15784.
- [44] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1258-1267.
- [45] U. Jakobsen, S. A. Shelke, S. Vogel, S. T. Sigurdsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10424-10428.
- [46] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [47] H.-K. Walter, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- [48] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152.
- [49] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003-7008.
- [50] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [51] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [52] I. K. Astakhova, J. Wengel, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1112-1122.
- [53] F. Seela, H. Xiong, P. Leonard, S. Budow, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1374-1387.
- [54] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.

- [55] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 581-589.
- [56] M. Aigner, M. Hartl, K. Fauster, J. Steger, K. Bister, R. Micura, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47-51.
- [57] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2230-2231.
- [58] M. A. Fomich, M. V. Kvach, M. J. Navakouski, C. Weise, A. V. Baranovsky, V. A. Korshun, V. V. Shmanai, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4590-4593.
- [59] E. Westhof, *RNA* **2014**, *20*, 1843-1843.
- [60] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153-2154.
- [61] K. B. Wiberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 312-322.
- [62] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [63] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1541-1553.
- [64] F. Schoenebeck, D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121-8133.
- [65] G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443-2447.
- [66] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [67] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [68] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068-1072.
- [69] C. Stubinitzky, G. B. Cserep, E. Batzner, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11218-11221.
- [70] Á. Eördögh, J. Steinmeyer, K. Peewasan, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 457-464.
- [71] M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6257-6259.

- [72] P. van Delft, E. van Schie, N. J. Meeuwenoord, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, D. V. Filippov, *Synthesis* **2011**, 2011, 2724-2732.
- [73] I. Singh, C. Freeman, F. Heaney, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 6739-6746.
- [74] I. Singh, C. Freeman, A. Madder, J. S. Vyle, F. Heaney, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 6633-6639.
- [75] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5131-5142.
- [76] G. B. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Synthesis* **2015**, 47, 2738-2744.
- [77] J. Šečkutè, J. Yang, N. K. Devaraj, *Nucleic Acids Res.* **2013**.
- [78] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**.
- [79] J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 1362-1369.
- [80] Bu, E. Batroff, A. Niederwieser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 10827-10829.
- [81] J. Schoch, S. Ameta, A. Jaschke, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 12536-12537.
- [82] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8846-8847.
- [83] S. Ameta, J. Becker, A. Jaschke, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 4701-4707.
- [84] U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 9322-9326.
- [85] D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H.-W. Shih, K. N. Houk, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 13680-13683.
- [86] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 60-70.
- [87] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, 9, 4155-4158.
- [88] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, 10, 3725-3728.
- [89] C. P. Ramil, Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 89-95.
- [90] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 9920-9922.
- [91] Z. Yu, L. Y. Ho, Z. Wang, Q. Lin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5033-5036.

- [92] Z. Yu, T. Y. Ohulchanskyy, P. An, P. N. Prasad, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16766-16769.
- [93] P. Lederhose, Z. Chen, R. Müller, J. P. Blinco, S. Wu, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12195-12199.
- [94] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828-839.
- [95] Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5434-5437.
- [96] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600-10604.
- [97] Z. Yu, L. Y. Ho, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11912-11915.
- [98] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2874-2877.
- [99] Z. Yu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4153-4156.
- [100] S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang, T. Luo, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702-4705.
- [101] Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J.-S. Lee, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2002-2006.
- [102] W. L. Y Zhang, Z.K. Zhao, *Molecules* **2014**, *19*, 306-315.
- [103] W. Feng, L. Li, C. Yang, A. Welle, O. Trapp, P. A. Levkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8732-8735.
- [104] M. A. Tasdelen, Y. Yagci, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5930-5938.
- [105] A. A. Poloukhine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.
- [106] S. V. Orski, A. A. Poloukhine, S. Arumugam, L. Mao, V. V. Popik, J. Locklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024-11026.
- [107] D. M. Bauer, A. Rogge, L. Stolzer, C. Barner-Kowollik, L. Fruk, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8626-8628.
- [108] T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1071-1074.
- [109] T. Gruending, K. K. Oehlenschlaeger, E. Frick, M. Glassner, C. Schmid, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 807-812.

- [110] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7993-7995.
- [111] A. Padwa, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 371-378.
- [112] J. O. Mueller, F. G. Schmidt, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10284-10288.
- [113] M. C. Cuquerella, V. Lhiaubet-Vallet, F. Bosca, M. A. Miranda, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1219-1232.
- [114] J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat, T. Douki, *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 1048-1065.
- [115] H.-A. Wagenknecht, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 3197-3198.
- [116] S. Ito, Y. Tanaka, A. Kakehi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 762-766.
- [117] S. Ito, Y. Tanaka, A. Kakehi, K.-i. Kondo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1920-1923.
- [118] Lumiprobe, <http://de.lumiprobe.com/p/sulfo-cy3-maleimide>, 21.09.2016.
- [119] V. L. P. Leihkauf, C. Csongar, G. Tomaschewski, *J. Prakt. Chem.* **1989**, 789-798.
- [120] J. W. C. K. Lang, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 16-20.
- [121] *Klinische Pathophysiologie*, 9. ed., H. E. B. W. Siegenthaler, Thieme, Stuttgart, **2006**.
- [122] *Pathophysiologie*, 1. ed., K. K. U.R. Fölsch, R.F. Schmidt, Springer, Berlin, **2000**.
- [123] in *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics* (Ed.: C. Mülhardt), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**, pp. 84-120.
- [124] M. B. Kermekchiev, L. I. Kirilova, E. E. Vail, W. M. Barnes, *Nucleic Acids Res.* **2009**.
- [125] P. N. Asare-Okai, E. Agustin, D. Fabris, M. Royzen, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7844-7847.
- [126] K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2060.
- [127] W. H. Dawson, R. L. Cargill, R. B. Dunlap, *J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides* **1977**, *4*, 363-375.
- [128] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065-5068.
- [129] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **1981**, *16*, 131-133.

- [130] K. Wang, D. Wang, K. Ji, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, B. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 909-915.
- [131] X. Ren, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Analyst* **2015**, *140*, 2671-2678.
- [132] K. B. Mullis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1209-1213.
- [133] V. Raindlová, R. Pohl, M. Šanda, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1064-1066.
- [134] GeneLink, PCR Additives & Enhancers,
https://www.genelink.com/Literature/ps/M40-3021-PCR_Additives_Ver5.1.pdf,
- [135] S. J. Angepasst aus: J. A. D’Orazio, A. Marsch, J. Lagrew and L. Cleary, *Melanoma — Epidemiology, Genetics and Risk Factors, Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*, L. Davids, Intech Open, **2013**.
- [136] J. H.-S. H. Otteneder, Cumarin, <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-03-02896>, 11.10.2016.
- [137] G. A. Reynolds, K. H. Drexhage, *Opt. Commun.* **1975**, *13*, 222-225.
- [138] K. Hara, T. Sato, R. Katoh, A. Furube, Y. Ohga, A. Shinpo, S. Suga, K. Sayama, H. Sugihara, H. Arakawa, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 597-606.
- [139] Y. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653-4663.
- [140] H. S. Jung, P. S. Kwon, J. W. Lee, J. I. Kim, C. S. Hong, J. W. Kim, S. Yan, J. Y. Lee, J. H. Lee, T. Joo, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2008-2012.
- [141] C. Müller, A. Bauer, T. Bach, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6767-6769.
- [142] Römpp, Pyren, <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-16-05112>, 11.10.2016.
- [143] J. N. Wilson, E. T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4265-4274.
- [144] S. Sezi, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9257-9259.
- [145] P. Lederhose, K. N. R. Wust, C. Barner-Kowollik, J. P. Blinco, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5928-5931.

- [146] H. Schill, S. Nizamov, F. Bottanelli, J. Bierwagen, V. N. Belov, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16556-16565.
- [147] S. H. Szajnman, W. Yan, B. N. Bailey, R. Docampo, E. Elhalem, J. B. Rodriguez, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1826-1840.

8 Appendix

8.1 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

S.Arndt, H.-A. Wagenknecht, ““Photoclick” Postsynthetic Modification of DNA”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 14580–14582.

S.Arndt, H.-A. Wagenknecht, “Postsynthetische “Photoclick”-Modifizierung von DNA“, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 14808.

M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, and H.-A. Wagenknecht, „Copper-Free Postsynthetic Labeling of Nucleic Acids by Means of Bioorthogonal Reactions“, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1541 – 1553.

S. Arndt*, H.-K. Walter*, H.-A. Wagenknecht, „Synthesis of wavelength-shifting DNA hybridization probes by using photostable cyanine dyes“, *J.Vis.Exp* **2016**, 113, e54121.

M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserep, U. Wenge, P. Kele and H.-A. Wagenknecht, “Scope and limitations of typical copper-free biorthogonal reactions with DNA: Reactive 2'-deoxyuridine triphosphates for postsynthetic labeling”, *Journal of Organic Chemistry*, **2016**, 81, 7527–7538.

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe, die elektronische Version mit der schriftlichen übereinstimmt und ich die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe. Außerdem versichere ich, dass die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist.

Karlsruhe, den 19.12.2016

Stefanie Arndt

