

Artifizielle DNA-Bausteine

Isostere Fluoreszenzsonden und postsynthetische Diels-Alder Reaktion zur bioorthogonalen Markierung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich



genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Marcus Merkel

aus Mannheim, Baden-Württemberg

Karlsruhe, 2016

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem M. Klopper

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2016

meiner Familie

*„Alles ist möglich, vorausgesetzt,
dass es genügend unvernünftig ist“*

Niels Bohr

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2012 bis Juli 2016 am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung, für die wissenschaftlichen Freiheiten, die interessante Themenstellung sowie für die sehr gute und angenehme Arbeitsatmosphäre. Außerdem möchte ich mich für viele lockere aber dennoch anregende Gespräche, die zur Umsetzung der eigenen Ideen beitrugen, bedanken.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Prof. Dr. Nikolaus Ernsting und Dr. Lars Dehmel von der Humboldt-Universität zu Berlin für die Geduld, Kooperation und die Strukturbestimmungen.
- Dem Arbeitskreis Kele vom Research Centre for Natural Sciences in Budapest für die Synthese der Tetrazine sowie der Rhodaminderivate
- Dr. Andreas Rapp, Tanja Ohmer, Anne-Lena Emmerich und Pia Lang für das Messen der NMR-Proben.
- Damian, Sergej und David für die Messungen der NMR-Proben am 500 MHz Spektrometer.
- Richard von Budberg und Jakob Mayer für das Reparieren von allen möglichen Geräten.
- Ingrid Roßnagel und Angelika Mösle für die Anfertigung der Massenspektren.
- Dr. Norbert Foitzik für die wertvolle Hilfe rund ums Praktikum.
- Annette Hochgesandt für die Einkäufe und das Durchhaltevermögen bei den vielen MALDI-Messungen.
- Claudia Sommer für ihre Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Anliegen und den vielen interessanten und lustigen Gesprächen.
- Jeannine, Damian und Nadine für das aufwändige Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Kai Hildebrandt vom Arbeitskreis Barner-Kowollik vom Institut für Technische Chemie und Polymerchemie des KITs für die „Rettung in letzter Minute“.

- Ciske Faber für die Hilfe und die zahlreichen Unterhaltungen beim Lösemittelabfüllen.
- Andreas Dittmer für die jahrelange Versorgung mit Glykal, Humor und für sein offenes Ohr in jeglicher Hinsicht.
- Meinen Kollegen:

Dr. Philipp Ensslen, Barbara Reiß, Dr. Michael Weinberger, Dr. Ulrike Wenge, Dr. Sabrina Sezi, Dr. Christian Wellner, Dr. Claudia Stubinitzky, Stefanie Arndt, Krisana Peewasan, Nadine Gaß, Dr. Wolfgang Schmucker, Dr. Sebastian Barrois, Dr. Effi Bätzner, Dr. Alexander Penner, Jeannine Steinmeyer, Benjamin Lehmann, David Rombach, Heidi Walter, Christian Schwechheimer, Robert Hofsäß, Dr. Thomas Ehrenschwender, Dr. Carolin Holzhauser, Dr. Peggy Bohländer, Dr. Martin Weiser, Sergej Hermann, Damian Ploschik, Andrea Bijeljanin, Tamina Schneider, Yannick Fritz, Leonora Nurcaj, Linda Antusch, Christoph Bickmann und Ulrike Reißacher für die großartige Zeit, Zusammenarbeit und schönen Gespräche

- Meinen Laborkollegen

Dr. Peggy Bohländer und Dr. Claudia Stubinitzky für die ersten lustigen Monate im Luderlabor. Barb und Pille, für die wunderbare Zeit im Kinderlabor und für den Spaß und Witz aber auch den vertrauten und wissenschaftlichen Diskussionen, die einem in sämtlichen Problemen geholfen haben.

- Meinen Bachelor- und Vertieferpraktikanten:

Kevin Bossert, Tim Seifert, Jeannine Steinmeyer und Jasmin Quan und meiner Azubine Svenja Kusterer für die angenehme Zeit, Unterstützung und Hilfe zur Durchführung der Projekte

- Effi, Barry, Pille, Christoph, Alex und Robert für die genialen Stunden beim gemeinsamen Musizieren.
- Effi, Barry und Pille für einen unvergesslichen Sommer 2012 und für viele schöne Momente, die den Einstieg so genial und wunderbar machten.
- Pille und Celine für eine coole Zeit beim Kochen (bekochen lassen) oder Bierchen beim Frauenfußball.
- Dem kompletten PLokomotive HansA Glanz Team.

- Dave, Damian, Jeannine, Nadine, Christian und Jack für die ernsteren und vertrauten Gespräche und dass ich immer auf euch zählen kann
- Barb, Steffi und Heidi für ihr offenes Ohr und dass sie immer für einen da sind
- Robse und Binja, die für jeden Spaß zu haben sind
- Christoph und Carsten, für die zahlreichen Besuche im AKW und die gute Freundschaft.

Und vor allem bei denjenigen, die ich jetzt vergessen habe.

Mein weiterer Dank gilt auch den Mannheimern, die mir durch ihre Freundschaft und Unterstützung sowohl vor als auch während dem Studium eine schöne Zeit bereitet haben. Danke an Marian, Sarah, Mario, Thomas, Clarissa, Paula, Michi, Katrin, Lea, Kai, Jeanette und Alex.

Und im ganz Besonderen möchte ich mich bei Jeannine bedanken. Danke für die große Unterstützung und die Freude, die du mir bereitest. Danke, dass du da bist und zu mir hältst, auch wenn ich es manchmal nicht einfach gemacht habe.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinem Bruder Marcel, meinen Eltern und Großeltern, die mich mein ganzes bisheriges Leben mit Liebe und Unterstützung begleitet haben und ohne die ich niemals der Mensch geworden wäre, der ich jetzt bin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I Einleitung und Themenstellung	1
II Teil A: 4-Aminophthalimid und 4-N,N-Dimethylamino-phthalimid als isostere Basensurrogate	5
1 Theoretische Hintergründe	5
1.1 <i>Artifizielle Basenpaare mit Wasserstoff-Brücken</i>	5
1.2 <i>Artifizielle Basenpaare ohne H-Brücken</i>	7
1.3 <i>Fluoreszente Basensurrogate</i>	9
1.4 <i>4-Aminophthalimid als Fluoreszenzsonde</i>	12
1.5 <i>Primerverlängerung als Analyse- und Syntheseverfahren</i>	16
2 Syntheseübersicht	19
2.1 <i>Synthese des Phosphoramidit-Bausteins von DMAPI</i>	19
2.2 <i>Synthese des Phosphoramidit-Bausteins von o-4API</i>	24
2.3 <i>Synthese des m-4API-Nukleosids</i>	27
2.4 <i>Synthese des 2,4-Diaminopyrimidin Bausteins</i>	28
3 Synthese der Nukleotide	30
3.1 <i>Synthese der 4-API-modifizierten Nukleosidtriphosphate</i>	31
3.2 <i>Synthese der Nukleosid-α-Thiotriphosphate</i>	32
4 Synthese der Oligonukleotide	33
4.1 <i>Synthese phthalimidmodifizierter DNA</i>	34
4.2 <i>Synthese der mit 2,4-Diaminopyrimidin modifizierten Oligonukleotide</i>	36
5 Optische Charakterisierung	37
5.1 <i>Vergleich der optischen Eigenschaften von 2 und 4API</i>	37
5.2 <i>Vergleich der optischen Eigenschaften von 1 und DMAPI</i>	38
5.3 <i>Vergleich der farbstoffmodifizierten DNA</i>	40
6 Strukturbestimmung im Doppelstrang	46
6.1 <i>Struktur des o-4API:DAPym-Systems</i>	46
6.2 <i>Struktur des DMAPI:DAPym-Systems</i>	47
7 Enzymatischer Einbau des 4API:DAPym-Basenpaars in DNA	49
7.1 <i>Aufbau der Primerverlängerungsexperimente</i>	49
7.2 <i>Polymerasenscreening für das System o-4API:DAPym</i>	51
7.3 <i>Optimierung der Primer Extension für o-4API</i>	52
7.4 <i>Polymerase-Screening und Optimierung der Primer Extension für das Basensystem m-4API:DAPym</i>	56

7.5	<i>Vergleich der beiden Bausteine</i>	57
7.6	<i>Enzymatischer Einbau der α-Thiotriphosphate von o-4API in Oligonukleotide und enzymatischer Verdau</i>	60
8	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	64
III	Teil B: Tetrazinmodifizierte DNA zur bioorthogonalen Markierung von Nucleinsäuren	67
1	<i>Theoretischer Hintergrund</i>	67
1.1	<i>Bioorthogonale Konjugationsmethoden in der Nucleinsäurechemie</i>	67
1.2	<i>iEDDA in Nucleinsäuren</i>	70
2	<i>Aufbau des Systems</i>	76
3	<i>Syntheseübersicht</i>	77
4	<i>Enzymatischer Einbau tetrazinmodifizierter Triphosphate</i>	81
4.1	<i>Aufbau der Experimente</i>	81
4.2	<i>Primerverlängerungsexperimente mit tetrazinmodifizierter DNA</i>	83
5	<i>Postsynthetische Modifizierung mittels iEDDA</i>	85
6	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	88
IV	Zusammenfassung	91
V	Experimentalteil	95
1	<i>Synthesevorschriften 4API-Projekt</i>	95
2	<i>Synthesevorschriften Tetrazin-Projekt</i>	120
3	<i>Materialien und Geräte</i>	127
4	<i>Synthese der Oligonukleotide</i>	133
4.1	<i>Chemische DNA-Synthese</i>	133
4.2	<i>Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide</i>	136
4.3	<i>Enzymatische DNA Synthese</i>	138
4.4	<i>Charakterisierung</i>	139
4.5	<i>Konzentrationsbestimmung</i>	140
4.6	<i>Unmodifizierte Oligonukleotide</i>	141
4.7	<i>Hybridisierung</i>	141
4.8	<i>Optische Spektroskopie</i>	141
4.9	<i>Enzymatischer Verdau mittels Exonuklease III</i>	142
4.10	<i>Postsynthetische Modifizierung mittels iEDDA</i>	142
VI	Literaturverzeichnis	143
VII	Anhang	151

Abkürzungsverzeichnis

4API	4-Aminophthalimid
9°N	9°N-Polymerase
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
Abb.	Abbildung
Ac	cetyl
AcOH/OAc	Essigsäure/Acetat
ATP	Adenosintriphosphat
BCN	Bicyclononin
c	Konzentration
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
CDI	Carbonyldiimidazol
COMBO	Carboxymethylmonobenzozyklooktin
CPG	controlled pore glass
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition
Cy	Cyclohexyl-
DAPym	Diaminopyrimidin
dba	Dibenzylidenaceton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
dd	Didesoxy-
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA	Dimethylamin
DMAPI	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminophthalimid
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
DMTr	Dimethoxytrityl-
DMTr-Cl	Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dS	abasische Stelle
ds	Doppelstrang

DV	Deep Vent (exo-)
E	Energie
EE	Essigsäureethylester
em	Emission
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Et ₃ N	Triethylamin
Fluo	6-Carboxyhexylfluorescein
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G	uanin, 2'-Desoxyguanosin
h	Stunden
HBTU	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HE	Hemo KlenTaq
HeLa	Henrietta Lacks
HMDS	Hexamethyldisilazan
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (HR = high resolution)
IC	<i>Internal Conversion</i>
ICT	<i>Intramolecular Charge Transfer</i>
iEDDA	Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf
i-Pr	<i>iso</i> -Propyl
iPrPac	iso-Propyl-Phenoxyacetyl-
Kap.	Kapitel
KF	Klenow-Fragment (exo-)
t	Zeit
KOD	KOD XL
Konz.	Konzentration
L	Liter
LE	<i>Locally Excited</i>
LED	Leuchtdiode
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazan
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital

M	Molmasse
m-4API	meta-4-Aminophthalimid
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minuten
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	nano
NaPi	Natriumphosphat-Puffer (pH = 7)
NBS	N-Bromsuccinimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIS	N-Iodsuccinimid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
norm.	normiert
NPEOC	<i>p</i> -Nitrophenylethoxycarbonyl-
NT	Nukleotide
o-4API	ortho-4-Aminophthalimid
OEt	Ethoxy
OTf	Triflat
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PCR	Polymerasenkettenreaktion (polymerase-chain-reaction)
p.A.	analysenrein (<i>pro analysi</i>)
Pac	Phenoxyacetyl-
Ph	Phenyl
pH	pH-Wert
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Protonenschwamm
PW	PWO-Polymerase
quant.	quantitativ
R _f	Retentionsfaktor
Rhod	Rhodamin
RNA	Ribonukleinsäure

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S ₀	nicht angeregter Grundzustand
S ₁	erster elektronisch angeregter Zustand
ss	Einzelstrang
SPAAC	spannungsunterstützte Azid-Alkin- Cycloaddition
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
T	Temperatur
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBAC	Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	tert-Butyldimethylsilyl
TBDMS-Cl	tert-Butyldimethylsilylchlorid
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TEAB	Tributylammoniumbicarbonat
t-Bu	<i>tert</i> -Butyl
Temp.	Temperatur
TH	Therminator
THF	Tetrahydrofuran
TICT	<i>Twisted Intramolecular Charge Transfer</i>
T _m	Schmelztemperatur
TMP	Trimethylphosphat
Trp	Tryptophan
U	Uridin
ü. N.	Über Nacht
UV/Vis	Ultraviolettes- und sichtbares Lichtspektrum (190 – 800 nm)
UV	Ultraviolett
V	Vent (exo-)
Vis	sichtbar (visible)
VL	Vollängenprodukt
XPhos	Dicyclohexyl(2',4',6'-triisopropylbiphenyl-2-yl)phosphan

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

a Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

b IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNO) 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.

I Einleitung und Themenstellung

“DNA did not yet interest me. I was excited by molecules. DNA before PCR was long and stringy, not really molecular at all. [...] But then, [...] DNA synthesis was much more fun than killing rats [...] I started playing with the oligonucleotides to find out what they could do.”, sagte der Nobelpreisträger und Erfinder der Polymerasekettenreaktion (PCR) Kary Mullis in seiner Nobelpreisrede.^[1] Es mag einem schwer fallen, DNA als etwas Kleines und Molekulares anzusehen, wenn bedacht wird, welche Fülle an Informationen in diesem, aus vier Bausteinen bestehenden Konstrukt, steckt. Anhand dieses Vier-Buchstaben-Codes lassen sich alle biologischen Prozesse, die für unser Leben verantwortlich sind, ableiten, indem sie in der Abfolge der einzelnen Basen A,T,C und G niedergeschrieben sind. Bevor Kary Mullis nach Berkeley ging, um in der Biochemie zu promovieren, wusste er noch nicht, dass ihm die effiziente und präzise Arbeit der DNA-Replikationsmaschinerie eines Tages den Erfolg bringen würden, für den er letztendlich ausgezeichnet wurde. Dabei entwickelte er strenggenommen keine neue DNA-Synthese. Er wusste jedoch, wie er die Werkzeuge der Natur geschickt nutzen konnte, damit diese die zielgerichtete Synthese nach Anleitung einer festen Basensequenz übernehmen. Diese Werkzeuge bestehen aus Proteinen, die ebenfalls über Transkription und Translation aus Genen exprimiert wurden (Abb. 1).

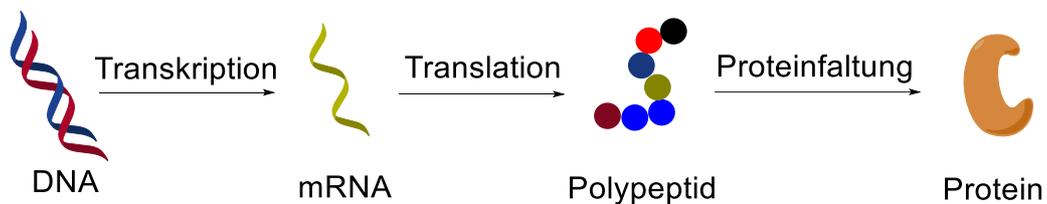


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Proteinbiosynthese.

Allerdings wird der DNA in diesen Prozessen eine eher statische und keine ausführende Rolle zugeordnet. Aufgrund der nahezu identischen Eigenschaften der einzelnen Bausteine, werden Nukleinsäuren nicht als hochgradig funktionelle Biopolymere angesehen.^[2] Um die molekularen und strukturellen Eigenschaften der Nukleinsäure jedoch mit vielfältigen Funktionen kombinieren zu können, wurden in der Vergangenheit unzählige Modifikationen an DNA und RNA durchgeführt. Viele Synthesemethoden erlauben es, die spezifische Markierung an bestimmten Stellen in der Nukleinsäuresequenz zu ermöglichen.

Themenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen auf Basis der beiden Farbstoffe 4-Aminophthalimid (**4API**) und 4-(*N,N*)-Dimethylaminophthalimid (**DMAPI**) neue C-Nukleoside synthetisiert werden, die nicht nur als isosterer Ersatz in Oligonukleotiden, sondern auch als Fluoreszenzsonden dienen können. Desweiteren soll ein tetrazinmodifizierter 2'-Desoxyuridinbaustein synthetisiert werden, wodurch die postsynthetische Modifizierung von Oligonukleotiden mittels Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf zugänglich wird.

4API und DMAPI als isosterer Basenersatz

Durch die ausgeprägte Solvatochromie und die nahezu perfekte Größenkomplementarität zu den natürlichen DNA-Basen sind die beiden Chromophore **4API** und das Analogon **DMAPI** für potentielle Anwendungen in der Nucleinsäureanalytik von besonderem Interesse. Durch das im Vergleich zu den natürlichen Bausteinen klar getrennte Absorptionsmaximum bei etwa 360 nm und die vielversprechenden Quantenausbeuten bietet sich der Einsatz als Fluoreszenzsonden in der zellulären Bildgebung an. Die optischen Eigenschaften erlauben außerdem einen Einblick in dynamische Molekularprozesse von Biomolekülen. Aus all diesen Gründen wurde das C-Nukleosid von **4API** bereits als isosterer Basenersatz **3** in DNA integriert und charakterisiert (Abb. 2).

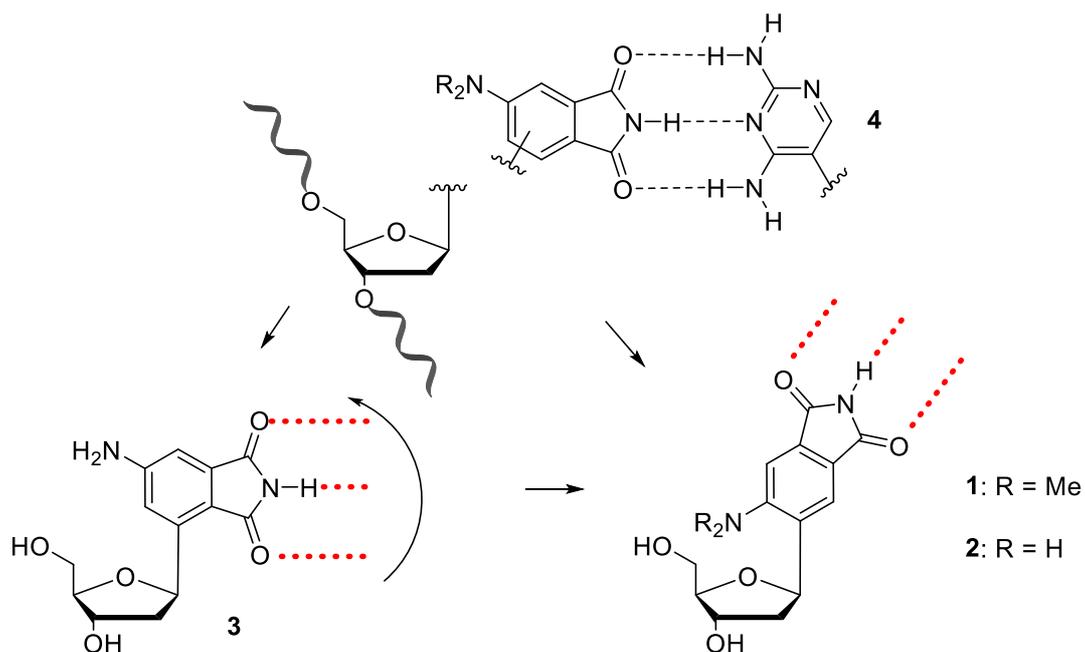


Abb. 2: Vorgeschlagenes Basenpaar **4API:DAPym** (oben) und Strukturformeln des bekannten Nucleosids **3** sowie der beiden Zielmoleküle **1** und **2** (unten).

C-Nukleoside weisen im Gegensatz zu den N-Analoga eine stabilere C-C-Knüpfung an der glykosidischen Bindung zwischen Riboseeinheit und Aglykon auf und sind somit im Vergleich zu diesen hydrolysestabiler. Obwohl dieser Baustein mit einer komplementären Gegenbase, dem 2,4-Diaminopyrimidin (**DAPym**), im Doppelstrang vergleichbare Eigenschaften aufweist wie mit den natürlichen Basen, haben weiterführende Messungen ergeben, dass aufgrund der geometrischen Ausrichtung der beiden artifiziellen Basen zueinander, keine optimale Paarung stattfinden kann. Bei genauerer Betrachtung erfolgt diese erst bei höheren Temperaturen, wenn die rigide Struktur der DNA-Helix anfängt sich aufzulockern und an Flexibilität zunimmt. Eine mögliche Verbesserung dieses Systems wäre die Veränderung des glykosidischen Bindungswinkels, um die Wasserstoffbrückenseite des Chromophors relativ zur Gegenbase auszurichten. Aus diesem Grund sollen die beiden C-Nukleoside **1** und **2** synthetisiert werden, bei denen die Anknüpfung des Aglykons über die ortho-Position zum Aminosubstituenten erfolgt. Das Nukleosid **2** wurde zusätzlich ausgewählt, da es leicht verbesserte optische Eigenschaften aufweist und als Modifikation in Oligonukleotiden im Vergleich zu **1** synthetisch einfacher zugänglich ist. Nach Einbau der beiden Bausteine mittels Phosphoramidit-Methode soll ihr Verhalten im Einzel- sowie im Doppelstrang optisch untersucht und mit dem bereits bekannten System verglichen werden.

Um das Potential als mögliches orthogonales Basensystem zu überprüfen, sollen die Triphosphatanaloga der neuen Nukleoside **1** und **2** sowie von **3** synthetisiert und in Primerverlängerungsexperimenten auf ihre Einbaueffizienz und -selektivität durch verschiedene Polymerasen gegenüber **DAPym** im Templatstrang überprüft und verglichen werden.

Tetrazinmodifizierte Bausteine zur postsynthetischen Modifizierung von Nukleinsäuren

Eine andere Herangehensweise zur Modifizierung von DNA ist die postsynthetische, also der eigentlichen Synthese nachgestellte, Einbringung oder Aktivierung einer Funktionalität. Diese bietet den Vorteil, dass meist nur ein Vorläufer benötigt wird, der anschließend in einem Reaktionsschritt beliebig vielfältig funktionalisiert werden kann. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll dafür ein tetrazinmodifiziertes Nukleosid synthetisiert werden, das anschließend in DNA eingebracht wird (Abb. 3). Da der Einbau enzymatisch über DNA-Polymerasen erfolgen soll, werden die Nukleosidtriphosphate

von **5** synthetisiert. Zuletzt soll das auf diese Weise hergestellte Oligonukleotid in postsynthetischen Diels-Alder-Reaktionen mit verschiedenen Dienophilen markiert werden.

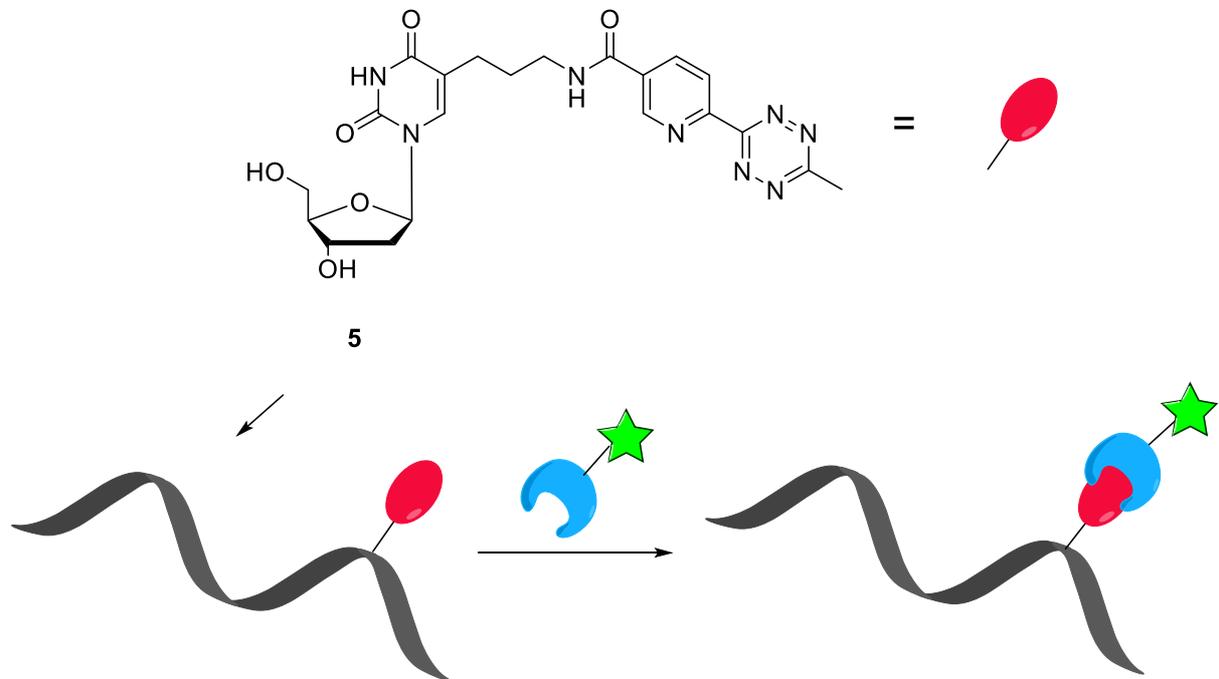


Abb. 3: Strukturformel des Zielmoleküls **5** und schematische Darstellung der postsynthetischen Markierung der Nukleinsäure.

II Teil A: 4-Aminophthalimid und 4-N,N-Dimethylamino-phthalimid als isostere Basensurrogate

1 Theoretische Hintergründe

1.1 Artificielle Basenpaare mit Wasserstoff-Brücken

Den einfachsten Zugang zu künstlichen DNA-Bausteinen bieten die natürlichen DNA-Basen selbst. Abgeleitet von einem G:C-Paar entwickelten *Benner et al.* die Strukturisomere **isoG** und **isoC** (Abb. 4a).^[3-4] Dieses komplementäre Basenpaar weist im Hinblick auf die natürlichen Bausteine ein orthogonales Wasserstoffbrückenmuster auf, in dem die Donor-(D) und Akzeptor-(A) Funktionalitäten vertauscht sind.

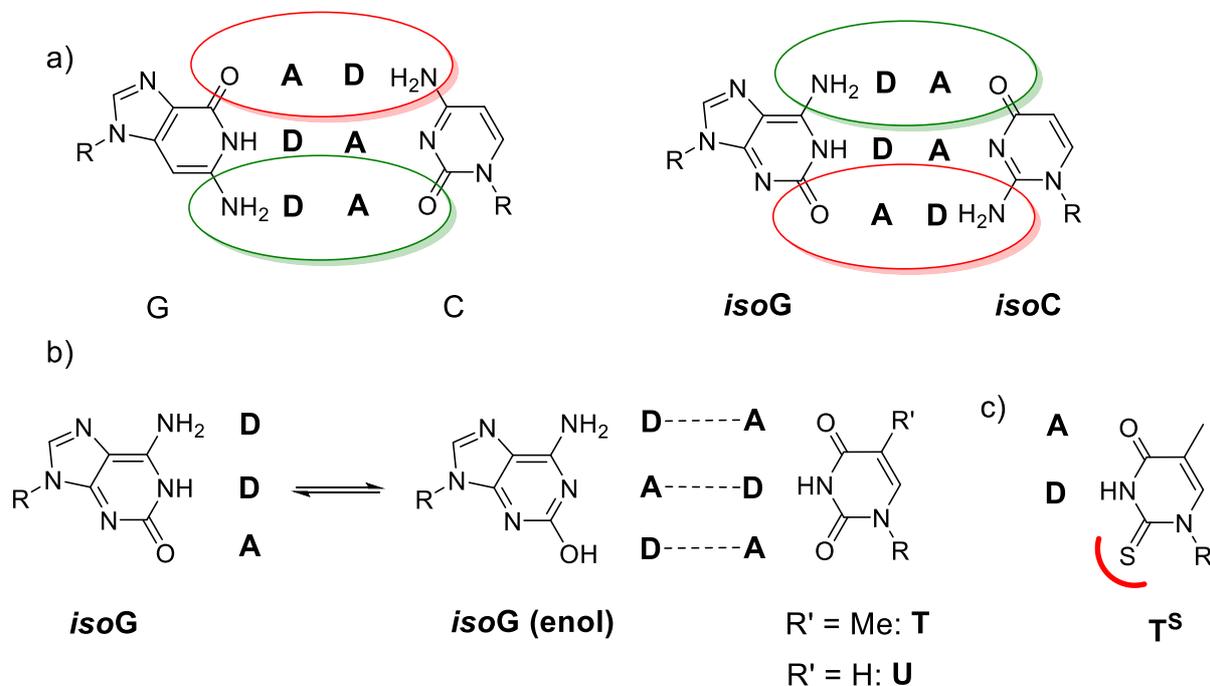


Abb. 4: a) Permutation des Wasserstoffbrückenmusters eines natürlichen G:C- und des **isoG:isoC**-Paares; b) Keto-Enol-Tautomerie von **isoG** und Fehlpaarung mit T/U; c) sterische Abschirmung des Schwefelatoms in **T^S**; R = 2'-Desoxyribose oder Ribose. ^[3-5]

Die erfolgreiche Erkennung und Replikation durch das Klenow-Fragment bestätigten die Funktion dieses neuen Basenpaares.^[3] Wie sich aber herausstellte, neigt **isoC** zu Deaminierungsreaktionen und **isoG** zu Fehlpaarungen mit T und U, welche tautomeriebedingt sind (Abb. 4b). Dennoch ist dieses System das erste artificielle Basenpaar, das bis dahin in der Polymerasekettenreaktion (PCR) Anwendung fand. Um die erwähnte Fehlpaarung auszuschließen, wurden die Triphosphate von T durch die des Bausteins **T^S** ersetzt, die aufgrund des großen Schwefelatoms kein

komplementäres Basenpaar zu **isoG**, aber dennoch zu A ausbilden können (Abb. 4c).^[5] Die Genauigkeit der Polymerasen lag pro Amplifizierung bei 98.0%.

Nach einigen Erkenntnissen und Optimierungen entwickelten *Benner et al.* das stabilere **P:Z** Paar (Abb. 5).^[6] Dadurch war es möglich, die Genauigkeit der PCR-Amplifikation auf 99.8% zu erhöhen.

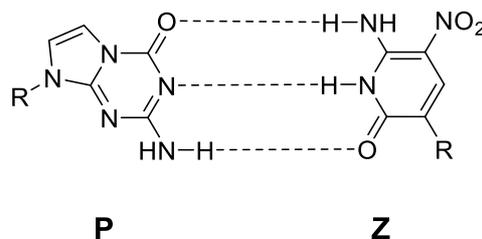


Abb. 5: **P:Z**-Basenpaar von *Benner et al.*; R = 2'-Desoxyribose.^[6]

Durch die Erweiterung des genetischen Vierbuchstaben-Codes um zwei weitere Nucleotide konnten DNA-Bibliotheken für die gerichtete Evolution erweitert werden. In LIVE- (*laboratory in vitro evolution*)-Experimenten konnte dadurch gezeigt werden, dass die spezifischsten Bindungssequenzen für Zellen, die bei Leberkrebs auftreten, das artifizielle Basenpaar **P:Z** enthielten.^[7]

Um die Jahrtausendwende berichteten *Hirao et al.* von einem neuen Basenpaar, bestehend aus dem Purin-Analogon **x** und dem C-Nucleosid des Pyridons **y** (Abb. 6a). Die eingeführte Dimethylaminogruppe von **x** dient der Abschirmung und daher der Vermeidung von Fehlpaarungen mit den Basen T und U.^[8] Templatgestützte RNA-Transkriptionsexperimente mit der T7-RNA-Polymerase haben gezeigt, dass das Ribonucleosidtriphosphat von **y** relativ spezifisch gegenüber **x** eingebaut wird.^[9]

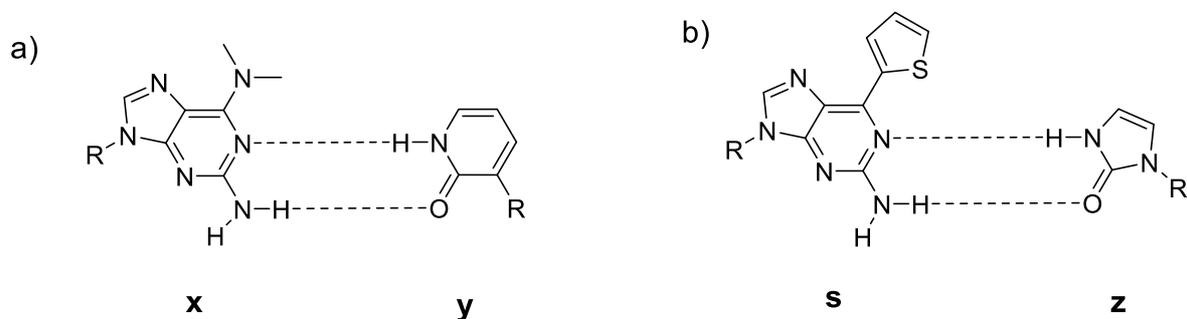


Abb. 6: a) **x:y**-Basenpaar und b) **s:z**-Basenpaar von *Hirao et al.*; R = 2'-Desoxyribose oder Ribose. ^[8, 10-11]

Um die Selektivität weiter zu erhöhen und das Stapelverhalten der Basen zu unterstützen, wurde die Dimethylaminogruppe von **x** durch einen planaren Thienylring

ersetzt (Abb. 6b). Das Templat mit dem Baustein **s** wurde in mRNA übersetzt, die für ein Protein kodiert, das in seiner Sequenz eine unnatürliche Aminosäure aufweist.^[10] Wird jedoch **y** in Kombination mit **s** als Templatbase eingesetzt, finden vermehrt Fehlpaarungen mit ATP statt. Um das zu verhindern, wurde der Sechsring des Pyridons von **y** durch das Imidazolon **z** ersetzt und somit die Größenkomplementarität zu **s** optimiert (Abb. 6b). Allerdings werden **dzTP** und **zTP** nicht mehr richtig von Polymerasen erkannt.^[11]

1.2 Artificielle Basenpaare ohne H-Brücken

Eine zweite wichtige Klasse artifizierender Basensurrogate bilden die von *Kool et al.* synthetisierten hydrophoben Bausteine. Im Gegensatz zu den natürlichen und bisher beschriebenen, artifizierten Basenpaaren, weisen diese keine Wasserstoffbrückenerkennungsmuster auf (Abb. 7a). Obwohl **F**, als hydrophobes Analogon zu T, mit keinem natürlichen Baustein stabile Basenpaare ausbildet, wird das **A:F**-Paar sehr selektiv über das Klenow-Fragment repliziert.^[12] Strukturanalysen haben gezeigt, dass die Größenkomplementarität der beiden Aglykone einen großen Anteil zu dieser Selektivität beiträgt.^[13] Als komplementäres und hydrophobes Gegenstück eignet sich das zu A isostere **Z** (Abb. 7a).^[14] Dieses Ergebnis zeigt, dass die Erkennung und Genauigkeit der Polymerase von weitaus mehr Faktoren abhängen als bisher angenommen. Um weitere Einflüsse, wie die Wechselwirkungen der Polymerase mit Wasserstoffakzeptoren in der kleinen Furche der DNA, aufzuklären, wurden die enzymatischen Einbaueffizienzen von **dZTP** und **dQTP** gegenüber **F** und **dFTP** gegenüber **Z** und **Q** verglichen.^[15]

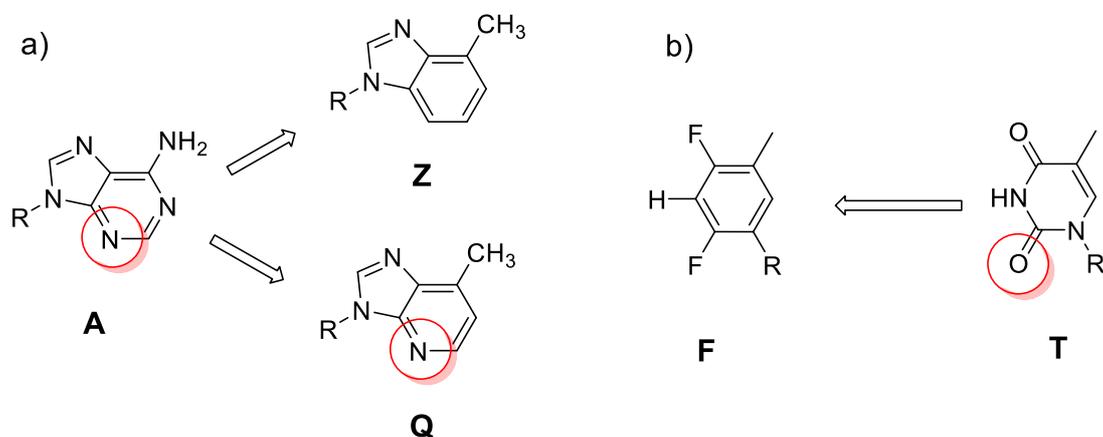


Abb. 7: Artificielle Basen ohne Wasserstoffbrücken von *Kool et al.*; Wasserstoffbrückenakzeptoren in der kleinen Furche (rot); R = 2'-Desoxyribose. ^[15]

Der Einbau der beiden A-Analoga fand gegenüber **F** jeweils selektiv statt, sowie umgekehrt. Der große Unterschied wird in der weiteren Elongation sichtbar. Diese erfolgte nur effizient, wenn die Base am 3'-Terminus des Primers ein Heteroatom aufweisen konnte, das vermutlich über Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren der Polymerase wechselwirkt (N3 bei A und **Q**; Carbonylgruppe bei T, Abb. 7 rot) und somit die Verlängerung unterstützt. Analog dazu wurden Primerverlängerungsexperimente mit modifizierten C und T durchgeführt, bei denen die Carbonylfunktion, die in die kleine Furche zeigt, fehlte und die zum gleichen Ergebnis führten.^[16]

Durch die Arbeiten von *Kool et al.* stieg das Interesse an artifiziellen, hydrophoben Basenpaaren extrem an. Zahlreiche Basensurrogate, wie das **PICS** (Abb. 8a) wurden von *Romesberg et al.* veröffentlicht.^[17] Neben duplexstabilisierenden Eigenschaften des selbstkomplementären Basenpaars, war es außerdem möglich, dieses enzymatisch mittels Klenow-Fragment in DNA einzubauen.

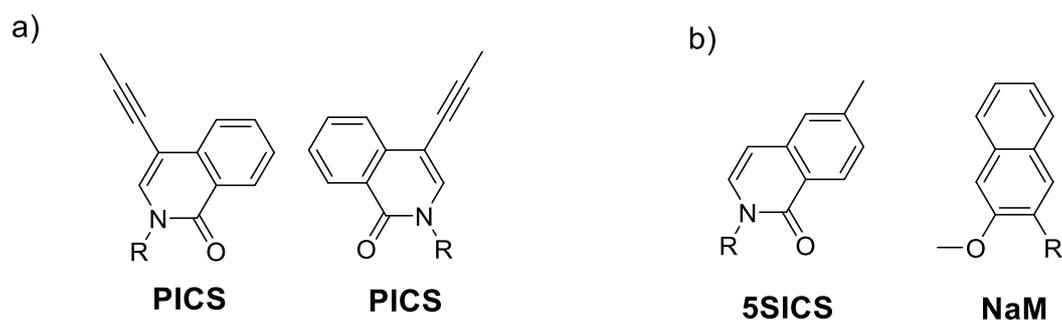


Abb. 8: a) Hydrophobes, selbstkomplementäres **PICS:PICS**- und b) hydrophobes **5SICS:NaM**-Basenpaar von *Romesberg et al.*; R = 2'-Desoxyribose.^[17-18]

Allerdings verzerrt sich, bedingt durch die Basenpaarung der beiden, großen π -Systeme, die natürliche Struktur des Primer/Templat-Komplexes so stark, dass die Polymerase nicht mehr fähig ist, den Primer zu verlängern. Abhilfe wurde durch mutierte Polymerasen geschaffen, die über Techniken der gerichteten Evolution zugänglich wurden.^[19] Ausgehend vom hydrophoben **PICS:PICS**-Paar entstand eine ganze Reihe an neuen Basenpaaren,^[20-22] die letztendlich zum prominentesten Beispiel, dem **5SICS:NaM**-Paar, führten (Abb. 8b).^[18] Im Vergleich zum **PICS:PICS**-Paar konnte durch die Veränderung der Struktur die nötige Größenkomplementarität erzielt werden. Das orthogonale Basenpaar wies in PCR-Experimenten hohe Einbaueffizienten auf und konnte durch die T7-RNA-Polymerase erfolgreich in RNA übersetzt werden.^[23-25] Um die Orthogonalität des dritten Basenpaars zu bestätigen, wurden die Triphosphate der künstlichen Bausteine über Transporterproteine in

Luedtke et al. synthetisierten Biarylpyrimidinnukleoside (Abb. 10).^[32] Ausgehend von einem natürlichen T erfolgt die bathochrome Verschiebung der Absorptions- sowie Emissionsmaxima durch Erweiterung des π -Systems.

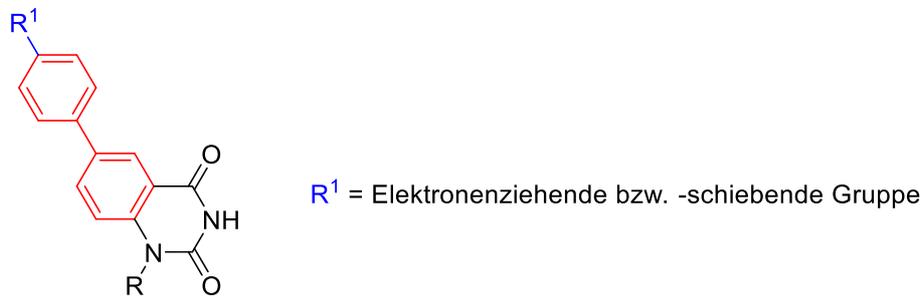


Abb. 10: Biarylmodifizierte Basenanaloga zu T von Luedtke et al.; R = 2'-Desoxyribose.^[32]

Die Imidofunktion dient hierbei als Elektronenakzeptor und der in Konjugation stehende Biarylrest als Elektronendonator, sodass ein *Push-Pull* System entsteht, das im angeregten Zustand zur Ladungstrennung führt (*charge transfer*). Diese Basenanaloga weisen in Abhängigkeit von R^1 ein starkes Solvatochromieverhalten auf.

Ein weiteres System derselben Arbeitsgruppe ist das entwickelte **DMA_C**-Nukleosid (Abb. 11), das als Indikator für DNA Sekundärstrukturen wie das „i-Motif“ fungiert.^[33] Die Expansion des π -Systems erfolgt mittels eines *N,N*-Dimethylanilinrestes, wodurch ein fluoreszentes, aber für die Nukleinsäurestruktur wenig beeinträchtigendes Basensurrogat entsteht, dessen optische Eigenschaften vom Protonierungsgrad der Verbindung abhängen. Erfolgt die Basenpaarung protonenvermittelt mit einem weiteren C, so wie es in C-reichen Regionen zur Ausbildung eines C-Quadruplexes vorkommt, werden sowohl Absorptions- als auch Emissionsmaximum, im Vergleich zur natürlichen G:C-Paarung, bathochrom verschoben.

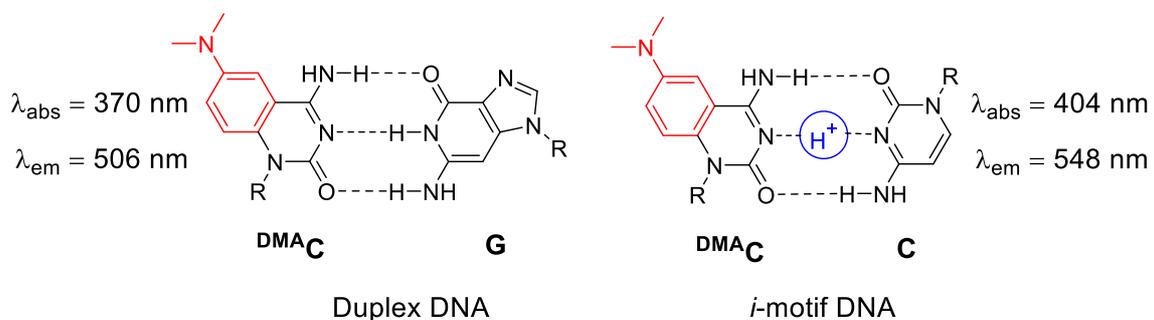


Abb. 11: Photophysikalische Eigenschaften von **DMA_C** in Abhängigkeit der Gegenbase.^[33]

Tor *et al.* entwickelten ebenfalls fluoreszente Basenanaloga, die unter anderem Anwendung in Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Systemen fanden (Abb. 12).

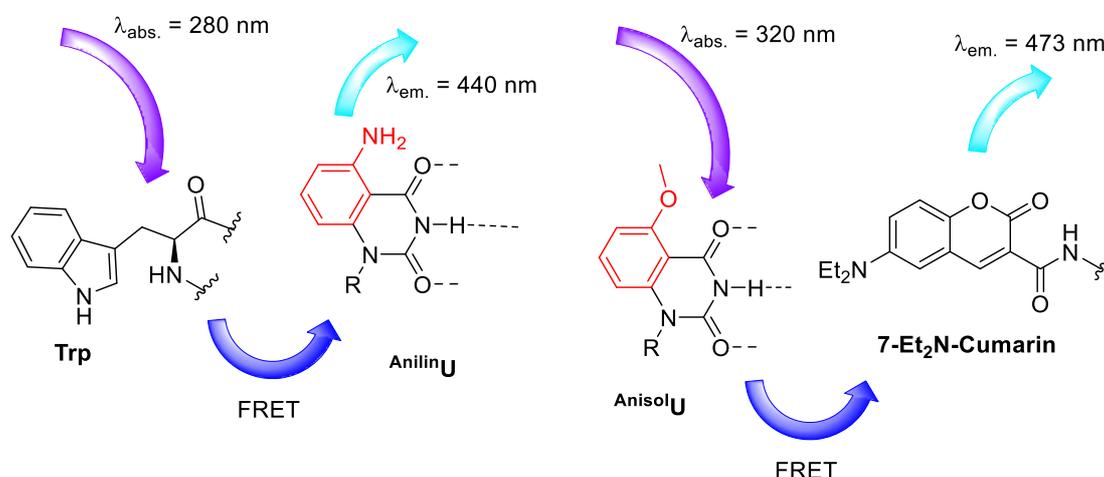


Abb. 12: a) FRET-System in **AnilinU**-modifizierter, proteinbindender RNA; b) FRET-System in **AnisolinU**-modifizierter rRNA; R = Ribose.^[34-35]

Der RNA-Baustein von **AnilinU** dient in proteinbindenden RNA Erkennungssequenzen als Akzeptor. Die Anregung des als Donor fungierenden Tryptophans (Trp) in der Aminosäuresequenz resultiert in einem Energietransfer auf die RNA-Modifikation, was als bathochrom verschobenes Fluoreszenzmaximum, verglichen mit der Emission von Tryptophan, ausgelesen werden kann (Abb. 12a).^[34] Dasselbe Prinzip wurde mit **AnisolinU** als Donor ausgenutzt, um Wechselwirkungen mit Aminoglykosid-Antibiotika zu untersuchen, die spezifisch an rRNA binden. Die Detektion erfolgte durch die Cumarin-Modifikation am Aminoglykosid als Akzeptor (Abb. 12b).^[35]

Um die Polarität zu erhöhen und somit ein Ansprechen der optischen Eigenschaften bedingt durch die Polarität der Umgebung zu erreichen, wurde die Anilineinheit so an den natürlichen Baustein anelliert, dass die Aminogruppe an 7-Position steht (**AnilinT**, Abb. 13a). Wegen des Solvatochromieverhaltens wurde der Fluorophor daher als Fluoreszenzsonde eingesetzt, die auf Basendiskriminierung und somit auf eine Fehlpaarung mit G reagiert.^[36] Anders als bei allen anderen Basenpaarungen (auch zur komplementären Base A) erfolgt im Vergleich ein etwa 2.5- bis 3-facher Anstieg der Fluoreszenz eingehend mit einer leichten Blauverschiebung des Maximums. Da G in den meisten Fällen aufgrund der vergleichbar leichteren Oxidierbarkeit zur Löschung der Fluoreszenz in isomorphen Fluoreszenzsonden führt, ist dieses

Basensurrogat eines der wenigen, das als Positivprobe auf eine Fehlpaarung mit G reagiert.

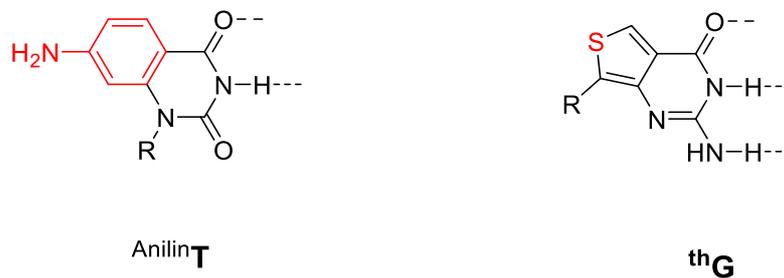


Abb. 13: a) Fluoreszentes Basensurrogat Anilin^T und b) Thienopyrimidin-Baustein th^G von *Tor et al.*; R = 2'-Desoxyribose.^[36-37]

Eine weitere Klasse isomorpher Fluoreszenzsonden von *Tor et al.* sind die Thienopyrimidin-Bausteine, die je eine natürliche Base ersetzen und somit einen ganzen Satz fluoreszierender Basensurrogate des RNA Alphabets repräsentieren.^[38] Der analoge DNA-Baustein d^{thG} (Abb. 13b) zeichnet im Vergleich zum isosteren **2-AP** die höheren Quantenausbeuten und die kleinere Beeinflussung struktureller Prozesse aus, was in Hybridisierungsexperimenten mit Sequenzen der Primerbindungsstelle des HIV-1 gezeigt wurde.^[37]

1.4 4-Aminophthalimid als Fluoreszenzsonde

Ein Großteil der in Kap. 1.3 vorgestellten Fluoreszenzsonden weisen ein kleines π -System auf, dessen optische Eigenschaften durch elektronenziehende bzw. -schiebende Substituenten (*Push-Pull*) festgelegt werden. Ein Vorteil ist die durch diese Gruppen gegebene Fähigkeit, Wechselwirkungen mit den für das Molekül umgebenden Partnern einzugehen, was zu einer Veränderung des optischen Verhaltens führt. Durch die lichtinduzierte Umstrukturierung der elektronischen Situation entsteht eine der Ladungstrennung und ein im Vergleich zum Grundzustand verändertes Dipolmoment, dessen energetische Lage durch eine polare Umgebung herabgesetzt wird (positive Solvatochromie). Dies äußert sich in einer zusätzlichen Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima (Abb. 14).

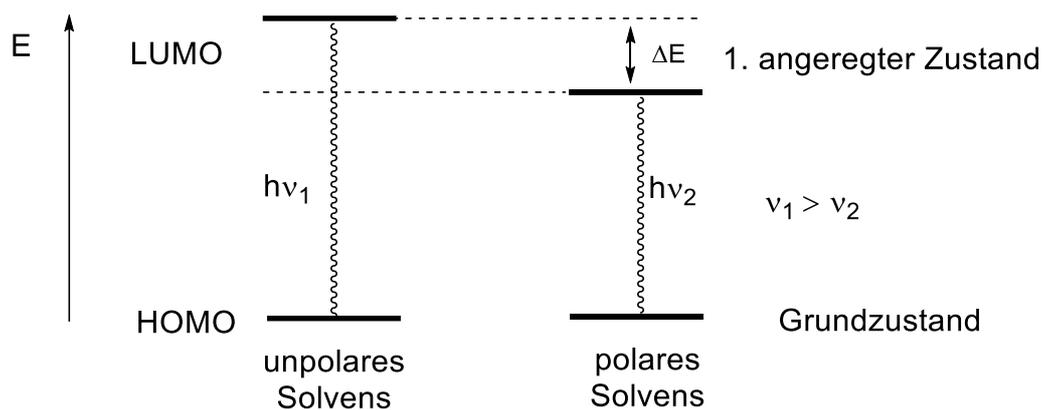


Abb. 14: Vereinfachtes Schema der positiven Solvatochromie; h = Planck'sches Wirkungsquantum; ν = Frequenz des absorbierten bzw. emittierten Lichts; ΔE = Energieunterschied der beiden, angeregten Zustände; E = Energie; HOMO/LUMO = Grenzorbitale.

1.4.1 Konstruktion des fluoreszenten Basensystems

Vereint man die besprochene Herangehensweise für das Design fluoreszenter, isosterer und orthogonaler Basenpaare, kann ausgehend von einem Imidgerüst der isomorphe Chromophor konstruiert werden (Abb. 15). Dieses ist gleichzeitig fähig, als elektronischer Akzeptor Basenpaarungen einzugehen. Um die Orthogonalität gegenüber dem A:T-Paar zu wahren, muss die Größe der neuen Base den Abmessungen einer Purinbase entsprechen. Da die bereits besprochenen Fluoreszenzsonden mindestens bityklische Aromatensysteme sind, erfolgt die Anknüpfung der Zuckereinheit am zweiten Ring (Abb. 15, grün). Nach Einführung der elektronenschiebenden Aminogruppe (Abb. 15, rot) wird der bereits literaturbekannte, solvatochrome Farbstoff 4-Aminophthalimid (**4API**) erhalten.

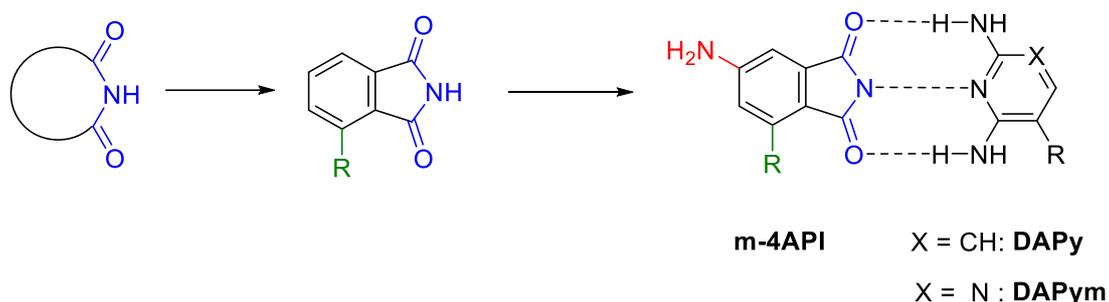


Abb. 15: Konstruktion des fluoreszenten Basenpaars **m-4API:DAPy** bzw. **m-4API:DAPym**; R = 2'-Desoxyribose.

In diesem Zusammenhang wurden das **m-4API** (glykosidische Kupplung in *meta*-Position zur Aminogruppe) und als komplementäres Gegenstück das 2,6-Diaminopyridin (**DAPy**) von *Ernsting et al.* als neues fluoreszentes und orthogonales Basenpaar vorgeschlagen (Abb. 15).^[39]

1.4.2 Das m-4API:DAPym System in Oligonukleotiden

Obwohl das **4API** und das davon abgeleitete, ebenfalls fluoreszente 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid (**DMAPI**) schon oft in Biopolymeren eingesetzt wurden,^[40-42] erfolgte die Anwendung in Nukleinsäuren davor nur ein einziges Mal.^[43] Die Abmessungen des in Kapitel 1.4.1 vorgeschlagenen Basenpaars weisen jedoch dieselben Größenverhältnisse auf, wie ein natürliches Purin-Pyrimidin-Paar. Abgeleitet davon wurden bei *Wagenknecht et al.* in Kooperation mit *Ernsting et al.* die beiden C-Nukleoside **m-4API** und **DAPym** synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut (Abb. 16a).^[44] Die Zuckermofifikation beeinflusst dabei kaum das Solvatochromieverhalten im Vergleich zum freien Chromophor. Eingebaut in Oligonukleotide steigt die Quantenausbeute des **4API**, bedingt durch Wechselwirkungen mit den Nachbarbasen im Einzelstrang, auf das ca. 2.7-fache an (Abb. 16b). Im Doppelstrang steigt die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Gegenbase bis auf das Doppelte an. Lediglich bei einer Fehlpaarung mit **G** entspricht diese dem des Einzelstrangs. Die Einbettung in den hydrophoben Basenstapel resultiert in einer leichten hypsochromen Verschiebung der Fluoreszenzmaxima. Schmelzpunktmessungen und die im Vergleich zu den natürlichen Basen leicht geringere Intensität der Emission lassen darauf schließen, dass die Geometrie der beiden Basen zueinander nicht optimal ist.

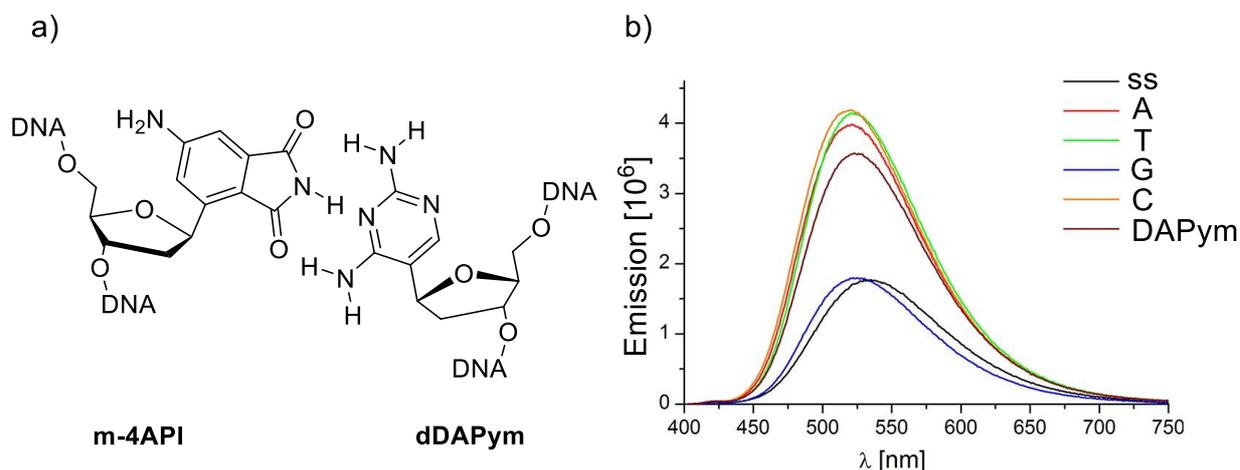


Abb. 16: a) **m-4API:DAPym**-Basenpaarung im DNA-Duplex b) Fluoreszenz von **m-4API** im Einzel- und Doppelstrang in Abhängigkeit der Gegenbase.^[44]

Bei genauerer Betrachtung des Absorptionsverhaltens des Chromophors im Doppelstrang mit **m-4API:DAPym** fällt auf, dass bei einem Anstieg der Temperatur das artifizielle Basenpaar zuerst stabilisiert wird, bevor der Doppelstrang in die Einzelstränge übergeht (Abb. 17).^[45] Dies wird durch die grüne Kurve bei 365 nm mit

einem Abfall der Absorption zwischen 20 und 45 °C deutlich. Im Vergleich stellt die blaue Kurve bei 260 nm das Schmelzverhalten der DNA dar.

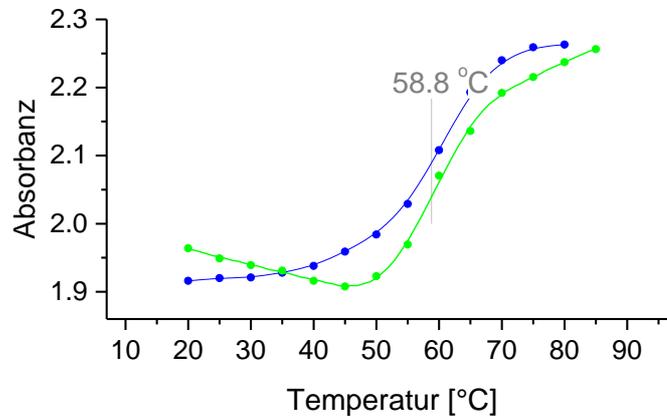


Abb. 17: Schmelzkurve: **m-4API:DAPym**-Paar im DNA-Doppelstrang; Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ (blau) und $\lambda_{\text{abs}} = 365 \text{ nm}$ (grün).

NMR Untersuchungen ergaben, dass die gegenseitigen Geometrien der Basen in zwei Zuständen (1H und 2H) vorliegen können. (Abb. 18)

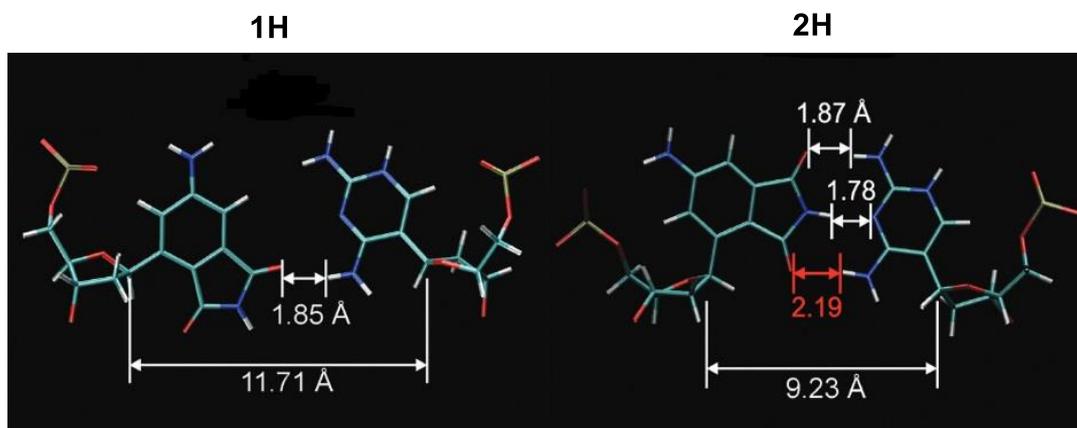


Abb. 18: NMR Strukturen der 1H und 2H Konfiguration mit Abstand der Wasserstoffbrücken.^[45]

Bei Raumtemperatur liegen diese beiden Konformationen im Gleichgewicht vor. Bei Erhöhung der Temperatur wird das Rückgrat der Doppelhelix aufgelockert, wodurch die Basenpaarung erleichtert wird. Da dieser Prozess mit einer Erniedrigung der Entropie einhergeht, ist die große freiwerdende Bindungsenthalpie des artifiziellen Komplexes der ausschlaggebende Faktor.

analysiert werden. Anhand des Musters kann, aufgrund der relativen Lage der Banden zueinander, die Sequenz direkt abgelesen werden.

Eine weitere Methode, für die sein Entwickler mit dem Nobelpreis honoriert wurde, aber mehr der DNA-Synthese dient, ist die nach *Kary Mullis* entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR). In vielen Fällen ist die Menge an Oligonukleotidsträngen zu gering, um auswertbare Analysen durchzuführen. Die PCR konnte Abhilfe schaffen, denn durch diese Methode wurde es möglich, einen DNA-Abschnitt innerhalb kürzester Zeit, mit wenig Aufwand und Kosten, zu vervielfachen. Das Duplizieren der DNA erfolgt durch mehrmalige Primerverlängerungen. Der zu vervielfältigende Doppelstrang wird durch Erhöhung der Temperatur aufgewunden, damit sich anschließend jeweils ein Primer an je ein 5'-Terminus der Template anlagern kann (Abb. 20). Im nächsten Schritt übernimmt die Polymerase die Synthesearbeit und verlängert die beiden Primer nach Anleitung der Template in 3'-Richtung und kopiert die gewünschte Sequenz einmal. Beginnt die Synthese noch einmal von vorne, dann nimmt die Anzahl der Kopien mit jedem Zyklus exponentiell zu (2^n , n = Zyklus). Wenn genügend Kopien erstellt wurden, reicht sich der spezifische Doppelstrangabschnitt an.^[48]

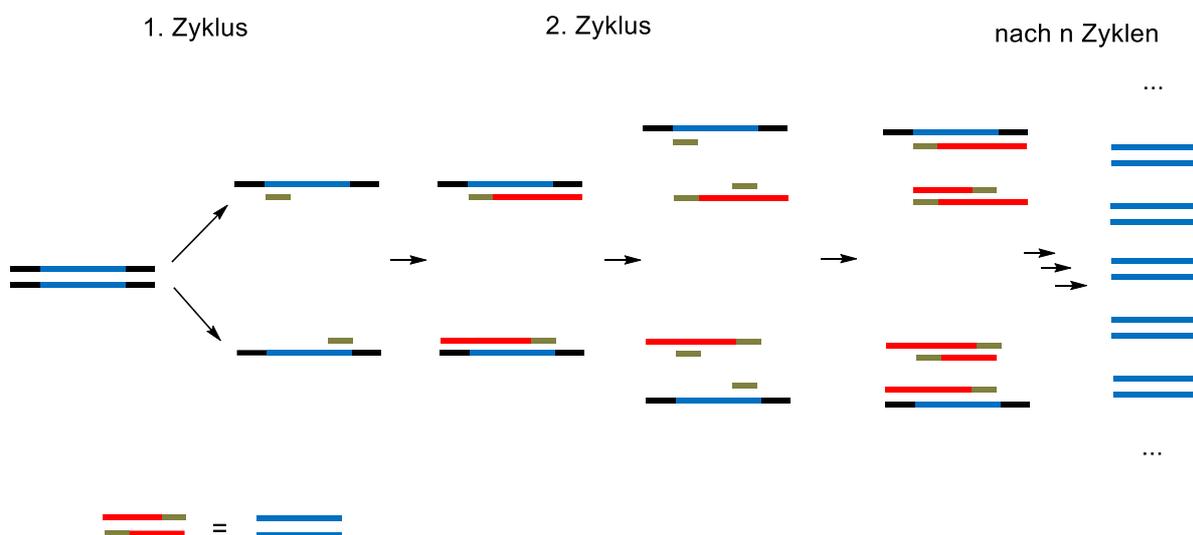


Abb. 20: Schematische Darstellung der PCR.

Anfangs war dieses Verfahren sehr mühsam, da die verwendete Polymerase (Polymerase I, *E. coli*), aufgrund der benötigten hohen Temperaturen der Primerelongation, denaturierte und daher vor jedem Zyklus neu zugegeben werden

musste. Erst die Entdeckung thermostabiler Polymerasen, die aus Bakterien, die in heißen Quellen leben, isoliert wurden, machte die PCR zu einem wertvollen Instrument.^[49] Mit der damals eingesetzten Taq Polymerase aus *Thermus aquaticus* konnten Gensequenzen mit bis zu 2000 Basenpaaren innerhalb kürzester Zeit und mit hoher Spezifität bis zu 10 millionenfach kopiert werden. Da diese Polymerase allerdings keine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading*) besitzt, ist sie sehr fehleranfällig.^[50] Heutzutage werden viele weitere thermostabile Polymerasen eingesetzt, die isoliert oder künstlich hergestellt worden sind. Sie lassen sich anhand ihrer primären Aminosäuresequenz in sechs verschiedene Familien unterteilen: A, B, C, D, X und Y.^[51] Im Folgenden werden die verschiedenen DNA-Polymerasen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, kurz zusammengefasst:

Die Hemo KlenTaq gehört zur Familie der A-Polymerasen und ist eine, in der Aminosäuresequenz verkürzte Variante der Taq-Polymerase.^[52] Ein weiterer Vertreter dieser Familie ist das Klenow-Fragment (3'→5' exo-), ein genverändertes Proteinfragment der Polymerase I aus *Escherichia coli*.^[53] Beiden Enzymen fehlt ebenfalls die Proteindomäne für die 3'→5' Exonukleaseaktivität. Alle weiteren verwendeten Polymerasen gehören der B-Familie an. Sowohl die Vent (exo-) aus *Thermococcus litoralis* als auch die Deep Vent (exo-) aus der *Pyrococcus* Spezies GB-D wurden genetisch so verändert, dass ihnen die *proofreading*-Funktion fehlt.^[54-55] Diese Form der Vent (exo-) ist immer noch um das Doppelte genauer als die Taq-Polymerase.^[56] Die Terminator I, II und III sind Varianten der 9°N_MTM Polymerase, die erstmals aus Archaeen der Spezies *Thermococcus* 9°N-7 gewonnen wurden.^[57-59] Sie erhielt ihren Name aufgrund des geographischen Fundorts, wo diese Spezies entdeckt wurde. Im Gegensatz zum Mutterenzym, das eine geringe 3'→5' Exonukleaseaktivität aufweist (1-5% des Wildtyps), besitzen die Terminator-Polymerasen diese nicht. Die *proofreading*-Aktivität ist bei dem aus der *Pyrococcus* *woesei* stammenden Pwo und der aus *Thermococcus kodakaraensis* stammenden KOD vorhanden.^[60-61] Die KOD zeigt hohe Einbaueffizienzen von 5-modifizierten Uridinderivaten.^[62-63]

2 Syntheseübersicht

Im Folgenden sind die einzelnen Syntheseschritte zum Aufbau der Nucleoside **1** und **2** erläutert. Das **4API (6)** ist kommerziell erhältlich, während **9** in zwei Stufen aus **7** und **8** über eine Stufe aus **6** zugänglich wird. Anschließend wurden sie jeweils zu **11** und **10** halogeniert und mittels palladiumkatalysierter C-C-Kupplung mit einem 2'-Desoxyribofuranosid zu **1** und **2** umgesetzt (Abb. 21). Die Synthese wurde zu Beginn für Nucleosid **1** ausgearbeitet und anschließend auf **2** übertragen.

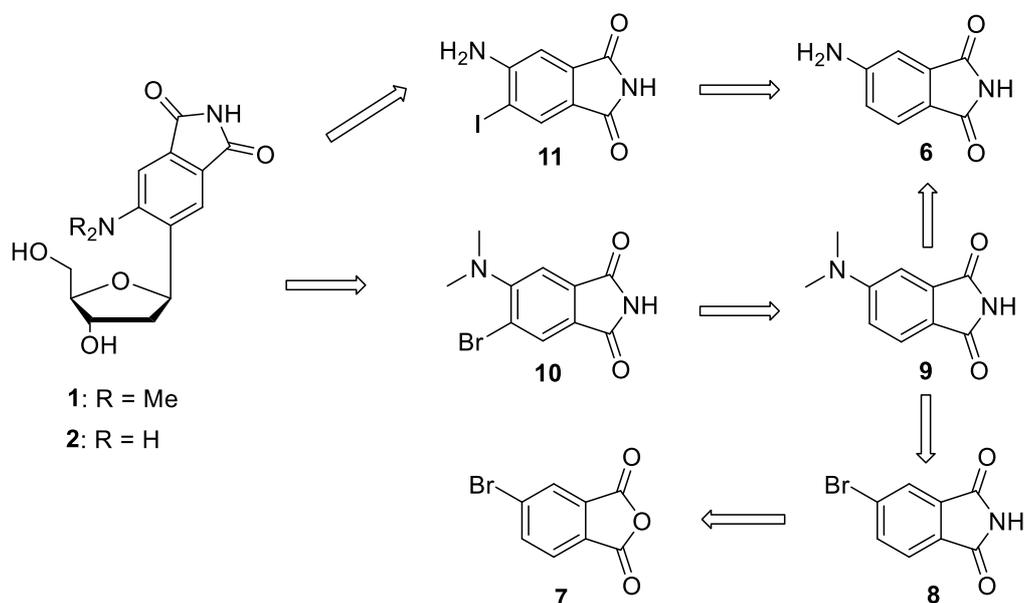


Abb. 21: Retrosynthetische Darstellung der beiden Nucleoside **1** und **2**.

2.1 Synthese des Phosphoramidit-Bausteins von DMAPi

Der Chromophor **9** kann auf verschiedene Wege synthetisiert werden und ist durch Methylierung des kommerziell erhältlichen **6** oder durch Einführen einer Dimethylaminogruppe in das Phthalimigrundgerüst zugänglich (Abb. 22). Die direkte und selektive Methylierung der Aminogruppe von **6** und dessen Derivaten wird standardmäßig im säurefreien, siedenden Dimethylsulfat (DMS) durchgeführt, welches gleichzeitig als Methylierungsreagenz dient.^[64-65] Wegen der hohen Toxizität von DMS wurde hier jedoch nach alternativen Methoden gesucht. Daher wurde eine Variante der *Eschweiler-Clarke*-Reaktion angewendet, bei der nach nukleophiler Addition der Aminogruppe an Formaldehyd die entstehende Iminspezies durch Natriumcyanoborhydrid reduziert wird. Dies konnte an **4API**- und Therephthalsäure-

Derivaten erfolgreich durchgeführt werden.^[66-67] Die Nukleophilie der Imidfunktion führt jedoch dazu, dass vermehrt das Addukt **12** gebildet wird. Dies kann thermisch zersetzt werden, wodurch **9** in Ausbeuten von 77% erhalten werden kann. Alternativ kann der Chromophor durch die Kondensation von **7** mit Harnstoff und einer anschließenden *Hartwig-Buchwald*-Aminierung synthetisiert werden.^[68] Als besonders effektiv haben sich bei C-N-Kupplungsreaktionen mit Dimethylamin die Biarylmonophosphinliganden von *Buchwald et al.* erwiesen.^[69] Auf diesem Weg wurde **9** mit einer Ausbeute von 60% dargestellt.

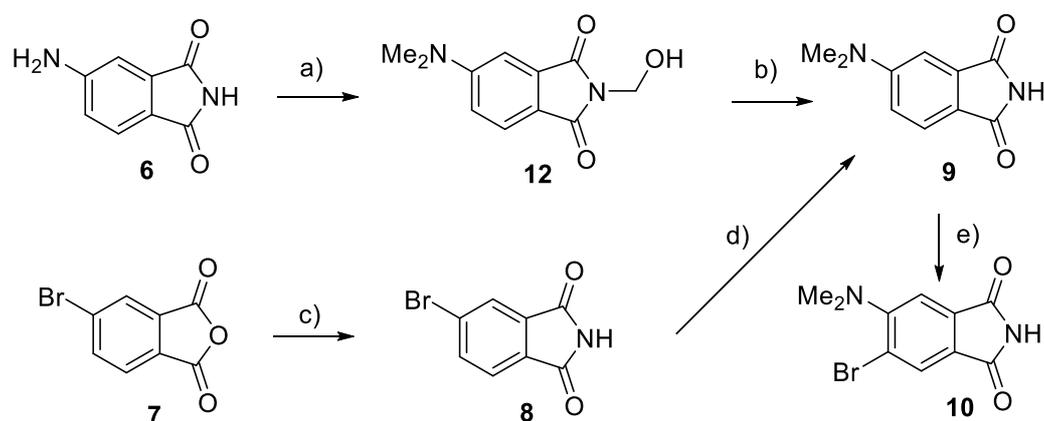


Abb. 22: Syntheseroute zur Darstellung von Farbstoff **9** und anschließender Funktionalisierung zu **10**: a) Formalin (37%), NaBH₃CN, DMF, RT, 4 h; b) *o*-Xylol, Rückfluss, ü. N., 77% über zwei Stufen; c) Harnstoff, 140 °C, 20 min, 87%; d) Me₂NH, Pd₂(dba)₃, XPhos, LiHMDS, THF, Rückfluss, 2 h, 60%; e) NBS, DMF, 0 °C, 2 h, 78%.

Die anschließende Bromierung von **9** zu **10** mit NBS erfolgte ausschließlich an der 5-Position. Als Konkurrenzreaktion stand an dieser Stelle die Halogenierung der Methylgruppen durch lichtinduzierte radikalische Substitution. Die Nebenproduktbildung konnte jedoch durch Lichtausschluss und niedrige Reaktionstemperaturen vollständig unterdrückt werden, wodurch Ausbeuten von bis zu 83% erreicht wurden.

Das für die anschließende *Heck*-Reaktion notwendige Olefin **17** ist literaturbekannt und kann ausgehend von **13** in drei Stufen synthetisiert werden.^[70] Dazu wurden die Hydroxygruppen der Zuckereinheit von **13** mit TBDMS-Cl als Silylether geschützt. Durch Silylierung der Nukleobase mit HMDS entstand ein positiv geladener Pyrimidiniumrest an **15**, der durch *in situ* Eliminierung zu Glykal **16** umgesetzt wurde.

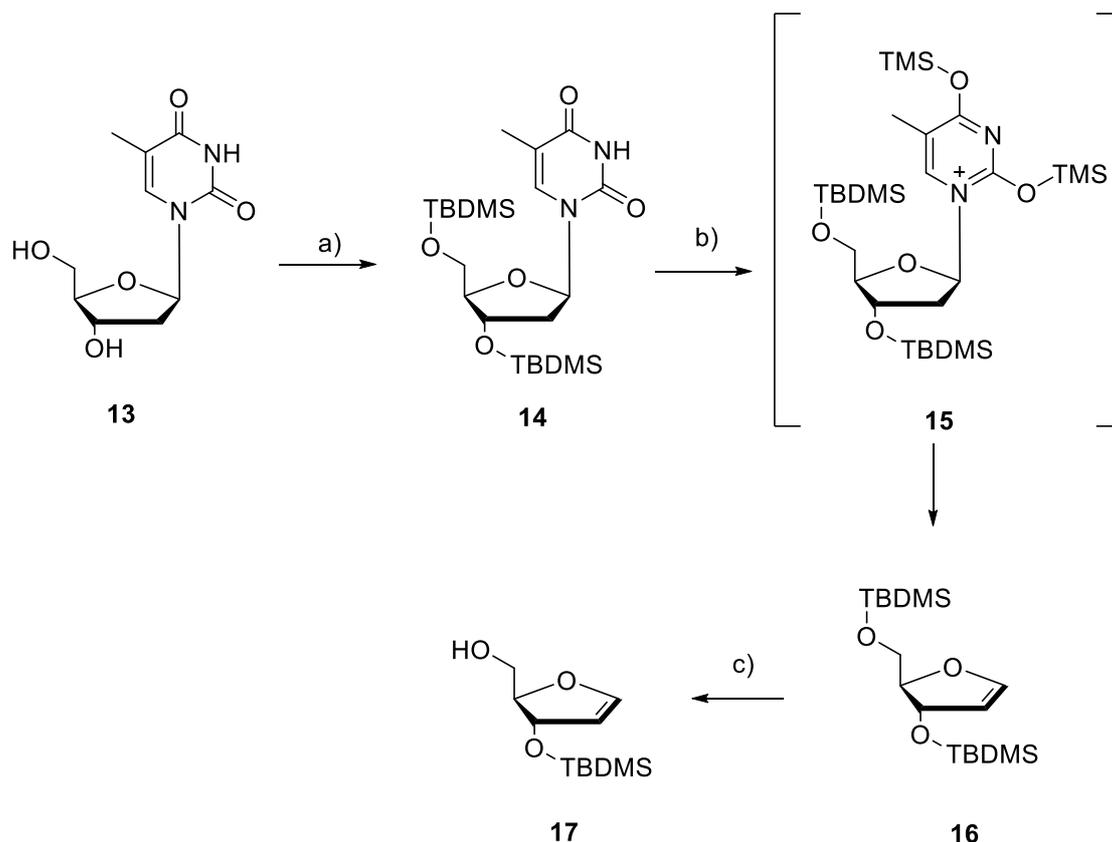


Abb. 23: Syntheseroute zur Darstellung von Glykal **17**: a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, ü. N., quant.; b) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, HMDS, Rückfluss, 4 h, 26%; c) TBAF, THF, 0 °C, 2 h, 51%.

Obwohl einige Beispiele^[71-74] zeigen, dass **16** als doppelt geschützter Zucker erfolgreich in palladiumkatalysierten C-C-Kupplungen eingesetzt werden können, kann es von Vorteil sein, den TBDMS-Rest der 5'-Position von **16** selektiv abzuspalten. Dadurch entsteht eine, von der Ringebene des Zuckers aus gesehen, sterisch gehinderte Seite, welche die Bildung des π -Komplexes zwischen dem Olefin und der oxidierten Palladium Spezies bei der anschließenden *Heck*-Reaktion von einer Seite begünstigt und die Reaktion somit stereoselektiv ablaufen lässt. Die anschließende Insertion des Palladiums erfolgt am elektronenreicheren β -Kohlenstoffatom.^[75]

Die Kupplungsreaktion zwischen **10** und **17** erwies sich als Schlüsselschritt dieser Synthese und ist sehr stark von den Bedingungen und jeweiligen Reagenzien abhängig (Abb. 24, Tabelle 1). In vielen Fällen werden bei palladiumkatalysierten Synthesen von C-Nucleosiden perfluorierte Arylphosphan- und Arylarsenliganden eingesetzt.^[76]

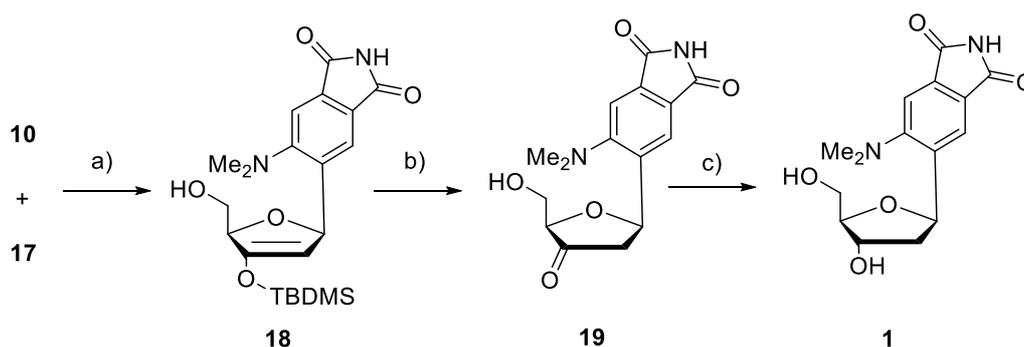


Abb. 24: Syntheseroute zur Darstellung von Nucleosid **1**: a) Pd₂(dba)₃, [(t-Bu)₃PH]BF₄, Cy₂NMe, Dioxan, 75 °C, 1 h, 70%; b) Et₃N·3HF, THF, 0 °C → RT, 20 min; 90% c) NaBH(OAc)₃, AcOH/MeCN 1:5, 0 °C, 25 min, 99%.

Als Anhaltspunkt wurden die von *Michael Weinberger* verwendeten Synthesebedingungen gewählt, die bereits zum erfolgreich synthetisierten **4API-C-Nucleosid 3** führten (Ansatz 1).

Tabelle 1: Screening der *Heck*-Reaktion zur Darstellung von **18** bzw **19**; Reaktionszeit: ü. N. (1 h für Ansatz 14)

Ansatz z	Pd-Quelle	Ligand	Base	Additiv	Lösungsmittel	Temp.	Ausbeute
1	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	Et ₃ N	-	MeCN	82 °C	< 5% (19)
2	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	Ag ₂ CO ₃	-	MeCN	82 °C	-
3	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	Ag ₂ CO ₃	-	DMF	95 °C	< 5% (19)
4	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	Ag ₂ CO ₃	TBAC* *	DMF	95 °C	-
5	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	NaHCO ₃	TBAC* *	DMF	45 °C	-
6	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	Na ₂ CO ₃	TBAC* *	DMF	95 °C	-
7	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	Cs ₂ CO ₃	-	DMF	95 °C	-
8	Pd(OAc) ₂	P(PhF ₅) ₃	n-Bu ₃ N	-	DMF	95 °C	< 5% (19)
9	Pd(OAc) ₂	dppe	Et ₃ N	-	DMF	95 °C	-
10	Pd(OAc) ₂	dppp	Et ₃ N	-	DMF	95 °C	-
11	Pd(OAc) ₂	dppb	Et ₃ N	-	DMF	95 °C	-
12	Pd(OAc) ₂	dppf	Et ₃ N	-	DMF	95 °C	-
13	Pd(OAc) ₂	P(Adamantyl) ₃	Et ₃ N	-	DMF	95 °C	30% (19)
14	Pd ₂ (dba) ₃	P(t-Bu) ₃ *	Cy ₂ NMe	-	Dioxan	75 °C	70% (18)

*hier wurde das Salz [(t-Bu)₃PH]BF₄ eingesetzt; ** Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat

Das entschützte Kupplungsprodukt **19** konnte mit diesen Bedingungen jedoch nur in Spuren erhalten werden. Auch der Austausch der organischen Base durch Carbonate

konnte den Umsatz nicht steigern (Ansatz 2). Als nächstes wurde das Lösemittel DMF gewählt, um die Reaktionstemperatur zu erhöhen (Ansatz 3). Außerdem wurde ein Phasentransferkatalysator zugegeben, um die Löslichkeit der anorganischen Basen zu erhöhen (Ansatz 4-6). Doch auch diese Optimierungsversuche führten nicht zum gewünschten Ergebnis. In den meisten Fällen konnte neben der Ausgangsverbindung nur das Dehalogenierungsprodukt **9** isoliert werden. Auffällig ist, dass erst der Wechsel zu einzähnigen Alkylphosphanliganden den gewünschten Erfolg erbrachte. Mit Tri(1-Adamantyl)-phosphan konnte **19** erstmals in Ausbeuten von 30% isoliert werden (Ansatz 13). *Fu et al.* entwickelten hochreaktive *Heck*-Systeme bei denen es möglich war, Arylbromide bei Raumtemperatur umzusetzen.^[77] Das Katalysesystem beinhaltet den Liganden $P(t-Bu)_3$ und die Base Cy_2NMe . Das geschützte Nukleosid **18** konnte so nach nur 45 min in sehr guten Ausbeuten von 70% erhalten werden (Ansatz 14). Alkylphosphanliganden sind jedoch sehr oxidationsempfindlich, weswegen das Tetrafluoroborat-Salz eingesetzt wurde und die aktive Spezies *in situ* durch Deprotonierung generiert wurde. **19** wurde unter diesen Bedingungen nur in Spuren nachgewiesen und konnte ausgehend von **18** mit $Et_3N \cdot 3HF$ nahezu quantitativ erhalten werden. Die anschließende Reduktion mit Natriumtriacetoxyborhydrid verlief stereoselektiv über die Koordination der reduzierenden Bor-Hydrid-Spezies an der 5'-OH Position des Zuckerrestes und führte zu Nukleosid **1**.

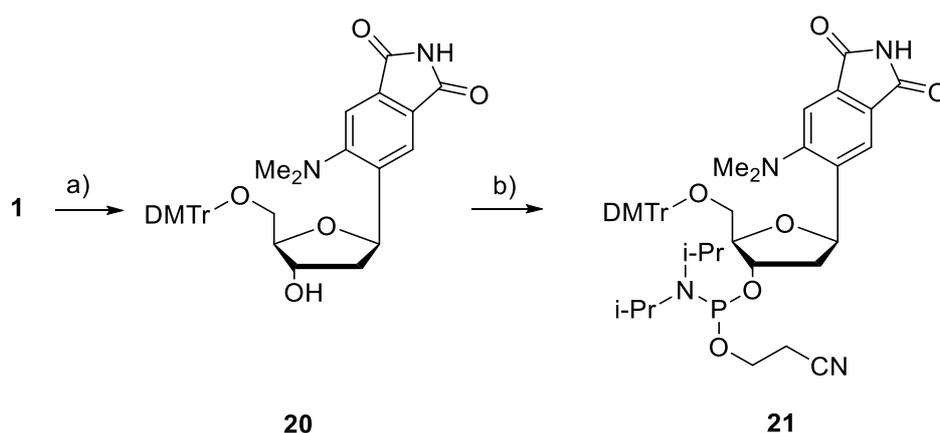


Abb. 25: Syntheseroute zur Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **21**: a) DMTr-Cl, Et_3N , Pyridin, 30 °C, ü. N., 69%; b) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphorylchlorid, DIPEA, DCM, RT, 65%.

Die abschließenden Schritte für den Phosphoramidit-Baustein **21** umfassen die selektive DMTr-Schützung der 5'-OH- Gruppe von **1** und die anschließende Phosphonierung von **20** (Abb. 25).

2.2 Synthese des Phosphoramidit-Bausteins von o-4API

Ausgehend von den Ergebnissen aus Kap. 2.1 konnte die Synthesestrategie für **2** übernommen werden. Das funktionalisierte Phthalimid **11** ist literaturbekannt^[78] und konnte ausgehend von **6** direkt in einer einfachen elektrophilen Substitution mit NIS in DMF dargestellt werden (Abb. 26).

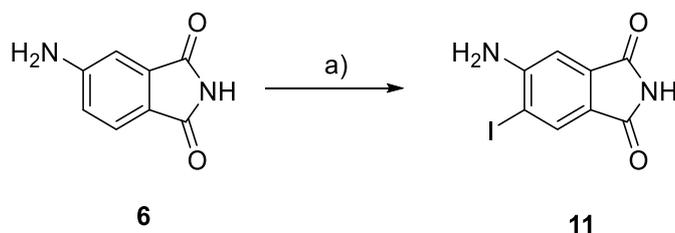


Abb. 26: Synthetische Darstellung des halogenfunktionalisierten Aglykons **11** a) NIS, DMF, 45 °C, 80%.

Anschließend wurden **11** und **17** in einer palladiumkatalysierten *Heck*-Reaktion zu **22** umgesetzt (Abb. 27). Die optimierten Katalysebedingungen wurden aus der Reaktion zur Darstellung von **18** übernommen (vgl. Kap. 2.1). Im Vergleich dazu musste die Reaktionszeit jedoch stark erhöht werden. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Tatsache, dass die β -Eliminierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Katalysezyklus ist, da das **4API** im Vergleich zu **DMAPI** elektronenärmer ist und somit den Eliminierungsschritt weniger unterstützt. Die Ausbeuten von **22** sind stark von den gewählten Bedingungen abhängig. Werden die Reaktionen nicht ganz wasserfrei durchgeführt, wird die TBDMS-Gruppe schon vorher abgespalten, wodurch es schwierig wird, **23** säulenchromatographisch zu isolieren. Unter optimalen Bedingungen kann **22** jedoch in Ausbeuten von bis zu 65% dargestellt werden.

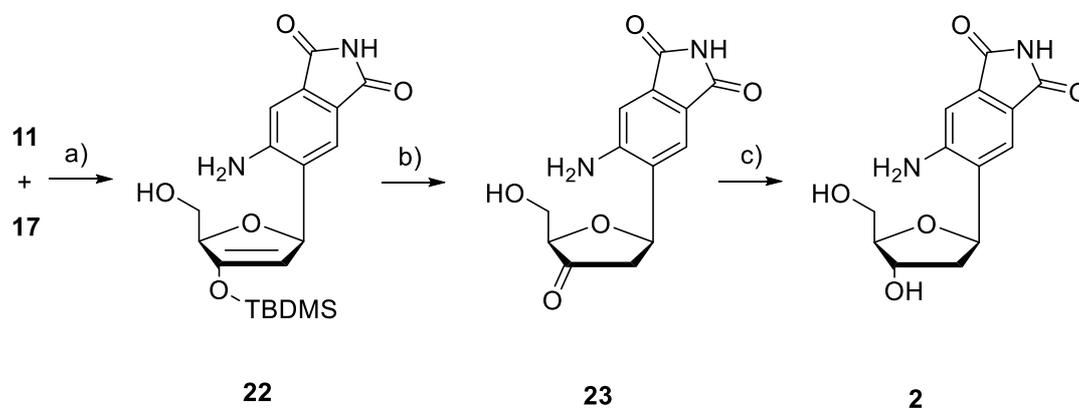


Abb. 27: Syntheseroute zur Darstellung von Nucleosid **2**: a) Pd₂(dba)₃, [(t-Bu)₃PH]BF₄, Cy₂NMe, Dioxan, 75 °C, ü. N., 65%; b) Et₃N·3HF, THF, 0 °C → RT, 2 h; c) NaBH(OAc)₃, AcOH/MeCN 3:1, 0 °C, 2 h, 64% (über zwei Stufen).

Nach Abspaltung der TBDMS-Gruppe und ohne weitere Aufarbeitung von **23** wurde **2** mit einer Ausbeute von 64% über zwei Stufen erhalten.

Die Phosphoramidit-Methode erfordert die Maskierung der exozyklischen Aminogruppe von **2** mit einer geeigneten orthogonalen Schutzgruppe. Aufgrund der Labilität des Farbstoffs gegenüber Nucleophilen unter basischen Bedingungen muss die DNA-Synthese unter *Ultramild* Bedingungen ablaufen (vgl. Kap. 4.1). *Michael Weinberger* konnte bei diesem System allerdings zeigen, dass die geeignete Phenoxyacetyl-Schutzgruppe sehr schlecht abgespalten wird. Aus diesem Grund wurde die von *Pfleiderer et al.* entwickelte *p*-Nitrophenylethoxycarbonyl (NPEOC)-Schutzgruppe eingeführt (Abb. 28:), die über eine β -Eliminierung mit starken, nicht nukleophilen Basen wie Diazabicycloundecen (DBU) abgespalten wird und somit mit der *Ultramild* Methode kombiniert werden kann.^[79-81]

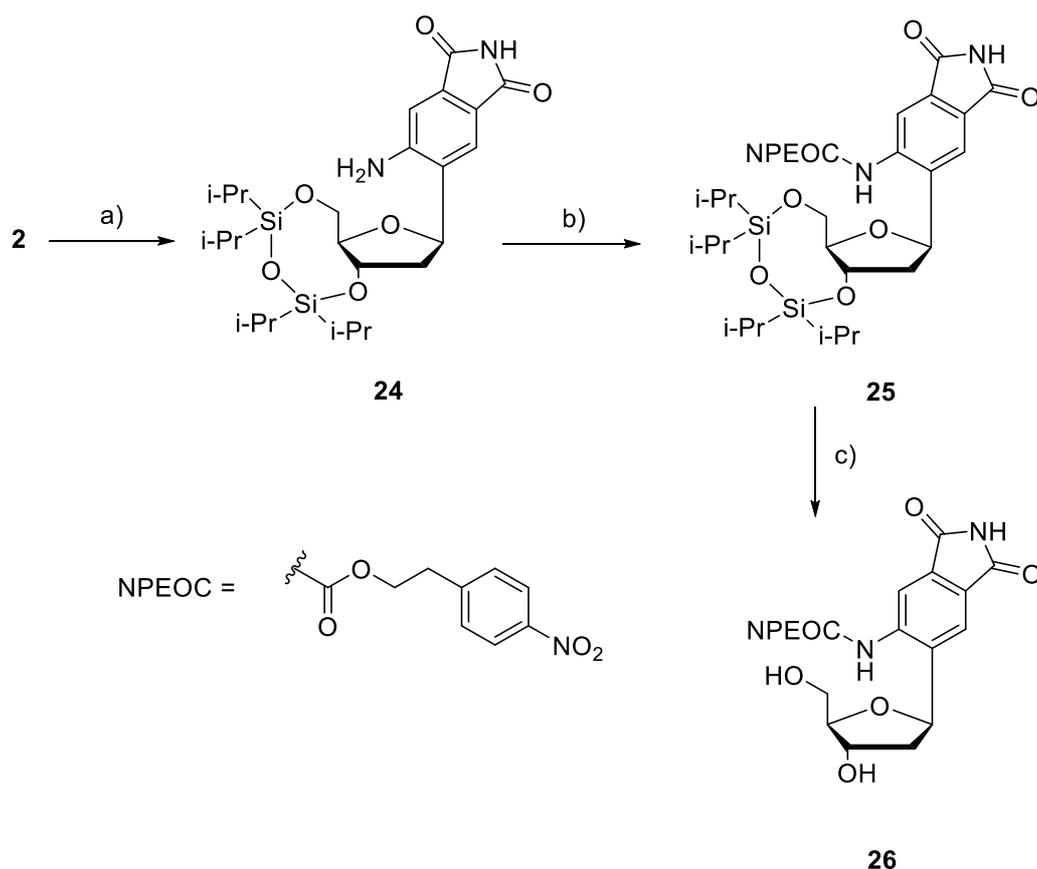


Abb. 28: Syntheseroute zur Darstellung des NPEOC-geschützten Nucleosids **26**: a) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan, Pyridin, 0 °C \rightarrow RT, ü. N., 56%; b) 1) Triphosgen, Et₃N, DCM, 0 °C, 1 h 2) *p*-Nitrophenylethanol, DCM, RT, ü. N.; c) TBAF, THF, 0 °C, 15 min, 30% (über zwei Stufen)

Um diese Schutzgruppe einzuführen, mussten die beiden Hydroxyfunktionalitäten des Zuckerrestes geschützt werden. Hier bietet sich der Einsatz der Silylschutzgruppenchemie an. Die Regioselektivität gegenüber der Aminogruppe wird

durch den Einsatz der zyklischen Marciewicz-Schutzgruppe (Tetraiso-propyldisiloxane-1,3-diyl) gewährleistet, wodurch **24** mit einer Ausbeute von 56% dargestellt wurde. Die Carbamatsynthese von **25** erwies sich, aufgrund der geringen Nukleophilie der konjugierten Aminogruppe, etwas schwierig. Aktivierungsversuche durch CDI und NHS-Ester führten zu keinem Umsatz. Literaturbekannt sind Carbamate des **4APIs**, bei welchen die Aminogruppe durch Triphosgen in das entsprechende Isocyanat umgesetzt wird, das anschließend *in situ* mit Alkoholen weiterreagiert.^[82] Die Darstellung von **25** erfolgte durch Umsetzung von **24** mit Triphosgen und 4-Nitrophenylethanol. Nach der anschließenden Silyletherspaltung von **25** konnte das Nukleosid **26** über zwei Stufen in Ausbeuten von 30% erhalten werden.

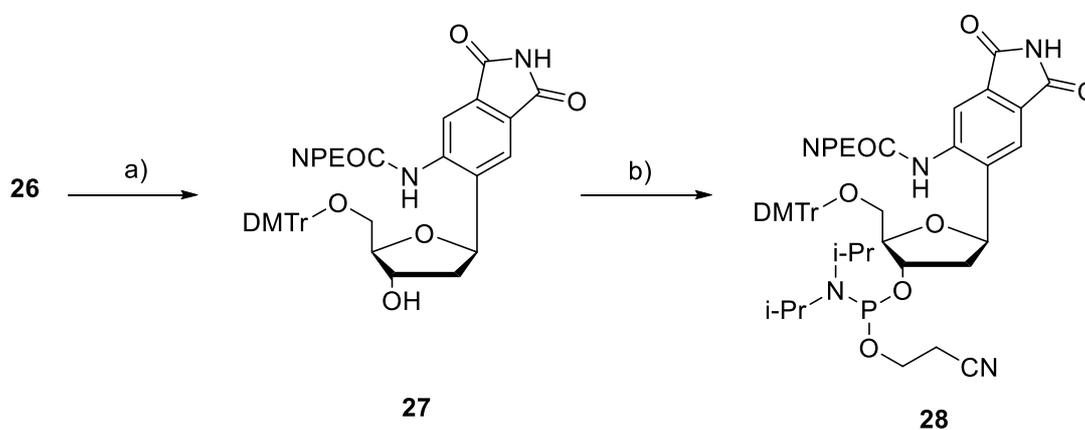


Abb. 29: Syntheseroute zur Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **28**: a) DMTr-Cl, Et₃N, Pyridin, RT, ü. N., 51%; b) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphorylchlorid, DIPEA, DCM, RT, 57%.

Die abschließenden Schritte für den Phosphoramidit-Baustein **28** umfassen ebenfalls die selektive DMTr-Schätzung der 5'-OH-Gruppe von **26** und die anschließende Phosphonierung von **27** (Abb. 29).

2.3 Synthese des m-4API-Nukleosids

Die Synthese des Nukleosids **4** wurde von *Michael Weinberger* entwickelt^[44] und in dieser Arbeit übernommen. Für die Synthese des Aglykons **32** wurde **29** zuerst substituentengesteuert mit NIS iodiert (Abb. 30). Anschließend wurde die Methylgruppe von **30** mit KMnO_4 oxidiert und **31** zu Imid **32** mit Harnstoff kondensiert.

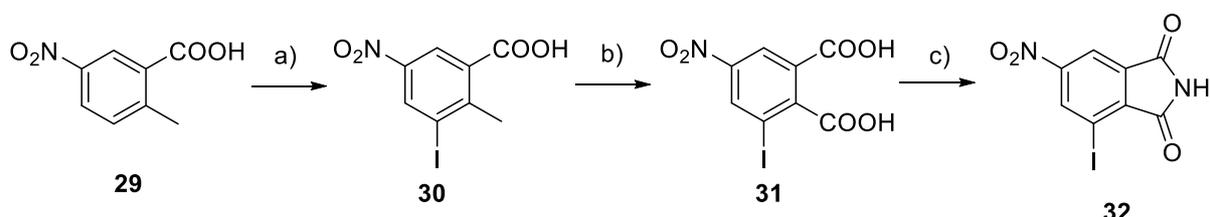


Abb. 30: Syntheseroute zur Darstellung des funktionalisierten Aglykons **32** nach *Michael Weinberger*.^[44] a) NIS, konz. H_2SO_4 , 60 °C, 2,5 h, 82%; b) KMnO_4 , NaOH, H_2O , ü. N. c) *o*-Xylol, 160 °C, 4 h, 39% (über zwei Stufen).

Wie in Abb. 31 gezeigt, wurde **32** mit **17** mittels einer palladiumkatalysierten *Heck*-Reaktion umgesetzt. Unter diesen Bedingungen wird **33** *in situ* zu **34** entschützt. Nach anschließender stereoselektiver Reduktion der Ketogruppe wurde das Nukleosid **35** erhalten. Um die **4API**-Funktionalität zu generieren, wurde abschließend die Nitrogruppe von **35** mit NaSH reduziert und das Nukleosid **4** erhalten.

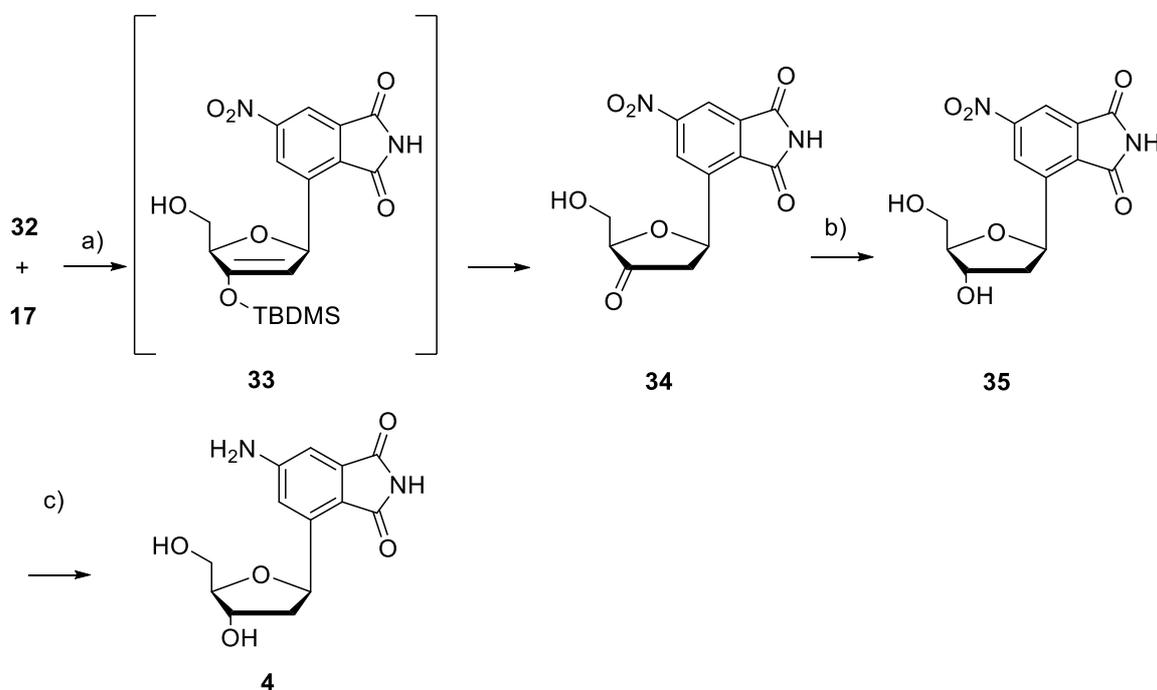


Abb. 31: Syntheseroute zur Darstellung von Nukleosid **4**: a) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{P}(\text{C}_6\text{F}_5)_3$, Et_3N , MeCN, 82 °C, ü. N., 36%; b) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH/MeCN 2:1, 0 °C, 1 h, 49%; c) NaSH, EtOH, Rückfluss, 1 h, 70%.

2.4 Synthese des 2,4-Diaminopyrimidin Bausteins

Die Synthese des 2,4-Diaminopyrimidin-Bausteins **42** wurde von *Falko Berndt* entwickelt.^[44] Im Zuge dieser Arbeit wurde diese Syntheseroute vollständig übernommen und wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

Die einzelnen Syntheseschritte ähneln denen aus den bereits besprochenen Kapiteln. Im ersten Schritt erfolgte die *Hack*-Reaktion ausgehend von kommerziell erhältlichem **36** mit **17** (Abb. 32). Da auch in diesem Fall eine Mischung aus **37** und **38** entsteht, wurde das Rohprodukt ohne Aufarbeitung mit TBAF zu **38** entschützt. Die anschließende Reduktion lieferte die Vorstufe **39**

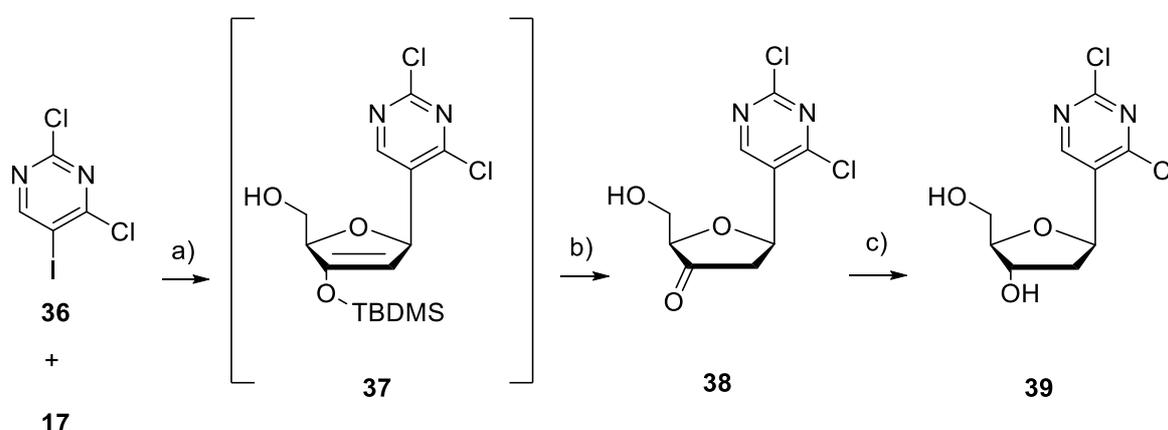


Abb. 32: Syntheseroute zur Darstellung von Nucleosid **39** nach *Falko Berndt*. a) Pd(OAc)₂, P(C₆F₅)₃, Et₃N, MeCN, 82 °C, ü. N., b) TBAF, AcOH, THF, 0 °C, 1 h, 28% (über zwei Stufen); c) NaBH(OAc)₃, AcOH/MeCN, 0 °C, 30 min, 68%.

Die funktionalisierte Pyrimidinbase **39** konnte nun beliebig modifiziert werden (Abb. 33). Dazu wurde die 5'-OH-Gruppe als Silylether geschützt und die bereits benzylgeschützten (Bz) Aminogruppen über eine *Hartwig-Buchwald*-Aminierung in **40** eingeführt. Die anschließende Entschützung der 5'-Hydroxygruppe lieferte das Nucleosid **42**.

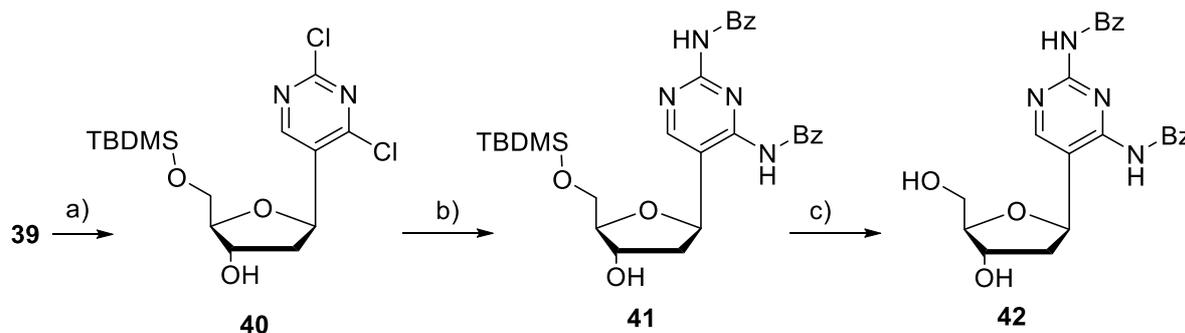


Abb. 33: Syntheseroute zur Darstellung von Nucleosid **42**: a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, 3 h, 31%; b) Pd₂(dba)₃, Xantphos, Benzamid, Cs₂CO₃, Dioxan, 100 °C, 20 h, 90%, c) ET₃N·3HF, THF, RT, 1 h, 62%.

Die abschließenden Schritte zur Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **44** umfassen ebenfalls die selektive DMTr-Schützung der 5'-Hydroxygruppe von **42** und die anschließende Phosphonierung von **43**.

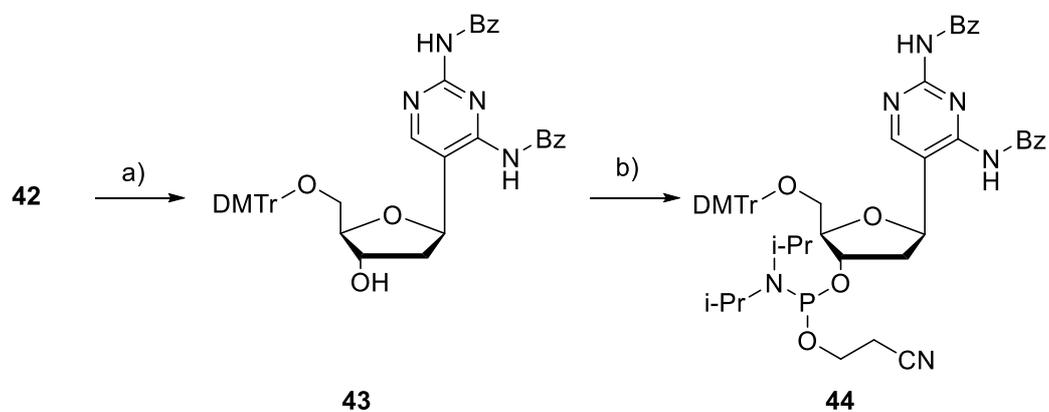


Abb. 34: Syntheseroute zur Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **44** nach *Falko Berndt*: a) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 2 d, 65%; b) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid, DIPEA, DCM, RT, 55%.

3 Synthese der Nukleotide

Die Synthese und Aufreinigung von Nukleosidtriphosphaten ist mit vielen Problemen und geringen Ausbeuten verbunden. Auch wenn es einige Berichte gibt, die eine effiziente Synthese ausgewählter Beispiele aufzeigen, so handelt es sich mehr um Ausnahmen und nicht um ein allgemeingültiges Protokoll. Der erste Schritt der Synthese beinhaltet die Monophosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe von **I** zu einem Chlorophosphatintermediat **II** (Abb. 35). Diese wird standardmäßig mit Phosphorylchlorid durchgeführt, was dazu führt, dass die Reaktion aufgrund der hohen Reaktivität nicht regioselektiv abläuft. Eine deutliche Verbesserung präsentierten *Yoshikawa et al.*^[83] Werden Trialkylphosphate als Lösemittel eingesetzt und das Intermediat anschließend wässrig aufgearbeitet, so können die Ausbeuten der 5'-Monophosphate **III** bis auf 90% erhöht werden.

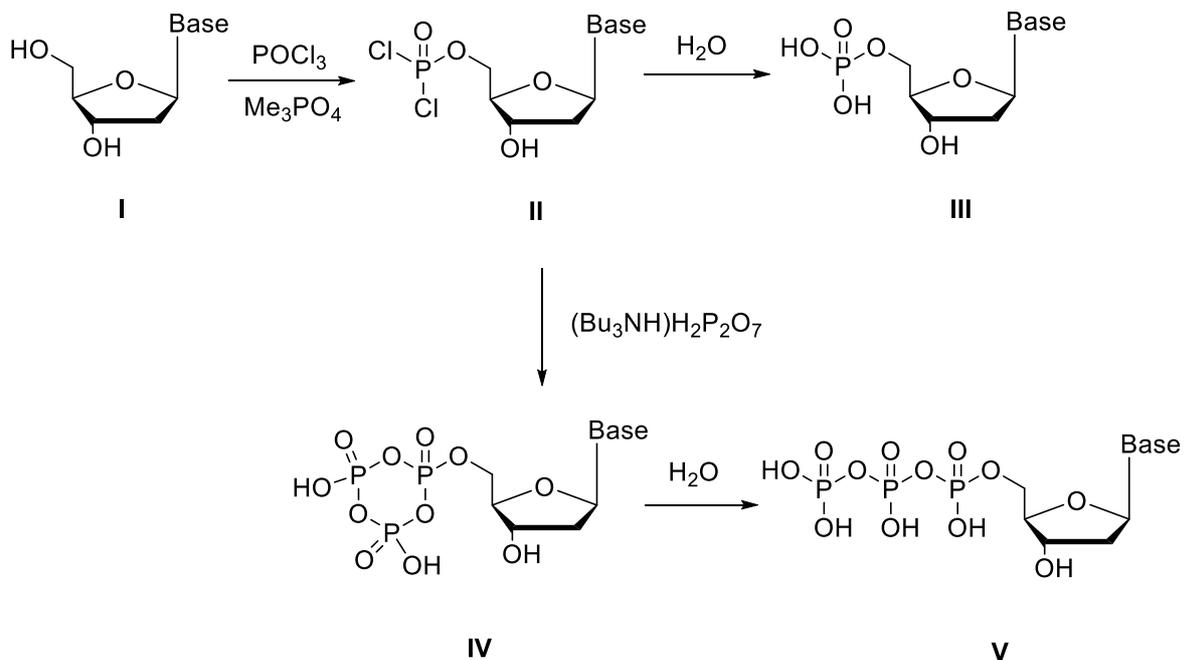


Abb. 35: Schematische Darstellung der Syntheseroute der Nukleosid-Monophosphate nach *Yoshikawa et al.* und der Nukleosidtriphosphate nach *Ludwig et al.*^[83-84]

Die Ursache dafür ist noch nicht bekannt. Es bildet sich vermutlich ein reaktiver Komplex zwischen Phosphorylchlorid und dem Trialkylphosphat aus, der bevorzugt von der primären 5'-Hydroxygruppe nukleophil angegriffen wird. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Löslichkeit aller Komponenten in alkylierten Phosphaten. *Ludwig et al.* griffen diese Methode auf und setzten das Chlorintermediat **II** vor der wässrigen Aufarbeitung mit Pyrophosphatanionen um, sodass ein cyclisches Anhydrid **IV** entstand.^[84] Dieses wurde anschließend zum Nukleosidtriphosphat **V** hydrolysiert. Die

Ausbeuten dieser Methode sind ebenfalls nicht sehr hoch, allerdings ist bei dieser Eintopfvariante die Maskierung der 3'-Hydroxygruppe nicht erforderlich.

3.1 Synthese der 4-API-modifizierten Nukleosidtriphosphate

Für die Synthese der Triphosphate **45** und **46** wurde die Synthese von *Ludwig et al.* übernommen (Abb. 36). Dazu wurden die Nukleoside **2** und **4** zusammen mit Protonenschwamm® (PS) jeweils in wasserfreiem Trimethylphosphat (TMP) gelöst. Die Base diente der Neutralisation des bei dieser Reaktion entstandenen Chlorwasserstoffs. Um die Bildung des phosphatverbrückten Dimers zu unterdrücken, erfolgte eine rasche Zugabe des Phosphorylchlorids, um die Zahl der freien primären 5'-Hydroxygruppen schnellstmöglich zu verkleinern. Die Phosphorylierungen der anderen nukleophilen Gruppen wurden durch einen leichten Unterschuß des Reagenzes und durch Zugabe unter Kühlung unterdrückt.

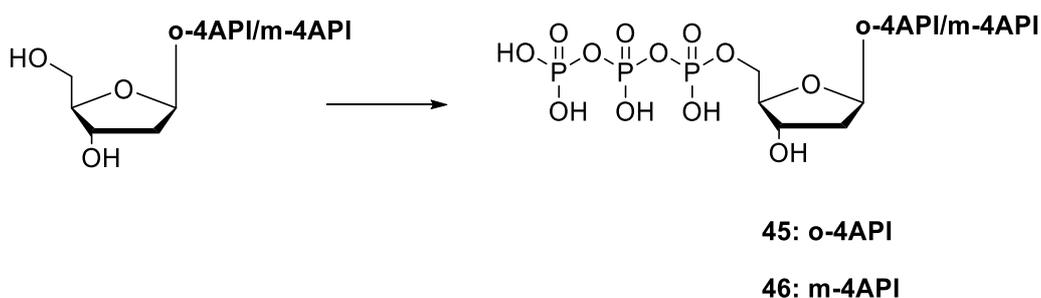


Abb. 36: Syntheseroute zur Darstellung der Nukleosidtriphosphate **45** und **46**: 1) POCl₃, PS, TMP, -10 °C, 4 h; 2) (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF, 30 min; 3) TEAB/H₂O, 5% (**45**) und 8% (**46**).

Der anschließende Umsatz zum Triphosphatanhydrid erfolgte durch Zugabe des Pyrophosphats. Zur besseren Löslichkeit wurde das Tributylammoniumsalz verwendet. Nach der Hydrolyse mit TEAB-Puffer (pH = 7.2) erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC. Das Triphosphat **45** konnte in Ausbeuten von 5% isoliert werden, während **46** in 8% erhalten wurde. Die geringen Ausbeuten lassen sich durch Bildung der Dimere sowie der höheren Phosphate während der Synthese erklären. Im Normalfall werden zur Entfernung der höheren Phosphate Ionenaustauschchromatographien durchgeführt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass das **4API** den höheren Pufferkonzentrationen nicht standhält und irreversibel zerstört wird. Somit bleibt die RP-Chromatographie die einzige Aufreinigungsmöglichkeit für diese Nukleosidtriphosphate.

3.2 Synthese der Nucleosid- α -Thiotriphosphate

Für die Synthese der α -Thiotriphosphate von **2** wurde die Methode nach *Ludwig* übernommen und teilweise angepasst. Für die Einführung des Schwefelatoms in die α -Phosphatgruppe wurde das Phosphorylchlorid durch Thiophosphorylchlorid ersetzt (Abb. 37).

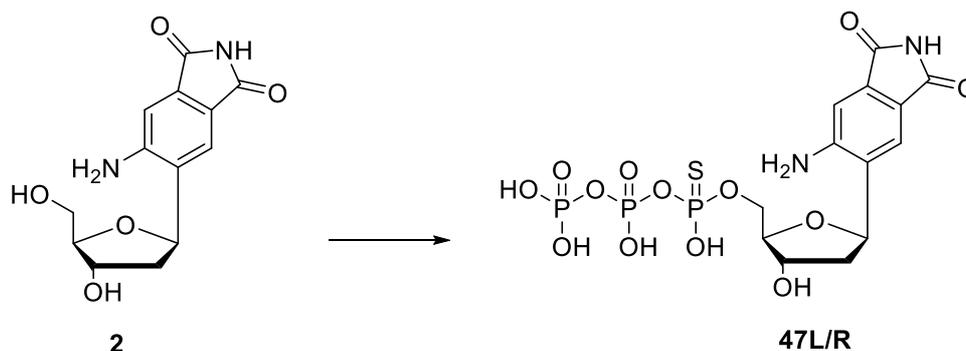


Abb. 37: Syntheseroute zur Darstellung der beiden Nucleosidthiotriphosphats **47**: 1) PSCl_3 , PS, TMP, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h; 2) $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF, 30 min; 3) TEAB/ H_2O , 5%.

Durch diese Modifizierung wird am α -Phosphor ein chirales Zentrum generiert, das zu zwei Diastereomeren führt. In Abb. 38 ist das Chromatogramm der Aufreinigung durch RP-HPLC dargestellt. Da die absolute Stereoinformation nicht bestimmt wurde, wurden die beiden Isomere durch ihre Lage im Chromatogramm relativ zueinander mit **47L** und **47R** benannt. Die Gesamtausbeute der Isomerenmischung betrug 5%.

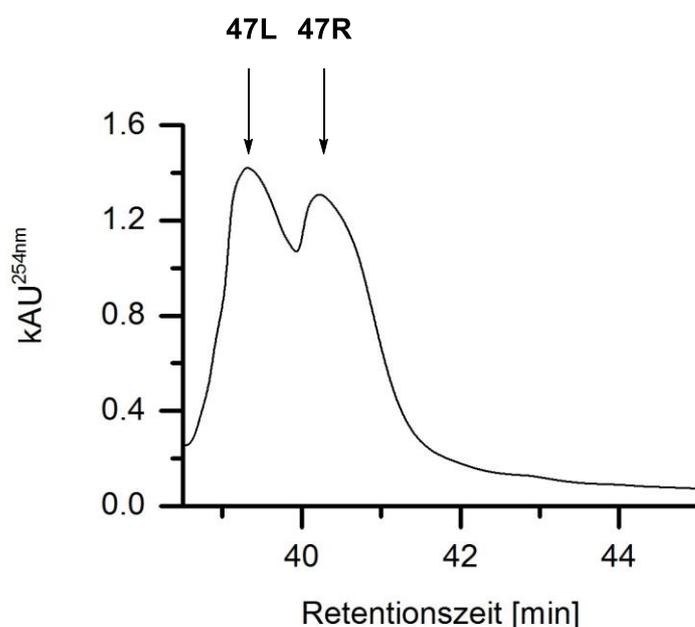
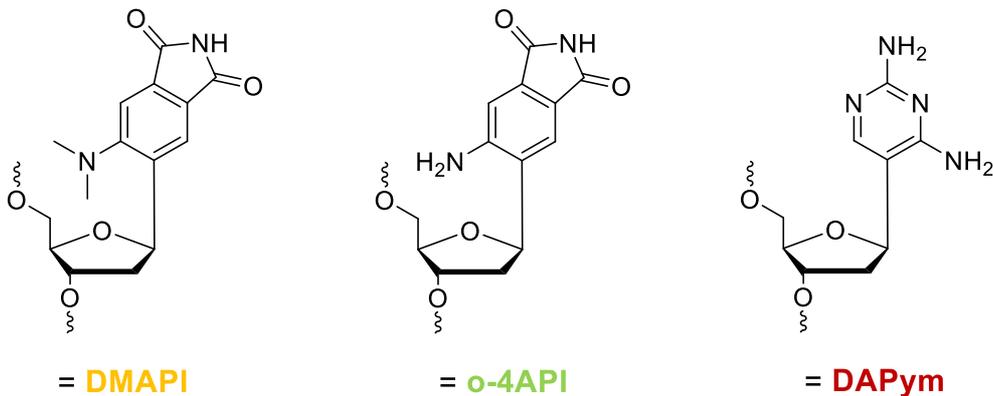


Abb. 38: HPLC-Chromatogramm zur Auftrennung der beiden Diastereomere **47L** und **47R**.

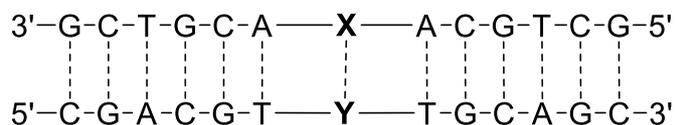
4 Synthese der Oligonukleotide

Mithilfe automatisierter Festphasen-Synthese wurden die Phosphoramidit-Bausteine **21 (DMAPI)** und **28 (o-4API)** in Oligonukleotide eingebaut (Abb. 39). **DNA5** wurde mit Baustein **44 (DAPym)** von *Falko Berndt* synthetisiert, während **DNA8** mit einer abasischen Stelle von *Michael Weinberger* synthetisiert wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit der Eigenschaften in DNA wurden dieselben Sequenzen ausgewählt, in denen das **m-4API:DAPym** Basenpaar bereits untersucht wurde (vgl. Kap. 1.4.2). Die unmodifizierten DNA-Stränge **DNA4-7** wurden kommerziell bezogen.



DNA1: X = DMAPI

DNA2: X = o-4API



DNA3: Y = DAPym

DNA5: Y = T

DNA7: Y = C

DNA4: Y = A

DNA6: Y = G

DNA8: Y = dS

Abb. 39: Die drei mittels Phosphoramidit-Methode eingebauten Basen **DMAPI**, **o-4API** und **DAPym** (oben) und DNA-Sequenzen **DNA1-8** (unten).

Für den enzymatischen Einbau der Triphosphate **45** und **46** wurden passende Templatstränge mit Baustein **44** synthetisiert, die als passende Gegenbase **DAPym** aufweisen (**T1-2**, Abb. 40).

T1: 3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AG**DAPym**-GCA-CGG-TCG-CG-5'

T2: 3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AGC-GAC-GT**DAPym**-TGC-AGC-5'

Abb. 40: Synthetisierte Templatstränge **T1-2** für Primerverlängerungsexperimente.

4.1 Synthese phthalimidmodifizierter DNA

Die Phosphoramidit-Methode unter Standardbedingungen bzw. die anschließende Aufarbeitung ist bei phthalimidmodifizierten Nucleinsäuren nicht möglich. Die Phthalimideinheiten werden unter anderem in der Schutzgruppenchemie verwendet, um Amine zu maskieren und können durch Hydrazinolyse oder Verseifung wieder entfernt werden. Die Abspaltung erfolgt dabei durch Angriff eines Nucleophils an die elektrophile Carbonyleinheit, wodurch das entschützte Amin und, je nach Nucleophil, Derivate der Phthalsäure frei werden und die Imidfunktionalität verloren geht. Die Aufarbeitung der nach der Phosphoramidit-Synthese hergestellten Oligonucleotide setzt jedoch die Stabilität der Nucleinsäuren und deren Modifikationen gegenüber Nucleophilen voraus, da die Entschützung der exozyklischen Aminogruppen und die Abspaltung von der festen Phase mit konz. Ammoniak bei 55 °C stattfindet. Um dies zu entgehen, muss beim Einbau phthalimidmodifizierter Bausteine, wie schon berichtet, die als *Ultramild* bekannte Methode eingesetzt werden.^[85] Der Unterschied zur Standardmethode liegt zum einen an den verwendeten Schutzgruppen an den Basen, die eine Aufarbeitung mit einer 0.5 M methanolischen Kaliumcarbonatlösung bei Raumtemperatur ermöglichen (Abb. 42). Die Maskierung der Aminogruppe der Cytosin Base erfolgt als Acetylamid während Adenosin ein Phenoxyacetylrest und Guanin das davon abgeleitete Isopropylphenoxyacetylamid trägt. Der Thymin-Baustein wird nach wie vor ohne Schützung der Nucleobase eingesetzt. Ein weiterer Unterschied besteht im *Capping*-Schritt. Um einem Schutzgruppenwechsel an G zu entgehen, wird Acetanhydrid durch das Anhydrid der Phenoxyacetylsäure ersetzt.

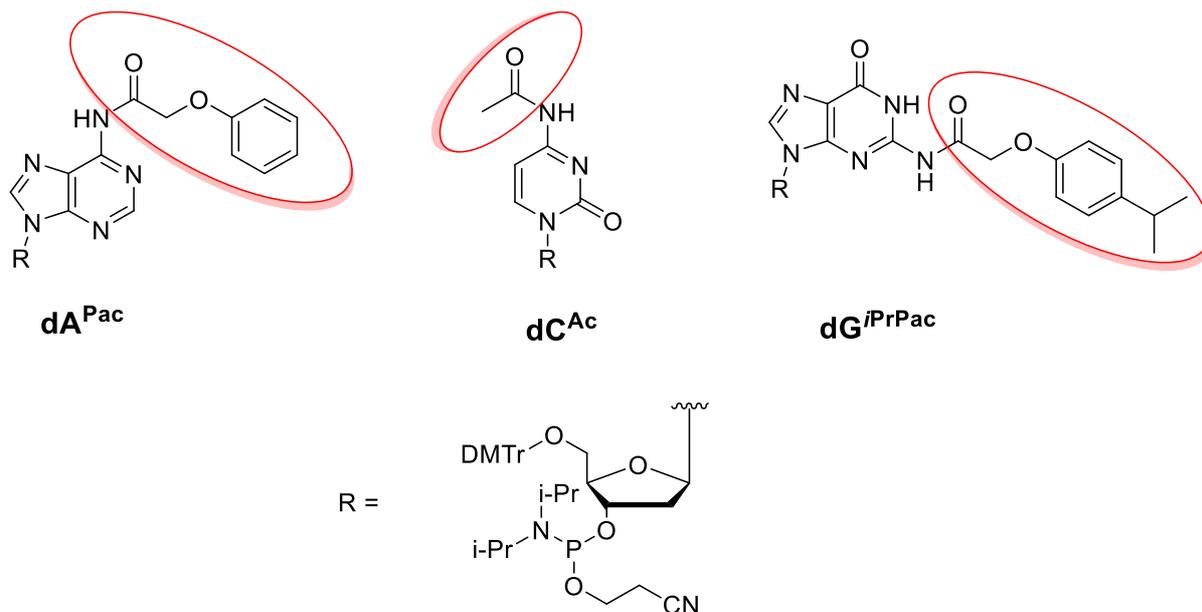


Abb. 41: Phosphoramidit-Bausteine dA^{Pac} , dC^{Ac} und $\text{dG}^{\text{iPrPac}}$ für die DNA-Synthese nach der *Ultramild* Methode; Schutzgruppen sind mit roten Kreisen markiert.

Mithilfe dieser Methode konnten durch veränderte Abspaltbedingungen das C-Nukleosid **3** in Oligonukleotide eingebaut und untersucht werden.^[44] Die *Ultramild* Methode wurde daher für beide in dieser Arbeit synthetisierten Phosphoramidit-Bausteine **21** und **28** übernommen und teilweise erweitert.

Aufgrund der Inertheit der Dimethylaminogruppe von **DMAPI** kann auf das Einführen einer Schutzgruppe in den künstlichen Baustein verzichtet werden und **21** direkt in der Oligonukleotidsynthese zu **DNA1** umgesetzt werden. Wie sich später herausstellte, wird die Imidfunktion ebenfalls toleriert. Der Baustein wurde in DCM (0.1 M) gelöst und die Kupplungszeit im Syntheseprotokoll von 30 s auf 2400 s für eine bessere Einbaueffizienz erhöht (vgl. Kap. V4.1). Anschließend wurde **DNA1** nach der *Ultramild* Methode aufgearbeitet.

Für die Synthese von **DNA2** wurde der Baustein **28** in DCM (0.1 M) gelöst und die Kupplungszeit von 30 s auf 975 s im Vergleich zu den natürlichen Bausteinen erhöht (vgl. Kap. V4.1). Nach dem erfolgreichen Einbau wurde jedoch eine andere Entschützungsverfahren mit der *Ultramild* Methode kombiniert. Anders als die Abspaltung der Amidschutzgruppen durch Hydrolyse wird das NPEOC-Carbamat des artifiziellen Bausteins über β -Eliminierung, induziert durch eine starke nichtnukleophile Base wie Diazabicycloundecen (DBU) in Pyridin, gespalten (Abb. 42).

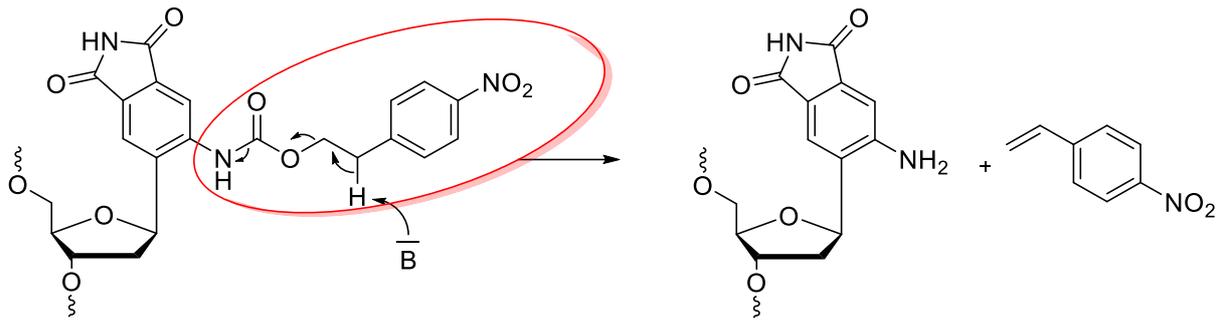


Abb. 42: Geschütztes o-4-API in DNA und Abspaltung der NPEOC-Gruppe durch DBU (B).

Das dabei entstehende Styrol und Acrylnitril (Abspaltprodukt der Schutzgruppen des Phosphatrückgrates) sind jedoch in der Lage, die Nucleobasen der DNA zu alkylieren, was durch anschließende massenspektrometrische Untersuchung bestätigt werden konnte. Um dem bekannten Problemen zu entgehen, wurde dem Abspaltreagenz Thymin als sogenannter *scavenger* zugegeben.^[86] Da der Linker zwischen Nucleinsäure und CPG unter diesen Abspaltbedingungen bestehen bleibt, wurde die DNA anschließend mittels der *Ultramild* Methode freigesetzt.

4.2 Synthese der mit 2,4-Diaminopyrimidin modifizierten Oligonukleotide

Für die Synthese der Templatstränge **T1-2** wurde der Phosphoramidit-Baustein **44** in DCM (0.1 M) gelöst und die benötigte Kupplungszeit von 30 s auf 280 s erhöht. Die Entfernung der Schutzgruppen von den Nucleobasen und das Abspalten vom CPG-Harz folgten den Standardbedingungen mit konz. Ammoniak bei 55 °C über Nacht. Bei **T2** wurde außerdem die letzte DMTr-Schutzgruppe am 5'-Terminus beibehalten um die anschließende Aufarbeitung zu erleichtern. Dafür wurde eine Variante der Affinitätschromatographie genutzt, die spezifisch die DMTr-Schutzgruppe inklusive DNA bindet. Nach Eluierung der nichttritylierten Abbruchstränge erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppe, wodurch die aufgereinigte DNA von der Säule gespült und aufgefangen wurde.

Alle weiteren Oligonucleotide wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt (vgl. Kap. V4.2)

5 Optische Charakterisierung

Die beiden Chromophore **DMAPI** und **4API** werden im Folgenden mit den Nukleosiden **1** und **2** optisch charakterisiert und jeweils verglichen.

5.1 Vergleich der optischen Eigenschaften von **2** und **4API**

Wie bereits in Kap. 1.4 erwähnt, weist **4API** ein ausgeprägtes Solvatochromieverhalten auf (Abb. 43). Die Verschiebungen der Absorptionsmaxima sind weniger ausgeprägt und werden mit steigender Polarität, vor allem durch protische Lösemittel, leicht rot verschoben. Viel deutlicher wird das Verhalten bei der Betrachtung der Fluoreszenz. Durch die Stabilisierung des angeregten Zustands durch das polare Lösemittel erfolgt die bathochrome Verschiebung von $\lambda_{em} = 440$ nm (in EE) auf $\lambda_{em} = 562$ nm (in Wasser). Die Stokes-Verschiebung wird dabei von $\Delta\lambda_{Stokes} = 85$ nm auf $\Delta\lambda_{Stokes} = 197$ nm erhöht. Während die Fluoreszenzquantenausbeute in aprotischen Lösemitteln mit steigender Polarität weitestgehend konstant bleibt ($\Phi \sim 0.60 - 0.70$)^[87], nimmt sie in protischen Lösemitteln stetig ab. In Wasser wurde sie zu $\Phi = 0.030$ bestimmt, was im Bereich der literaturbekannten Werte liegt ($\Phi = 0.014$ ^[88]; 0.022 ^[89]). Der Grund hierfür liegt in der Exciplex-Bildung zwischen Chromophor und Solvensmolekülen im angeregten Zustand, dessen Komplex durch IC deaktiviert wird.^[90]

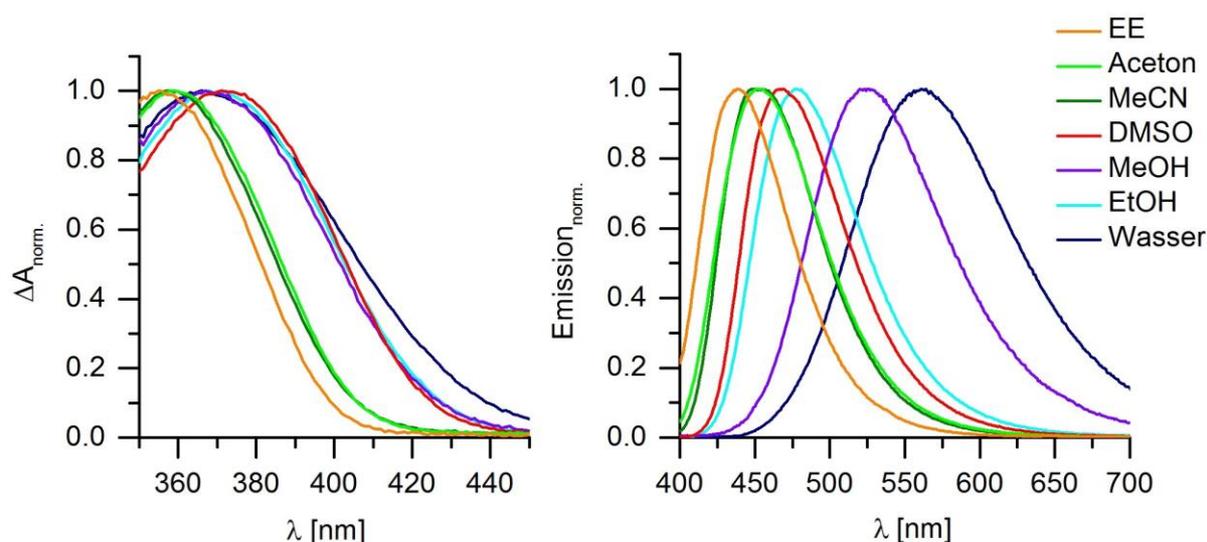


Abb. 43: Normierte Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) von **4API**.

Die Zuckermodifikation von **2** beeinträchtigt das optische Verhalten des Chromophors nur geringfügig und die ausgeprägte Solvatochromie bleibt erhalten (Abb. 44).

Bei genauerer Betrachtung des Fluoreszenzmaximums in Wasser kann eine leichte hypsochrome Verschiebung festgestellt werden. Der Zuckerrest scheint den Chromophor teilweise abzuschirmen und somit eine unpolare Solvatationsumgebung zu schaffen, was sich ebenfalls in der leicht erhöhten Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser ($\Phi = 0.036$) im Vergleich zum freien Chromophor bemerkbar macht.

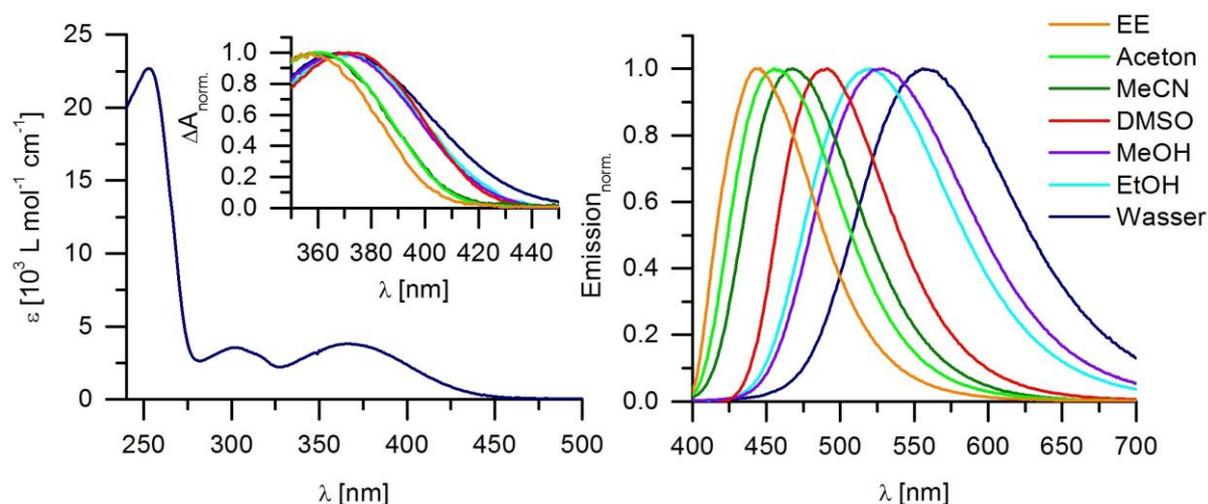


Abb. 44: links: Absorptionsspektrum von **2** in Wasser; Einsatz: normierte Absorptionsspektren von **2** in verschiedenen Lösemitteln; rechts: normierte Fluoreszenzspektren von **2** in verschiedenen Lösemitteln.

5.2 Vergleich der optischen Eigenschaften von **1** und **DMAPI**

Die beiden zusätzlichen Methylgruppen an der Aminofunktion von **DMAPI** führen durch einen zusätzlichen induktiven Effekt zu einer höheren Elektronendichte im Aromaten und folglich zu einer Erhöhung des HOMOs. Da das LUMO weniger beeinflusst wird, folgt dies zu einer weiteren Rotverschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima (Abb. 45). Das Fluoreszenzmaximum in Wasser wird sogar auf $\lambda_{em} = 600$ nm verschoben. Im Gegensatz zu **4API** ist die Fluoreszenzquantenausbeute von **DMAPI** sehr stark von der Polarität des Lösemittels abhängig und fällt in Wasser auf $\Phi = 0.006$ ab.^[91]

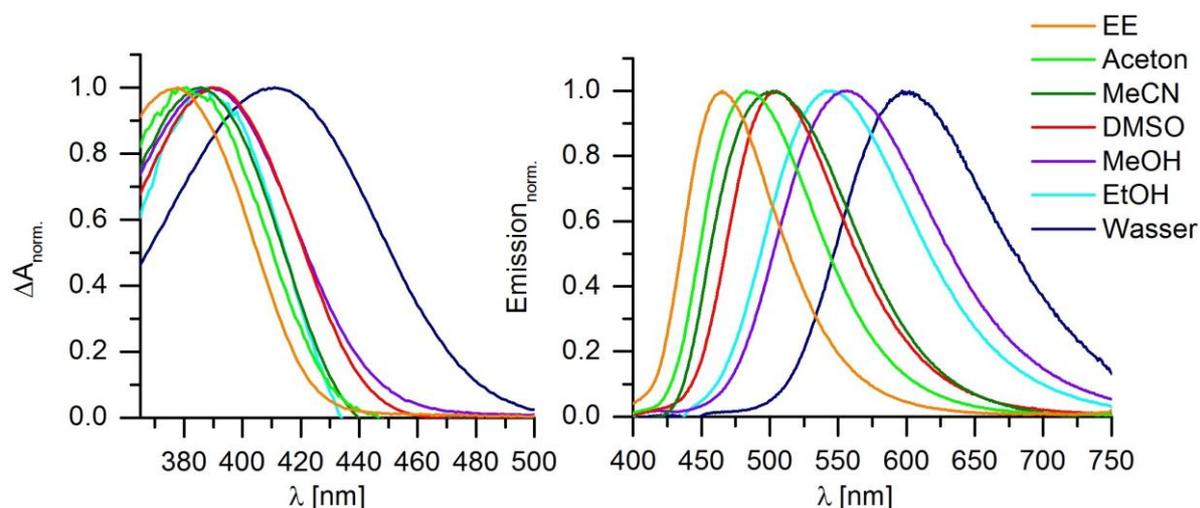


Abb. 45: Normierte Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) von **DMAPI**.

Experimente und theoretische Berechnungen ergaben, dass der erste angeregte Zustand in einen TICT-(*twisted intramolecular charge transfer*)-Zustand übergehen kann, der mit steigender Polarität der Umgebung mehr stabilisiert wird (Abb. 46a).^[87, 92] Die Desaktivierung erfolgt dann strahlungslos in den S_0 -Grundzustand.

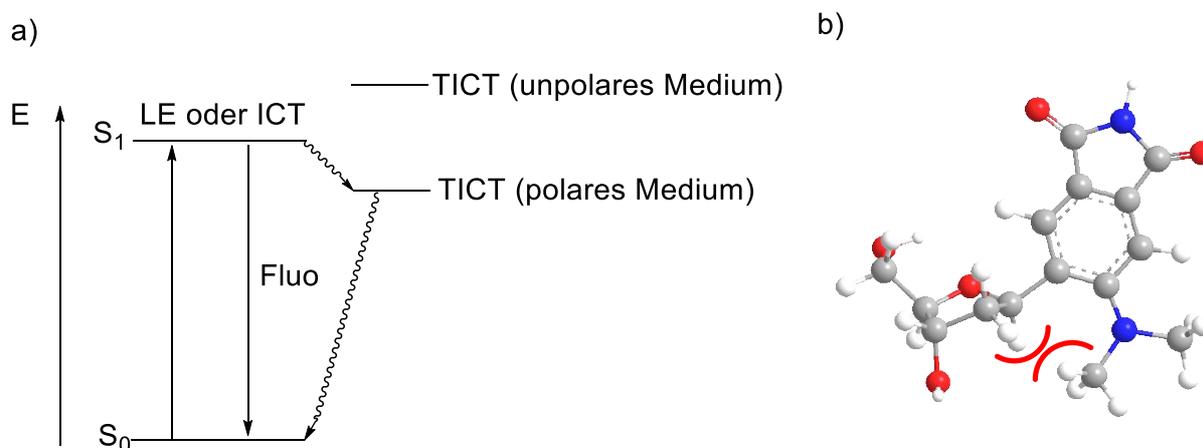


Abb. 46: a) Vereinfachtes Jablonski-Schema mit TICT-Zuständen, S_0 = Singulett-Grundzustand, S_1 = erster angeregter Singulett-Zustand, LE = Locally Excited Zustand, ICT = Intermolecular Charge Transfer-Zustand;^[93] b) Sterische Hinderung der Dimethylaminogruppe mit der 2'-Desoxyriboseeinheit.

Auch im Nukleosid **1** werden die optischen Eigenschaften des Farbstoffs kaum beeinflusst (Abb. 47), wobei am Auffälligsten die um ca. 40 nm blauverschobene Fluoreszenzbande in Wasser ist. Die Abschirmung durch die Zuckereinheit erfolgt auch hier (vgl. Kap. 5.1). Die Fluoreszenzquantenausbeuten sinken allerdings weiter auf $\Phi_{\text{Wasser}} = 0.003$. Der zur Dimethylaminogruppe ortho-stehende Rest befindet sich in räumlicher Nähe zu einer der Methylgruppen. Eine Konformationsänderung der Dimethylaminogruppe würde dem sterisch gehinderten Zustand aus dem Weg gehen

und damit den TICT-Zustand begünstigen (Abb. 46b), was sich in der leicht niedrigeren Quantenausbeute bemerkbar macht.

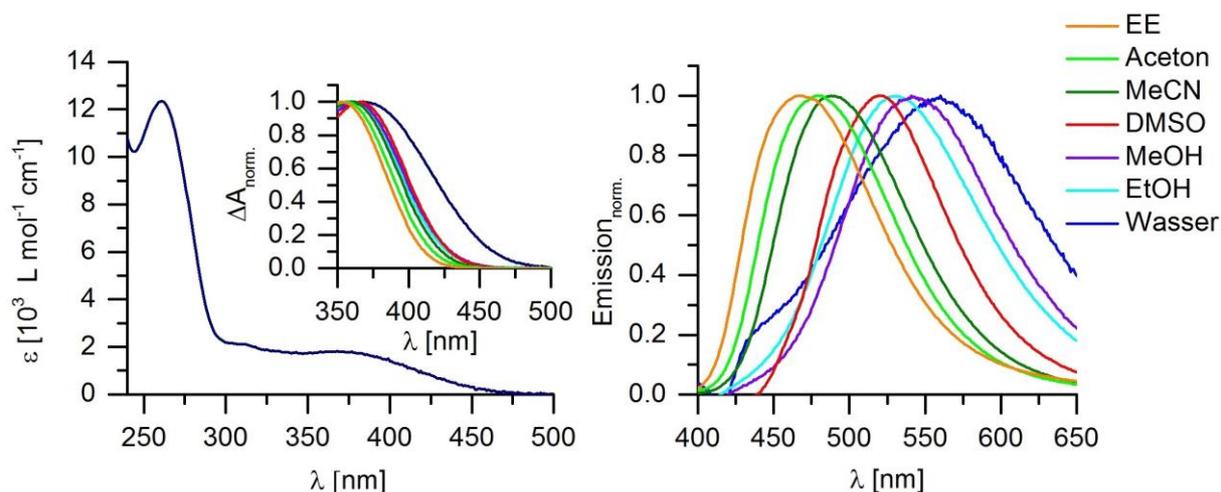


Abb. 47: links: Absorptionsspektrum von **1** in Wasser; Einsatz: normierte Absorptionsspektren von **1** in verschiedenen Lösemitteln; rechts: normierte Fluoreszenzspektren von **1** in verschiedenen Lösemitteln.

5.3 Vergleich der farbstoffmodifizierten DNA

Die beiden Bausteine **1** und **2** konnten erfolgreich in DNA eingebracht werden (**DNA1** und **DNA2**, vgl. Kap. 4) und wie folgt, im Einzel- und Doppelstrang (Gegenstränge: **DNA3-8**, vgl. Kap. 4) optisch vermessen werden.

5.3.1 Optische Charakterisierung von o-4API in DNA

In den Absorptionsspektren ist die charakteristische Bande des **4APIs** bei 385 nm sichtbar (Abb. 48, links), wobei die Rotverschiebung durch Wechselwirkungen des Farbstoffes mit den Nachbarbasen zustande kommt.^[94] Die hydrophobe Umgebung macht sich ebenfalls in der Fluoreszenz bemerkbar (Abb. 48, rechts), indem durch die Abschirmung des Chromophors durch die restlichen Basen die Maxima um 30 nm (ss) bis 50 nm (ds) hypsochrom verschoben werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute steigt im Einzelstrang, im Vergleich zum freien Nukleosid, auf etwa das Doppelte an ($\Phi_{ss} = 0.065$). Das optische Verhalten im Doppelstrang hingegen ist stark von der Gegenbase abhängig.

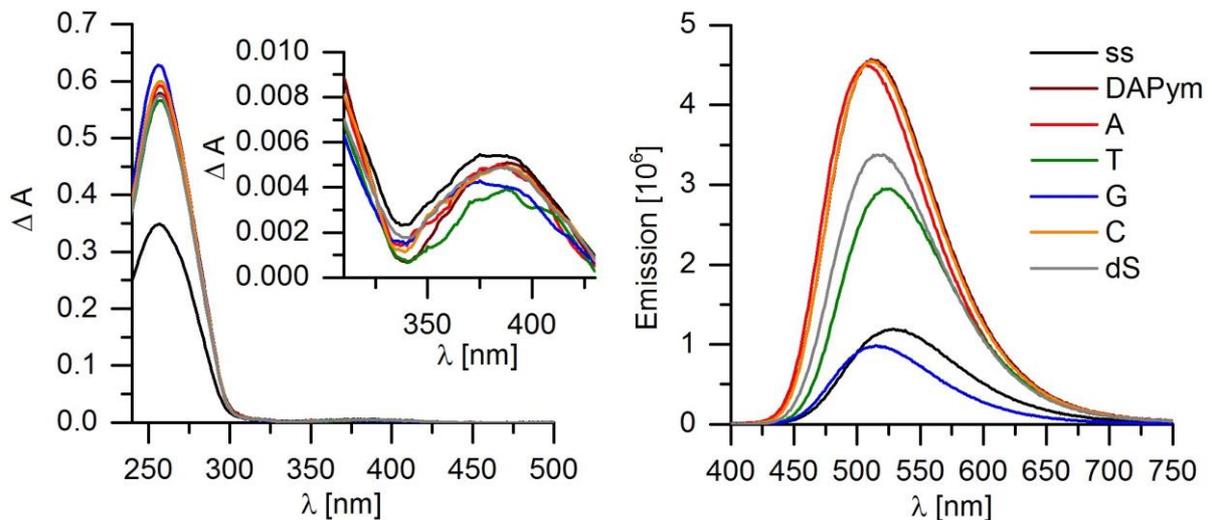


Abb. 48: Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **DNA2** ($c = 2.5 \mu\text{M}$) im Einzelstrang (ss) und Doppelstrang in Abhängigkeit der Gegenbase; $\lambda_{\text{exc}} = 385 \text{ nm}$.

Im Vergleich zum Einzelstrang steigen die Intensitäten der Fluoreszenz, mit Ausnahme von G, weiter an. Dies könnte aus der Einbettung des Chromophors in die Doppelhelix resultieren. Der große Unterschied wird in den Fehlpaarungen mit den Purinbasen sichtbar. Während G, wie erwartet, den Farbstoff aus dem Basenstapel verdrängt, scheinen möglicherweise die attraktiven Wechselwirkungen mit A aufgrund des passenden Wasserstoffbrückenmusters die nicht vorhandene Größenkomplementarität zu kompensieren (Abb. 49).

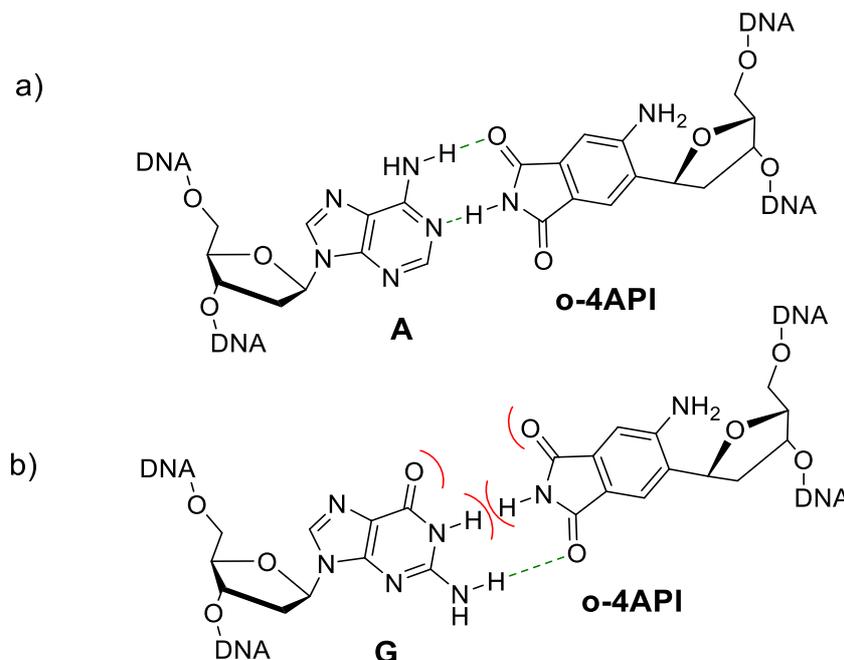


Abb. 49: a) Mögliche Basenfehlpaarung von **o-4API** mit A; b) Mögliche Basenfehlpaarung von **o-4API** mit G; attraktive (grün) und repulsive (rot) Wechselwirkungen.

Bei den Pyrimidinbasen ist die Basenpaarung zu **DAPym** und C vergleichbar. Im Vergleich zu A sind die Maxima um 5 nm bathochrom verschoben. Vergleicht man die Dipolmomente der jeweiligen Gegenbasen (A: 2.5 D; C: 7.0 D)^[95] fällt auf, dass die Pyrimidinbasen die Chromophorenumgebung mehr polarisieren als die Purinbase, was durch das Fluoreszenzverhalten ersichtlich werden könnte. Aufgrund der möglichen Wasserstoffbrücken mit C könnte das **4API** durch attraktive Wechselwirkungen und passender Größe im Basenstapel interkaliert werden, sowie es auch für **DAPym** möglicherweise der Fall ist. Die nichtausgebildete Wasserstoffbrücke scheint die Basenpaarung nicht zu beeinflussen. Bei T ist die Intensität ein wenig geringer, da beide Imdfunktionen, die zueinander ausgerichtet sind, zu repulsiven Wechselwirkungen führen könnte. Allgemein ist hier der Faktor der Größenkomplementarität ausgeprägter. Ist keine Gegenbase vorhanden (dS), dann schiebt sich das **4API** in den Basenstapel, was die Erhöhung und hypsochrome Verschiebung der Fluoreszenz gegenüber T zeigt.

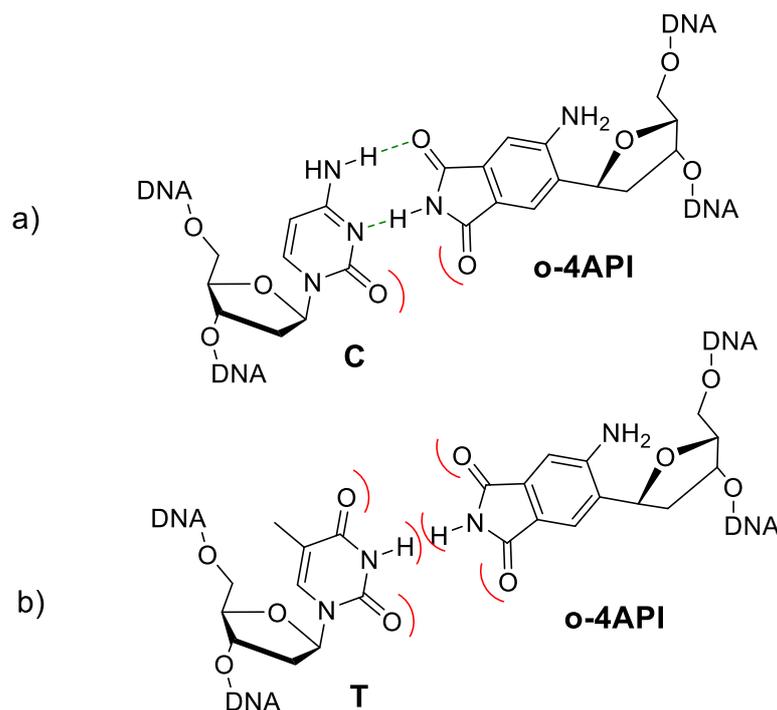


Abb. 50: a) Mögliche Basenfehlpaarung von **o-4API** mit C; b) Mögliche Basenfehlpaarung von **o-4API** mit T; attraktive (grün) und repulsive (rot) Wechselwirkungen.

5.3.2 Optische Charakterisierung von DMAPI in DNA

Die Absorptionsspektren von **DMAPI** im Einzel- sowie Doppelstrang weisen eine charakteristische Bande bei ca. 410 nm auf (Abb. 51), die im Vergleich zum Nukleosid **1** rotverschoben ist. Qualitativ hätte man das gleiche optische Verhalten erwarten können, wie es bei **o-4API** in DNA auftritt. Allerdings scheint die angesprochene *syn*-Konformation (vgl. Kap. 5.2) von **1** im DNA-Strang erhalten zu bleiben, was zu einer geringen Fluoreszenzquantenausbeute führt, da der Chromophor sich nicht in den hydrophoben Basenstapel einbettet (Abb. 51, rechts).

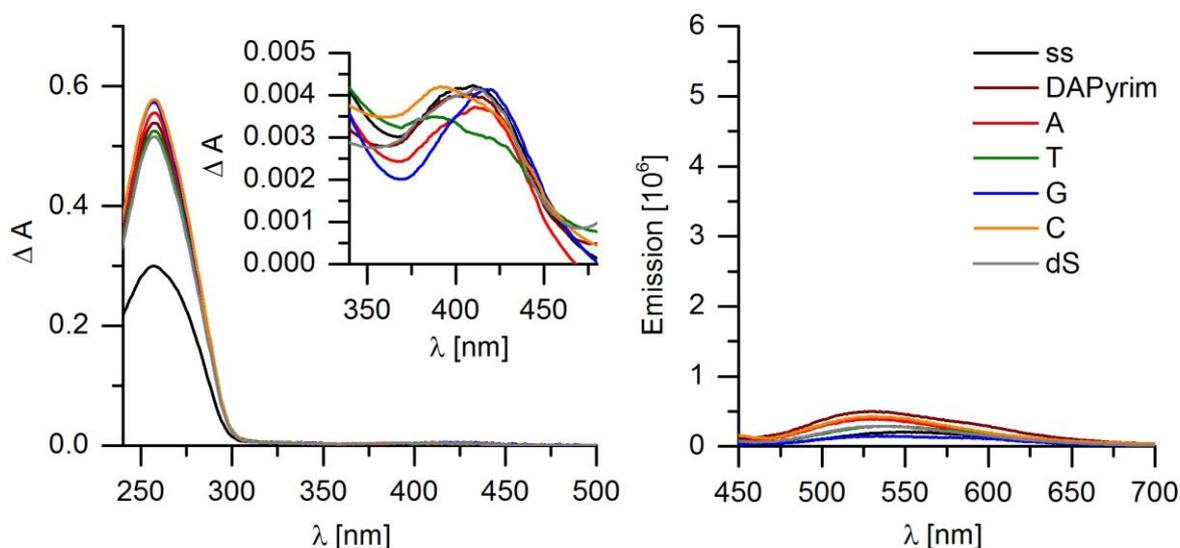


Abb. 51: : Absorptions- (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **DNA1** ($c = 2.5 \mu\text{M}$) im Einzel- und Doppelstrang in Abhängigkeit der Gegenbase ; $\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$.

Werden die Fluoreszenzmessungen wiederholt, verändert sich jedoch nach jeder Anregung die Intensität, sowohl im Einzel- als auch im Doppelstrang (Abb. 52).

Bisher war es nicht möglich, den photostationären Zustand zu erreichen. Da dieser Prozess mit einer Intensitätssteigerung einhergeht und photochemische Reaktionen durch Massenspektrometrie ausgeschlossen werden können, lässt sich vermuten, dass der Chromophor in den Basenstapel hineindreht und dort verharrt. Durch Anregung und anschließendem Übergang in den TICT-Zustand ist die Energie des Systems offensichtlich genügend groß, um die Energiebarriere der *anti*-Konformation zu überwinden und im Basenstapel zu interkalieren. Der neue Zustand hat offenbar, bedingt durch Wechselwirkungen zu den Nachbarbasen im Einzel- sowie zusätzlich zur Gegenbase im Doppelstrang, ein lokales Energieminimum erreicht, von wo aus die nötige Energie fehlt, um in den Ausgangszustand zurück zu gelangen. Es wäre denkbar, dass dieser gestapelte Komplex das Energieniveau des TICT-Zustands

anhebt, wodurch die Rate der Deaktivierung über den strahlungslosen Prozess abnimmt und somit die Fluoreszenzlebenszeit und -quantenausbeute zunimmt.

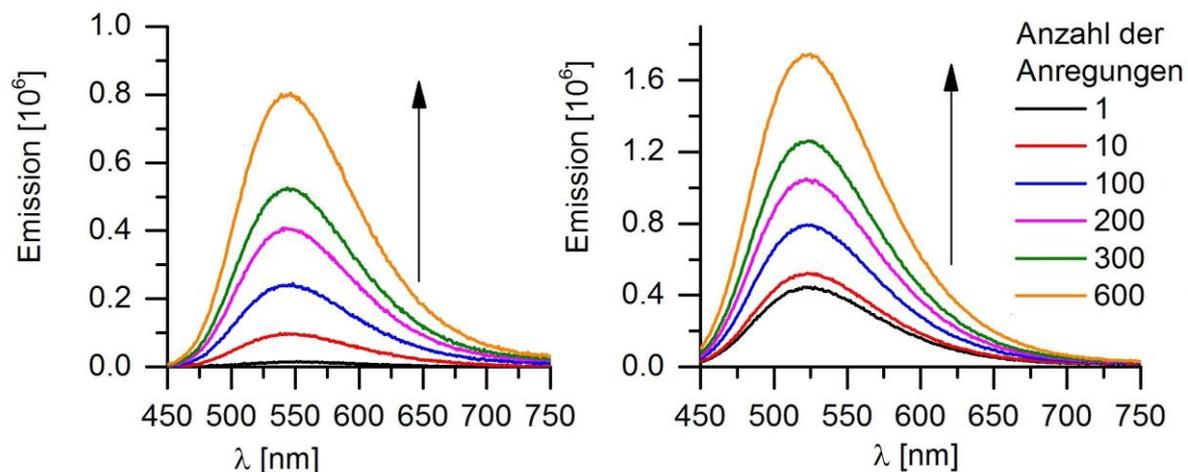


Abb. 52 Fluoreszenzanstieg in Abhängigkeit der Anzahl der Anregungen im Einzel- (links) sowie im Doppelstrang (rechts); $c = 2.5 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$.

5.3.3 Vergleich von **o-4API**, **m-4API** und **DMAPI** in DNA

Die optische Charakterisierung von **o-4API** in DNA hat gezeigt, dass die Veränderung des glykosidischen Bindungswinkels die Ausbildung der Basenpaarung im Vergleich zu **m-4API** optimieren konnte. Die Basenpaarung **o-4API:DAPym** stabilisiert den DNA-Duplex leicht, was sich in einer leichten Erhöhung der Schmelztemperaturen bemerkbar macht (Tabelle 2). Obwohl diese das optische Verhalten der Basenfehlpaarung nur bedingt widerspiegeln, kann im Allgemeinen gesagt werden, dass die Selektivität gegenüber G und T erhöht wurde, während sie für A und C weiterhin im selben Größenbereich liegt.

Im Vergleich zu den unmethylierten Chromophoren sind Schmelztemperaturen und optisches Verhalten von **DMAPI** im Einklang und zeigen eine Destabilisierung des DNA-Duplexes. Ein eindeutiges Ergebnis nach der Belichtung bleibt in diesem Fall aus, da sich die Temperaturänderung im Rahmen des Messfehlers aufhält. Durch Reproduktion der Experimente kann gesagt werden, dass dieses spezielle Verhalten nur für **DMAPI** beobachtet wird, jedoch nicht für **o-4API** und **m-4API**.

Tabelle 2: Schmelzpunkte der modifizierten Oligonukleotide in Abhängigkeit der Gegenbase.

Gegenbase	T_m[°C]		
	DMAPI	o-4API	m-4API^[44]
DAPym	52.0	54.4	53.6
A	53.8	54.2	56.0
T	53.9	53.0	53.0
G	53.1	52.3	53.5
C	49.1	51.4	51.2
dS	48.6	49.3	50.0

6 Strukturbestimmung im Doppelstrang

Um die Basenpaarung der beiden neuen artifiziiellen Systeme **o-4API:DAPym** und **DMAPI:DAPym** genauer zu untersuchen, wurden von *Lars Dehmel* im Arbeitskreis *Ernsting* Kernspinresonanz-Untersuchungen des jeweiligen DNA-Duplexes durchgeführt.

6.1 Struktur des o-4API:DAPym-Systems

Wie bereits in Kap. 1.4.2 gezeigt, ist die Ausrichtung der beiden artifiziiellen Basen **m-4API** und **DAPym** zueinander im Doppelstrang nicht optimal, sodass es zu zwei möglichen Strukturen kommt, die im Gleichgewicht liegen. Für den Doppelstrang **DNA2-5** wurde das Basenpaarungsverhalten an **o-4API:DAPym** ebenfalls untersucht. Wie aus Abb. 53a und b ersichtlich, lagert sich der Chromophor zur Gegenbase koplplanar an, wodurch eine nur geringe strukturelle Störung entsteht.

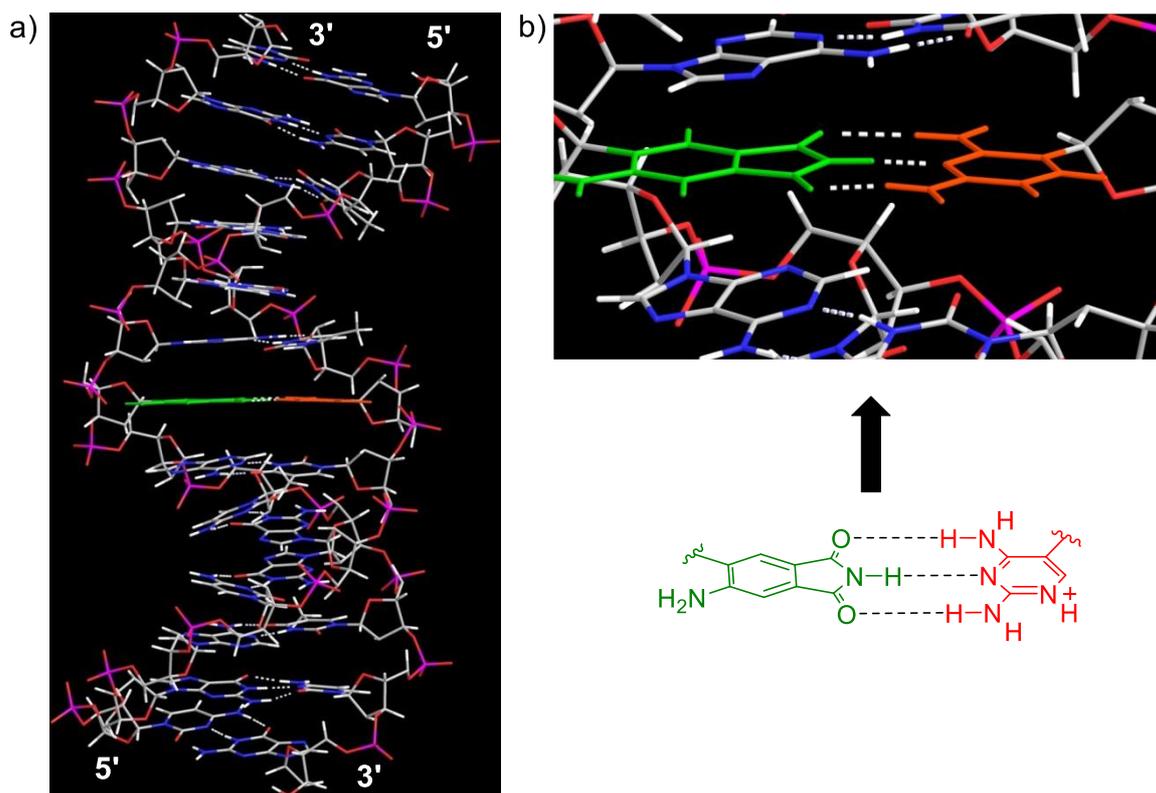


Abb. 53: NMR-Struktur des Doppelstrangs **DNA2-5** mit verschiedenen Ansichten a und b.

Die Konformation der Zuckereinheit von **DAPym** entspricht der B-DNA konformen C2'-endo-Konformation. Für **o-4API** ist dies nicht ganz zutreffend, allerdings etwas ausgeprägter als bei **m-4API**, für das bei Ausbildung der Basenpaarung eine C2'-exo-Konformation erhalten wird. Die Basenpaarung erfolgt ausschließlich über zwei Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 53c). Durch den kleineren Winkel (O=C-N-C=O)

des Fünfrings der Imidstruktur ist die Ausbildung aller drei Wasserstoffbrücken verhindert, sodass im Mittel nur eine Carbonyleinheit von **o-4API** mit einer Aminogruppe von **DAPym** in Wechselwirkung treten kann. Die Struktur wechselt daher zwischen zwei möglichen Strukturmotiven hin und her, wobei die N-H-N-Bindung erhalten bleibt. Dieses Verhalten beschreibt vermutlich die optischen Eigenschaften des **4APIs** in Betracht auf die Basenpaarung mit den natürlichen Bausteinen. Durch diese Flexibilität könnte sich der Chromophor der Gegenbase etwas besser anpassen, wodurch es leichter zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken kommt. Die erhaltenen Strukturen zeigen, dass die erwartete Geometrieoptimierung durch Veränderung des glykosidischen Bindungswinkels des Nucleosids durchaus erfolgreich durchgeführt wurde.

6.2 Struktur des DMAPI:DAPym-Systems

Nach der Untersuchung des **DMAPI:DAPym**-Systems im Doppelstrang **DNA1-5** wurde eine völlig andere Struktur erhalten als bei den bisher besprochenen Phthalimidnucleosiden **2** und **3**. Die beiden Methylgruppen des Aminosubstituenten liegen nicht in der planaren Ebene des Chromophors, da die Aminogruppe selbst verdreht ist und offenbar nicht in Konjugation mit dem aromatischen System steht (Abb. 54a).

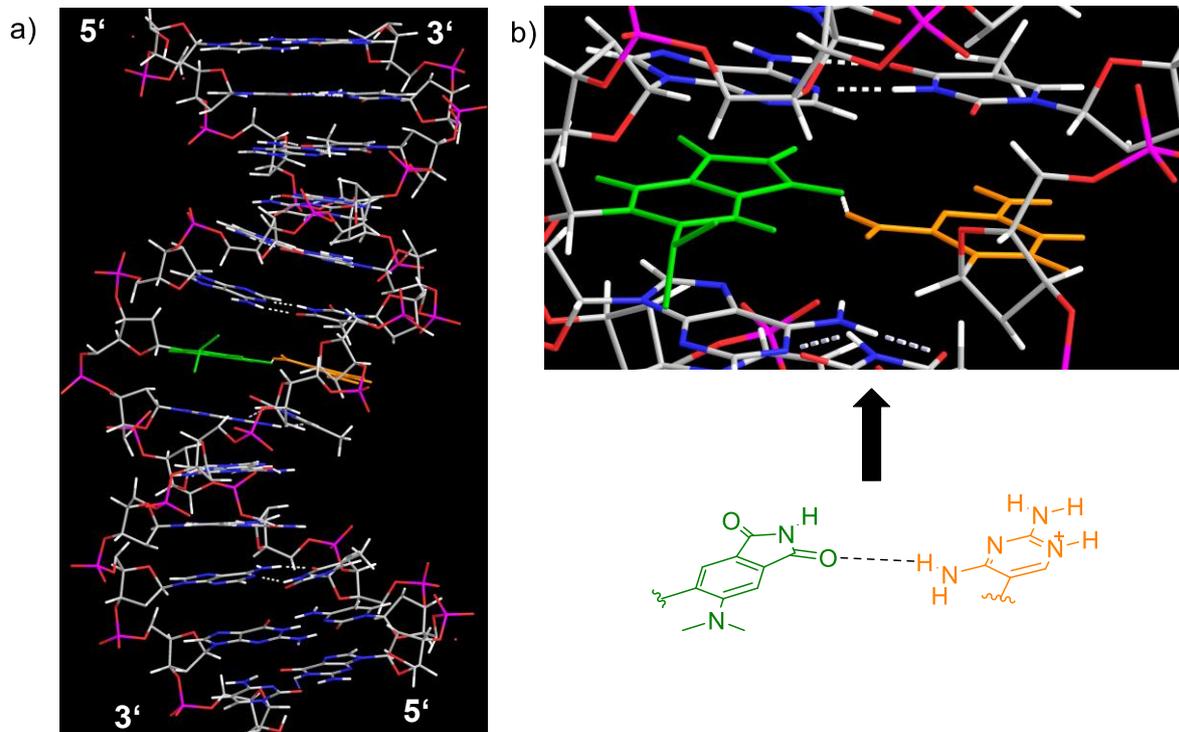


Abb. 54: NMR-Struktur des Doppelstrangs **DNA1-5** mit verschiedenen Ansichten a und b.

Durch diesen Substituenten wird das Nukleosid gezwungen, die erwartete *syn*-Konformation einzunehmen. Dadurch wird die Ausrichtung der Base so verändert, dass zwischen **DMAPI** und **DAPym** keine Wechselwirkung mehr stattfinden kann (Abb. 54b und c). Diese Untersuchungen erklären womöglich die geringen Quantenausbeuten des Chromophors im Einzel- sowie im Doppelstrang. Das komplette optische Verhalten lässt sich allerdings noch nicht abschließend deuten. In Kombination mit der TICT-Theorie (vgl. Kap. 5.2) scheint eine konformelle Anpassung des Chromophors an den Basenstapel wahrscheinlich. Als artifizielles Basensystem ist das **DMAPI:DAPym**-Paar allerdings nicht geeignet, da die besonderen Eigenschaften erst durch Einbringung des Farbstoffs in die DNA hervorgerufen werden und für das freie Nukleosid nicht beobachtet wurden.

7 Enzymatischer Einbau des 4API:DAPym-Basenpaars in DNA

Das neu entwickelte Basenpaar und das zuvor von *Wagenknecht et al.* beschriebene **m-4API:DAPym**-System (vgl. Kap 1.4.2) weisen eine Größenkomplementarität und ein orthogonales Wasserstoffbrückenmuster zu den natürlichen Basen auf. Eine weitere Anforderung an ein neues Basenpaar ist die Erkennung und der Einbau der artifiziellen Nukleosidtriphosphate durch Polymerasen.

7.1 Aufbau der Primerverlängerungsexperimente

Nach der Synthese der artifiziellen Triphosphate (vgl. Kap. 3.1) wurden sogenannte Primerverlängerungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde ein kurzer DNA-Strang (23 NT, Primer: **P1** und **P2**) an ein längeres Oligonukleotid (Templat: **T1** und **T2**) hybridisiert und anschließend mit den neuen und mit den natürlichen Nukleotiden durch Polymerasen verlängert. Je nach Einbauposition der künstlichen Bausteine wird zwischen „Standing-Start“-(**T1**)- und „Running-Start“-(**T2**)-Experimenten unterschieden. Im ersten Fall wird der artifizielle Baustein als erste Base direkt an den Primer an Position 24 gesetzt (Abb. 55). Die Polymerase elongiert anschließend den DNA-Strang mit natürlichen Triphosphaten zum Volllängenprodukt (VL, 35 NT). Beim „Running-Start“-Experiment erfolgt der Einbau an Position 30.

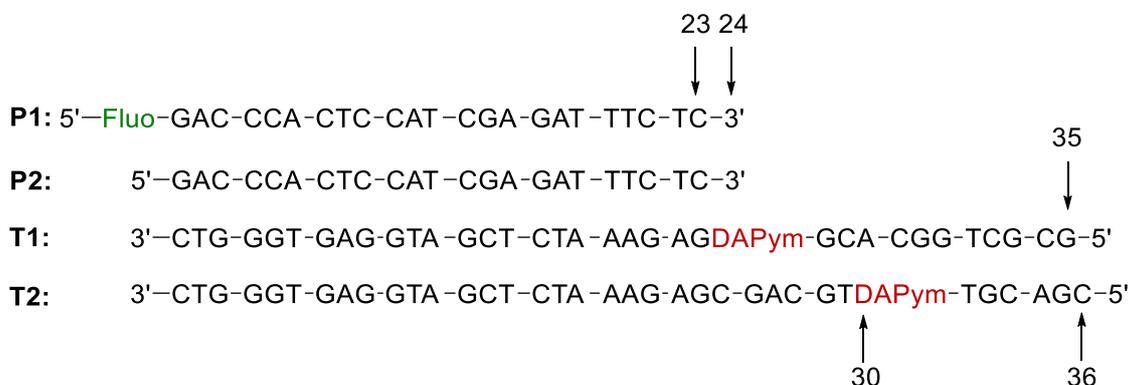


Abb. 55: DNA-Sequenzen für die Primerverlängerungsexperimente mit den Primern **P1** und **P2** und den Templaten **T1** („Standing-Start“) und **T2** („Running-Start“).

Die Analyse der synthetisierten Oligonukleotide erfolgte durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Dabei wurde die negativ geladene DNA auf ein Gel aufgetragen, an welches ein elektrisches Potential angelegt war. Die einzelnen Stränge liefen im elektrischen Feld von der negativ geladenen Anode zur positiv geladenen Kathode. Die Laufstrecke der DNA auf dem Gel ist proportional zur Stranglänge, wobei die Mobilität mit kleineren Strängen steigt. **P1** war am 5'-Terminus mit einer Fluoresceineinheit modifiziert, welche der Visualisierung der DNA diente

(vgl. Kap. V4.3.1). Nach Ablauf der Primerverlängerung und Analyse mittels PAGE wurden die Gele in einer Dunkelkammer mit einer LED (λ_{exc} : 470 ± 20 nm) belichtet und die Emission des Fluoresceins mit einem entsprechenden Emissionsfilter (λ_{em} = 535 ± 20 nm) detektiert (Abb. 56, links). Das **4API** wurde in diesem Wellengängenbereich nicht angeregt. Der selektive Einbau und die Intaktheit des künstlichen Bausteins wurden daher über die Eigenfluoreszenz nachgewiesen. Dazu wurde das Gel im UV-Bereich bei λ_{exc} = 312 nm belichtet und die Emission detektiert (Abb. 56, rechts). Da die Anregung des Fluoresceins ebenfalls in diesem Wellenbereich stattfand und die Fluoreszenzmaxima im selben Detektionsbereich des Emissionsfilters lagen, wurden die Primerverlängerungsexperimente in diesem Fall mit **P2** durchgeführt.

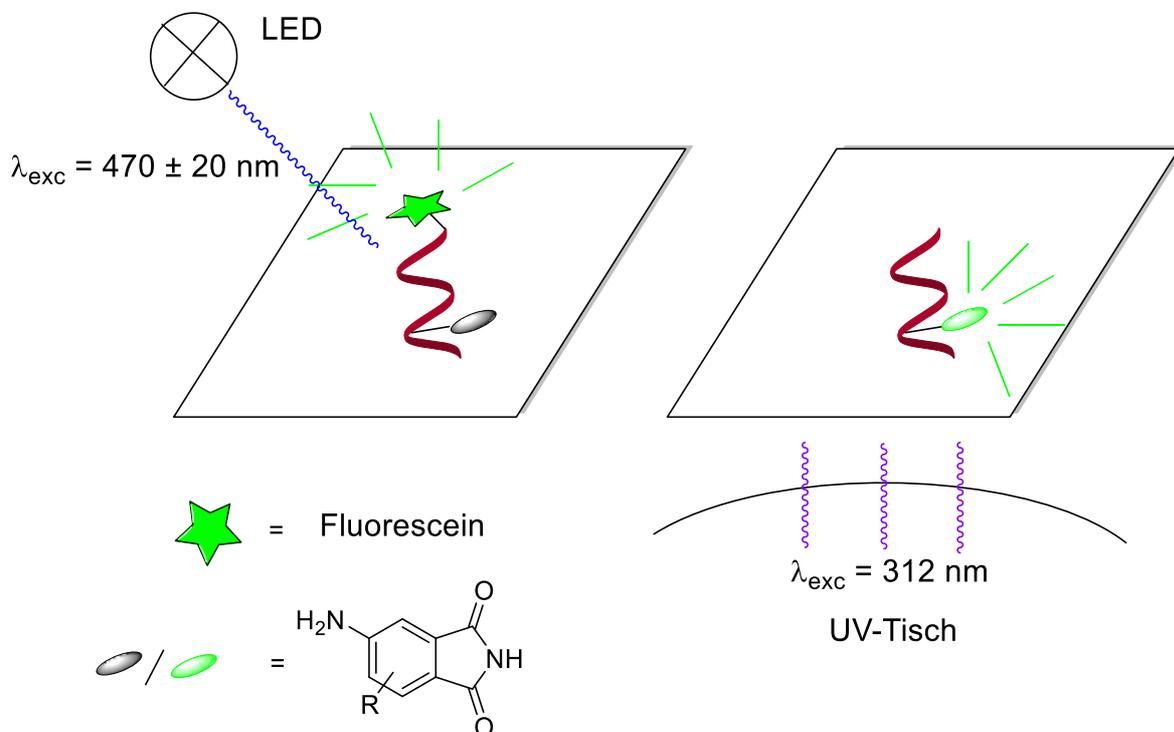


Abb. 56: Schematische Darstellung der DNA Visualisierung der PAGE Gele. Die Anregung erfolgt mittels LED (links) oder einem UV-Tisch (rechts). Die Detektion erfolgte mittels Breitbandfilter (535 ± 20 nm).

Im Folgenden sind die Analysen der Fluorescein-Emission in schwarz/weiß und die des **4APIs** in grün/schwarz dargestellt.

7.2 Polymerasenscreening für das System o-4API:DAPym

Im Laufe der Evolution hat sich die Replikationsmaschinerie so optimiert, dass die Vervielfältigung der Information effizient und weitgehend fehlerfrei abläuft. Die Polymerasen wurden dabei auf die natürlichen Bausteine zugeschnitten. Aufgrund der Vielfalt dieser Enzyme unterscheiden sie sich jedoch meist in ihrer Effizienz und Toleranz gegenüber Fehlern und künstlichen Bausteinen. Um die geeignete Polymerase für das artifizielle Basensystem **o-4API:DAPym** zu finden, wurden diese auf ihre Einbaueffizienzen überprüft. Die Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, 30 min bei einer Temperatur von 70 °C durchgeführt. Da der Elongationsschritt einer gewöhnlichen PCR bei einer Temperatur zwischen 68 °C bis 72 °C durchgeführt wird, wurde der Mittelwert von 70 °C gewählt. Durch Zugabe des gleichen Volumens an EDTA-haltigem Ladepuffer wurde der Co-Faktor Mg²⁺ komplexiert und die Reaktion somit gestoppt.

In Abb. 57 sind die PAGE-Analysen der „Standing-Start“-Experimente (**P1**, **T1**) mit Baustein **45** und den einzelnen Polymerasen dargestellt. Die Detektion erfolgte über die Emission des Fluoresceins. In der ersten und letzten Gelspur ist jeweils der unbehandelte **P1** als Referenz zu sehen.



Abb. 57: PAGE Analyse des Polymerase-Screenings: **P1**: 750 nM, **T1**: 900 nM; **45**: 200 µM; Polymerasen (1.0 µL): **0**: keine Polymerase; **HE**: HemoKlen Taq; **V**: Vent (exo-); **DV**: Deep Vent (exo-) **Ph** HF/GC: Phusion; **TH I-III**: Thermanator I-III; **KOD**: KOD XL, **PW**: PWO; **KF**: Klenow-Fragment; **9°N**: 9°N.

Aufgrund der niedrigeren Mobilität von längeren Oligonukleotiden in der Gelmatrix ist der Einbau von **45** durch eine höherliegende Bande deutlich zu erkennen (24 NT). Insgesamt wurde **45** in Abwesenheit der dNTPs von allen Polymerasen, die keine Exonukleaseaktivität aufweisen, erkannt und eingebaut. Diese Exonukleaseaktivität dient dem Enzym die Fehlerrate zu verringern, indem Fehlpaarungen erkannt und abgebaut werden (*proofreading*). Die KOD XL und 9°N Polymerasen haben den Primer zwar verlängert, bauten diesen allerdings auch ab. Sie besitzen zu geringen Teilen

diese *proofreading*-Funktion. Die hohe Toleranz von Terminator I und II gegenüber künstlichen Bausteinen wurde durch eine zweite Bande (25 NT) ersichtlich. Hier zeigt sich, dass sogar Fehlpaarungen toleriert werden und die Polymerase nicht gehindert wurde, den Primer zu verlängern. Werden Oligonukleotidstränge ohne Anleitung eines Templates verlängert (was auch in nicht-hybridisierten Einzelsträngen geschieht), so spricht man von einer 3'-Transferase-Aktivität.

7.3 Optimierung der Primer Extension für o-4API

Die „Standing-Start“-Experimente mit **45** als einzigen Baustein haben gezeigt, dass die Erkennung und der Einbau durch manche Polymerasen toleriert wurde. Um die Intaktheit des **4APIs** zu überprüfen, wurden sie mit **P2**, wie oben beschrieben, wiederholt (Abb. 58). In diesem Experiment diente der Farbstoff selbst als fluorogener Marker. In Spur **0** wurde als Negativprobe die Polymerase vorenthalten. Im unteren Abschnitt des Gels ist eine unscharfe Bande zu erkennen, die auf das Mononukleotid **45** hinweist. Die scharfe Bande weiter oben, die bei allen ausgewählten Polymerasen sichtbar ist, zeigt einen DNA Strang mit 24 NT und intaktem **4API**.

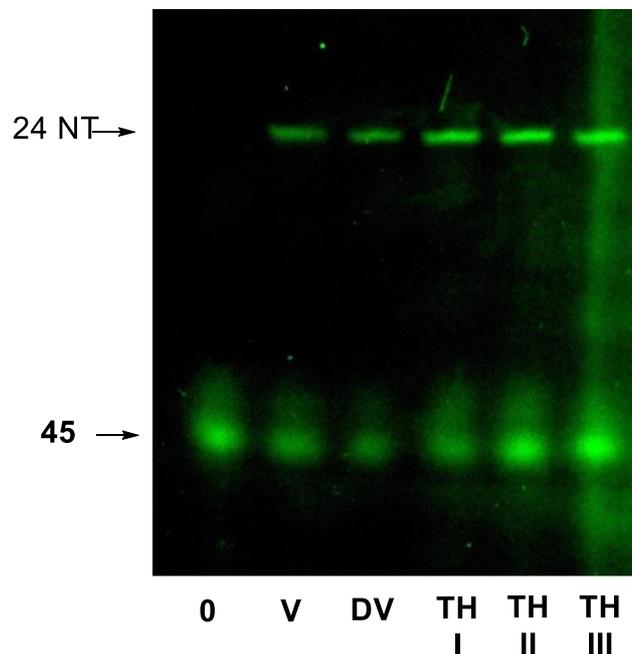


Abb. 58: PAGE-Analyse des Polymerase-Screenings: **P2**: 750 nM, **T1**: 900 nM; **45**: 200 μ M; Polymerasen (1.0 μ L): **0**: keine Polymerase; **V**: Vent (exo-); **DV**: Deep Vent (exo-); **TH I-III**: Terminator I-III.

Mit Erkenntnis, dass der neue Baustein eingebaut wird und weiterhin seine fluoreszente Funktion behält, wurde anschließend das Verhalten der Polymerasen in Anwesenheit der natürlichen Triphosphate (dNTPs) mit **P1** und **T1** überprüft. Als Referenz ist in Abb. 59 zusätzlich eine Spur für Vent (exo-) dargestellt, in der keine

dNTPs enthalten waren. Die PAGE-Analyse zeigt, dass das Volllängenprodukt mit 35 NT bereits nach 30 min für alle Terminator-Polymerasen erhalten wurde. Das Auftreten einer weiteren Bande bei 36 NT ist auf die bereits beschriebene 3'-Transferaseaktivität zurückzuführen. Für Vent (exo-) und Deep Vent (exo-) entstand ebenfalls eine Bande, die einer Stranglänge von 35 NT entspricht. Allerdings sind auch große Mengen an Primer und das n+1 Produkt (24 NT) zu erkennen, was einen Hinweis darauf gibt, dass die beiden Polymerasen nach Einbau des neuen Basenpaars gehemmt sind, den Strang zu elongieren (Bypass-Problem).

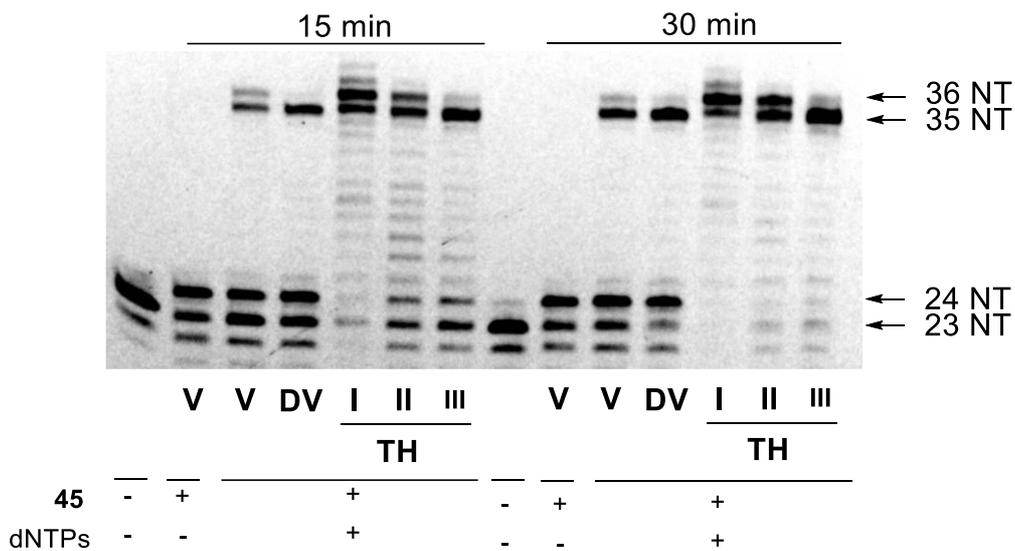


Abb. 59: PAGE-Analyse des Polymerase-Screenings in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **45** und dNTPs; **P1**: 750 nM, **T1**: 900 nM; **45** und dNTPs: 200 µM; Polymerasen (1.0 µL): **V**: Vent (exo-); **DV**: Deep Vent (exo-); **TH I-III**: Terminator I-III.

Dieser Effekt ist noch deutlicher in Abb. 60 zu erkennen. Hier wurden die Experimente mit **P2** und **T1** für Deep Vent (exo-) und Terminator III wiederholt. Als Referenzen enthielten die Proben entweder nur **45** oder nur die dNTPs. Für Deep Vent (exo-) konnte bei Zugabe aller Triphosphate nur eine Bande nachgewiesen werden, die dieselbe Mobilität aufwies, wie der um eine Base verlängerte Primer (24 NT). Das Volllängenprodukt dagegen war nicht detektierbar. Die Polymerase hat daher zu gewissen Anteilen die dNTPs gegenüber **DAPym** eingebaut, was die Bande des Volllängenprodukts in Abb. 59 signalisiert. Terminator III ignoriert den artifiziellen Baustein bei Anwesenheit der dNTPs fast vollständig, da sich im Volllängenprodukt aus Abb. 59 keine **4API**-Fluoreszenz nachweisen lässt und eine leichte Bande bei 24 NT zu sehen ist. Interessanterweise hat die Fehlpaarung mit den dNTPs die Elongation nicht verhindert, so wie es bei einem Einbau von **45** auftritt. Dies weist

darauf hin, dass die Natur der dNTPs selbst einen weitaus größeren Faktor für die weitere Verlängerung einnimmt als die Paarung.

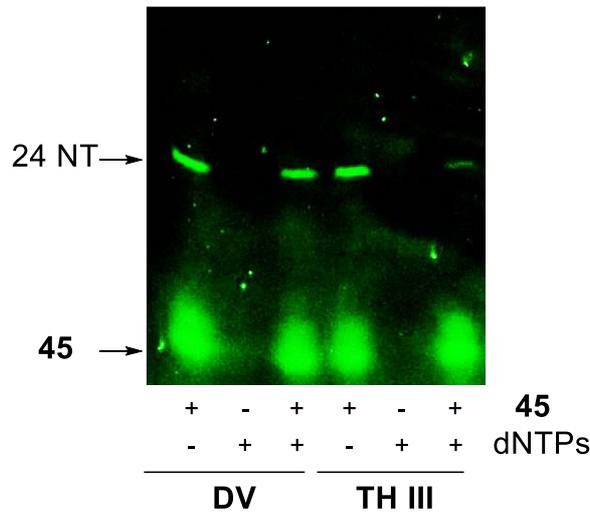


Abb. 60: PAGE-Analyse des Polymerase-Screenings in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **45** und dNTPs; **P2:** 750 nM, **T1:** 900 nM; **45** und dNTPs: 200 µM; Polymerasen (1.0 µL): **DV:** Deep Vent (exo-); **TH III:** Therminator III.

Werden die gleichen Experimente mit **T2** („Running-Start“), Deep Vent (exo-) und Therminator III wiederholt, wird das Ergebnis noch deutlicher. Das Volllängenprodukt mit 36 NT wurde auch in Abwesenheit des künstlichen Bausteins fast vollständig erhalten (Abb. 61, links). Bei Zugabe von **45**, wurde der Bypass kinetisch gehemmt, sodass die Bande bei einer Länge von 30 NT deutlich sichtbar wurde. Dies wird ebenfalls mit **P2** als Primer erkenntlich (Abb. 61, rechts).

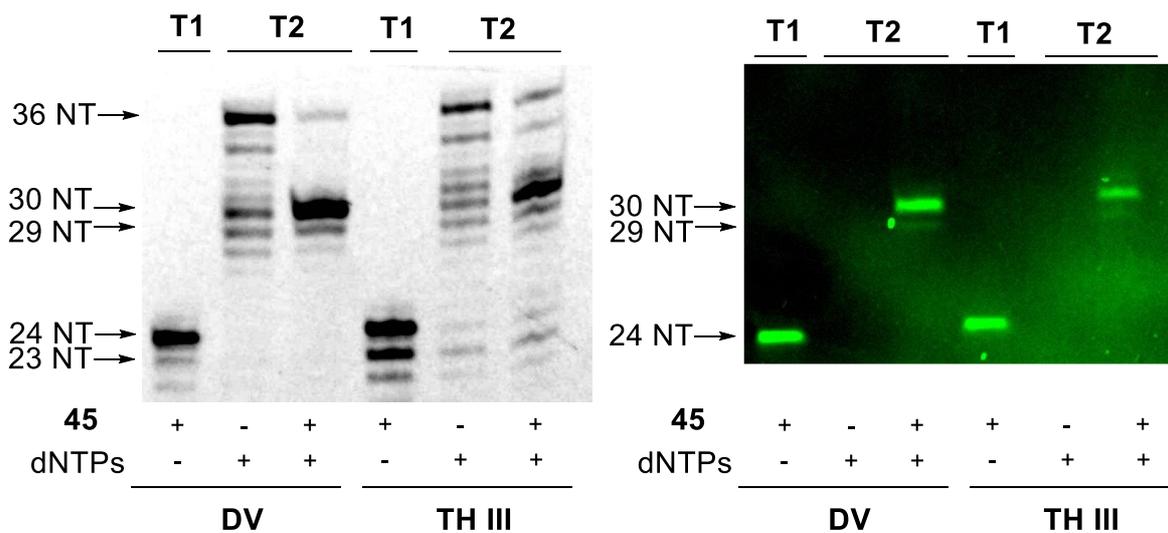


Abb. 61: PAGE-Analyse der Primerverlängerungen in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **45** und dNTPs; **P1** (links) und **P2** (rechts): 750 nM, **T1** und **T2:** 900 nM; **45** und dNTPs: 200 µM; Polymerasen (1.0 µL): **DV:** Deep Vent (exo-); **TH III:** Therminator III.

Auf beiden Gelen ist außerdem eine leichte Bande zu erkennen, die einer Länge von 29 NT entspricht. Diese weist darauf hin, dass zu einem kleinen Teil Fehleinbauten von **45** stattgefunden haben. Vermutlich wurde **45** als Gegenbase zu T erkannt, da dieses in **T2** an Position 29 sitzt und ebenfalls mit **45** Basenpaare ausbilden kann (vgl. Kap. 5.3.1).

Alle vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass der Einbau von **45** prinzipiell erfolgt, der Bypass jedoch kinetisch gehemmt ist. Die „Standing-Start“-Experimente von Terminator I und II zeigten jedoch, dass **45** in Abwesenheit der dNTPs zwar fehleingebaut wird, der Bypass aber dennoch stattfindet (Abb. 57, Bande bei 25 NT). Die Experimente wurden mit **P2** für beide Enzyme wiederholt (Abb. 62). Interessant ist die Farbstoffbande in der ersten und vierten Spur, die einer Länge von 37 NT entspricht. Hier wurde vermutlich das Templat **T1** selbst durch die 3'-Transferaseaktivität der Polymerase verlängert. In den Experimenten mit Fluoresceinmarkern kann dieses Artefakt nicht beobachtet werden, da die Anregungswellenlänge nicht der des **4APIs** entspricht und das Templat sonst nicht anders markiert ist.

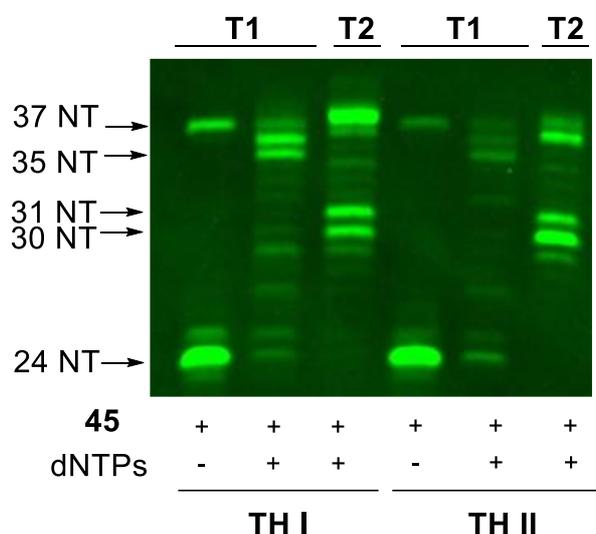


Abb. 62: PAGE-Analyse der Primerverlängerungen in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **45** und dNTPs; **P2:** 750 nM, **T1** und **T2:** 900 nM; **45** und dNTPs: 200 µM; Polymerasen (1.0 µL): **TH I** und **II:** Terminator I und II.

Wird die Effizienz der beiden Polymerasen verglichen, so kann an der Doppelbande bei 35/36 NT erkannt werden, dass Terminator I den Primer im „Standing-Start“-Experiment vollständig verlängert hat. Im „Running-Start“-Experiment ist das Bypass-Problem wieder erkenntlich (Bande bei 30 NT). Dieses Phänomen ist bei Terminator II noch stärker ausgeprägt. Bei beiden Polymerasen ist zusätzlich eine Bande zu erkennen, die einem Oligonukleotid von 31 NT entspricht. Dies weist ebenfalls auf einen Fehleinbau von **45** gegenüber T hin.

7.4 Polymerase-Screening und Optimierung der Primer Extension für das Basensystem m-4API:DAPym

Das Triphosphat **46** des *meta*-verknüpften **4API** Nucleosids **4** wurde ebenfalls enzymatisch in DNA inkorporiert. Dazu wurde auch für dieses System zuerst ein Polymerase-Screening durchgeführt (Abb. 63). Die Ergebnisse sind denen des **o-4APIs** sehr ähnlich (vgl. Abb. 57, Kap. 7.2). Im Prinzip wurde **46** von allen Polymerasen, die keine Exonukleaseaktivität aufweisen, erkannt und eingebaut. Terminator I, II und im geringen Maße auch III neigen ebenfalls dazu, diesen Baustein ein weiteres Mal fehleinzubauen, was durch die Bande bei 25 NT ersichtlich wird.

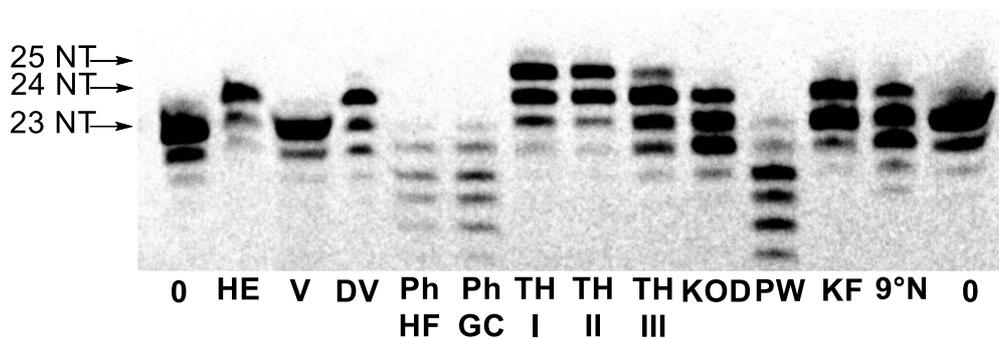


Abb. 63: PAGE-Analyse des Polymerase-Screenings: **P1:** 750 nM, **T1:** 900 nM; **46:** 200 μ M; Polymerasen (1.0 μ L): **HE:** Hemo Klen Taq; **V:** Vent (exo-); **DV:** Deep Vent (exo-); **Ph HF/GC:** Phusion; **TH I-III:** Terminator I-III; **KOD:** KOD XL, **PW:** PWO; **KF:** Klenow-Fragment; **9°N:** 9°N.

Die Experimente wurden mit den dNTPs sowohl im „Standing-Start“- als auch im „Running-Start“-Experiment mit Terminator I und II wiederholt. Der Umsatz des Primers zu den Volllängenprodukten (35-37 NT) wurde auch in diesem Fall erreicht (Abb. 64). Während die Ergebnisse für Terminator II ziemlich genau denen von **45** entsprechen (vgl. Kap. 7.3), ist den Intensitäten der jeweiligen Spuren zu entnehmen, dass das Volllängenprodukt für Terminator I in großen Mengen erhalten wurde. Für Terminator II ist außerdem der verlangsamte Bypass bei 27 NT zu erkennen. In der Sequenz weist **T1** an dieser Stelle ein A auf. Aus den optischen Eigenschaften von **3** im DNA-Duplex ist bekannt, dass **m-4API** ebenfalls mit A Basenpaare ausbilden kann (vgl. Kap. 1.4.2).

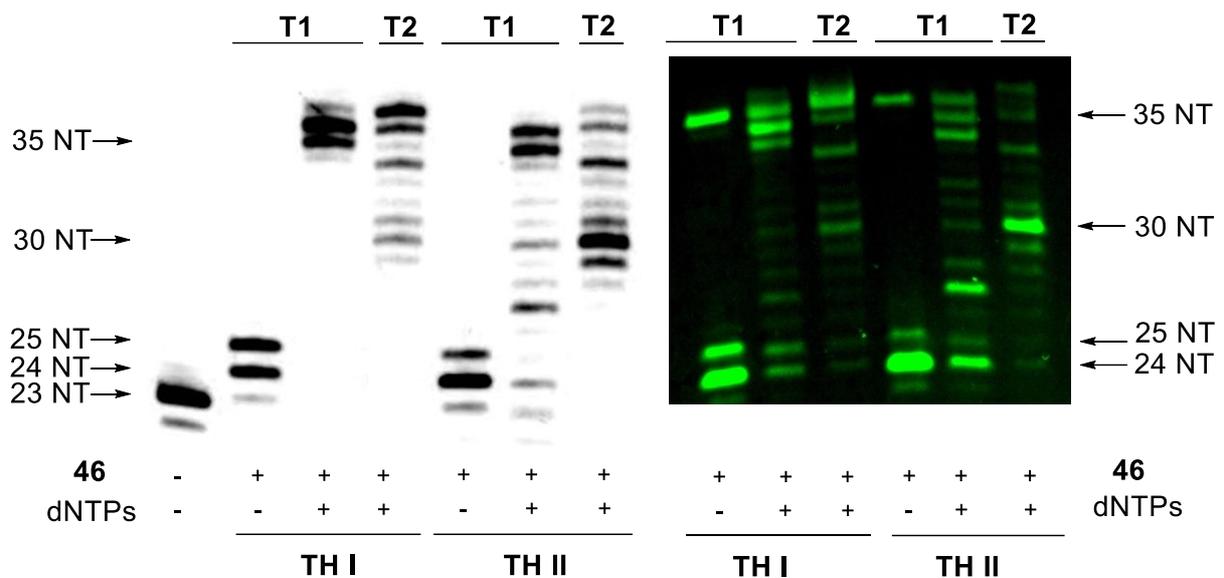


Abb. 64: PAGE-Analyse der Primerverlängerungen in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **46** und dNTPs; **P1** (links) und **P2** (rechts): 750 nM, **T1** und **T2**: 900 nM; **46** und **dNTPs**: 200 µM; Polymerasen (1.0 µL): **TH I** und **II**: Terminator I und II.

7.5 Vergleich der beiden Bausteine

Die Primerverlängerungsexperimente haben gezeigt, dass die Triphosphate **45** und **46** erkannt und, wenn auch teilweise unspezifisch, enzymatisch in DNA eingebaut werden können. Die selektive Erkennung dieser artifiziellen Bausteine geht jedoch aufgrund der benötigten Reaktivität der Polymerasen verloren. Dies wird vor allem im Fall der Terminator I deutlich, die sowohl **45** als auch **46** als passende Bausteine zu **DAPym** erkennt, obwohl die räumliche Ausrichtung der Wasserstoffbrücken-Bindungsseiten recht verschieden sind. Dies zeigt, dass der Koeffizient der Größenkomplementarität und des Stapelverhaltens der einzelnen Basen sehr stark ins Gewicht fallen. Aufgrund der Ungenauigkeit der Terminator I in Bezug auf die Einbaueffizienz lässt sich nicht sagen, welches System von beiden idealer ist. Viel klarer wird das Ergebnis, wenn man eine Polymerase in Betracht zieht, die exakter arbeitet, auch wenn die Elongation nicht vollständig verläuft. In Abb. 65 sind die Gele der kompletten Versuche mit Hemo KlenTaq als Polymerase dargestellt. Hier ist anhand der Intensitätsunterschiede der beiden Banden bei 23 NT und 24 NT deutlich zu erkennen, dass der initiale Einbau des künstlichen Bausteins im Fall von **46** effizienter stattfand als bei **45**. In Anwesenheit der dNTPs ist die Selektivität soweit gegeben, dass die **4API** Fluoreszenz im 24 NT- und im Vollängenprodukt („Running-Start“ und „Standing-Start“) nachgewiesen werden kann. Die Elongation nach dem Einbau von **46** ist zwar

immernoch gehemmt, findet aber verglichen dazu in großen Anteilen statt. Der Einbau von **45** wird dennoch ignoriert, wenn die Polymerase die Möglichkeit besitzt, die Inkorporation von dNTPs vorzuziehen. Im anderen Fall wird die Elongation unterbrochen. Auch bei Einsatz der Hemo KlenTaq-Polymerase wird in Abwesenheit der dNTPs eine Bande sichtbar, die durch 3'-Transferase entsteht.

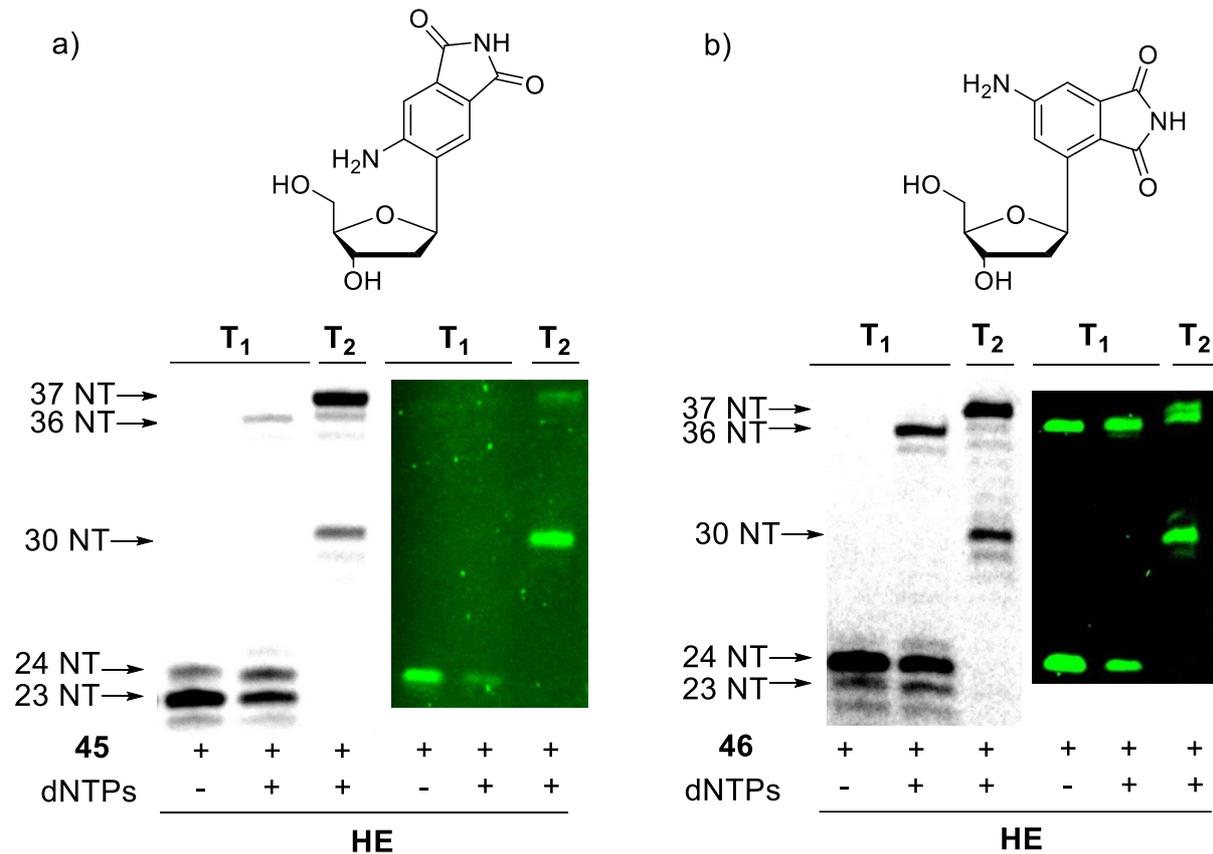


Abb. 65: PAGE-Analyse der Primerverlängerungen in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **45** (a), **46** (b) und dNTPs; jeweils **P1** (links) und **P2** (rechts): 750 nM, **T1** und **T2**: 900 nM; **45**, **46** und dNTPs: 200 µM; **HE**: Hemo KlenTaq (1.0 µL).

Der letzte Vergleich hat ergeben, dass die Geometrieoptimierung, vom Standpunkt des enzymatischen Einbaus aus gesehen, das System des artifiziiellen Basenpaars **m-4API:DAPym** nicht verbessern konnte. Wie in Kap. 1.4.2 beschrieben, ist die räumliche Ausrichtung der künstlichen Basen zueinander im bereits untersuchten System im DNA-Doppelstrang temperaturabhängig. Es ist außerdem bekannt, dass selbst künstliche Basenpaare, die kein Wasserstoffbrückenmuster aufweisen und im DNA-Duplex gestapelt und nicht planar vorliegen, während des Elongationsprozesses eine Watson-Crick-ähnliche Geometrie eingehen.^[96-97] Wie groß der Faktor der temperaturabhängigen Dynamik des **4API:DAPym**-Paars dabei ist und ob oder wie dieses Phänomen im neuen System auftritt, ist unklar.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist, wie auch schon aus anderen artifiziellen Basensystemen bekannt (vgl. Kap. 1.2), die Anwesenheit von Heteroatomen in der kleinen Furche zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren der Polymerase.^[15, 98] Die Polymerase hat das künstliche Triphosphat toleriert und an den Primer gebaut, den Bypass jedoch verweigert, sobald die spezifische Bindungsstelle fehlte. Hierdurch wird klar, warum die Elongation nach einer Fehlpaarung der dNTPs mit **DAPym** zu keinem Abbruch führte, denn alle natürlichen Bausteine weisen diese spezifische Bindungsstelle auf. Werden die räumlichen Ausrichtungen der beiden Geometrien der Phthalimid-Bausteine miteinander verglichen, dann kommt der Sauerstoff der einen Carbonylgruppe in der **m-4API** Konfiguration der Wasserstoffakzeptorposition näher als die der **o-4API** (Abb. 66).

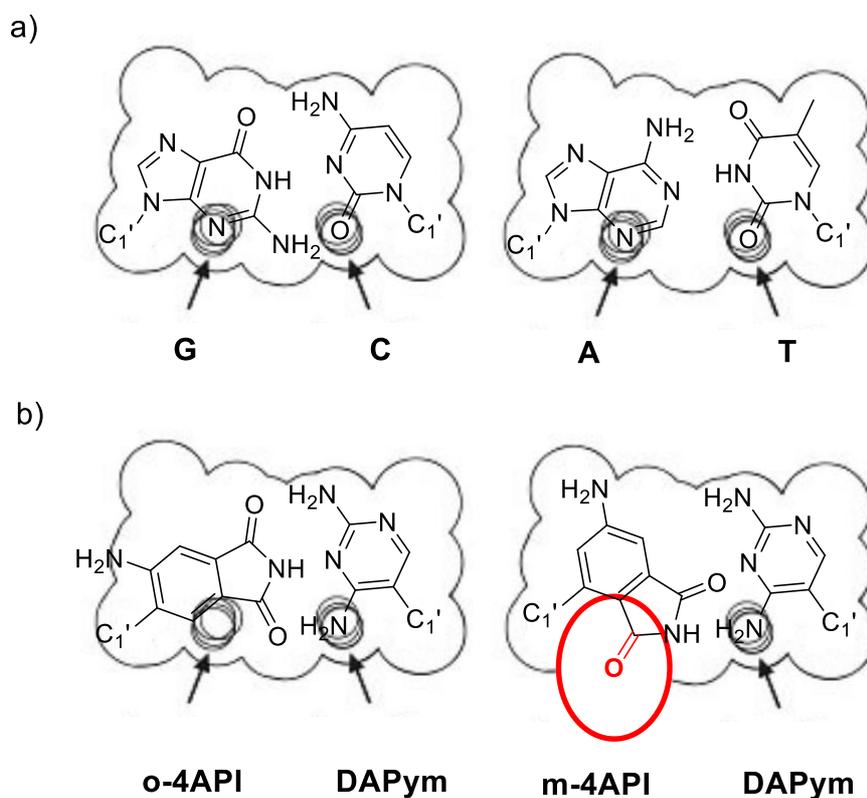


Abb. 66: Veranschaulichung der Basenpaarung im Doppelstrang: a) der natürlichen Basen **G:C** und **A:T**; b) von **o-API:DAPym** und **m-4API:DAPym**; die Pfeile markieren die Position der Heteroatome als Wasserstoffbrückenakzeptoren; bei **m-4API** ist die Position rot hervorgehoben.^[99]

7.6 Enzymatischer Einbau der α -Thiotriphosphate von o-4API in Oligonukleotide und enzymatischer Verdau

Die Primerverlängerungen mit Hemo KlenTaq als Polymerase konnten zeigen, dass **46** effizienter eingebaut wurde als **45**. Aufgrund der beiden unterschiedlichen Anknüpfungen der beiden Basen liegt die Vermutung nahe, dass die Einbaueffizienz von der Ausrichtung der Basen abhängt. Die Basenpaarung von **o-4API:DAPym** ist jedoch effektiver, was durch die optische Charakterisierung nachgewiesen werden konnte. Daher wurden zur weiteren Quantifizierung des enzymatischen Einbaus mittels Terminator I folgende Experimente gemacht.

Benner et al. synthetisierten zum Nachweis des enzymatischen Einbaus des **P:Z**-Basenpaars die α -Thiotriphosphate dieser beiden Nucleoside.^[100-101] In beiden Fällen akzeptierten die Polymerasen Taq und 9°N diese Phosphatanaloga. Durch anschließenden Verdau der Vollängenprodukte mit der Exonuklease III konnten die Einbaustellen der künstlichen Bausteine detektiert werden. Diese Nuklease ist in der Lage einen DNA-Strang in 3'→5'-Richtung abzubauen, indem pro Katalysezyklus ein Mononucleotid abgespalten wird. Werden Oligonucleotide synthetisiert, die in ihrer Sequenz Thiophosphatbrücken aufweisen, stoppt die Nuklease an dieser Position den Abbau. Das Prinzip zur Detektion ist in Abb. 67 erklärt.

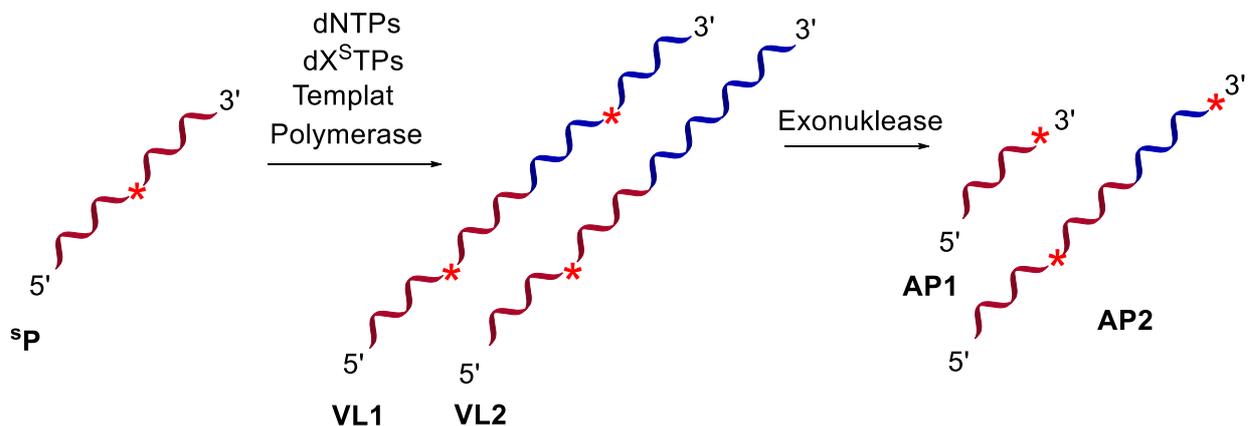


Abb. 67: Schematische Darstellung der Primerverlängerungsexperimente mit Thiophosphatgruppen (roter Stern) und anschließende Verdau durch Exonukleasen; **SP**: Primer mit einer Thiophosphatbrücke; **VL1**: Vollängenprodukt mit zwei Thiophosphatbrücken; **VL2**: Vollängenprodukt mit einer Thiophosphatbrücke; **AP1**: Abbauprodukt mit terminaler Thiophosphatgruppe; **AP2**: Abbauprodukt mit interner und terminaler Thiophosphatgruppe.

Für die Experimente sind Primer (**SP**) erforderlich, die in ihrer Sequenz eine Thiophosphatbrücke (roter Stern) aufweisen, welche dazu dient, die Exonuklease zu hindern, das komplette Oligonucleotid abzubauen. Werden die Primerverlängerungen mit den dNTPs und dem Thiotriphosphat **dX^STP** durchgeführt, dann entstehen je nach

Volllängenprodukt inklusive der unspezifischen 3'-Überhänge in beiden Fällen erhalten. Für die „Running-Start“-Experimente wurde das Volllängenprodukt ebenfalls erhalten. Allerdings ist hier ebenfalls das Bypass-Problem zu erkennen. Diese Position ist, wie bereits erwähnt, die Einbaustelle des artifiziellen Bausteins.

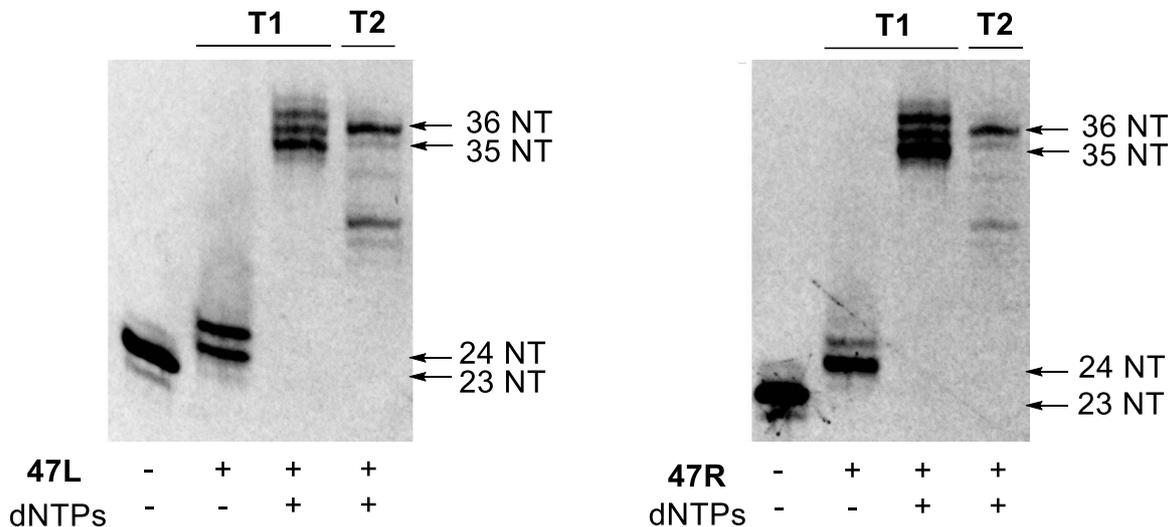


Abb. 69: PAGE-Analyse der Primerverlängerungen in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von **47L** (links), **47R** (rechts) und dNTPs; **P3**: 750 nM, **T1** und **T2**: 900 nM; **47L** und **47R** und dNTPs: 200 µM; Polymerasen: **TH I** (1.0 µL)

7.6.2 Enzymatischer Verdau durch Exonuklease III

Für den enzymatischen Verdau der thioverbrückten Oligonukleotide wurden die „Running-Start“-Experimente wiederholt. Nach der Synthese wurde die Polymerase durch eine Phenol-Extraktion entfernt und die wässrige Lösung entsalzt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand im Reaktions-Puffer aufgenommen, hybridisiert und mit der Exonuklease III versetzt. Anschließend wurde für bestimmte Zeiten bei 37 °C inkubiert und nach Ablauf der Reaktion dasselbe Volumen Ladepuffer zugegeben und die Probe bis zur Auftragung auf das PAGE-Gel eingefroren. In Abb. 70 sind die PAGE-Analysen der enzymatischen Verdauungsexperimente dargestellt. Zum Vergleich sind in den ersten beiden Spuren der unbehandelte und mit Exonuklease versetzte Primer **P3** dargestellt (Spur 0). Durch die Zugabe der Nuklease wird **P3** auf eine Länge von 16 NT abgebaut. Da die Inkubationszeit 30 min betrug, ist auch eine kürzere DNA-Bande zu sehen. Ohne Zugabe der Nuklease ist in der Referenzspur des Volllängenprodukts die Einbaustelle der artifiziellen Base bei 30 NT zu erkennen. Die Volllängenprodukte werden ebenfalls nach 5 min komplett abgebaut. Allerdings entsprechen die Abbauprodukte einer Länge von 16 NT für beide

Enzymatischer Einbau des 4API:DAPym-Basenpaars in DNA

Diastereomere. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Terminator I die dNTPs bevorzugt gegenüber **DAPym** eingebaut hat und die artifiziellen Bausteine komplett ignoriert hat.

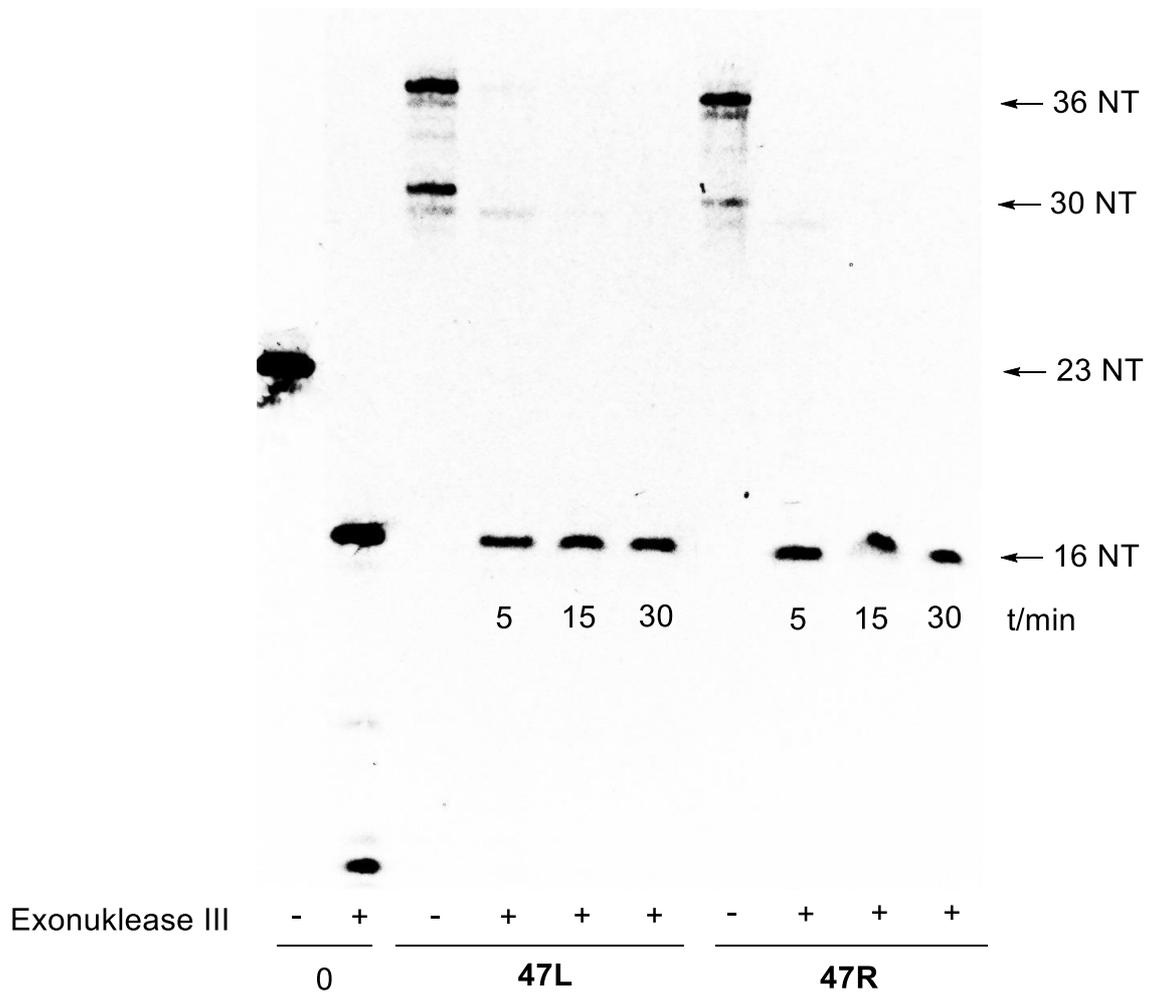


Abb. 70: Enzymatischer Verdau der Volllängenprodukte (VL) in Abhängigkeit der Inkubationszeit und Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von Exonuklease III (100 U); VL: 750 nM ; Spur 0: **P3** ohne VL; Spur **47L**: VL mit **47L**; **47R**: VL mit **47R**.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die beiden neuen Nucleoside **1** und **2** konnten über die Phosphoramidit-Methode erfolgreich in Oligonucleotide eingebaut werden. Anhand von **2** konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die *Ultramild* Methode mit der NPEOC-Schutzgruppenchemie kombinieren lässt. Das Basenpaarungsverhalten der beiden C-Nucleoside wurde dabei jeweils in Abhängigkeit der Gegenbase optisch charakterisiert, wobei neben den natürlichen DNA-Basen auch das vorgeschlagene komplementäre Nucleosid **4** untersucht wurde. Die Struktur der artifiziellen Basenpaarung wurde zusätzlich mittels Kernspinresonanzspektroskopie ermittelt. Obwohl sich die Chromophore nicht stark unterscheiden, sind ihre Eigenschaften in DNA jedoch sehr verschieden. Wird das optische Verhalten von **2** in DNA mit den jeweiligen Gegenbasen verglichen, so fällt auf, dass es sich im Falle von **DAPym**, A und C kaum unterscheidet, was durch die strukturellen Daten gestützt wird. Aufgrund der Imidstruktur werden im Mittel jeweils zwei Wasserstoffbrücken mit der entsprechenden Gegenbase **DAPym** ausgebildet. Durch dieses dynamische Verhalten lässt sich die partielle Komplementarität zu den natürlichen Bausteinen erklären. Im Gegensatz dazu lässt sich das Verhalten von **1** im Oligonucleotid nicht so leicht deuten. Die ersten Ergebnisse haben gezeigt, dass **1** nicht als isosterer Ersatz geeignet ist. Die Struktur zeigt die erwartete *syn*-Konformation des Zuckers auf, wobei hierbei das Verhalten nach der Belichtung interessant ist. Der Fluoreszenzanstieg wurde hier durch eine mögliche Konformationsausrichtung der Base erklärt. Da lichtinduzierte, chemische Reaktionen ausgeschlossen werden können, lässt sich das Verhalten nur durch eine Veränderung der Solvation des Farbstoffs interpretieren. Hier müssen weitere Untersuchungen in Hinblick auf die Struktur nach der Belichtung durchgeführt werden.

Desweiteren konnten die Nucleosidtriphosphate der beiden artifiziellen Nucleoside **2** und **3** erfolgreich synthetisiert werden. Für den Einbau dieser wurden verschiedene Polymerasen getestet, die **45** und **46** als mögliche Substrate in Primerverlängerungen erkennen. In beiden Fällen konnte der Einbau und die Intaktheit über die Eigenfluoreszenz der jeweiligen Chromophore bestätigt werden. Wurden Polymerasen ausgewählt, die ihre Substrate spezifischer aussuchen, so wurde **46** effektiver in Oligonucleotide eingebaut als **45**. Der anschließende Aufbau zum Vollängenprodukt erfolgte mit **46** als Substrat deutlich schneller.

Um die Selektivität der Terminator-Polymerase mit **45** zu überprüfen, wurden aus Nukleosid **2** die beiden isomeren Thiotriphosphatanaloga **47L** und **47R** synthetisiert. Diese wurden ebenfalls in Oligonukleotide eingebaut und anschließend enzymatisch verdaut. Die Abbauprodukte widersprachen jedoch dem enzymatischen Einbau dieser Phosphatspezies. Da die artifiziellen Bausteine jedoch teilweise eingebaut wurden, worauf die Primerverlängerung mit **45** hinwies, stellt sich hier die Frage ob sich α -Thiotriphosphate als Substrate für die Terminator-Polymerasen überhaupt eignen. Zur Untersuchung der Selektivität sind für Terminator-Polymerasen Didesoxynukleoside und deren Triphosphate besser geeignet (Abb. 71).

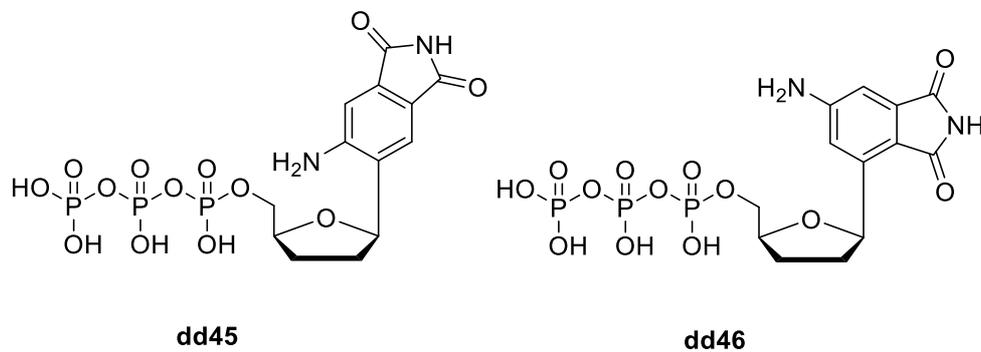


Abb. 71: Didesoxynukleosidtriphosphate **dd45** und **dd46** mit beiden Chromophorenausrichtungen **o-4API** und **m-4API**.

In dieser Arbeit wurden außerdem die Einbaueffizienzen der phthalimidmodifizierten Bausteine überprüft und verglichen. Wichtig wäre in diesem Zusammenhang der Einbau der Triphosphate von **4** mit **4API**-modifizierten Templatsträngen (Abb. 72). Es wäre durchaus denkbar, dass eine Aminogruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren könnte, was sich auf die Effizienz der Primerverlängerung positiv auswirken würde.

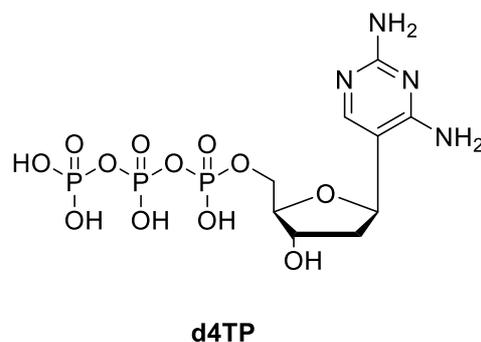


Abb. 72: Nukleosidtriphosphat **d4TP** von Nukelosid **4**.

Insgesamt konnte die Effizienz des **4API:DAPym**-Systems durch das neue Nukleosid **2** in Bezug auf die Basenpaarung verbessert werden. Aufgrund des strukturellen Verhaltens des **o-4APIs** lassen sich die teilweise von der Gegenbase unabhängigen fluoreszenten Eigenschaften in Anwendungen der RNAi nutzen. Für eine effektive Basenpaarung müsste die Ringstruktur ähnlich den Purinbasen angepasst werden, um die Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken zu unterstützen. Wird dieses Vorgehen mit der Einführung eines Heteroatoms in die Ringstruktur kombiniert, würde an dieser Position eine Angriffsstelle für Polymerasen generiert werden. *Broom et al.*^[102] synthetisierten Pyridopyrimidinderivate, die den hier erwähnten Anforderungen entsprechen könnten (Abb. 73). Das Absorptionsmaximum dieser Verbindung liegt mit 360 nm ebenfalls in einem von den übrigen Nukleobasen abgetrennten Bereich. Die optischen Eigenschaften könnten eventuell ähnlich dem Ansatz von *Luedtke et al.*^[33] durch weitere Substituenten verbessert werden.

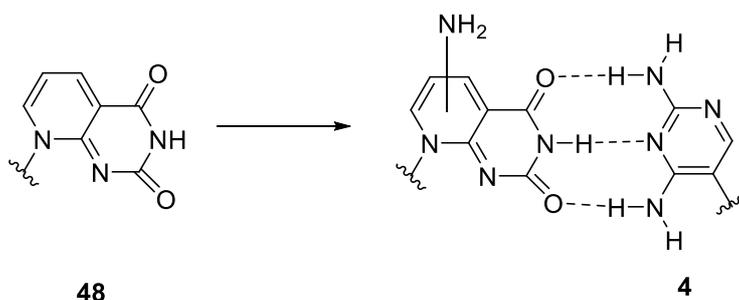


Abb. 73: Pyridopyrimidinderivat **48** von *Broom et al.* und mögliche Basenpaarung mit Nukleosid **4**.

III Teil B: Tetrazinmodifizierte DNA zur bioorthogonalen Markierung von Nukleinsäuren

1 Theoretischer Hintergrund

Wie bereits in Kap. II1.3 beschrieben, können Fluorophore auf verschiedene Art und Weisen in Nukleinsäuren integriert werden. Allen Methoden gemein ist die Modifizierung während der Synthese als artifizieller Baustein, wie es beispielsweise in der Phosphoramidit-Methode angewendet wird. In einigen Fällen wird aus verschiedenen Gründen die Modifikation jedoch erst nach der Synthese eingebracht. Zum einen ist nicht jede funktionelle Gruppe gegenüber den Bedingungen der chemischen Nukleinsäuresynthese stabil und zum anderen kann es von Vorteil sein, einen funktionalisierten Vorläufer zu haben (hier die Nukleinsäure), der anschließend beliebig modifiziert werden kann. Synthetisch bringen diese Methoden allerdings einige Herausforderungen mit sich. Die Modifikation muss den kompletten Syntheseweg überstehen und sollte keine Kreuzreaktivität gegenüber den anderen Funktionalitäten der DNA oder RNA aufweisen, um sie am Ende postsynthetisch nutzen zu können.

1.1 Bioorthogonale Konjugationsmethoden in der Nukleinsäurechemie

Der Begriff der bioorthogonalen Markierung wurde von *Bertozzi et al.* geprägt und umfasst im Allgemeinen Reaktionen, dessen Reaktionspartner keine Reaktivitäten gegenüber biologischen Bestandteilen zeigen, selektiv unter physiologischen Bedingungen (O_2 , $pH = 7$, Normaldruck, H_2O) miteinander reagieren, hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen und keine Toxizität gegenüber der Zelle oder dem Organismus aufweisen.^[103] Eine der ersten Reaktionen, die in diesem Sinne in Zellen durchgeführt wurde, ist die Staudinger-Ligation.^[104] Im Vergleich zur klassischen Staudinger-Reaktion, in der Azide durch Triarylphosphine zu Aminen reduziert werden, schließt sich bei dieser Ligation ein Kupplungsschritt an, bei dem mit Hilfe eines Elektrophils die Markierung des Ziels erreicht wird (Abb. 74).

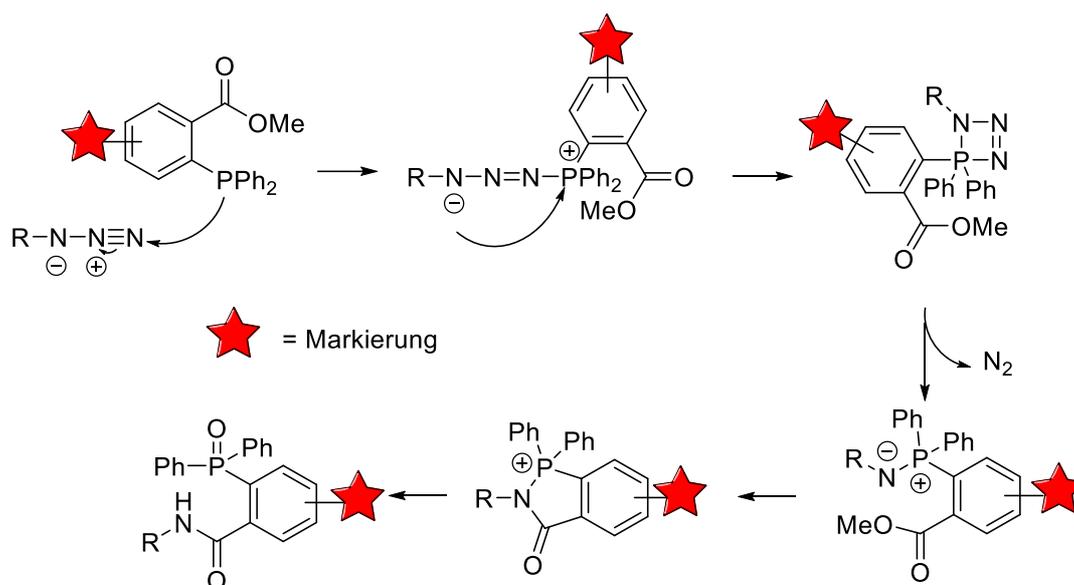


Abb. 74: Mechanismus der Staudinger-Ligation zur bioorthogonalen Markierung von Aziden. ^[104]

Ausgehend von diesem Ergebnis haben sich im Laufe der Jahre einige Methoden etabliert, bioorthogonale Markierungen in biologischen Systemen, wie Proteinen, durchzuführen. Aber auch die Nukleinsäurechemie profitiert davon, was im Folgenden zusammengefasst ist.

Eine der bekanntesten Ligationsmethoden ist die ursprünglich nach *Huisgen et al.* formulierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden, die zu 1,2,3-Triazolen führt.^[105] *Sharpless et al.* und *Meldal et al.* entdeckten, dass sich Reaktionsgeschwindigkeit und Regioselektivität durch Cu(I)-Salze steigern lassen.^[106-107] Nach einigen Verbesserungen wurde die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) durch den von Sharpless eingeführten Begriff der „Click“-Reaktion bekannt.^[108] Durch die Orthogonalität der einzelnen Komponenten gegenüber den Bestandteilen der Nukleinsäuren hat sich die CuAAC als eine der Standardreaktionen für In-vitro-Postmodifizierungen in DNA und RNA durchgesetzt (Abb. 75).^[109]

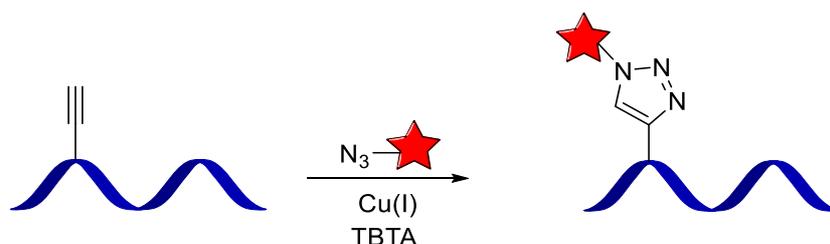


Abb. 75: Schematische Darstellung der CuAAC zwischen alkinmodifizierten Nukleinsäuren und azidmodifizierten Markern; TBTA = Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin.

Da die In-vivo-Anwendung aufgrund der hohen Zelltoxizität des Kupfers begrenzt ist, muss hierbei auf die kupferfreie Variante zurückgegriffen werden. *Bertozzi et al.* bedienten sich an Cyclooctinen,^[110] deren reaktives Verhalten gegenüber Aziden schon Mitte des letzten Jahrhunderts durch *Blomquist et al.* beschrieben wurde.^[111] Das Einbringen der Alkinfunktionalität in eine Ringstruktur erhöht die Reaktivität in ringgespannten Alkin-Azid-Cycloadditionen (SPAAC), wodurch die Reaktionsgeschwindigkeiten erheblich gesteigert werden konnten. Diese kann durch zusätzliche Substituenten beeinflusst werden (Abb. 76).

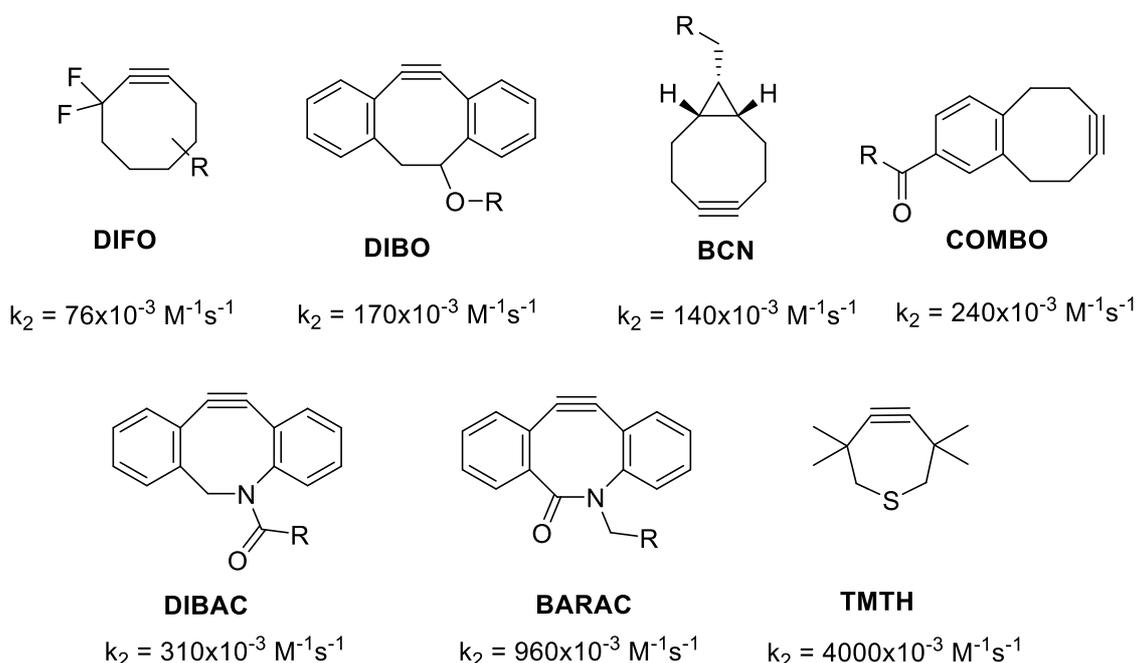


Abb. 76: Cyclooctinderivate mit Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für SPAAC in MeCN.^[112-113]

Zusätzliche Aromaten verkürzen dabei die Bindungslängen, was im Allgemeinen zu einer größeren Spannung im System führt. Folglich wird der energetische Abstand zum Übergangszustand geringer, die Aktivierungsbarriere sinkt, wodurch die Geschwindigkeitskonstante gesteigert wird. Durch elektronenziehende Gruppen wird das LUMO des Cyclooctins energetisch herabgesetzt, wodurch der Ladungstransfer von Azid auf das Alkin erleichtert wird und im Weiteren zu einer Stabilisierung des Übergangszustands führt.^[114] Die Reaktionsgeschwindigkeiten der SPAAC sind jedoch im Vergleich zu denen der CuAAC um den Faktor 100 bis 10000 geringer.

Die Cyclooctinderivate sind desweiteren in der Lage, [4+2]-Cycloadditionen, sog. Diels-Alder-Reaktionen, einzugehen. Dieser Methode wurde, im Sinne der bioorthogonalen Ligation, aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit, Ausbeuten

und Regioselektivität immer mehr Bedeutung zugesprochen. Dabei handelt es sich nicht um die klassische, sondern um die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA), auf welche im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird.

Eine elegante Methode ist die nötige Reaktivität erst dann zu generieren, wenn sie gebraucht wird. Systeme, bei denen dieses Prinzip ausgenutzt wird und die mit Licht gesteuert werden können, sind als „Photoclick“-Reaktionen bekannt.^[115] Dabei entsteht durch Belichtung eines Tetrazols ein Nitrilimin (Dipol), das anschließend mit einem Dipolarophil umgesetzt wird. Sowohl die optischen Eigenschaften als auch die Reaktionsgeschwindigkeit kann durch die Substituenten beeinflusst werden. *Wagenknecht et al.* publizierte die erste „Photoclick“-Reaktion in DNA basierend auf einem Diaryltetrazol, das postsynthetisch mit verschiedenen Dipolarophilen markiert wurde (Abb. 77).^[116] Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind im Vergleich zu anderen kupferfreien Methoden relativ hoch ($k_2 = 23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

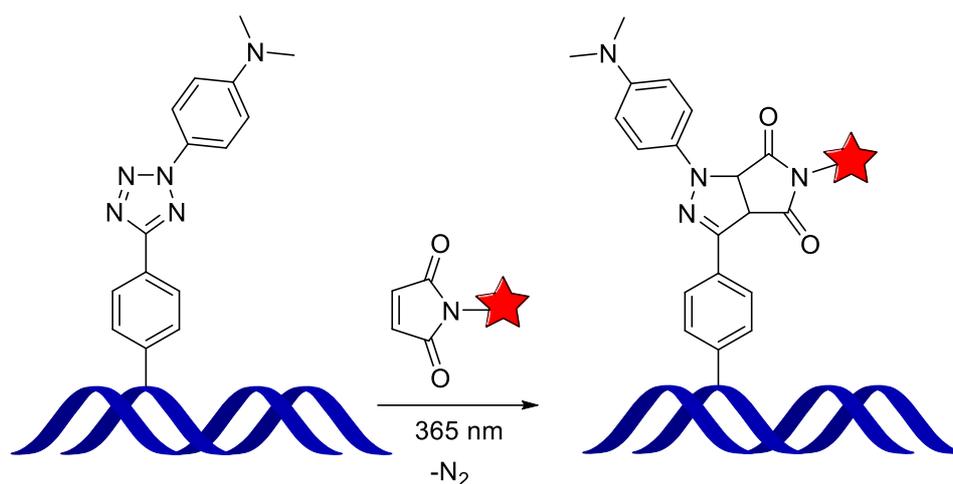


Abb. 77: „Photoclick“-Reaktion zwischen tetrazolmodifizierter DNA und maleimidmodifizierten Marker.^[71]

1.2 iEDDA in Nukleinsäuren

Im Gegensatz zur klassischen Diels-Alder-Reaktion sind bei der iEDDA die reaktionsbeteiligten Orbitale das LUMO des Diens und das HOMO des Dienophils (Abb. 78). Die Geschwindigkeit und Effizienz dieser Reaktion ist umso höher, je kleiner die HOMO-LUMO-Lücke der entsprechenden Grenzorbitale ist. Um den Abstand dieser zu verringern und folglich die Aktivierungsbarriere der Reaktion abzusenken, gibt es folgende Möglichkeiten. Zum einen wird das HOMO des Dienophils durch elektronenschiebende Gruppen angehoben, während das LUMO des Diens durch

elektronenziehende Substituenten abgesenkt wird. Eine weitere Möglichkeit ist das Einführen von Heteroatomen, wie Stickstoff, in das π -System des Diens. Durch den höheren p-Charakter der Atomorbitale erfolgt eine weitere Stabilisierung des LUMOs. Die energetische Anhebung des Dienophils kann, durch Einbettung in ein gespanntes Ringsystem geschehen.^[117]

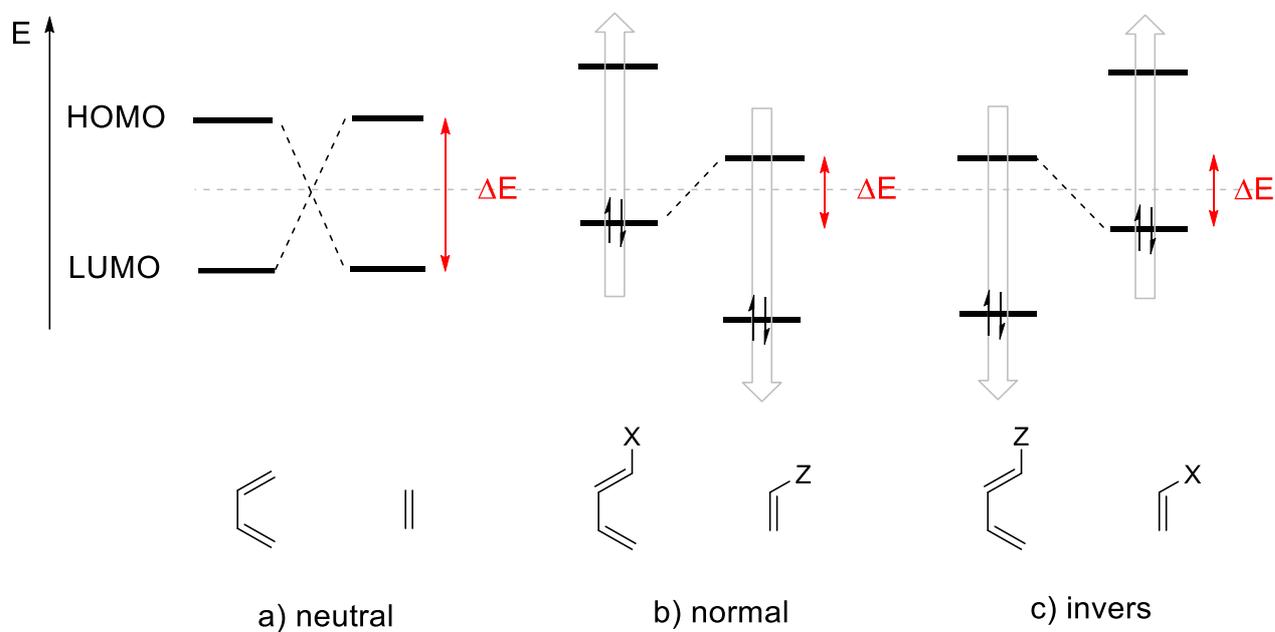


Abb. 78 Beeinflussung der energetischen Lage der Grenzorbitale durch Substituenten an Dienen und Dienophilen; HOMO-LUMO Wechselwirkungen in Diels-Alder Reaktionen mit a) neutralen, b) normalen und c) inversem Elektronenbedarf, X = elektronenschiebende, Z = elektronenziehende Substituenten.^[117]

1.2.1 Tetrazinmodifizierte Nukleinsäuren

Durch den Austausch von vier CH-Einheiten des Benzols durch Stickstoff, erhält man 1,2,4,5-Tetrazine, die erstmals in [4+2]-Cycloadditionen durch *Sauer et al.* eingesetzt wurden.^[118-120] Die Reaktionen weisen, abhängig vom eingesetzten Dienophil, hohe Reaktionsgeschwindigkeiten auf (Abb. 79). Nach der [4+2]-Cycloaddition entsteht ein Bicyklus, der durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion elementaren Stickstoff freisetzt. Dieser Schritt macht die Reaktion irreversibel. Das entstehende Dihydropyridazin wird anschließend durch Luftsauerstoff zu Pyridazin oxidiert. *Fox et al.* und *Hilderbrand et al.* nutzten das Potential der Tetrazine in bioorthogonalen Ligationsreaktionen mit *trans*-Cyclooctenen und Norbornen.^[121-122]

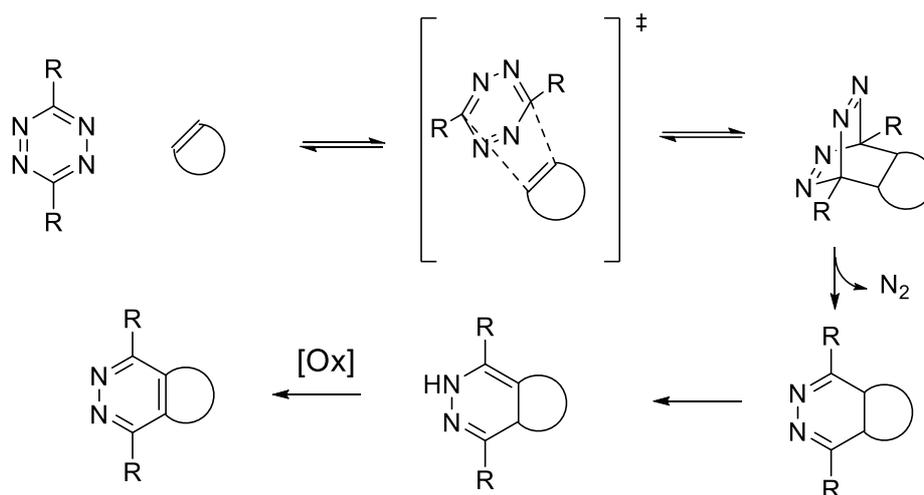


Abb. 79: Mechanismus der iEDDA mit 1,2,4,5-Tetrazinen und ringgespannten Alkenen.

Aufgrund dieser Vorergebnisse, wurde die iEDDA immer interessanter für die Nukleinsäurechemie. Die Reaktivität der Tetrazine lässt sich über die Substituenten an der 3- und 6-Position steuern, wobei im Allgemeinen eine Verringerung der Ladungsdichte im konjugierten System zu einer höheren Reaktivität führt. Bei der Wahl des Substitutionsmusters ist ebenfalls die miteinkehende Instabilität der Systeme zu beachten, sodass ein Kompromiss zwischen beiden Effekten gefunden werden muss.

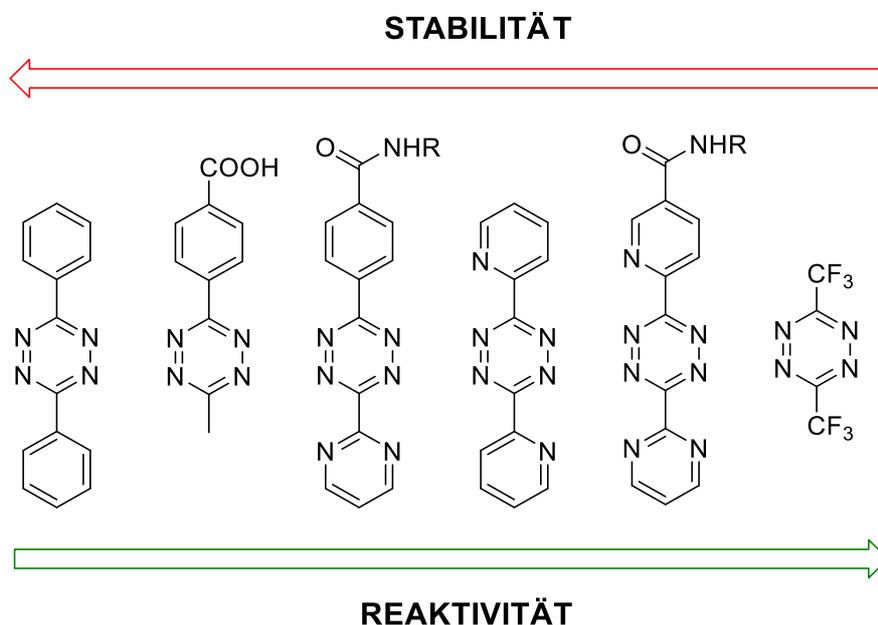


Abb. 80 Reaktivität und Stabilität ausgewählter 1,2,4,5-Tetrazinderivate.^[117]

Zwei ausgewählte Tetrazinderivate wurden daher in der Gruppe von *Wagenknecht et al.* an die 5-Position von 2'-Desoxyuridin (dU) geknüpft und über verschiedenen Methoden in DNA eingebracht. Aufgrund der Labilität gegenüber Nukleophilen musste

auf die klassische Phosphoramidit-Methode bzw. die Aufarbeitung der Oligonukleotide verzichtet werden.

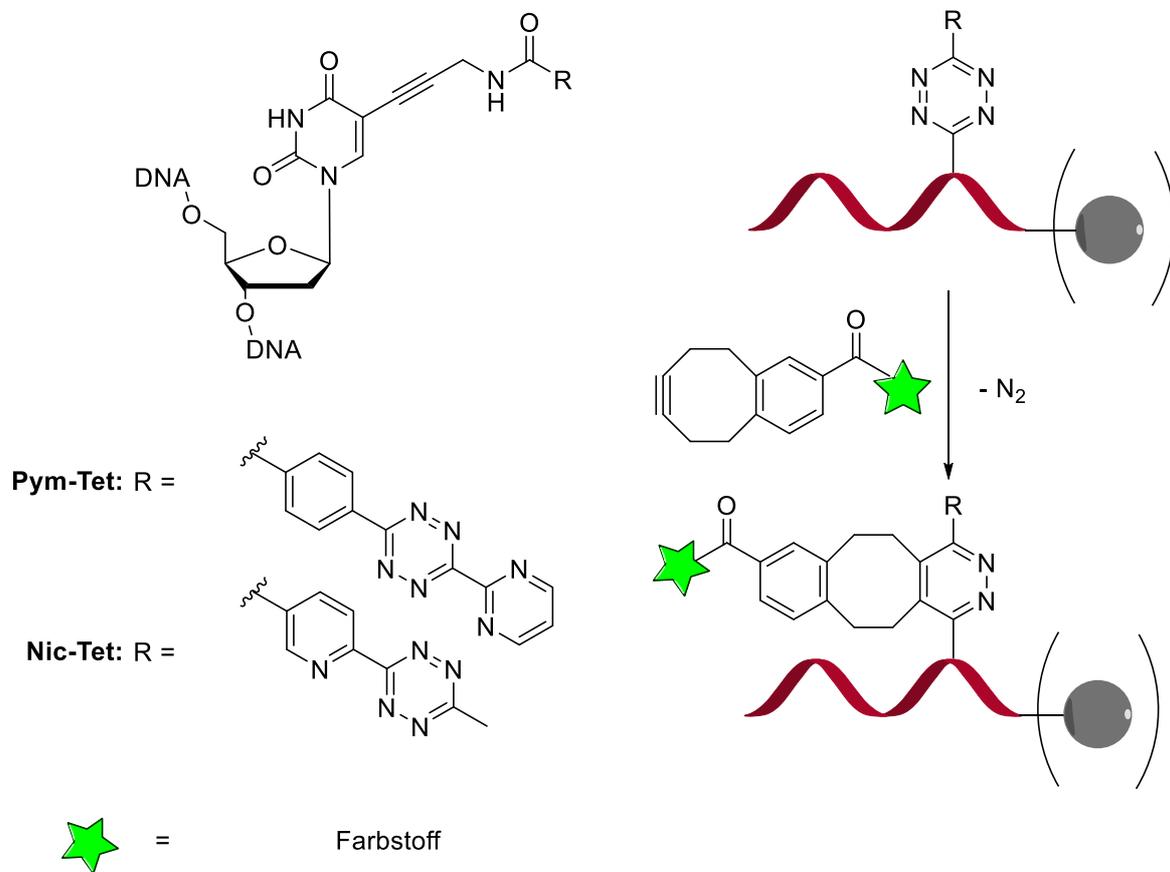


Abb. 81: Tetrazinmodifizierte DNA-Bausteine **Pym-Tet** und **Nic-Tet** (auf der festen Phase) von *Wagenknecht et al.* (links) und schematische Darstellung der iEDDA in tetrazinmodifizierter DNA mit **COMBO**-modifizierten Farbstoffen (rechts).

Ulrike Wenge synthetisierte dazu die Nukleosidtriphosphate des **Pym-Tet**-Bausteins und führte diese mittels Polymerasen in DNA ein. Die anschließend durchgeführten iEDDA-Experimente mit **COMBO**-modifizierten Fluorophoren zeigten das Konjugations-Produkt, welches allerdings nur in Ausbeuten von 5 bis 10% erhalten werden konnte. Ob die geringen Ausbeuten der Markierung auf die DNA-Umgebung oder die Labilität der Tetrazineinheit zurückzuführen ist, ist bisher nicht bekannt.^[123]

Effi Bätzner synthetisierte das Phosphoramidit des stabileren **Nic-Tet**-Bausteins und konnte damit zeigen, dass die Einbaueffizienz vergleichbar mit den natürlichen Bausteinen ist. Aufgrund der Basenlabilität des Tetrazins konnte die modifizierte DNA allerdings nicht von der festen Phase abgespalten werden und musste daher vor der Abspaltung markiert werden. Dass die Tetrazineinheit bis zur Aufarbeitung intakt war, wurde durch Konjugation mit **COMBO**-Fluorescein bestätigt.^[124]

1.2.2 Alkenmodifizierte Nucleinsäuren

Aufgrund der Instabilität der Tetrazine wurden vermehrt dienophilmodifizierte Nucleinsäuren entwickelt, die anschließend mit tetrazinmodifizierten Markern „geclickt“ wurden. *Jäschke et al.* präsentierte dazu Guanosinmonophosphatderivate, um RNA am 5'-Terminus zu markieren (Abb. 82). Der Einbau erfolgte durch die 5'-Initiator-Nucleotid-Methode mittels T7-RNA-Polymerasen. Um die vergleichsweise langsamen Reaktionsraten der **NOR**s zu umgehen, wurden diese anschließend durch die reaktiveren **TCO**s ersetzt.^[125] Allerdings erfolgte bei der Synthese der Nucleotide eine Umwandlung in das *cis*-Isomer, das in der iEDDA inaktiv ist. Demzufolge musste dieses durch das nächstreaktivere **BCN** ersetzt werden.^[126] Auf diese Weise wurden nach nur 10 min nahezu quantitative Ausbeuten in der iEDDA erreicht.

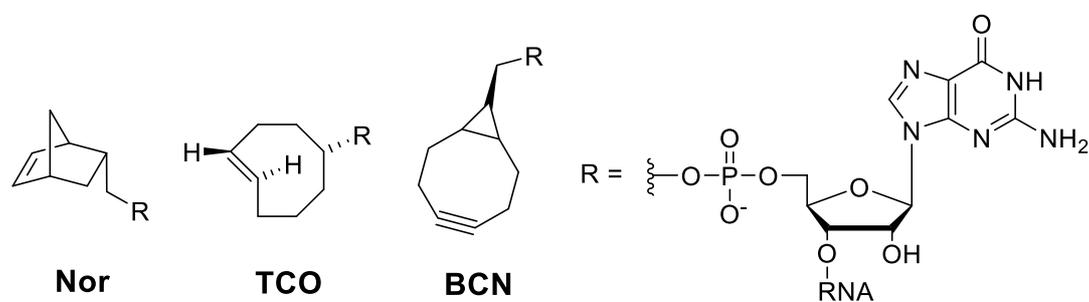


Abb. 82 Ringgespannte dienophilmodifizierte GMP-Bausteine von *Jäschke et al.*^[125-126]

Für den internen Einbau in Nucleinsäuren wurden **NOR**s meist über Ethinyl linker an die Nucleobasen angebracht und als Phosphoramidit-Bausteine eingebaut. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der **NOR**s stiegen dabei auf $k_2 = 20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ an.^[127]

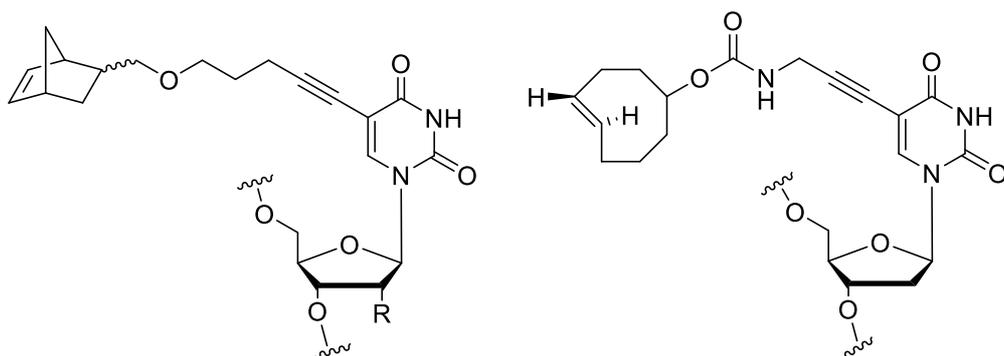


Abb. 83: Interne **BCN**- (links) und **TCO**- (rechts) modifizierte DNA und RNA; R = H (DNA) oder OH (RNA).^[127-129]

Kath-Schorr et al. nutzten den RNA-Baustein in In-vivo-Experimenten in Säugetierzellen und konnten zeigen, dass die Reaktivität vor allem von dem sterischen Bedarf der Tetrazine abhängt.^[128] Auf die gleiche Weise wurden **TCO**-Systeme entwickelt, deren Triphosphate enzymatisch in DNA eingebaut und anschließend mit

tetrazinmodifizierten Boronsäuren und Fluorescein konjugiert wurden. Analog synthetisierten *Brown et al.* und *Wang et al.* Aptamere, die zur Fluoreszenz-Visualisierung von HeLa-Zellen ausgenutzt wurden.^[129]

Obwohl diese Systeme in In-vitro-Anwendungen sehr gut funktionieren, könnte es ausgehend von den großen sterisch hindernden Substituenten zu Störungen bzw. Beeinflussungen des Metabolismus in Zellen kommen. *Luedtke et al.* und *Marx et al.* präsentierten dazu die vinylmodifizierten Bausteine **d^{vin}U** und **d^{vin}A** (Abb. 84).^[130-131]

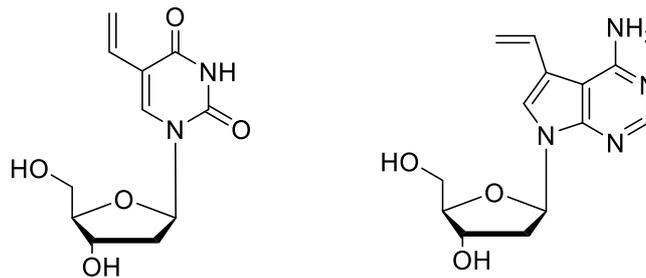
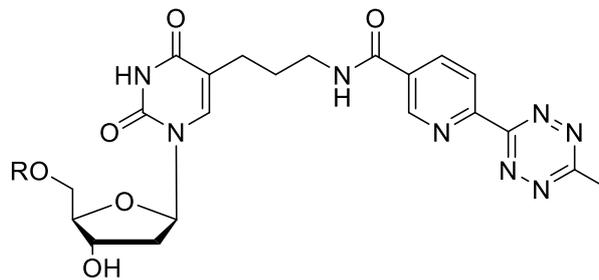


Abb. 84: Vinylmodifizierte DNA-Basen **d^{vin}U** von *Luedtke et al.* (links) und **d^{vin}A** von *Marx et al.* (rechts).^[130-131]

Obwohl die Dienophileinheiten nicht durch Ringspannung aktiviert werden, weisen sie vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten in iEDDA auf, wie die Cyclooctine in SPAAC (vgl. Kap. 1.1). Eingebaut in DNA lassen sich die Reaktionsgeschwindigkeiten von **d^{vin}A** verdreifachen, was dadurch zustande kommt, dass die iEDDA in der großen Furche stattfindet und die polare Umgebung zu einer Beschleunigung der Reaktion führt.^[132] Das **d^{vin}U** wurde in HeLa-Zellen eingeschleust und konnte dort erfolgreich mit TAMRA-modifizierten Tetrazinen konjugiert werden.

2 Aufbau des Systems

Aufgrund der in Kap. 1.2.1 beschriebenen Ergebnisse sollte das Nukleosid-triphosphat von **5** synthetisiert und anschließend über Polymerasen in DNA eingebracht werden. Dabei wurde, aufgrund der höheren Stabilität, das beschriebene **Nic-Tet** als Grundstruktur verwendet. Im Gegensatz zu den vorher synthetisierten Tetrazinnukleosiden wurde die starre Ethinylbrücke durch einen flexiblen Propyllinker ersetzt, wodurch die optischen Eigenschaften der anschließend geknüpften Fluorophore verbessert werden sollten.^[133]



5: R = H

49: R = P₃O₉³⁻

Abb. 85: Nukleosidtriphosphat **49** des Tetrazin-Bausteins **5** mit flexiblem Propyllinker zum enzymatischen Einbau in DNA.

3 Syntheseübersicht

Eine weit verbreitete Methode, DNA zu modifizieren, ist die Anknüpfung eines funktionellen Rests an einen der natürlichen Bausteine, welcher anschließend synthetisch oder enzymatisch in Nukleinsäuren eingebracht werden kann. Hierbei hat sich die Kupplung zwischen Modifikation und 2'-Desoxyuridin über eine Ethinylbrücke als effizient erwiesen (Abb. 86). Dafür wurde das kommerziell erhältliche Propargylamin (**51**) als TFA-Amid geschützt und mit dem kommerziell erhältlichen Baustein **50** in einer palladiumkatalysierten *Sonogashira*-Kupplung mit Ausbeuten von 60% zu **53** umgesetzt. In vielen Fällen wird nach der Abspaltung der Schutzgruppe von **53** das freie Amin als Vorstufe für weitere Modifikationen verwendet.

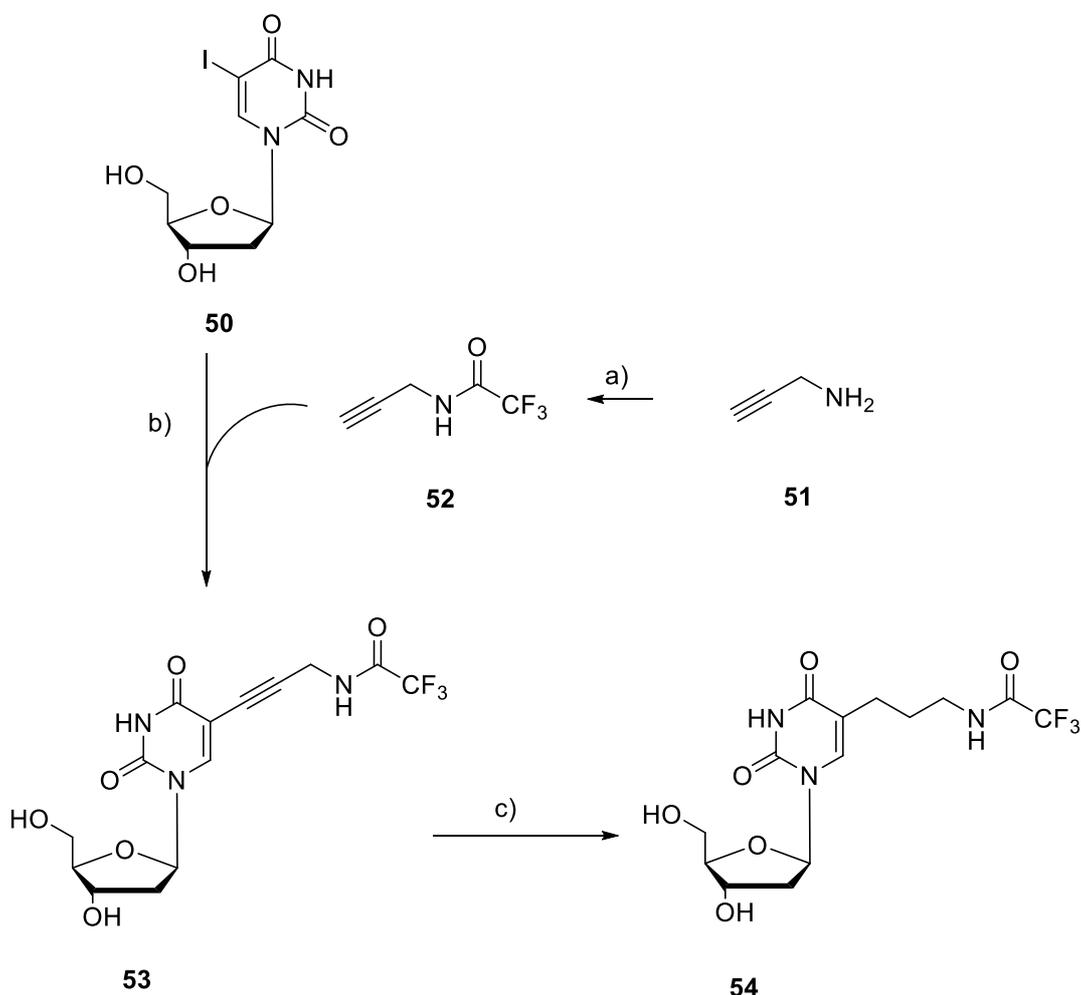


Abb. 86: Synthese des Nucleosid-Precursors **54** zur weiteren Modifizierung; a) Trifluoressigsäureethylester, MeOH, 24 h, 0 °C → RT, 60%; b) **52**, CuI, Et₃N, Pd(PPh₃)₄, DMF ü. N., RT, 60%; c) Triethylsilan, Pd(OH)₂, MeOH ü. N., RT, 79%.

Bei der postsynthetischen Einbringung von Fluorophoren haben *Wagenknecht et al.* jedoch gezeigt, dass der Austausch des starren durch einen flexiblen Linker die optischen Eigenschaften stark verbessert.^[133] Aus diesem Grund wurde die

Ethynylbrücke mittels *Pearlman's* Katalysator und Triethylsilan reduziert.^[134] **54** konnte in Ausbeuten von 79% erhalten werden.

Die Eigenschaften von 1,2,4,5-Tetrazinen sind, wie in Kap. 1.2.1 beschrieben, sehr stark von den in 3- und 6-Position befindlichen Substituenten abhängig. Um einen Kompromiss zwischen Reaktivität und Stabilität zu finden, ist es daher wichtig, asymmetrische Tetrazine zu synthetisieren, deren chemisches Verhalten den Anforderungen und Bedingungen einer bioorthogonalen Reaktion entspricht. Die Standardsynthese der 1,2,4,5-Tetrazine erfolgt, abgeleitet von der *Pinner*-Reaktion, durch Überführung eines Nitrils in das entsprechende Imidohydrazid mit Hydrazin (Abb. 87). Durch einen anschließenden, nukleophilen Angriff des Hydrazinderivats auf ein zweites Nitril, entsteht eine Hydrazoverbindung, die oxidationsempfindlich ist und formal zu einer Azoverbindung oxidiert wird. Nach der folgenden Cyclisierung entsteht das Dihydropyridazin, das durch Oxidation zum 1,2,4,5-Tetrazin umgesetzt wird.^[135]

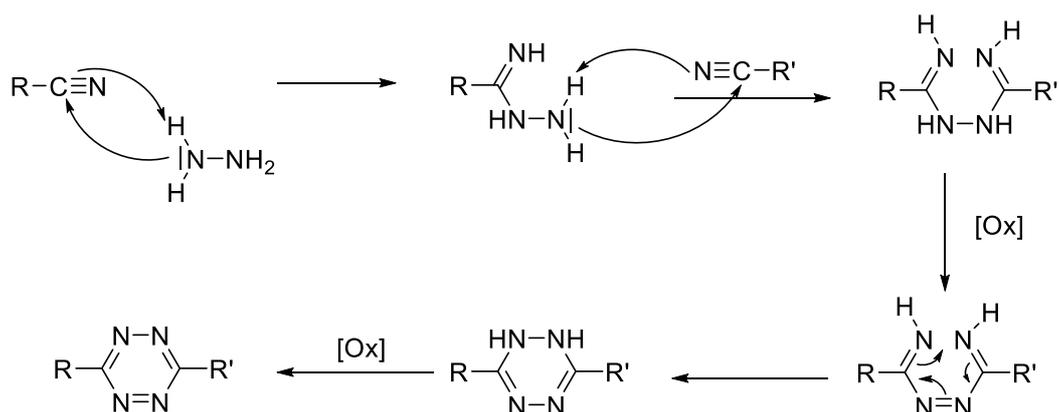


Abb. 87: Mechanismus der Synthese von 1,2,4,5-Tetrazinen nach *Pinner et al.*^[135]

Da dieser Ansatz, ausgehend von aliphatischen Nitrilen, nur zu geringen bis gar keinen Ausbeuten führt, wurde versucht, das Tetrazinderivat metallkatalysiert zu synthetisieren. Dieser Ansatz beruht auf der Beobachtung von *Deveraj et al.*, dass $Zn(OTf)_2$ und $Ni(OTf)_2$ als Lewisäuren fungieren und die Ausbeuten in wasserfreiem Hydrazin extrem steigern können (Abb. 88).^[136]

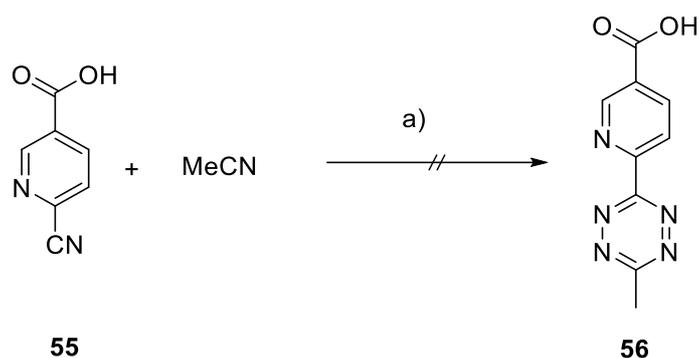


Abb. 88: Metallkatalysierte Synthese von 1,2,4,5-Tetrazinen nach *Deveraj et al.*: a) 1) NH_2NH_2 , $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, THF, 24 h, 60 °C; 2) NaNO_2 , $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$.

Anstatt reines Hydrazin zu verwenden, wurde in diesem Fall aufgrund der besseren Zugänglichkeit eine Lösung in THF benutzt. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Metallsalze in THF wurde **55** nicht zum gewünschten Produkt umgesetzt. Die Ausbeuten von *Effi Bätzner* konnten dadurch nicht verbessert werden und somit ist der Zugang zu **56** weiterhin nur durch die Umsetzung von **55** mit Hydrazinhydrat und Triethylorthoacetat gegeben (Abb. 89), wodurch **56** in Ausbeuten von 16% erhalten werden konnte.

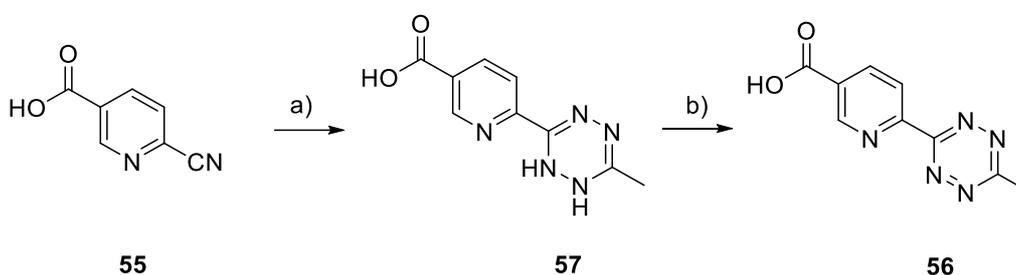


Abb. 89: Synthese des Tetrazins **56**: a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_3\text{C}(\text{OEt})_3$, 2 h, 100 °C; b) pH = 3, NaNO_2 , RT, 16% (über zwei Stufen).

Anschließend wurde die TFA-Schutzgruppe von **54** entfernt und dieses so zu **58** umgesetzt (Abb. 90). Dazu wurde die Carbonsäureeinheit von **56** mit HBTU aktiviert und anschließend mit HOBt in den Aktivester überführt. Die Amidkupplung mit **58** verlief mit einer Ausbeute von 49%.

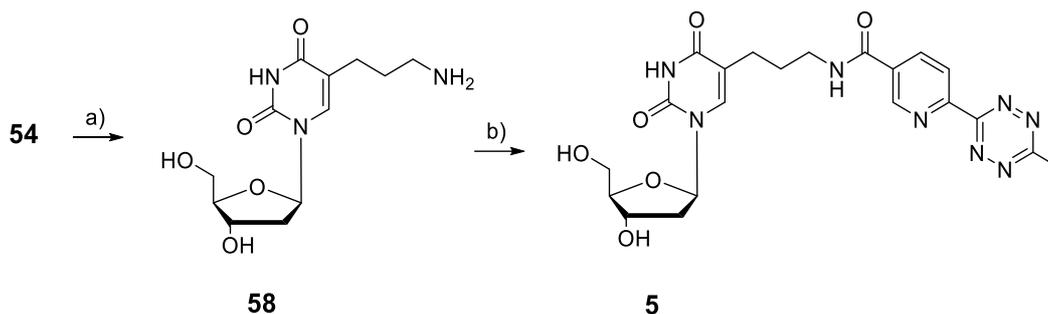


Abb. 90: Synthetische Darstellung von **5**: a) konz. NH_3 , 24 h, RT, quant.; b) **56**, HBTU, HOBt, DIPEA, DMF, 20 h, RT, 49%.

Nach Erhalt des Nucleosids **5** wurde anschließend das Nucleosidtriphosphat synthetisiert. Für die Darstellung von **49** wurden die Reaktionsbedingungen aus der Synthese für **45** und **46** übernommen (vgl. Kap. II.3.1). Im Unterschied zur vorigen Synthese wurde das Phosphorylchlorid jedoch im Überschuss zugegeben um die Dimerbildung vollständig zu unterdrücken. Aufgrund der Basenlabilität von **5** wurde auch hier auf die Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie verzichtet und das Nucleosidtriphosphat direkt mittels RP-HPLC aufgereinigt. **58** konnte somit in Ausbeuten von 17% erhalten werden.

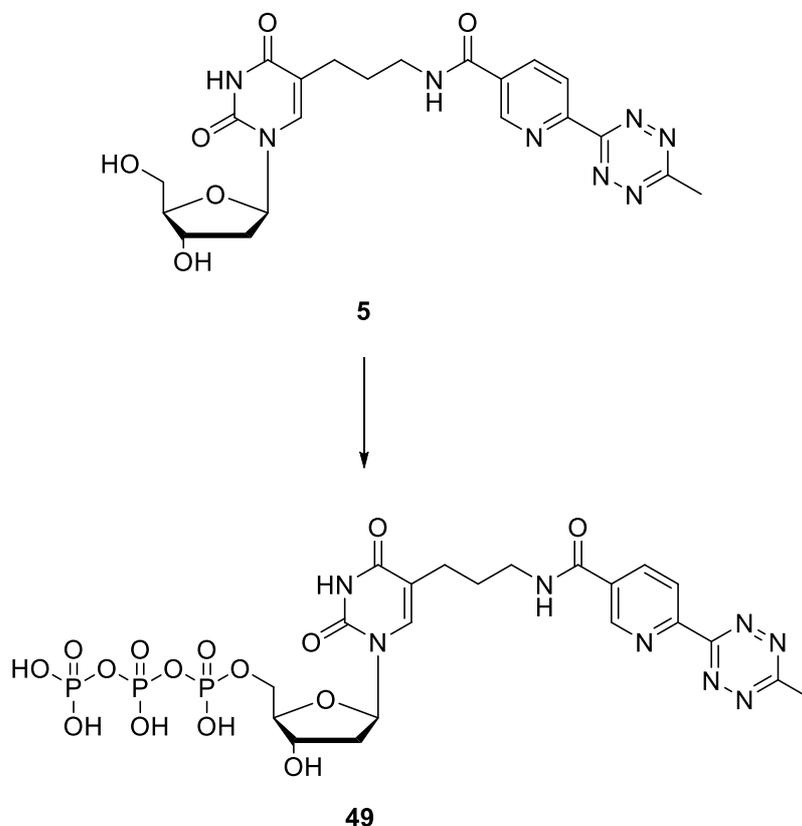


Abb. 91: Syntheseroute zur Darstellung des Nucleosid-Triphosphats **49**: 1) POCl_3 , PS, TMP, -15°C , 5 h; 2) $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF, 30 min; 3) TEAB/ H_2O , 4 h, 17%.

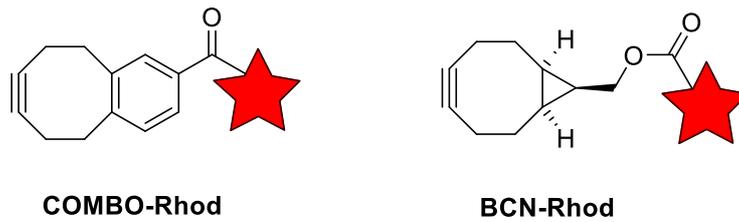


Abb. 93: COMBO- und BCN- modifiziertes Rhodamin zur postsynthetischen iEDDA.

Rhodamin hat den Vorteil, dass es selektiv bei höheren Wellenlängen neben Fluorescein angeregt werden kann. Dadurch werden nur die Banden sichtbar, die durch den Farbstoff markiert sind (Abb. 94). Der Abstand der beiden Farbstoffe zueinander ist so groß, dass ein Energietransfer des Fluoresceins auf das Rhodamin ausgeschlossen werden kann. Daher sind die Intensitäten der Fluorescein-Emission der unterschiedlichen DNA-Banden proportional zu ihrer Menge und somit lassen sich die Ausbeuten der iEDDA über deren Integration bestimmen.

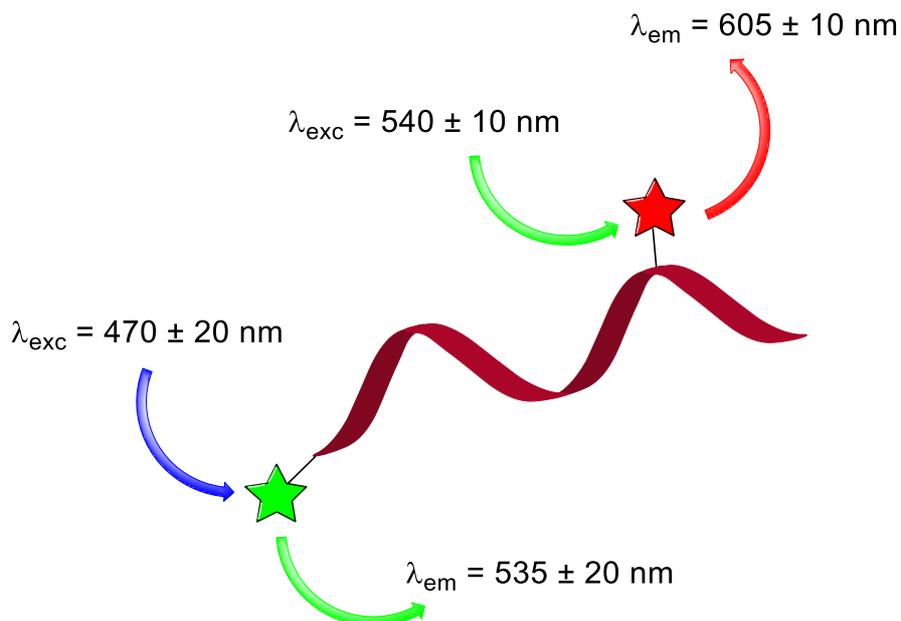


Abb. 94: Selektive Anregung von Fluorescein (grün) und Rhodamin (rot). Die angegebenen Emissionswellenlängen λ_{em} beziehen sich auf die Breitbandfilter der Visualisierungsmaschine.

4.2 Primerverlängerungsexperimente mit tetrazinmodifizierter DNA

Für die Primerverlängerungen mit **49** wurden die aus Kap. II1.5 vorgestellten Polymerasen Deep Vent (exo-), Hemo KlenTaq und KOD XL auf die Einbaueffizienz von **49** überprüft. In Abb. 95 sind die PAGE-Analysen der zeitabhängigen Experimente mit Deep Vent (exo-) dargestellt. Der Einbau im „Standing-Start“-Experiment erfolgte bei Abwesenheit der natürlichen Triphosphate (dNTPs) innerhalb von 30 min vollständig (Abb. 95a). Die synthetisierte Sequenz entsprach einer Länge von 24 NT. Bei Zugabe der natürlichen Bausteine wurde das Volllängenprodukt (35 NT) ebenfalls nach 30 min nachgewiesen. Auch im „Running-Start“-Experiment erfolgte der volle Umsatz zum Volllängenprodukt innerhalb derselben Zeit (Abb. 95b). Wie bereits erwartet, wiesen die modifizierten DNA-Stränge aufgrund des Tetrazin-restes eine geringere Mobilität in der Gelmatrix auf, was dazu führt, dass die Banden im Vergleich zu denen der unmodifizierten DNA (+T) etwas verschoben sind.

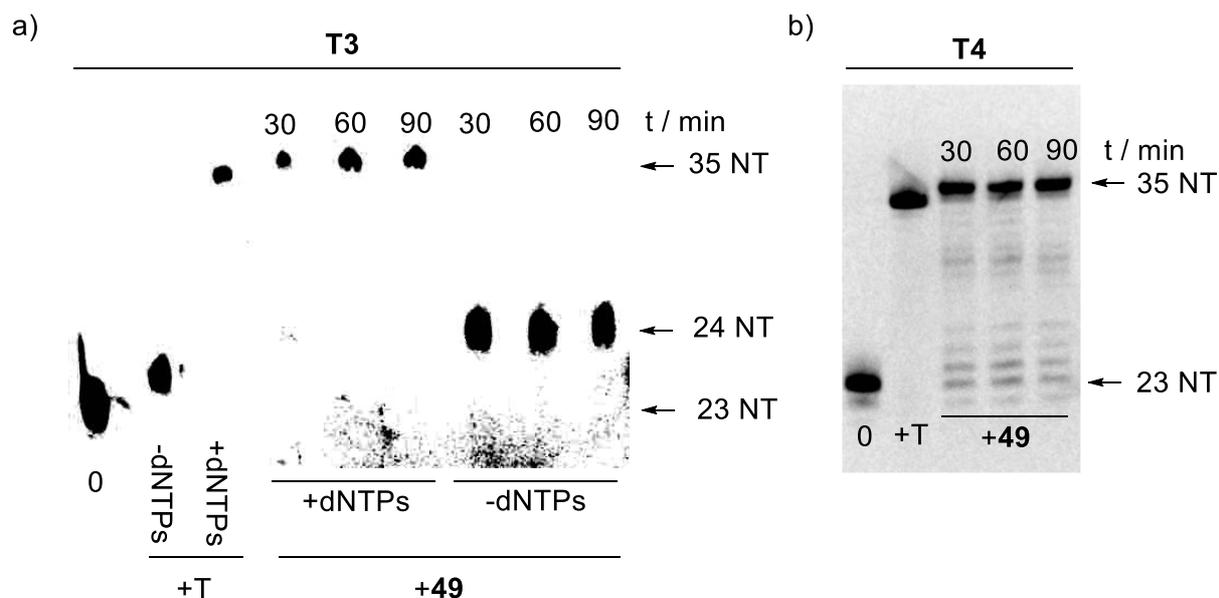


Abb. 95: PAGE-Analyse der Primerverlängerungen mit **49**; Primer: 750 nM, Template: 900 nM; Deep Vent (exo-): (1.0 U); dNTPs und **49**: 200 μ M, 72 °C; 0: keine dNTPs; +T: alle vier natürlichen dNTPs; +49: dATP, dGTP, dCTP, **49**.

Da mit diesen Experimenten gezeigt werden konnte, dass der enzymatische Einbau von **49** möglich ist, wurden anschließend die Bedingungen in Hinsicht auf die Stabilität des Tetrazins optimiert. Der pH-Wert der kommerziell erhältlichen Reaktionspuffer liegt im Normalfall bei etwa 8.5. Um den modifizierten Baustein zu schonen, aber gleichzeitig die Stabilität der Triphosphate nicht einzuschränken, musste der pH-Wert des Puffers auf einen Wert von 7.2 (bei Raumtemperatur) eingestellt werden. Zur weiteren Optimierung wurden die „Running-Start“-Experimente mit weiteren

Polymerasen bei unterschiedlichen Temperaturen wiederholt (Abb. 96). Während Deep Vent (exo-) und Hemo KlenTaq weitaus höhere Temperaturen für die Elongation des Primers benötigten, konnte mit KOD XL bei 45 °C bis 50 °C nach 30 min das Vollängenprodukt fast vollständig erhalten werden. Im Fall der Hemo KlenTaq war bei 50 °C und 55 °C außerdem eine Bande zu erkennen, die einer Stranglänge von 26 NT entsprach. Dies zeigt, dass der Einbau der natürlichen Nukleotide stattfand, der des modifizierten Bausteins **49** jedoch gehemmt ist und dadurch die Polymerisation abbrach. Durch den veränderten pH-Wert wurde die Aktivität der Polymerasen herabgesetzt, was dazu führte, dass bei geringeren Temperaturen nur noch die dNTPs toleriert wurden.

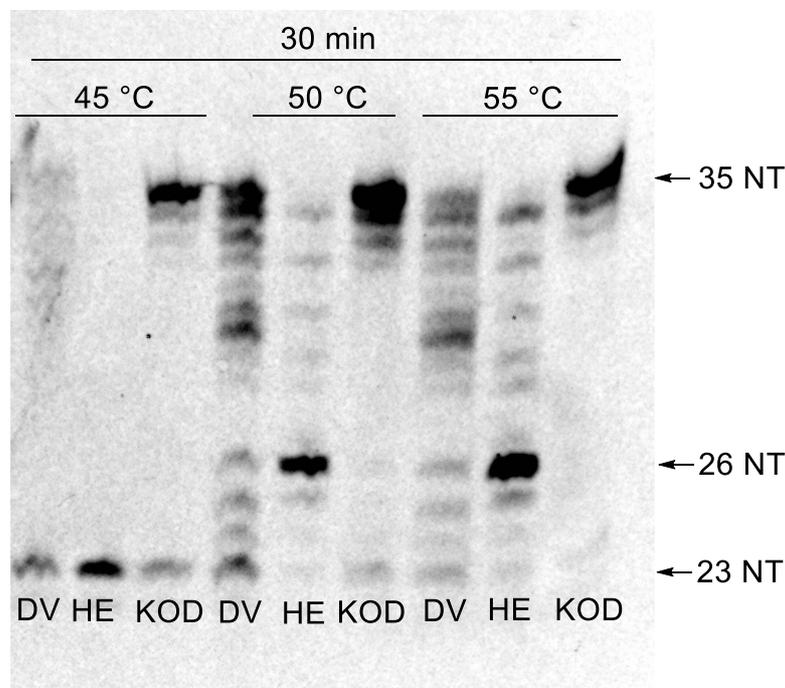


Abb. 96: PAGE-Analyse der Optimierung der Primerverlängerung: Primer: 750 nM, Template: 900 nM; dNTPs und **49**: 200 μ M; Polymerasen: DV: Deep Vent (exo-) (1.0 U); HE: Hemo KlenTaq (0.5 μ L); KOD: KOD XL (1.25 U).

5 Postsynthetische Modifizierung mittels iEDDA

Die enzymatisch synthetisierten Oligonukleotide wurden nach der Synthese über eine iEDDA mit ringgespannten Alkenen wie **COMBO** und **BCN**, die mit einem Farbstoff markiert waren, umgesetzt (Abb. 97). Als Fluorophor eignet sich in diesem Fall das Rhodamin B, da es sich durch das differenzierte Emissionsmaximum von der Emission des Fluoresceins unterscheiden lässt.

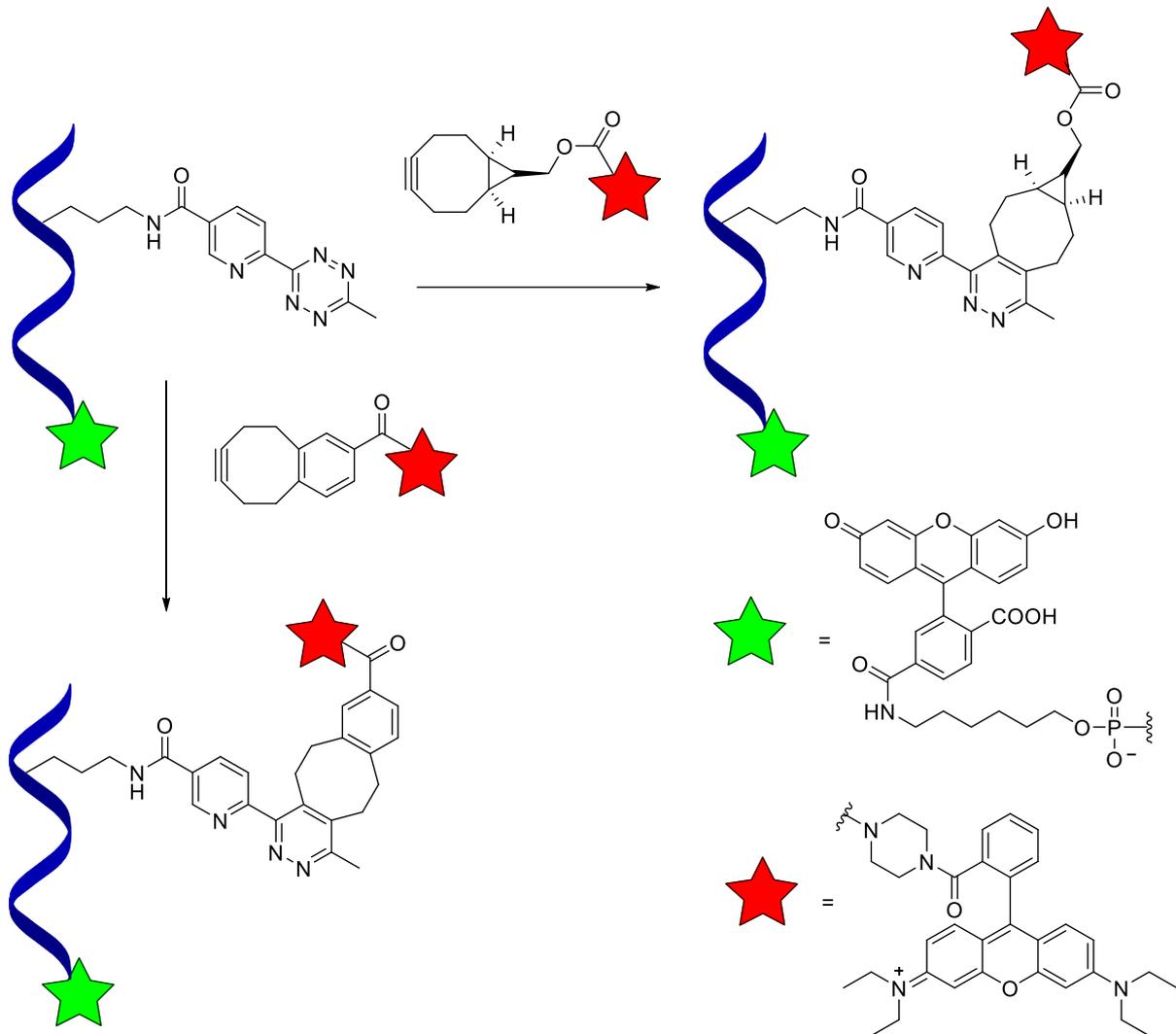


Abb. 97: Reaktionsschema: iEDDA der tetrazinmodifizierten DNA mit rhodaminmodifiziertem **BCN** und **COMBO**.

Für die postsynthetische Diels-Alder-Reaktion wurden die Primerverlängerungsexperimente mit den optimierten Bedingungen unter der Verwendung der KOD XL Polymerase bei 50 °C wiederholt und anschließend aufgearbeitet. Dazu wurden die Reaktionslösungen entsalzt, eingengt und unter der Annahme, dass sich der Primer vollständig zum Volllängenprodukt umgesetzt hat, eine 10 µM wässrige Stammlösung hergestellt. Für das modifizierte Rhodamin B-Derivat wurden je Lösungen mit

verschiedenen Konzentrationen in DMSO hergestellt (5 mM **BCN** und 10 mM **COMBO**). Anschließend wurde die DNA-Lösung dazu pipettiert, sodass die Reaktionen in Wasser/DMSO im Volumenverhältnis 1:1 durchgeführt wurden. Nach Ablauf der Reaktionszeit und Zugabe desselben Volumens Ladepuffers wurde die Probe unmittelbar auf das Gel geladen. Nach Beendigung der PAGE wurden die Gele zuerst, wie bereits beschrieben, bei 470 nm mittels LED belichtet, um die fluoresceinmarkierten Oligonukleotide sichtbar zu machen (vgl. Kap. 4.1, Abb. 94). Abb. 98 stellt die PAGE-Analysen der iEDDA für die Dienophile **COMBO-Rhod** und **BCN-Rhod** dar. In beiden Fällen wurde eine neue DNA Bande oberhalb der Vollängenprodukte sichtbar, die nach Anregung bei 535 nm eine Emission zwischen 595 nm und 615 nm aufwies. Die geringere Mobilität und das beschriebene, optische Verhalten legen nahe, dass das rhodamintragende Konjugationsprodukt entstanden ist. In beiden Fällen ist die Reaktion bereits nach ca. 10 bis 15 min beendet. Der vollständige Umsatz konnte auch nicht durch weiteren Überschuss des Konjugationspartners oder durch Verlängerung der Reaktionszeit erreicht werden.

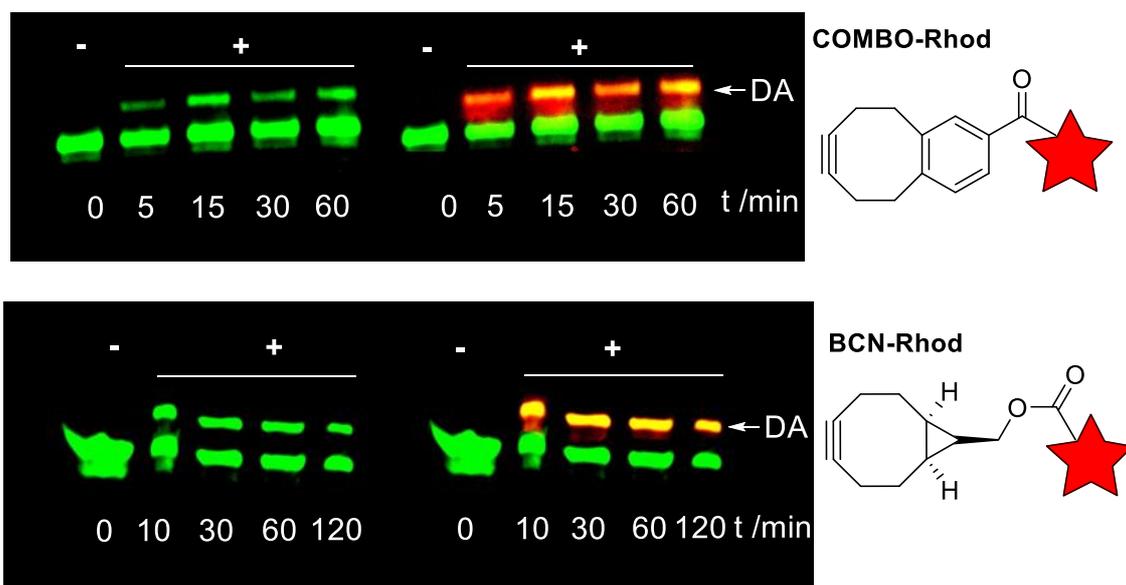


Abb. 98: PAGE-Analyse der postsynthetischen iEDDA; Fluoreszenz des Fluoresceins (links) und zusätzlich rote Fluoreszenz des Rhodamin B. DA kennzeichnet das Diels-Alder-Produkt.

Werden die einzelnen Intensitäten der Fluorescein-Emission in der jeweiligen Spur verglichen und jeweils ins Verhältnis zur Summe beider Intensitäten gesetzt, so kann der Umsatz der Reaktion nahezu quantifiziert werden. Für **COMBO-Rhod** ergibt sich somit eine Ausbeute von 20 bis 25%. Die höhere Aktivität von **BCN-Rhod** spiegelt sich in der leicht erhöhten Ausbeute von 35 bis 40% wieder.

Im Vergleich zu dem zuvor eingebauten tetrazinmodifizierten **Pym-Tet**-Bausteins ließen sich die Ausbeuten der postsynthetischen Modifizierung stark erhöhen. Zum Vergleich sind beide Nukleoside nochmals dargestellt (Abb. 99). Diese Verbesserung kann durch mehrere Faktoren begründet werden. Zum einen ist der Austausch des elektronenziehenden Pyrimidin-Substituenten durch eine Methylgruppe mit der Stabilisierung des Tetrazins verbunden. Gleichzeitig geht der sterische Anspruch verloren, wodurch die Diels-Alder-Reaktion erleichtert wird. Außerdem wird dadurch die Reaktivität gesteigert, wobei hier auch eine Erhöhung durch den Nikotinsäure-rest stattfindet. Da der Umsatz der iEDDA von den eingesetzten Dienophilen abhängt, ist es offensichtlich, dass die Limitierung nicht allein von der Labilität, sondern auch von der geringen Reaktivität der Tetrazine abhängt. Der Einfluss des Linkers auf die Konjugation ist hierbei noch nicht geklärt. Dieser hat jedoch offenbar die nötige Flexibilität, sodass sich der Rest von **5** besser in der großen Furche der DNA einlagern kann, wodurch die iEDDA positiv beeinflusst werden würde. ^[132]

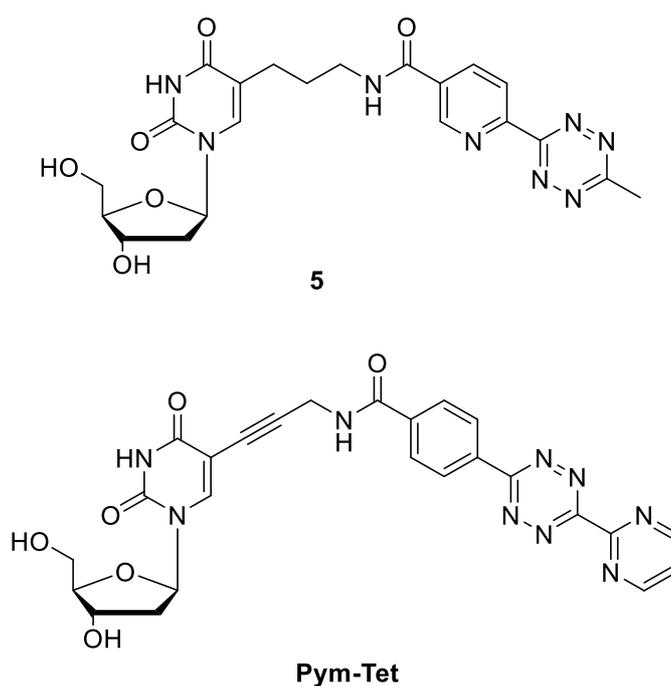


Abb. 99: Darstellung der beiden enzymatisch eingebauten Tetrazinnukleoside **5** und **Pym-Tet**.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz der hohen Instabilität der 1,2,4,5-Tetrazine, insbesondere unter DNA-Synthesebedingungen, konnten das modifizierte Nukleosid **5** und das Nukleosidtriphosphat **49** erfolgreich synthetisiert werden. Desweiteren konnte der Baustein mittels Polymerasen in DNA eingebracht werden. Um die Einbaueffizienz zu optimieren, wurde ein Polymerasenscreening unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Für den Einbau von **49** konnte mit der KOD XL Polymerase der beste Kompromiss zwischen Reaktionsbedingungen und Einbaueffizienz im Vergleich getroffen werden, was elektrophoretisch bestätigt wurde. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden anschließend postsynthetisch über eine iEDDA mit den dienophilmodifizierten Farbstoffen **COMBO-Rhod** und **BCN-Rhod** markiert. Das Reaktionsprodukt konnte ebenfalls elektrophoretisch nachgewiesen werden. Da für beide Dienophile jeweils unterschiedliche Umsätze beobachtet werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass nicht die Instabilität des eingesetzten Tetrazins allein, sondern auch die Reaktivitäten der einzelnen Komponenten zueinander eine wichtige Rolle spielen. Um die Reaktivität des Diens zu erhöhen, gibt es folgende Möglichkeiten: Zum einen können Substituenten den elektronischen Charakter des Diens und somit die Lage der Grenzorbitale beeinflussen und zum anderen ist die Größe bzw. der sterische Anspruch dieser Reste ein nicht zu vernachlässigender Faktor.^[124] Je kleiner diese sind, desto geringer ist die Aktivierungsbarriere. *Hilderbrand et al.* synthetisierten eine Reihe an 1,2,4,5-Tetrazinen, die an einer Seite keine Substituenten aufweisen.^[137]

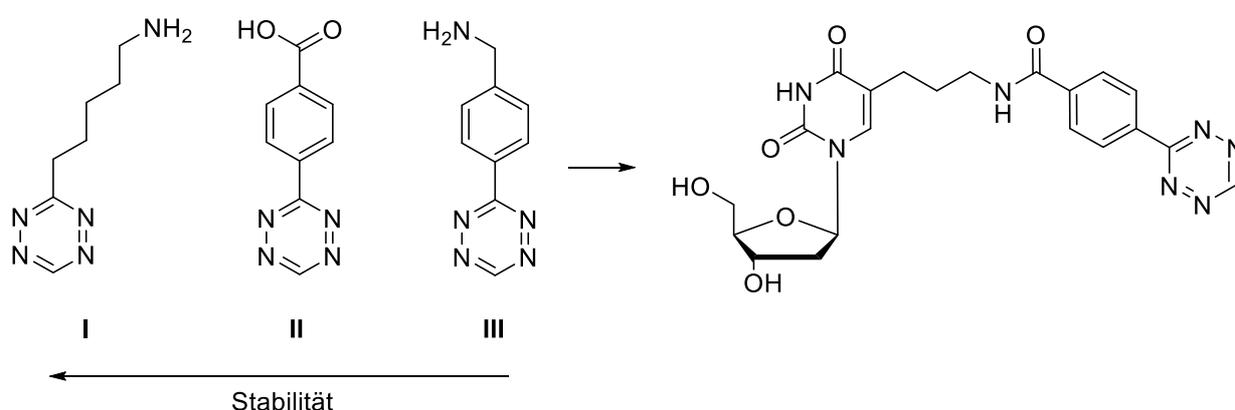


Abb. 100: Vorgeschlagene tetrazinmodifizierte Nukleoside mit erhöhter Reaktivität.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten von **I** und **5** mit TCO als Reaktionspartner sind vergleichbar, während sie für **II** und **III** um das Fünffache ansteigen. Über die

Funktionalisierungen der Tetrazin-Bausteine wäre es möglich, diese ebenfalls an DNA-Bausteine zu knüpfen und anschließend als Triphosphate in DNA einzubringen und postsynthetisch zu untersuchen (Abb. 100).

Eine weitere Möglichkeit bietet bei solch instabilen Systemen die In-situ-Freisetzung der Reaktivität durch gesteuerte Mechanismen. Tetrazine könnten beispielsweise lichtinduziert durch Sensibilisatoren, während der Reaktion erzeugt und anschließend mit dienophilmodifizierten Markern umgesetzt werden.

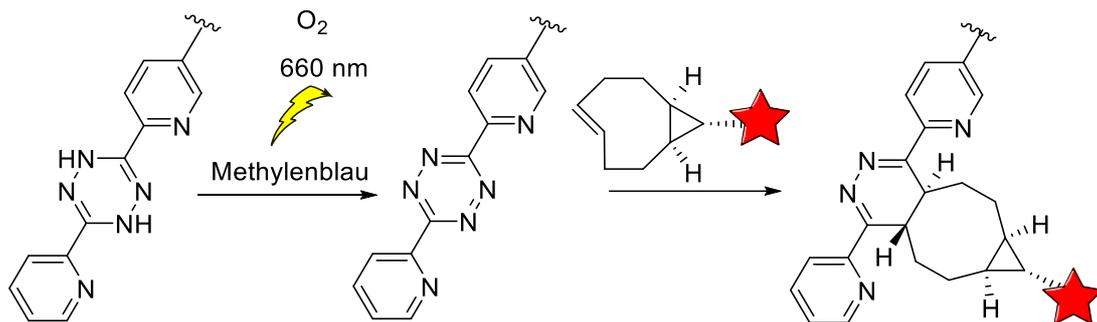


Abb. 101: Lichtinduzierte photokatalytische Oxidation von Dihydrötetrazinen und anschließende iEDDA mit TCO-modifizierten Markern.^[138]

Ein Beispiel hierfür sind die Dihydrötetrazine, die gegenüber Sauerstoff im physiologischen Milieu stabil sind und erst mit Licht durch Katalysatoren wie Methylenblau am gewünschten Ziel zum Tetrazin umgesetzt werden (Abb. 101).^[138] Zwar müssen bei diesen Systemen drei Komponenten zugegeben werden, allerdings würde sich durch geschickte Wahl der Modifikationen der DNA-Bausteine Photokatalyse und bioorthogonale Ligation in DNA kombinieren lassen. Diese beiden Ansätze könnten Möglichkeiten bieten, die Ausbeuten der iEDDA in DNA zu erhöhen.

IV Zusammenfassung

4API und DMAPI als isostere Basensurrogate

In der vorliegenden Arbeit konnten Oligonukleotide mit den beiden Farbstoffen 4-Aminophthalimid (**4API**) und 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid (**DMAPI**) erfolgreich modifiziert werden. Die Absorptionseigenschaften, das ausgeprägte Solvatochromieverhalten, sowie die solvatisierungsabhängigen Fluoreszenzquantenausbeuten machen diesen Baustein besonders interessant für statische und dynamische Beobachtungen von biologischen Mechanismen. Durch die zu den übrigen DNA-Basen passende Größe, Form und dem Vorhandensein von wasserstoffausbildenden Funktionalitäten, lässt sich die Modifizierung selbst als orthogonales, isosteres und fluoreszentes Basensurrogat mit der passenden Gegenbase 2,4-Diaminopyrimidin (**DAPym**) formulieren. Aufgrund der genannten Eigenschaften besitzen die phthalimidbasierten Derivate das Potential, in Bezug auf Struktur und Funktion, biologische Systeme so wenig wie möglich zu beeinflussen. Der synthetische Zugang zu den Oligonukleotiden wurde durch ein teilweise verändertes Schutzgruppenkonzept vereinfacht. Auch wenn die Nebenproduktbildung nicht ganz unterdrückt werden konnte, wurden beide Nukleoside **1** und **2** erfolgreich über die Phosphoramidit-Methode in DNA integriert. Anschließend wurden beide Oligonukleotide zur Untersuchung der ausgebildeten Basenpaarung von **4API** mit den natürlichen sowie des entsprechenden artifiziellen Bausteins optisch charakterisiert und verglichen.

Desweiteren wurden NMR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung dieser durchgeführt. Durch das optische Verhalten konnten in Kombination mit den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie die einzelnen Wechselwirkungsverhältnisse geklärt werden. Durch die in dieser Arbeit gewählte Geometrie der artifiziellen Basen wurden die Basenpaarungseigenschaften für **o-4API** im Vergleich zum bereits bestehenden System (**m-4API**) verbessert. Das Analogon **DMAPI** konnte sich jedoch aufgrund der veränderten Konformation als geeignetes Basensurrogat nicht durchsetzen. Das Phänomen des lichtinduzierten Fluoreszenzanstiegs lässt aber Anhaltspunkte dafür offen, die photophysikalischen Mechanismen dieser Verbindungsklasse besser zu verstehen.

Der biochemische Aspekt dieser Arbeit umfasste den enzymatischen Einbau der artifiziellen **4API**-Bausteine mittels DNA-Polymerasen. Aufgrund des passenden Wasserstoffbrückenmusters zu **DAPym** wurde dieses System als potentiell drittes DNA-Basenpaar getestet. Dazu wurden die Nucleosidtriphosphate von **2** und **3** erfolgreich synthetisiert und in Primerverlängerungsexperimenten als mögliche Substrate untersucht. Die Einbaurate und -effizienz war zwar nicht mit denen der natürlichen Bausteine zu vergleichen, allerdings wurden die beiden **4API**-Derivate durch tolerante Polymerasen wie der Terminator I als Gegenbase zu **DAPym** erkannt und eingebaut. Bei einer genaueren Untersuchung mit selektiven Polymerasen konnte sich die **m-4API** Geometrie gegenüber **o-4API** durchsetzen. Trotz der teilweise strukturellen Unterschiede zu den natürlichen Bausteinen konnten die artifiziellen Bausteine enzymatisch in Oligonukleotide eingebracht werden und konnten durch ihr Fluoreszenzverhalten als intakt identifiziert werden.

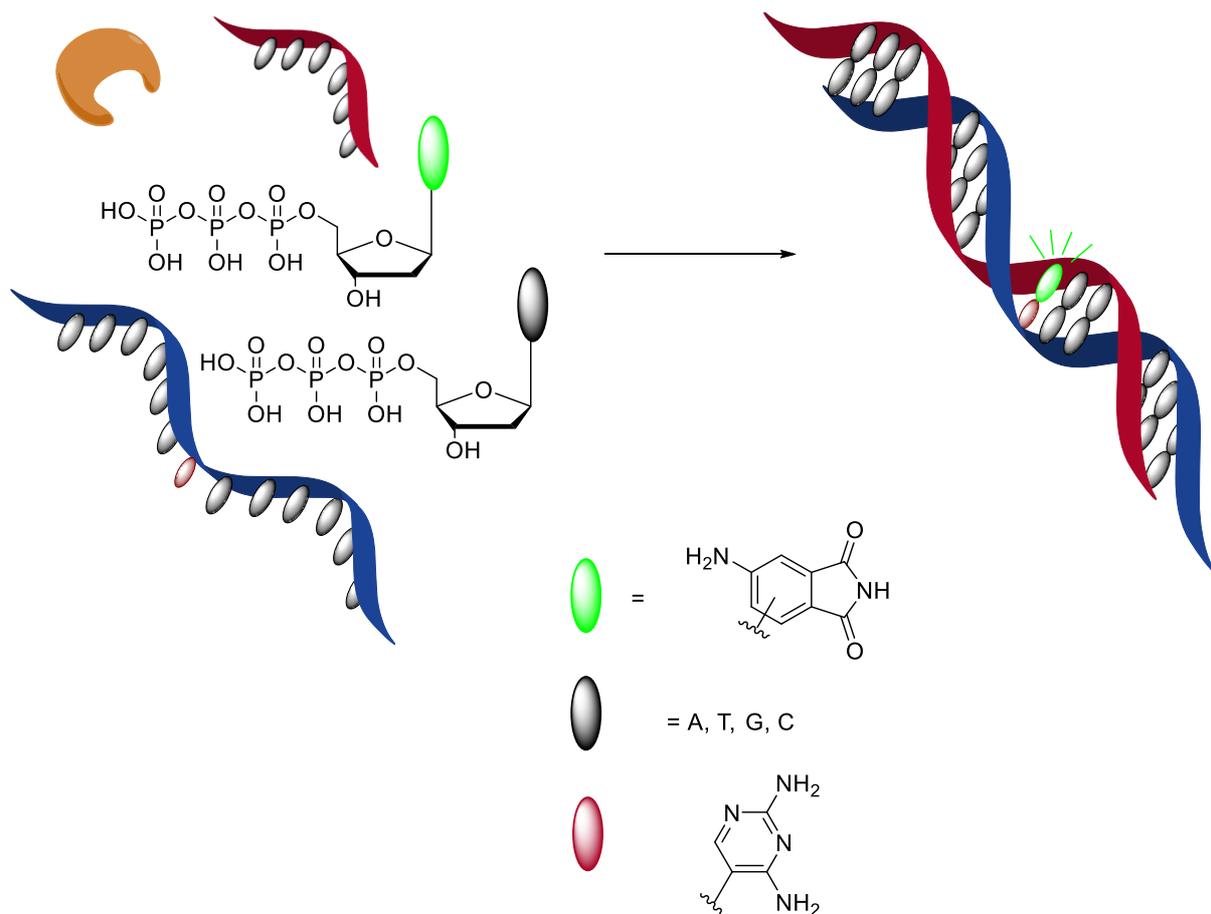


Abb. 102: Schematische Darstellung der Primerverlängerung mit den artifiziellen Basen **4API** und **DAPym**.

Postsynthetische Diels-Alder Reaktion an Nukleinsäuren

Für die Anwendung bioorthogonaler Diels-Alder-Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf wurden tetrazinmodifizierte Nukleosidtriphosphate synthetisiert und mittels DNA-Polymerasen erfolgreich in Oligonukleotide eingebracht. Dabei wurde der artifizielle Baustein **49** durch gängige Polymerasen erkannt. Um die Reaktion so mild wie möglich durchzuführen, wurde die KOD XL Polymerase ausgewählt, da für diese geringere Reaktionstemperaturen ausreichen. Durch die anschließende Ligation mit dienophilmodifizierten Farbstoffen konnte das Prinzip der postsynthetischen Markierung mittels dieser Verbindungsklassen aufgezeigt werden. Trotz der Instabilität der 1,2,4,5-Tetrazine konnten diese in DNA als intakt identifiziert werden, woraus Umsätze mit **BCN**-Derivaten von bis zu 40% und mit **COMBO**-Derivaten von bis zu 30% erreicht wurden.

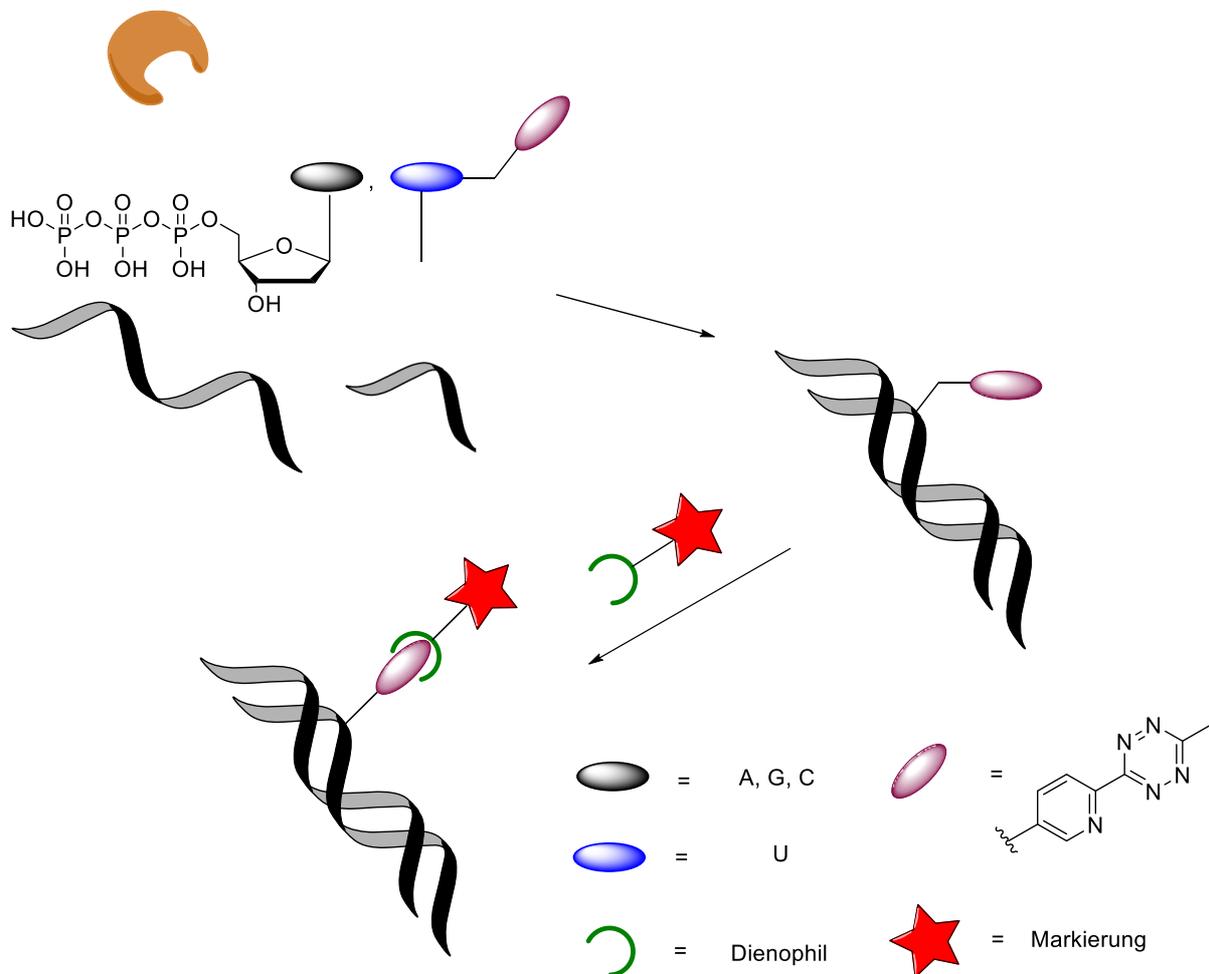
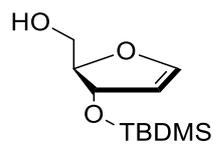


Abb. 103: Schematische Darstellung der Primerverlängerung und anschließende postsynthetische Markierung.

V Experimentalteil

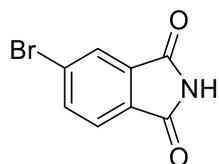
1 Synthesevorschriften 4API-Projekt

Synthese von ((2R,3S)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,3-dihydrofuran-2-yl)methanol (17) erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[70]



C₁₁H₂₂O₃Si
230,38 g/mol

Synthese von 4-Bromphthalimid (**8**)



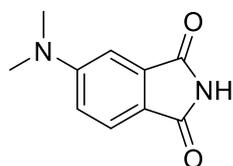
$C_8H_4BrNO_2$
MW: 226,03 g/mol

5.68 g (22.2 mmol) 4-Bromphthalsäureanhydrid und 1.50 g (22.2 mmol) Harnstoff wurden zusammen feingepulvert und in einem Rundkolben auf 140 °C erhitzt. Nach Beendigung der Gasentwicklung (ca. 20 min) wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Rohprodukt in 25 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 60 mL Wasser wurde der ausgefallene Feststoff abgesaugt, mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 4,89 g (21,6 mmol, 87%) **8** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.75$ (*n*-Hexan/EE 1:1).

Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[68]

Synthese von 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid (**9**)



$C_{10}H_{10}N_2O_2$
MW: 190,20 g/mol

Syntheseweg 1:

Es wurden 1.00 g (6.17 mmol) 4-Aminophthalimid in 20 mL DMF gelöst. Anschließend wurden 4.66 mL (61.6 mmol) einer 37%igen wässrigen Formaldehydlösung zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 1.60 g (12.3 mmol) Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 130 mL Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 2 M Salzsäure auf pH = 2-3 angesäuert und über Nacht stehen gelassen. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Die Waschlösung wurde drei Mal mit je 100 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit dem Feststoff vereinigt und in 50 mL *o*Xylol suspendiert. Die Mischung wurde über Nacht unter Rückfluss gekocht und das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 900 mg (4.74 mmol, 77%) **9** als gelber Feststoff erhalten.

Syntheseweg 2:

250 mg (1.13 mmol) **8**, 50.6 mg (0.06 mmol) Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) und 52.7 mg (0.11 mmol) XPhos wurden im ausgeheizten Bördelglas unter Ar-Atmosphäre vorgelegt. Anschließend wurden 1.11 mL (2.21 mmol) einer Dimethylaminlösung (2 M in THF) und 2.21 mL (2.21 mmol) einer LiHMDS Lösung (1 M in THF) zugegeben und für 24 h auf 65 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 30 mL einer gesättigten Ammoniumchloridlösung gegeben und drei Mal mit je 50 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde

mittels FC (*n*-Hexan/EE 3:2) aufgereinigt. Es wurden 110 mg (0.57 mmol, 52%) **9** als gelber Feststoff erhalten.

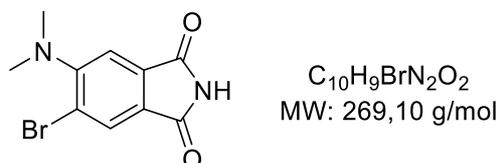
$R_f = 0.49$ (*n*-Hexan/EE 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 10.81 (s, 1H, NH), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6), 6.96 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-3), 6.92 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H, H-5), 3.07 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.64, 169.30, 154.22, 135.16, 124.23, 117.70, 115.00, 104.81, 40.00.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 191.0815; gefunden $[\text{M}+\text{H}]^+$: 191.0817.

Synthese von 4-Brom-5-(*N,N*-dimethylamino)phthalimid (**10**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 350 mg (1.84 mmol) **9** unter Ar-Atmosphäre in 20 mL DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 360 mg (2.02 mmol) NBS zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C und dann 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde vorsichtig durch Zugabe von 100 mL Wasser (unter Kühlung) abgestoppt und drei Mal mit je 50 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und anschließend mit einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FC (*n*-Hexan/Aceton 5:1) aufgereinigt. Es wurden 410 mg (1.52 mmol, 83%) **10** als hellgelber Feststoff erhalten.

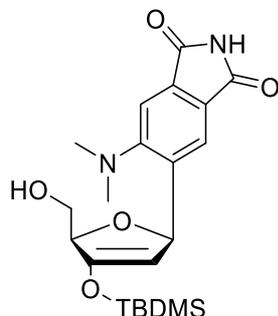
$R_f = 0.70$ (*n*-Hexan/EE 1:1).

1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.23 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, Aryl-H), 7.41 (s, 1H, Aryl-H), 2.88 (s, 6H, CH_3).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm) = 168.60, 167.82, 156.76, 133.28, 128.59, 125.87, 121.51, 113.99, 43.27.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für $C_{10}H_{10}BrN_2O_2$ $[M+H]^+$: 268.9920; gefunden $[M+H]^+$: 268.9919.

Synthese von ((2R,5R)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(4-(dimethylamino)-phthalimid-5-yl)-2,5-dihydrofuran-2-yl)methanol (**18**)



$C_{21}H_{30}N_2O_5Si$
MW: 418,57 g/mol

Es wurden 550 mg (2.04 mmol) **10**, 94 mg (0.10 mmol) Tris(dibenzyliden-aceton)dipalladium(0) und 59.3 mg (0.20 mmol) Triter~~t~~butylphosphonium-tetrafluoroborat in einem ausgeheizten Bördelglas vorgelegt und unter Ar-Atmosphäre in 4.5 mL Dioxan gelöst. Danach wurden 706 mg (3.07 mmol) **17** und 0.87 mL (4.09 mmol) Dicyclohexylmethylamin zugegeben eine Stunde bei 75 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels FC (*n*-Hexan/EE 5:1 → 2:1) aufgereinigt. Es wurden 595 mg (1.42 mmol, 70%) **18** als gelber Feststoff erhalten.

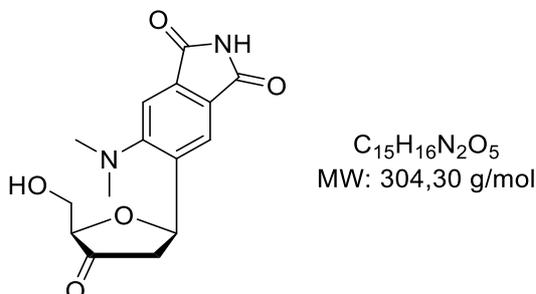
$R_f = 0.70$ (*n*-Hexan/EE 2:3).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.08 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, Aryl-H), 7.35 (s, 1H, Aryl-H), 6.05 (dd, $J = 3.9, 1.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.94 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-2'), 4.81 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, OH), 4.49 (dp, $J = 4.5, 2.3$ Hz, 1H, H-4'), 3.64 (ddd, $J = 11.8, 4.9, 2.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.52 (dt, $J = 11.7, 4.7$ Hz, 1H, H-5'), 2.84 (s, 6H, (CH₃)₂N), 0.93 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.23 (s, 3H, CH₃Si), 0.22 (s, 3H, CH₃Si).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.13, 169.05, 157.66, 151.81, 141.04, 133.09, 128.31, 125.11, 112.14, 101.70, 83.44, 78.29, 61.93, 44.72, 25.45, 17.77, -5.02, -5.13.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für C₂₁H₃₁N₂O₂Si [M+H]⁺: 419.1997; gefunden [M+H]⁺: 419.1998.

Synthese von 1'-(4-*N,N*-dimethylaminophthalimid-5-yl)-1',2',3'-tridesoxy-3'-oxo- β -D-ribofuranose (**19**)



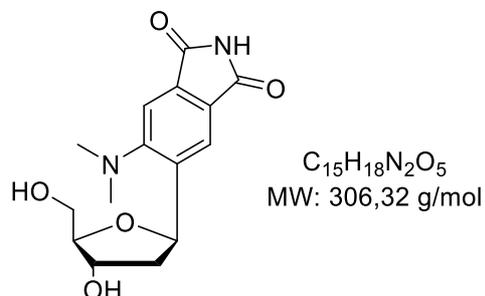
In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 120 mg (0.29 mmol) **18** in 1.8 mL trockenem THF gelöst und 93 μ L (0.57 mmol) Et₃N·3HF hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde über eine kurze Kieselgelfiltersäule entsalzt, mit EE eluiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels FC (DCM/Aceton 10:1) aufgereinigt. Es wurden 80 mg (0.26 mmol, 90%) **19** als gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0.31$ (*n*-Hexan/EE 2:3).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.14 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, Aryl-H), 7.45 (s, 1H, Aryl-H), 5.60 (dd, $J = 10.8, 5.7$ Hz, 1H, H-1'), 5.09 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, OH), 4.03 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-4'), 3.71 (t, $J = 3.6$ Hz, 2H, H-5'), 2.97 (dd, $J = 17.7, 5.7$ Hz, 1H, H-2'), 2.78 (s, 6H, CH₃), 2.44 (dd, $J = 17.8, 10.9$ Hz, 1H, H-2').

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 214.02 (C=O), 169.06 (C=O), 168.99 (C=O), 157.77, 140.30, 133.24, 125.78, 123.38, 112.84, 82.40, 71.71, 60.42, 44.81, 44.72.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für C₁₅H₁₇N₂O₅ [M+H]⁺: 305.1132; gefunden [M+H]⁺: 305.1132.

Synthese von 1'-(4-*N,N*-dimethylaminophthalimid-5-yl)-1',2'-dideoxy- β -D-ribofuranose (**1**)

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 200 mg (0.66 mmol) **19** in 18 mL in MeCN/AcOH (5:1) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 279 mg (1.31 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid zugegeben und die Reaktion bei 0 °C für 30 min weitergerührt. Durch Zugabe von 4.0 mL 50% EtOH wurde die Reaktion gestoppt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels FC (DCM/MeOH 15:1) aufgereinigt. Es wurden 192 mg (0.63 mmol, 95%) **1** als gelber Feststoff erhalten.

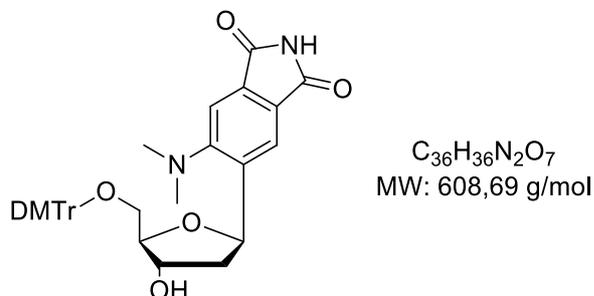
$R_f = 0.20$ (DCM/MeOH 7:1)

1H -NMR (500 MHz, DMSO) $\delta = 11.08$ (s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, Aryl-H), 7.41 (s, 1H, Aryl-H), 5.39 (dd, $J = 10.4, 5.2$ Hz, 1H, H-1'), 5.13 (s, 1H, OH-3'), 4.86 (s, 1H, OH-5'), 4.25 (dt, $J = 5.9, 2.1$ Hz, 1H, H-3'), 3.77 (td, $J = 4.7, 2.4$ Hz, 1H, H-4'), 3.53 (m, 2H, H-5'), 2.76 (s, 6H, CH_3), 2.18 (ddd, $J = 12.7, 5.3, 1.8$ Hz, 1H, H-2'), 1.87 (ddd, $J = 12.7, 10.5, 5.9$ Hz, 1H, H-2').

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.18, 169.15, 157.56, 141.81, 132.80, 125.88, 122.92, 112.92, 87.66, 74.38, 72.59, 62.23, 44.72, 43.14.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für $C_{15}H_{19}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 307.1288; gefunden $[M+H]^+$: 307.1287.

Synthese von 1'-(4-*N,N*-dimethylaminophthalimid-5-yl)-5'-O-(dimethoxytrityl)-1',2'-dideoxy- β -D-ribofuranose (**20**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 100 mg (0.33 mmol) **1** in 8.0 mL trockenem Pyridin gelöst und 125 mg (0.34 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid zugegeben. Nach 7 h wurden 48 μ L Et₃N und weitere 125 mg (0.34) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid zugegeben und die Reaktion für 20 h bei 30 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt mittels FC (*n*-Hexan/EE 1:1 + 0.1% Et₃N) aufgereinigt. Es wurden 139 mg (0.23 mmol, 69%) **20** als gelber Feststoff erhalten.

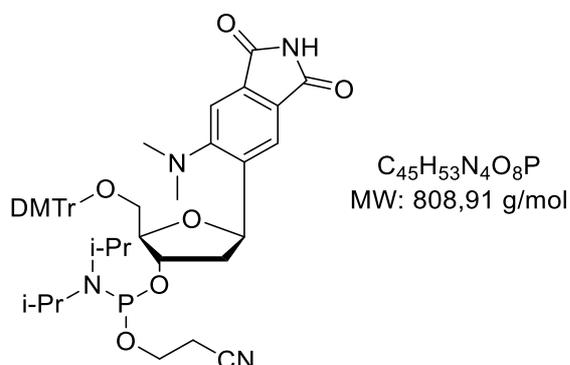
$R_f = 0.29$ (*n*-Hexan/EE 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.11 (s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, Aryl-H), 7.47 (s, 1H, Aryl-H), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.35 – 7.27 (m, 6H, Aryl-H), 7.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Aryl-H), 6.91 (dd, $J = 9.0, 3.2$ Hz, 4H, Aryl-H), 5.43 (dd, $J = 10.2, 5.4$ Hz, 1H, H-1'), 5.18 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, OH-3'), 4.14 (dd, $J = 5.9, 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 3.91 (dt, $J = 6.4, 3.3$ Hz, 1H, H-4'), 3.21 (dd, $J = 10.0, 6.1$ Hz, 1H, H-5'), 3.13 (dd, $J = 10.0, 3.3$ Hz, 1H, H-5'), 2.79 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.28 (ddd, $J = 12.9, 5.5, 1.9$ Hz, 1H, H-2'), 1.88 (ddd, $J = 12.8, 10.2, 6.4$ Hz, 1H, H-2').

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.08 (C=O), 169.03(C=O), 158.04, 158.03, 157.44, 149.59, 145.02, 141.63, 136.09, 135.62, 135.56, 132.86, 129.74, 129.64, 127.80, 127.68, 126.58, 125.98, 123.87, 122.01, 113.20, 113.17, 85.81, 85.36, 74.81, 72.45, 64.39, 54.99, 44.55, 43.06.

HR-MS (ESI): m/z berechnet für $C_{36}H_{36}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: 631.2421; gefunden $[M+Na]^+$: 631.2407.

Synthese von 1'-(4-*N,N*-dimethylaminophthalimid-5-yl)-3'-O-[(2-cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphanyl]-5'-O-(dimethoxytrityl)-1',2'-dideoxy- β -D-ribofuranose (**21**)

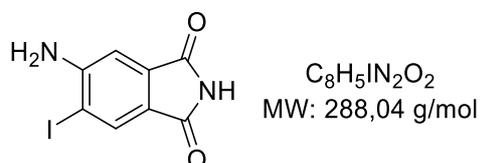


In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 50 mg (0.08 mmol) **20** in 4.8 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 51 μ L (0.30 mmol) DIPEA und anschließend 27 μ L (0.12 mmol) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid zugegeben. Die Reaktion wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden weitere 27 μ L (0.12 mmol) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid zugegeben und nochmals 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt auf eine Kieselgel-Säule überführt und mittels FC (DCM/Aceton 15:1 + 0.1% Et₃N) aufgereinigt. Es wurden 56 mg (0.07 mmol, 84%) **21** als gelber Feststoff erhalten

$R_f = 0.44; 0.36$ (*n*-Hexan/EE 2:1).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO) δ (ppm) = 147.07, 146,79.

MALDI-MS: m/z berechnet: 809.4 [M+H]⁺; gefunden: 809.5 [M+H]⁺.

Synthese von 4-Amino-5-iodphthalimid (**11**)

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 1.00 g (6.16 mmol) 4-Aminophthalimid und 2.78 g (12.3 mmol) NIS in 20 mL DMF gelöst und über Nacht bei 45 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 80 mL Wasser gestoppt und anschließend der Feststoff abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit Wasser, einer gesättigten Natriumsulfidlösung und nochmals mit Wasser gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 1.42 g (4.93 mmol, 80%) **11** als senffarbener Feststoff erhalten.

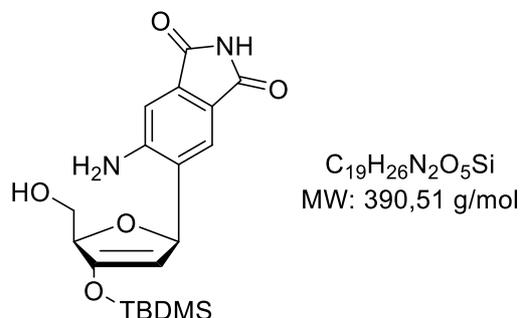
$R_f = 0.33$ (*n*-Hexan/Et₂O 1:2).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 10.90 (s, 1H, Imid-NH), 7.92 (s, 1H, Aryl-H), 7.02 (s, 1H, Aryl-H), 6.46 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.14, 168.01, 153.97, 134.93, 133.91, 119.88, 106.66, 86.52.

HR-MS (EI): m/z berechnet für $C_8H_5IN_2O_2$ [M]⁺: 287.9390; gefunden [M]⁺: 287.9389.

Synthese von ((2R,5R)-5-(4-Aminophthalimid-5-yl)-3-((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-2,5-dihydrofuran-2-yl)methanol (**22**)



Es wurden 200 mg (0.69 mmol) **11**, 32 mg (0.03 mmol) Tris(dibenzyliden-aceton)dipalladium(0) und 20 mg (0.07 mmol) Tri-*t*-butylphosphoniumtetrafluoroborat in einem ausgeheizten Bördelglas vorgelegt und unter Ar-Atmosphäre in 2.0 mL Dioxan gelöst. Danach wurden 240 mg (1.04 mmol) **17** und 295 μ L (1.39 mmol) Dicyclohexylmethylamin zugegeben und über Nacht auf 75 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels FC (*n*-Hexan/EE 1:1 \rightarrow EE) aufgereinigt. Es wurden 176 mg (0.45 mmol, 65%) **22** als gelber Feststoff erhalten.

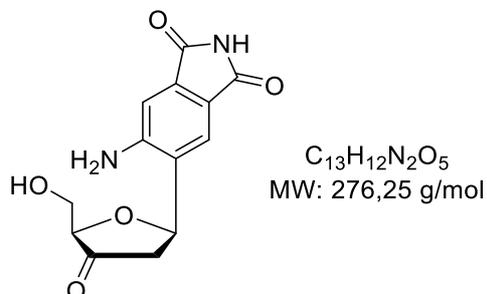
$R_f = 0.56$ (*n*-Hexan/EE 2:3).

1H -NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) = 10.71 (s, 1H, NH), 7.59 (s, 1H, Aryl-H), 6.93 (s, 1H, Aryl-H), 6.43 (s, 2H, NH_2), 5.77 (dd, $J = 4.3, 1.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.97 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-2'), 4.94 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, OH-5'), 4.48 (dp, $J = 4.3, 2.1$ Hz, 1H, H-4'), 3.65 (ddd, $J = 11.5, 4.4, 1.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.50 (dt, $J = 11.6, 4.4$ Hz, 1H, H-5'), 0.92 (s, 9H, $(CH_3)_3C$), 0.22 (s, 3H, CH_3), 0.21 (s, 3H, CH_3).

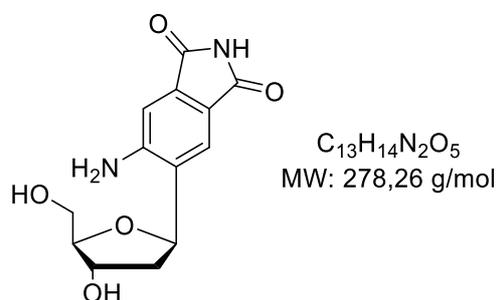
^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.55, 169.40, 152.46, 151.28, 134.31, 128.21, 123.67, 117.78, 108.17, 100.34, 83.22, 80.78, 61.67, 25.43, 17.74, -5.00, -5.17.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für $C_{19}H_{27}N_2O_5Si$ $[M+H]^+$: 391.1684; gefunden $[M+H]^+$: 391.1683.

Synthese von 1'-(4-Aminophthalimid-5-yl)-1',2',3'-dideoxy-3'-oxo- β -D-ribofuranose
(23)



Im ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 176 mg (0.45 mmol) **22** in 3.0 mL trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 150 μ L $Et_3N \cdot 3HF$ (0.92 mmol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde über eine kurze Kieselgelfiltersäule entsalzt, mit MeOH eluiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (enthält 125 mg **23**) wurde ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Synthese von 1'-(4-Aminophthalimid-5-yl)-1',2'-dideoxy-β-D-ribofuranose (**2**)

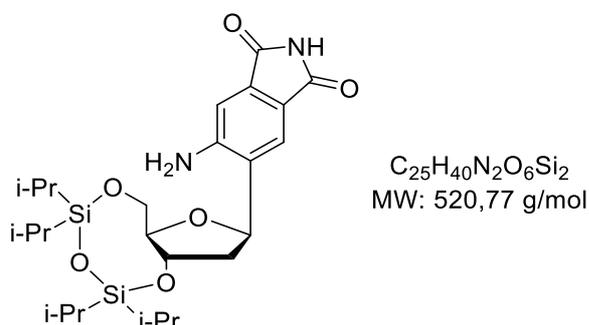
In einem ausgeheizten Rundkolben wurde unter Ar-Atmosphäre das Rohprodukt von **23** (enthält 125 mg, 0.45 mmol) in 12 mL einer Mischung aus AcOH/MeCN (3:1) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 144 mg (0.68 mmol) Natriumtriacetoxybothydrid zugegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit 6.0 mL einer Mischung aus EtOH/H₂O (1:1) gestoppt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde über *Reversed-Phase* Chromatographie mit einer C18-Säule aufgereinigt (Gradient: H₂O → H₂O/MeCN 5:1). Es wurden 109 mg (0.39 mmol, 87%) **2** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 10.71 (s, 1H, Imid-NH), 7.53 (s, 1H, Aryl-H), 6.94 (s, 1H, Aryl-H), 6.32 (s, 2H, NH₂), 5.11 – 5.07 (m, 2H, H-1', OH-3'), 5.00 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH-5'), 4.22 (dq, *J* = 5.7, 2.7 Hz, 1H, H-3'), 3.78 (q, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-4'), 3.60 – 3.51 (m, 2H, H-5'), 2.08 (ddd, *J* = 12.7, 5.8, 2.0 Hz, 1H, H-2'), 1.92 (ddd, *J* = 12.6, 10.2, 6.4 Hz, 1H, H-2').

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.58, 169.43, 151.88, 133.98, 128.07, 122.40, 118.06, 108.09, 87.69, 77.44, 71.91, 61.51.

HR-MS (FAB): *m/z* berechnet für C₁₃H₁₅N₂O₅ [M+H]⁺: 279.0975; gefunden [M+H]⁺: 297.0976.

Synthese von 1'-(4-Aminophthalimid-5-yl)-3',5'-O-(1'',1'',3'',3''-tetra(*iso*-propyl)-disiloxan-1'',3''-diyl)-1',2'-dideoxy- β -D-ribofuranose (**24**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 400 mg (1.45 mmol) **2** in 5.0 mL trockenem Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Danach wurden 510 μ L (1.59 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan langsam zugetropft und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels FC (*n*-Hexan/EE 2:1) aufgereinigt. Es wurden 650 mg (1.25 mmol, 86%) **24** als gelber Feststoff erhalten.

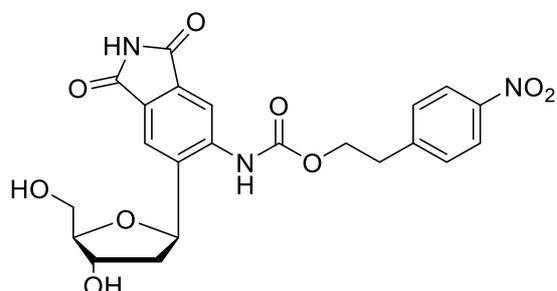
$R_f = 0.38$ (*n*-Hexan/EE 1:1).

1H -NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 10.70 (s, 1H, Imid-NH), 7.61 (s, 1H, Aryl-H), 6.96 (s, 1H, Aryl-H), 6.16 (s, 2H, NH_2), 5.09 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-1'), 4.40 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-3'), 4.07 – 3.97 (m, 2H, H-5'), 3.72 (dt, $J = 7.7, 4.1$ Hz, 1H, H-4'), 2.43 (dt, $J = 12.3, 7.6$ Hz, 1H, H-2'), 1.97 (dt, $J = 12.9, 6.9$ Hz, 1H, H-2'), 1.14 – 0.94 (m, 28H, *i*-Pr).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 169.54, 169.31, 150.85, 133.80, 129.54, 120.92, 118.28, 107.86, 84.40, 73.70, 71.38, 61.82, 17.41, 17.25, 17.17, 17.13, 17.02, 16.91, 16.90, 12.82, 12.61, 12.08, 11.97.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für $C_{25}H_{41}O_6N_2Si_2$ $[M+H]^+$: 521.2498; gefunden $[M+H]^+$: 521.2498.

Synthese von 1'-(4-N-(4-Nitrophenethoxycarbonyl)aminophthalimid-5-yl)-1',2'-dideoxy-β-D-ribofuranose (**26**)



$C_{22}H_{21}N_3O_9$
MW: 471,42 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 400 mg (0.77 mmol) **24** in 2.5 mL trockenem Chloroform gelöst und auf 0 °C gekühlt. Danach wurden 100 mg (0.34 mmol) Triphosgen, gelöst in 300 µL Chloroform, zugegeben und bei 0 °C für eine Stunde gerührt. Im Anschluss wurden 141 mg (0.84 mmol) *p*-Nitrophenethylalkohol zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gestoppt und drei Mal mit je 100 mL Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und anschließend in 5.0 mL trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 1.62 mL (1.62 mmol) TBAF (1 M in THF) zugegeben und für 15 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde über eine kurze Kieselgelfiltersäule entsalzt, mit MeOH eluiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels FC (DCM/MeOH 30:1) aufgereinigt. Es wurden 107 mg (0.23 mmol, 30%) **26** als weißer Feststoff erhalten.

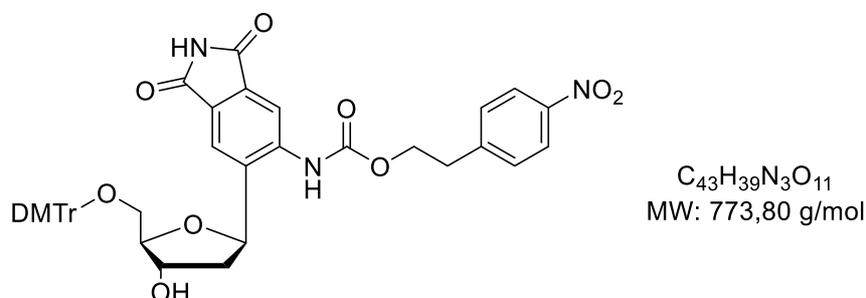
$R_f = 0.36$ (DCM/MeOH 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.25 (s, 1H, Imid-NH), 9.38 (s, 1H, Amid-NH), 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Aryl-H), 7.90 (s, 1H, Aryl-H), 7.86 (s, 1H, Aryl-H), 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Aryl-H), 5.34 (dd, J = 10.4, 5.6 Hz, 1H, H-1'), 5.19 (d, J = 3.8 Hz, 1H, OH-3'), 4.92 (t, J = 5.2 Hz, 1H, OH-5'), 4.41 (t, J = 6.5 Hz, 2H, O-CH₂), 4.21 (qt, J = 4.5, 2.8, 2.4 Hz, 1H, H-3'), 3.83 (td, J = 4.5, 2.4 Hz, 1H, H-4'), 3.53 (h, J = 6.4 Hz, 2H, H-5'), 3.12 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 2.18 (ddd, J = 12.3, 2.5 Hz, 1H, H-2'), 1.72 (ddd, J = 12.6, 10.4, 6.1 Hz, 1H, H-2').

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 168.79, 168.74, 153.85, 146.60, 146.29, 140.57, 132.25, 130.30, 128.32, 123.43, 121.68, 88.00, 76.04, 72.06, 64.66, 61.85, 41.67, 34.43.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für C₂₂H₂₂N₃O₉ [M+H]⁺: 472.1351; gefunden [M+H]⁺: 472.1349.

Synthese von 1'-(4-N-(4-Nitrophenethoxycarbonyl)aminophthalimid-5-yl)-5'-O-(dimethoxytrityl)-1',2'-dideoxy- β -D-ribofuranose (**27**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 60 mg (0.13 mmol) **26** in 3.0 mL trockenem Pyridin gelöst und 52 mg (0.15 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid zugegeben. Nach 90 min wurden 19 μ L Et_3N zugegeben und die Reaktion für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit 2.0 ml MeOH abgestoppt und das Lösemittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FC (*n*-Hexan/EE 2:3 + 0.1% Et_3N) aufgereinigt. Es wurden 44 mg (0.06 mmol, 45%) **27** als weißer Feststoff erhalten.

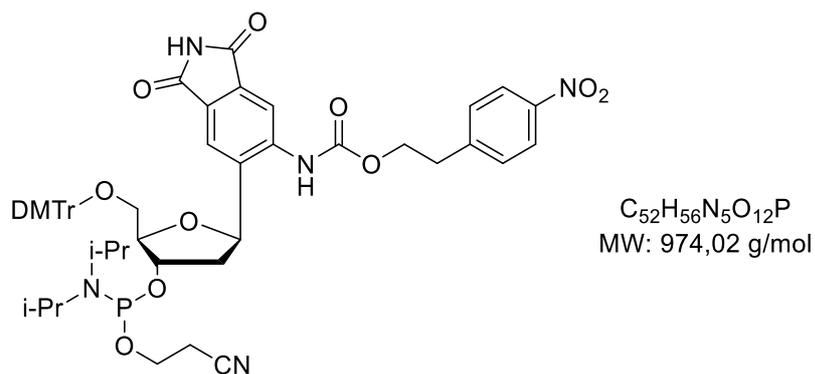
$R_f = 0.34$ (*n*-Hexan/EE 2:3).

1H -NMR (500 MHz, DMSO) $\delta = 11.27$ (s, 1H, Imid-NH), 9.39 (s, 1H, Amid-NH), 8.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.96 (s, 1H, Aryl-H), 7.83 (s, 1H, Aryl-H), 7.58 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.40 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.32 – 7.26 (m, 6H, Aryl-H), 7.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Aryl-H), 6.92 – 6.88 (m, 4H, Aryl-H), 5.42 (dd, $J = 9.9, 5.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.24 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, OH-3'), 4.42 (td, $J = 6.3, 2.1$ Hz, 2H, CH_2), 4.11 (dd, $J = 5.4, 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 3.97 (dt, $J = 6.0, 3.3$ Hz, 1H, H-4'), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 4H, OCH_3), 3.21 – 3.11 (m, 2H, H-5'), 3.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, O- CH_2), 2.29 (ddd, $J = 12.6, 5.7, 1.9$ Hz, 1H, H-2'), 1.74 (ddd, $J = 12.7, 10.0, 6.5$ Hz, 1H, H-2').

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO) $\delta = 168.75, 168.65, 158.03, 153.90, 146.51, 146.26, 144.92, 140.24, 135.54, 135.49, 132.14, 130.23, 129.70, 129.61, 128.52, 127.77, 127.64, 126.59, 123.39, 120.54, 113.17, 113.14, 86.07, 85.38, 75.35, 72.17, 64.59, 64.30, 54.99, 41.73, 34.43.$

HR-MS (ESI): m/z berechnet für $C_{43}H_{39}N_3O_{11}Na$ $[M+Na]^+$: 796.2483; gefunden $[M+Na]^+$: 796.2475.

Synthese von 1'-(4-*N*-(4-Nitrophenethoxycarbonyl)aminophthalimid-5-yl)-3'-O-[(2-cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphanyl]-5'-O-(dimethoxytrityl)-1',2'-dideoxy-β-D-ribofuranose (**28**)

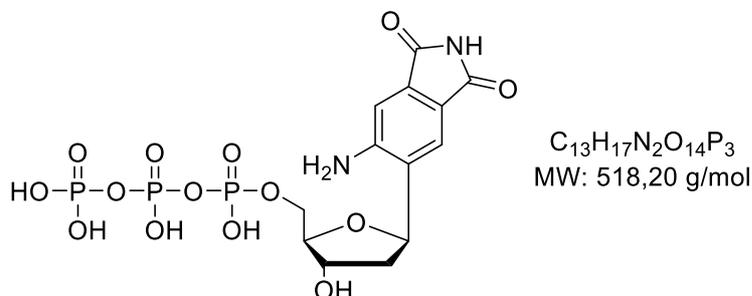


In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Ar-Atmosphäre 30 mg (0.04 mmol) **27** in 2.3 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 40 µL (0.23 mmol) DIPEA und anschließend 17 µL (0.06 mmol) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid zugegeben. Die Reaktion wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden weitere 17 µL (0.06 mmol) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphanylchlorid zugegeben und nochmals 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt auf eine Kieselgel-Säule überführt und mittels FC (DCM/Aceton 5:1 + 0.1% Et₃N) gereinigt. Es wurden 26 mg (0.02 mmol, 57%) **28** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f = 0.83; 0.67$ (DCM:Aceton 5:1).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO) δ(ppm) = 147.22, 146.85.

MALDI-MS: *m/z* berechnet: 972.4 [M-H]⁻; gefunden: 967.5 [M-H]⁻.

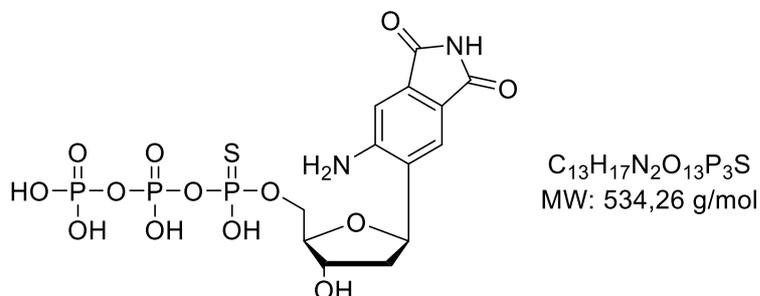
Synthese von 1'-(4-Aminophthalimid-5-yl)-1',2'-dideoxy-β-D-ribofuranosetriphosphat
(45)

Trimethylphosphat (TMP) und Tri-*n*-butylamin wurden über Molsieb über Nacht getrocknet. In einem ausgeheizten Kolben mit aufgesetztem Septum und Kanüle wurden 7 mg (25.2 μmol) **2** und 8 mg (37.7 μmol) fein gepulverter (mörsern!) Protonenschwamm über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Komponenten unter Argon in 300 μL TMP gelöst und auf -15 °C gekühlt. Danach wurden schnell unter starkem Rühren 2.2 μL (23.9 μmol) Phosphorylchlorid zugegeben. In einem separaten, ausgeheizten Kolben wurden 83 mg (151 μmol) Bis(tributylammonium)pyrophosphat für 1 h getrocknet und anschließend in 300 μL DMF und 26 μL (109 μmol) Tri-*n*-butylamin gelöst und diese Lösung zur Reaktionslösung gegeben. Das Eisbad wurde nach der Zugabe entfernt. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung in 6.0 mL einer 0.1 M TEAB Puffer-Lösung (pH = 6.8) über 40 min lang zugetropft. Die Lösung wurde für weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels HPLC (Laufmittel A: 50 mM TEAB, pH = 7.2, Laufmittel B: MeCN; Gradient: 0-17% B in 60 min) aufgereingt. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt (1.26 μmol, 5%).

$$\epsilon_{\max}(260 \text{ nm}) = 22678 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

MALDI-MS: *m/z* berechnet: 517.0 [M-H]⁻; gefunden: 514.5 [M-H]⁻.

Synthese von 1-(4-Aminophthalimid-5-yl)-1,2-dideoxy- β -D-ribofuranose- α -thiotriphosphat (**47L/R**)

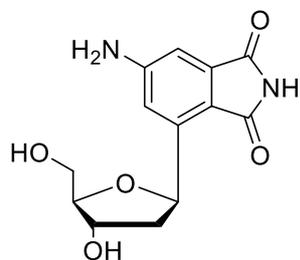


Trimethylphosphat (TMP) und Tri-*n*-butylamin wurden über Molsieb über Nacht getrocknet. In einem ausgeheizten Kolben mit aufgesetztem Septum und Kanüle wurden 7 mg (25.2 μ mol) **2** und 11 mg (50.3 μ mol) fein gepulverter (mörsern!) Protonenschwamm über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Komponenten unter Argon in 200 μ L TMP gelöst und auf -15 °C gekühlt. Danach wurden schnell unter starkem Rühren 3.2 μ L (31.4 μ mol) Thiophosphorylchlorid zugegeben. In einem separaten, ausgeheizten Kolben wurden 83 mg (151 μ mol) Bis(tributylammonium)pyrophosphat für 1 h getrocknet und anschließend in 220 μ L DMF und 24 μ L (101 μ mol) Tri-*n*-butylamin gelöst und diese Lösung zur Reaktionslösung gegeben. Das Eisbad wurde nach der Zugabe entfernt. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung in 6.0 mL einer 0.1 M TEAB Puffer-Lösung (pH = 6.8) über 40 min lang zugetropft. Die Lösung wurde für weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels HPLC (Laufmittel A: 50 mM TEAB, pH = 7.2, Laufmittel B: MeCN; Gradient: 0-17% B in 60 min) aufgereingt. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt (1.20 μ mol Isomerengemisch, 5%).

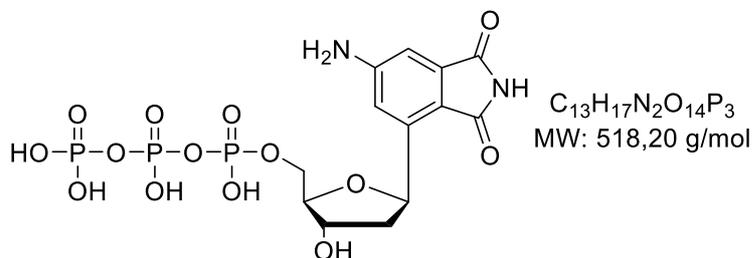
$$\varepsilon_{\max}(260 \text{ nm}) = 22678 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

MALDI-MS: m/z berechnet: 533.0 [M-H]⁻; gefunden: 530.3 [M-H]⁻.

Synthese von 1'-(5-Aminophthalimid-3-yl)-1',2'-dideoxy- β -D-ribofuranose (**4**) erfolgte wie in der Literatur beschrieben.^[44]



$C_{13}H_{14}N_2O_5$
MW: 278.26 g/mol

Synthese von 1'-(5-Aminophthalimid-3-yl)-1',2'-dideoxy-β-D-ribofuranosetriphosphat
(46)

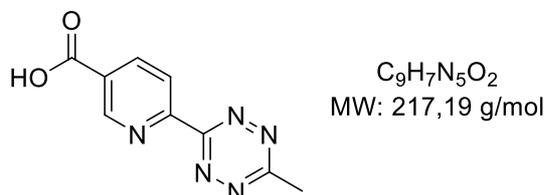
Trimethylphosphat (TMP) und Tri-*n*-butylamin wurden über Molsieb über Nacht getrocknet. In einem ausgeheizten Kolben mit aufgesetztem Septum und Kanüle wurden 7 mg (25.2 μmol) **3** und 8 mg (37.7 μmol) fein gepulverter (mörsern!) Protonenschwamm über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Komponenten unter Argon in 300 μL TMP gelöst und auf -15 °C gekühlt. Danach wurden schnell unter starkem Rühren 2.8 μL (30.2 μmol) Phosphorylchlorid zugegeben. In einem separaten, ausgeheizten Kolben wurden 83 mg (151 μmol) Bis(tributylammonium)pyrophosphat für 1 h getrocknet und anschließend in 300 μL DMF und 26 μL (109 μmol) Tri-*n*-butylamin gelöst und diese Lösung zur Reaktionslösung gegeben. Das Eisbad wurde nach der Zugabe entfernt. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung in 6.0 mL einer 0.1 M TEAB Puffer-Lösung (pH = 6.8) über 40 min lang zugetropft. Die Lösung wurde für weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels HPLC (Laufmittel A: 50 mM TEAB, pH = 7.2, Laufmittel B: MeCN; Gradient: 0-17% B in 60 min) aufgereingt. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt (2.02 μmol, 8%).

$$\epsilon_{\max}(260 \text{ nm}) = 9394 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

MALDI-MS: *m/z* berechnet: 517.0 [M-H]⁻; gefunden: 514.5 [M-H]⁻.

2 Synthesevorschriften Tetrazin-Projekt

6-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nikotinsäure (**56**)

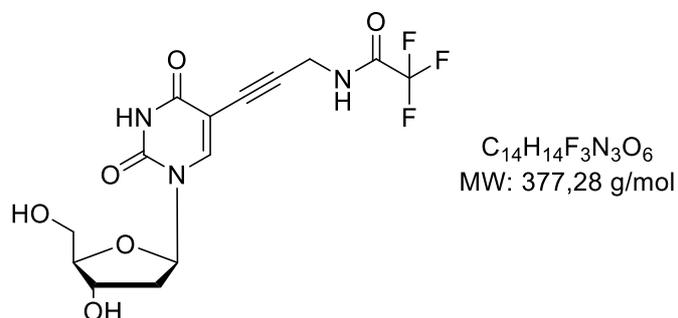


Es wurden 372 μ L (2.03 mmol) Triethylorthoacetat zu 300 mg (2.03 mmol) 6-Cyanonikotinsäure gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 685 μ L (20.3 mmol) Hydrazin Monohydrat zu der Mischung gegeben und für 1.5 h bei 100 °C gerührt (offene Apparatur).

Es wurde eine Lösung mit 700 mg (10.1 mmol) Natriumnitrit in 2.5 mL Wasser zur Reaktionslösung gegeben, 15 min lang gerührt und mit 1 M HCl-Lösung ein pH-Wert von 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde anschließend drei Mal mit je 50 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FC (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt. Es wurden 71 mg (0.33 mmol, 16%) **56** als purpurfarbener Feststoff erhalten.

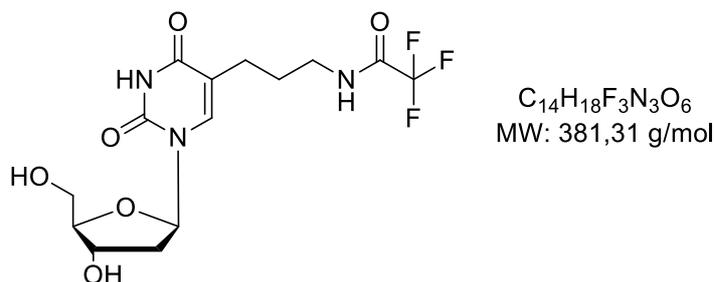
Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[124]

Synthese von 5-(3-Trifluoracetamidpropyn-1-yl)-2'-desoxyuridin (**53**)



In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 500 mg (1,41 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin in 15 mL absolutem DMF gelöst und 60 mg (0,31 mmol) Kupfer(I)-iodid sowie 390 μ L (2,83 mmol) Triethylamin zugegeben. Es wurde 15 min lang Argon durch die Lösung geleitet. Anschließend wurden 600 μ L (5,19 mmol) 2-Trifluor-N-(propyn-1-yl)acetamid, sowie 160 mg (0,14 mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium(0) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels FC (DCM/MeOH 15:1) aufgereinigt. Es wurden 319 mg (0,85 mmol, 60%) **53** als weißer Feststoff erhalten.

Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[139]

Synthese von 5-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propyl)-2'-desoxyuridin (**54**)

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Ar-Atmosphäre 250 mg (0.66 mmol) **53** und 50 mg (0.07 mmol) Pd(OH)₂ (auf Kohle, 20 w%) in 5.0 mL trockenem MeOH suspendiert und 1.05 mL Triethylsilan (6.63 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff über Celite abfiltriert, mit MeOH eluiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FC (DCM/Aceton 1:1) aufgereinigt. Es wurden 200 mg (0.52 mmol, 79%) **54** als weißer Feststoff erhalten.

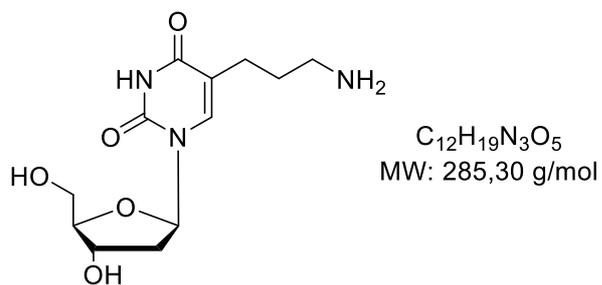
$R_f = 0.35$ (DCM/Aceton 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.28 (s, 1H, Imid-NH), 9.39 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, Amid-NH), 7.68 (s, 1H, Aryl-H), 6.16 (dd, $J = 7.5, 6.2$ Hz, 1H, H-1'), 5.22 (d, $J = 4.2$ Hz, OH-3'), 4.99 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, OH-5'), 4.24 (dt, $J = 9.1, 3.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.76 (q, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-4'), 3.59 (ddd, $J = 11.9, 5.4, 3.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.54 (ddd, $J = 11.7, 5.2, 3.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.17 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, N-CH₂-), 2.20 (dq, $J = 17.3, 7.2$ Hz, 2H, -CH₂), 2.15 – 2.03 (m, 2H, H-2'), 1.65 (pd, $J = 7.0, 2.4$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ = 163.34 (C=O), 156.15 (q, $J = 36.0$ Hz, F₃C-C=O), 150.31 (C=O), 136.45, 115.96 (q, $J = 288.2$ Hz, CF₃), 112.61, 87.31, 83.94, 70.42, 61.30, 39.02, 38.69, 27.12, 23.82.

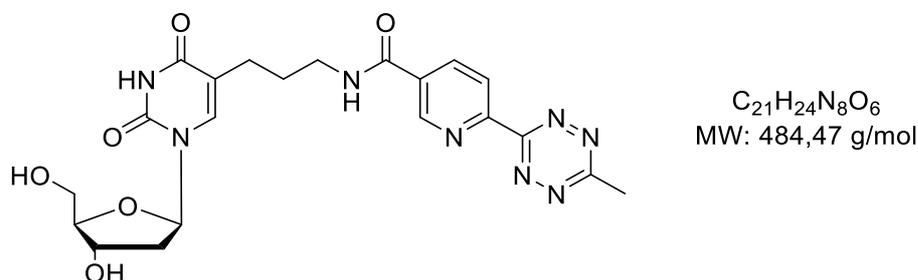
HR-MS (ESI): berechnet für C₁₄H₁₈F₃N₃O₆Na [M+Na]⁺: 404.1046; gefunden [M+Na]⁺: 404.1037.

Synthese von 5-(3-Aminopropyl)-2'-desoxyuridin (**58**)



Es wurden 200 mg (0.52 mmol) **54** in 5.0 mL konz. Ammoniak gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand anschließend im Hochvakuum getrocknet. Es wurde von einem vollständigen Umsatz ausgegangen und der weiße Feststoff ohne weitere Aufreinigung weiterverarbeitet.

Synthese 5-(3-(6-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nikotinamido)propyl)-2'-desoxyuridin
(5)



Es wurden 150 mg (0.53 mmol) **58** in einem ausgeheizten Rundkolben im Hochvakuum getrocknet. In einem separaten, ausgeheizten Rundkolben wurden 114 mg (0.53 mmol) **56**, 7 mg (0.05 mmol) HOBt und 219 mg (0.58 mmol) HBTU inklusive Rührfisch ebenfalls über Nacht im Hochvakuum getrocknet und anschließend unter Ar-Atmosphäre in 10 mL DMF gelöst. Es wurden 121 μ L (0.71 mmol) DIPEA zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. **58** (gelöst in 4.0 mL DMF) wurde zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels FC (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt. Es wurden 125 mg (0.26 mmol, 49%) **5** als pinkfarbener Feststoff erhalten.

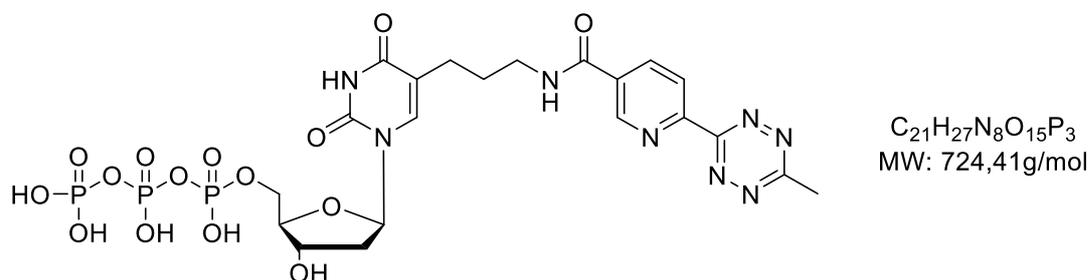
$R_f = 0.3$ (DCM/MeOH 8:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.29 (s, 1H, Imid-NH), 9.26 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, Aryl-H), 8.90 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, Amid-NH), 8.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Aryl-H), 8.47 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.74 (s, 1H, H-6), 6.18 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-1'), 5.24 (s, 1H, OH-3'), 5.04 (s, 1H, OH-5'), 4.26 (dt, $J = 5.9, 3.1$ Hz, 1H, H-3'), 3.77 (q, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-4'), 3.64 – 3.55 (m, 2H, H-5'), 3.10 (dd, $J = 18.0, 7.4$ Hz, 2H, N-C₂), 3.06 (s, 3H, CH₃), 2.28 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H, -CH₂), 1.74 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 167.66, 164.08, 163.40, 162.87, 152.01, 150.34, 149.15, 136.54, 136.44, 131.88, 123.34, 112.92, 87.33, 83.91, 70.44, 61.34, 38.74, 27.78, 23.99, 21.00.

HR-MS (FAB): m/z berechnet für $C_{21}H_{25}O_6N_8$ $[M+H]^+$: 485.1892; gefunden: $[M+H]^+$: 485.1892.

Synthese von 5-(3-(6-(6-Methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)nikotinamido)propyl)-2'-desoxyuridintriphosphat (**49**)



Trimethylphosphat (TMP) und Tri-*n*-butylamin wurden über Molsieb über Nacht getrocknet. In einem ausgeheizten Kolben mit aufgesetztem Septum und Kanüle wurden 50 mg (0.10 mmol) **5** und 33 mg (0.16 mmol) fein gepulverter (mörsern!) Protonenschwamm über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Komponenten unter Argon in 950 μ L TMP gelöst und auf -15 $^{\circ}$ C gekühlt. Danach wurden schnell unter starkem Rühren 10.0 μ L (0.11 mmol) Phosphorylchlorid zugegeben. Nach 4 h wurden nochmals 3.8 μ L (0.04 mmol) Phosphorylchlorid zugegeben und für eine Stunde weitergerührt. In einem separaten, ausgeheizten Kolben wurden 340 mg (0.62 mmol) Bis(tributylammonium)pyrophosphat für 1 h getrocknet und anschließend in 1.24 mL DMF und 92 μ L (0.39 mmol) Tri-*n*-butylamin gelöst und diese Lösung zur Reaktionslösung gegeben. Das Eisbad wurde nach der Zugabe entfernt. Nach 30 min wurde die Reaktionslösung in 6.0 mL einer 0.1 M TEAB Puffer-Lösung (pH = 6.8) über 40 min lang zugetropft. Die Lösung wurde für weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Der Rückstand wurde mittels HPLC (Laufmittel A: 50 mM TEAB, pH = 7.2, Laufmittel B: MeCN; Gradient: 0-30% B in 60 min) aufgereingt. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. (17.5 μ mol, 17%)

$$\epsilon_{\max}(260 \text{ nm}) = 14703 \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}.$$

MALDI-MS: m/z berechnet für [M-H] $^-$: 723.1; gefunden [M-H] $^-$: 721.4.

3 Materialien und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die bei der Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *TCI*, *ABCR*, *Sigma Aldrich*, *Molekula*, *Fluka*, *chemPUR*, *Acros Organics* und *Alpha Aesar* bezogen und wiesen mindestens die Qualitätsstufe „zur Synthese“ auf. Alle verwendeten Lösemittel wiesen mindestens die Qualitätsstufe p.A. (*pro analysi*) auf. Trockene Lösemittel (*Acros Organics*) unter Argon gehandhabt und gelagert. Für die Aufreinigung mittels HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Schutzgas

Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden unter Argonatmosphäre (Schweißargon 5.0, 99.999% Reinheit) durchgeführt. Glasgeräte für Reaktionen unter Feuchtigkeitsausschluss wurden mittels Heißluftföhn im Hochvakuum ausgeheizt.

Synthetische Arbeit

Bei der Reaktionsführung unter Schutzgas wurde das Reaktionsgefäß mit Rührfisch, mit einem Gummiseptum verschlossen und wie oben beschrieben, ausgeheizt. Wasserfreie Lösemittel, sowie empfindliche Reagenzien wurden mittels Standard Schlenk-Technik verwendet und nach Herstellerangaben gelagert. Flüssigkeiten wurden mittels Kunststoffspritzen und Teflonkanülen oder Mikroliterpipetten überführt. Für Feststoffe in pulverisierter Form wurde Wägepapier verwendet.

Bei der Durchführung von Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden Flachdewargefäße, sowie folgende Kältemischungen verwendet:

- 0 °C Eis in Wasser
- -15°C NaCl in Eis

Die Lösemittel wurden bei vermindertem Druck an einem Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C (Phosphoramidite bei 30 °C) entfernt.

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC)

Für Dünnschichtchromatographien wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* (Kieselgel 60 F₂₅₄ Kieselgel Schichtdicke 0.25 mm). Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Die chemische Auswertung der Substanzen erfolgte durch Anfärben mittels Schwefelsäure in Methanol (3%) und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön.

- Flash-Säulenchromatographie (FC)

Für die säulenchromatographischen Aufreinigungen wurde Kieselgel Typ 60 (Korndurchmesser 0,040 bis 0,063 mm) der Firma *Aldrich* und Quarzsand (geglüht, mit HCl gereinigt) der Firma *Riedel de Haën* verwendet. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst oder auf Kieselgel aufgezogen und bei leichtem Überdruck nach einer Methode von W.C. Still^[140] durchgeführt. Alternativ dazu wurde FC an einem *IntelliFlash 310* der Firma *Varian* durchgeführt. Dafür wurden vorgepackte Kieselgel SF10 Säulen der Firma *Agilent Technologies* und vorgepackte Kieselgel KP-Sil Säulen der Firma *Biotage* verwendet. Die präparative *reversed-phase* Aufreinigung erfolgte ebenfalls an diesem Gerät mit KP-C18-HS Säulen der Firma *Biotage*.

- Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Reinigung der Oligonukleotide und der modifizierten Triphosphate erfolgte durch *reversed-phase*-HPLC (RP-HPLC) an einem *Shimadzu* HPLC System (Entgaser, Pumpeneinheit LC-10AT, Autosampler SIL-10AD, Diodenarraydetektor SPD-M10A, Steuereinheit SCL-10A, Steuersoftware Class-VP) und einem *Varian* ProStar System (Autosampler 410, zwei Pumpeneinheiten 210, UV/Vis Detektor 325, Steuersoftware Galaxy). Für die analytische Chromatographie wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm, 5 μ m) verwendet. Präparative Trennungen erfolgten über eine *Supelcosil* Discovery[®] BIO Wide Pore C-18-5-Säule (250 x 10 mm, 5 μ m). Für Oligonukleotide wurde die entsprechende Säule mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5, Laufmittel A) equilibriert und im Gradienten mit MeCN (Laufmittel B) eluiert. Für die modifizierten Triphosphate erfolgte die Trennung mit 50 mM TEAB-Puffer (pH = 7.0, Laufmittel A) und im Gradienten mit MeCN (Laufmittel B). Die Flussgeschwindigkeit betrug 1.0 mL/min für analytische, bzw. 2.5 mL/min für präparative Methoden. Die Produkte der Chromatographie wurden fraktioniert in

sterilen Eppendorf Reaktionsgefäßen (1.7 mL) gesammelt. Die Analyse der aufgefangenen Fraktionen erfolgte über MALDI-TOF Massenspektrometrie. Die sauberen Fraktionen wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden von der Analytikabteilung des Instituts für Organische Chemie am KIT angefertigt. Die Messungen wurden an einem *Finnigan* MAT95 durchgeführt. Als Ionisierungsverfahren diente EI (*Elektronenstoßionisation*) und FAB (*Fast Atom Bombardement*).

Außerdem wurden Massenspektren in der Arbeitsgruppe Barner-Kowolik am KIT von Kai Hildebrandt an einem *ThermoFisher Scientific Q Exactive (Orbitrap)* Massenspektrometer durchgeführt. Als Ionisierungsverfahren diente (Eletrosprayionisation).

Zusätzlich wurden MALDI-TOF Massenspektren an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* aufgenommen. Je nach Molekül wurden folgende Matrices eingesetzt:

DNA: 3-Hydroxypicolinsäure (gesättigte Lösung in MeCN:Wasser = 1:1) / Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) = 9:1

Nukleosidtriphosphate: 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (gesättigte Lösung in Methanol)

Sonstige: 6-Aza-2-thiothymin (gesättigte Lösung in Acetonitril)

Die Angabe der Peaks erfolgte im Masse zu Ladungsverhältnis m/z .

NMR-Spektroskopie

Kernspinresonanz-Analysen wurden in deuterierten Lösungsmitteln der Firma *eurisotop* an folgenden Geräten durchgeführt:

- ^1H -NMR, 300 MHz, ^{13}C -NMR-Spektren, 75 MHz: *Bruker B-ACS 60*
- ^1H -NMR, 500 MHz, ^{13}C -NMR-Spektren, 126 MHz, ^{31}P -NMR-Spektren, 202 MHz: *Bruker Ascend 500*

Die Probe wurde in speziellen Messröhrchen (Außendurchmesser $\varnothing = 5$ mm) in etwa 0.4-0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Die chemischen Verschiebungen der

einzelnen Signale wurden in parts per million (ppm) angegeben. Als Referenz diente Tetramethylsilan. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte über die Signale der unvollständig deuterierten Lösungsmittel:

- CDCl_3 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.16$ ppm
- DMSO-d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2.50$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39.52$ ppm

Die gemessenen Signale wurden weiterhin anhand ihrer Aufspaltung charakterisiert. Die angegebenen Kupplungskonstanten J wurden als Betrag in Hertz (Hz) angegeben und je nach Multiplizität wie folgt abgekürzt:

s (Singulett), brs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett)

Die Auswertung der Spektren erfolgte nach 1. Ordnung.

Optische Spektroskopie

Alle Messungen wurden in 1.0 mL fassenden Quarzglasküvetten der Firma *Starna* durchgeführt, die eine Schichtdicke von 1.0 cm aufwiesen. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 20 °C aufgenommen. Für die Messungen wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv, Merck*) bzw. entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

- UV/Vis-Absorptionsmessungen:

Die Durchführung der UV/Vis-Absorptionsmessungen erfolgten an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit einem temperierbaren Küvettenhalter. Die Korrektur der Basislinie erfolgte gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels. Folgende Messparameter wurden verwendet: SBW: 2.0 nm, *Average time* 0.1 s, *Data interval* 1.0, *Light source change over* 350 nm.

- Fluoreszenzmessungen:

Die Durchführung der Fluoreszenzmessungen erfolgten an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon*. Ein Peltier-Element *LFI-3751* von *Wavelength Electronics* diente zur Temperatursteuerung. Für die Temperatur wurde eine Toleranz von 0.1 °C gewählt. Die Korrektur der Basislinie erfolgte gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels. Folgende Messparameter wurden verwendet: *Increment*: 1.0 nm, *Increment time*: 0.2 s, *Integration time* 0.1 s.

- Quantenausbeuten

Die Messungen der Quantenausbeuten wurden an einem *Quantaaurus QY C11347* in 5.0 mL fassenden Quarzglasküvetten der Firma *Hamamatsu* durchgeführt.

DNA-Festphasensynthese

Die chemische DNA-Synthese erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* Syntheseautomaten von *Applied Biosystems*. Das Gerät wurde mit Argon (Schweißargon 5.0, 99.999% Reinheit) als Schutzgas betrieben. Als Träger dienten CPGs mit 1.0 μmol Belegung (500 Å) von *Glen Research* und *Proligo Reagents*. Weitere Chemikalien für die Festphasensynthese wurden ebenfalls von *Glen Research*, *Proligo Reagents* und *Sigma Aldrich* bezogen.

Gefriertrocknung

Das Lyophilisieren wässriger Lösungen erfolgte nach Ausfrieren in flüssigen Stickstoff entweder an der Gefriertrocknungsanlage *Alpha 1-2 LD Plus* von *Christ* oder in einem Vakuumkonzentrator (*Alpha RVC*) von *Christ*.

Thermo-Cycler

Die Primerverlängerungsexperimente erfolgten in einem *TGradient Thermal Cycler* mit einem temperierbarem Silberblock für 96 x 0.2 mL Reaktionsgefäße von *Biometra*.

Gelelektrophorese

Die Durchführung der hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgele erfolgte in einer *Sequi-Gen GT Sequencing Cell* (21 x 40 cm) mit einem *PowerPac HV* von *Bio-Rad* bei 50 °C und 45 W. Die Gele enthielten 12% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 8.3 M Harnstoff, 2.0 mM EDTA, pH = 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure. Als Puffer diente TBE-Puffer (2.0 mM EDTA, pH = 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure).

Fluoreszenzimager

Die Analyse der Polyacrylamidgele erfolgte mit einem *Stella 8300* Fluoreszenzimager von *Raytest*. Dazu wurde die Fluoreszenz von Fluorescein, Rhodamin B und 4-Aminophthalimid ausgelesen. Die Anregung mit verschiedenen LEDs (Anregungsfiltern: 470 \pm 20 nm und 540 \pm 10 nm) erfolgte von oben, die mit dem UV-Tisch von unten. Die Emission wurde mit einer auf -20 °C gekühlten CCD-Kamera detektiert, wobei entsprechende Bandpassfilter (535 \pm 20 nm, 605 \pm 10 nm) verwendet

wurden. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der *Aida Image Analyzer v.450* Auswertesoftware von *Raytest*. Für die Quantifizierung wurde der *1D Multi Labeling* Modus verwendet.

4 Synthese der Oligonukleotide

4.1 Chemische DNA-Synthese

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *PerSeptive Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* Syntheseautomaten von *Applied Biosystems* und folgte der Phosphoramidit-Methode. Die kommerziell erhältlichen natürlichen DNA Bausteine wurden als 0.067 M Lösungen in MeCN in den Synthesizer eingebracht. Für die artifiziellen Bausteine wurden aufgrund der besseren Löslichkeit je 0.1 M Lösungen in DCM hergestellt. Die 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe wurde am Ende der Synthese entfernt (*DMTr-off*) oder beibehalten (*DMTr-on*).

Die automatisierte Festphasensynthese folgte einem Kupplungsprotokoll, das aus mehreren Einzelschritten besteht und für jeden Baustein individuell angepasst werden kann. Dieses Protokoll beinhaltet die Abfolge der verwendeten Substanz, die Menge und die verwendete Zeitspanne. Das verwendete Volumen wird durch die Anzahl der Pulse festgelegt, wobei ein Puls einer Menge von 16 µL entspricht. Der Eintrag für die Zeitspanne 0, beschreibt die schnellstmögliche Pumpgeschwindigkeit. Die Funktionen sind wie nachfolgend definiert:

Dbk: 3% Dichloressigsäure in Dichlormethan

Wsh: MeCN

Act: 0.45 M Tetrazol in MeCN

Caps*: Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und *N*-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B)

Ox: Iod in Wasser/THF/Pyridin

*für die *Ultramild*-Methode gilt:

Caps: Phenoxyacetylanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und *N*-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B)

Tabelle 3: Standardprotokoll für das Phosphoramidit eines natürlichen dA.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
<i>\$Deblocking</i>				
144	Index Frakt. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Tryl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Tryl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
<i>\$Coupling</i>				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
21	A+ Act	PULSE	5	0
21	A + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
<i>\$Capping</i>				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
<i>\$Oxidizing</i>				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
<i>\$Capping</i>				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Um die Kupplungseffizienz der modifizierten Bausteine **21**, **28** und **44** zu erhöhen, wurden die Kupplungszeiten und Anzahl der Pulse im Syntheseprotokoll im Bereich *\$Coupling* erhöht (Tabelle 4 - Tabelle 6).

Tabelle 4: verändertes Kupplungsprotokoll zum Einbau von **21**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
<i>\$Coupling</i>				
1	Wsh	PULSE	5	0
6	8	PULSE	20	0
2	Act	PULSE	7	0
24	7+ Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	5	1200
2	Act	PULSE	5	1200
6	8	PULSE	7	400
6	8	PULSE	20	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Tabelle 5: verändertes Kupplungsprotokoll zum Einbau von **28**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
<i>\$Coupling</i>				
1	Wsh	PULSE	5	0
6	8	PULSE	20	0
2	Act	PULSE	7	0
24	7+ Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	2	375
2	Act	PULSE	5	600
6	8	PULSE	7	400
6	8	PULSE	20	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Tabelle 6: verändertes Kupplungsprotokoll zum Einbau von **44**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge / Arg1	Zeit / Arg2
<i>\$Coupling</i>				
1	Wsh	PULSE	5	0
6	8	PULSE	20	0
2	Act	PULSE	7	0
24	7+ Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	2	80
2	Act	PULSE	5	200
6	8	PULSE	7	400
6	8	PULSE	20	0
1	Wsh	PULSE	40	0

4.2 Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide

Nach erfolgter DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden die Säulen geöffnet und das Granulat in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, wo es anschließend mit den jeweiligen Abspaltungsreagenzien behandelt wurde.

Abspaltung nach der Standardmethode

Das Trägermaterial wurde mit einer konz. wässrigen Ammoniaklösung (>25%, *trace select, Fluka*) versetzt und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die Base wurde im Vakuumkonzentrator (35 °C, 100 mbar, 35 min) entfernt und die überstehende wässrige Lösung abgetrennt. Der CPG-Rückstand wurde anschließend drei Mal mit je 200 µL Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Lösungen bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mittels *Reversed-Phase* HPLC aufgereinigt.

Abspaltung nach der *ultramild*-Methode

Die Abspaltung/Entschützung fand in verschraubbaren Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Die feste Phase wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon mit 1.0 mL einer *Deprotect*-Lösung (50 mM K₂CO₃ in MeOH) der Firma *Glen Research* behandelt. Anschließend wurden 6.0 µL konz. Essigsäure zugegeben und die methanolische Phase abgetrennt. Das CPG wurde drei Mal mit je 200 µL entionisiertem Wasser

nachgewaschen und die vereinigten Lösungen schrittweise bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mittels *Reversed-Phase* HPLC aufgereinigt.

Abspaltung nach der kombinierten *ultramild*-Methode

Die Abspaltung der NPEOC-Schutzgruppen fand in verschraubbaren Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Die feste Phase wurde zur Entschützung unter Argon mit 1.0 mL 0.5 M DBU, 40 mM Thymin in Pyridin versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das CPG abgetrennt, drei Mal mit trockenem Pyridin gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Abspaltung von der festen Phase erfolgte nach der *ultramild*-Methode“.

Abspaltung und Aufreinigung der *DMTr-on* synthetisierten Oligonukleotide

Die Abspaltung der *DMTr-on* synthetisierten DNA von der festen Phase folgte der Standardmethode mit konz. Ammoniak. Der trockene Rückstand wurde in 2.0 mL einer 50 mg/mL NaCl-Lösung aufgenommen.

Die *Glen-Pak™ Purification Cartridges* wurden vor Gebrauch erst mit 0.5 mL MeCN gewaschen und mit 1.0 mL TEAA-Puffer (2.0 M, pH = 7.0) equilibriert. Die Säule wurde mit je 1.0 mL Aliquoten der DNA/NaCl-Lösung beladen. Anschließend wurde zwei Mal mit je 1.0 mL Salzlösung (5% MeCN in 100 mg/mL NaCl-Lösung) gewaschen. Die Abspaltung der DMTr-Gruppe erfolgte durch zweifaches Spülen mit je 1.0 mL einer 2% TFA-Lösung. Die TFA-Reste wurden zwei Mal mit je 1.0 mL entionisiertem Wasser entfernt. Zuletzt wurde das Oligonukleotid in zwei Fraktionen zu je 1.0 mL mit 0.5% Ammoniak in MeCN/Wasser 1:1 eluiert. Die beiden Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff ausgefroren, lyophilisiert und über MALDI-TOF-MS analysiert.

DNA1: 3'-GCA-GCT-**DMAPI**AC-GTC-G-5'

DNA2: 3'-GCA-GCT-**o4API**AC-GTC-G-5'

T1: 3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AG**DAPym**-GCA-CGG-TCG-CG-5'

T2: 3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AGC-GAC-GT**DAPym**-TGC-AGC-5'

Abb. 104: Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide **DNA1-2** und **T1-2**.

In Tabelle 7 sind die einzelnen Synthese-, Aufarbeitungs- und HPLC-Methoden, den nachfolgenden Oligonukleotidsträngen zugeordnet. Dabei entspricht **DMAPI** = **21**, **o4API** = **28** und **DAPym** = **44** für den Einbau des jeweiligen Phosphoramidits.

Tabelle 7: Synthese- und Aufreinigungsmethoden von **DNA1-2** und **T1-2** (Eluenten RP-HPLC: A = 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6,5), B = MeCN).

DNA-Strang	Synthese		HPLC	
	Methode	Aufarbeitung	Methode	Detektion
DNA1	<i>Ultramild</i>	<i>Ultramild</i>	0 - 12% B in 50 min	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 400 \text{ nm}$
DNA2	<i>Ultramild</i>	DBU/ <i>Ultramild</i>	0 - 12% B in 50 min	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 365 \text{ nm}$
T1	standard	standard	0 - 20% B in 50 min 20% für 10 min	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$
T2	<i>DMTr-on</i>	<i>DMTr-on</i>	-	-

4.3 Enzymatische DNA Synthese

Die für den enzymatischen Einbau verwendeten Polymerasen sowie Exonukleasen wurden von den Firmen *New England Biolabs* und *Novagen* bezogen und wurden falls nicht anders angegeben mit den dazugehörigen kommerziell verwendeten Reaktionspuffern verwendet.

4.3.1 Primerverlängerungsexperimente

Die Primerverlängerungsexperimente wurden in Ansätzen zu je 20 μL durchgeführt. Dafür wurden Stammlösungen mit Primer, Templat und Reaktionspuffer hergestellt und anschließend im Thermo-Cycler für 10 min bei 90 °C inkubiert. Es folgte eine Abkühlphase über 55 min auf 25 °C. Im Anschluss wurden die dNTPs sowie die modifizierten Triphosphate und die entsprechende Polymerase zugegeben. Die Endkonzentrationen der Bausteine betragen jeweils 200 μM . Die Primer, Template, Temperaturen, Zeiten, Enzyme sowie die jeweilige Menge sind den Bildunterschriften der einzelnen Abbildungen der Polyacrylamidgele zu entnehmen. Für die Menge an Enzym, wurde bei keiner Angabe der Aktivität U, das angegebene Volumen der kommerziell erhaltenen Enzymlösung zugegeben.

4.3.2 Aufarbeitung und Detektion

Die Experimente mit fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden (Abb. 105) wurden mit 20 μL EDTA-haltigem Beladungspuffer (20 mM EDTA, pH = 8,0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12% Ficoll, 0,01% Bromphenolblau, 0,02% Xylen Cyanol FF, 7,0 M Harnstoff) abgestoppt. Die Auftrennung erfolgte anschließend über ein 12%iges

denaturierendes Polyacrylamidgel. Die Gele wurden dazu mit 6.0 μL der DNA-Lösung beladen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden in einem Fluoreszenzimager detektiert und analysiert. Dazu erfolgte eine Anregung des Fluoresceins mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20$ nm. Die anschließende Emission wurde mit einem entsprechenden Bandpassfilter ($\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20$ nm) ausgelesen.

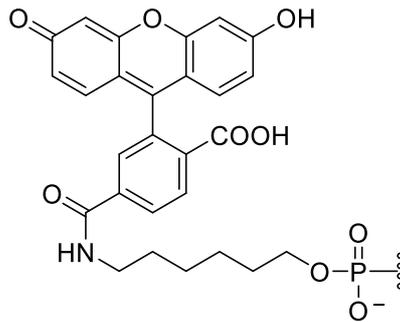


Abb. 105: Fluorescein am 5'-Terminus des Primers.

Bei den Experimenten, die keine fluoresceinmarkierten Oligonukleotide aufwiesen, fand die Detektion über die Fluoreszenz der Modifikation (**4API**) statt. Dazu wurde jedes Experiment doppelt durchgeführt, sodass der Ansatz verdoppelt und somit ein Gesamtvolumen von 40 μL erhalten wurde. Nach der Primerverlängerung wurden die Reaktionslösungen über eine *illustra MicroSpin G-25 Column* entsalzt und anschließend bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 10 μL entionisiertem Wasser aufgenommen und mit 10 μL Beladungspuffer (20 mM EDTA, pH = 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12% Ficoll, 0.01% Bromphenolblau, 0.02% Xylen Cyanol FF, 7.0 M Harnstoff) versetzt. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls über ein 12%iges denaturierendes Polyacrylamidgel. Es wurden 10 μL der Lösung beladen. Nach der Elektrophorese erfolgte die Detektion des **4API** in einem Fluoreszenzimager mit UV-Tisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 312$ nm. Die Fluoreszenz ist ebenfalls über einen Bandpassfilter ($\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20$ nm) sichtbar.

4.4 Charakterisierung

Enzymatisch synthetisierte Oligonukleotide

Zur Charakterisierung der Produkte der Primerverlängerungsexperimente wurden 12% PAGE durchgeführt. Der Nachweis und die Zuordnung der Oligonukleotide

erfolgten über die Wanderungstrecke auf dem Gel und dem Vergleich zu nicht modifizierten DNA-Strängen.

Chemisch synthetisierte Oligonukleotide

Für die in Kap. II4 aufgelisteten Oligonukleotide wurde jeweils die zugehörige Masse berechnet und über MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Charakterisierung der Oligonukleotide **DNA1-2** und **T1-2**.

DNA-Strang	Masse		ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
	berechnet [g/mol]	gefunden [g/mol]	
DNA1	4013	4012	124.3
DNA2	3985	3982	134.6
T1	10872	10873	340.2
T2	11160	11160	351.4

4.5 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA Einzelstränge wurde mithilfe des *Lambert-Beerschen* Gesetzes bestimmt.^[141] Dazu wurde die Absorption der DNA Lösung bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient für unmodifizierte Nukleinsäuren setzt sich dabei wie folgt zusammen:

$$\epsilon_{260} = (A * \epsilon_A + T * \epsilon_T + G * \epsilon_G + C * \epsilon_C) * 0.9$$

A:	Anzahl der Adeninbasen	$\epsilon_A = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
T:	Anzahl der Thyminbasen	$\epsilon_T = 8.80 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
G:	Anzahl der Guaninbasen	$\epsilon_G = 11.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
C:	Anzahl der Cytosinbasen	$\epsilon_C = 7.30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Der Faktor 0.9 berücksichtigt dabei die Hypochromizität, die bedingt durch den Aufbau des DNA-Stranges auftritt. Für modifizierte DNA muss der molare Extinktionskoeffizient der Modifikation unter Berücksichtigung des Effektes addiert werden. Im Folgenden sind die einzelnen Werte der Bausteine aufgelistet:

ε_{DMAPI}	=	12.4 mM ⁻¹ cm ⁻¹
ε_{04API}	=	22.7 mM ⁻¹ cm ⁻¹
ε_{DAPym}	=	2.24 mM ⁻¹ cm ⁻¹
ε_{ds}	=	0.00 mM ⁻¹ cm ⁻¹
ε_{Fluo}	=	83.0 mM ⁻¹ cm ⁻¹

Die Absorbanz bei $\lambda = 260$ nm wurde an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure-Modus gemessen.

4.6 Unmodifizierte Oligonukleotide

Unmodifizierte, sowie die am 5'-Terminus fluoresceinmarkierten Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion* bezogen. Die Ansatzgröße belief sich zwischen 0.2 und 1.0 μ mol. Die kommerziell erhaltene DNA war HPLC gereinigt und lyophilisiert und wurde in entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Anlage aufgenommen und die Konzentration anschließend über die UV/Vis-Absorption bestimmt.

4.7 Hybridisierung

Der modifizierte DNA-Strang und der komplementäre Gegenstrang (1.0 eq) wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaPi) und 250 mM NaCl bei pH 7 für 10 min bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurde über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.8 Optische Spektroskopie

Soweit nicht anders beschrieben, erfolgten die UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der DNA-Lösungen in Konzentrationen zu 2.5 μ M in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaPi) und 250 mM NaCl bei pH 7 an den oben beschriebenen Geräten.

Schmelztemperaturen

Die Schmelztemperaturen der DNA-Doppelstränge wurden über die temperaturabhängige Absorptionsänderung bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dazu wurde analog den UV/Vis-Absorptionsmessungen die Temperatur von 10 °C bis 90 °C variiert. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min. Die Messdaten wurden in 0.5 °C Abständen erfasst. Der Temperaturwert wurde am Start- bzw. Endpunkt für 10 min konstant gehalten. Durch einen sigmoidalen Fit und anschließender Differenzierung der erhaltenen Funktion wurden die Schmelzpunkte bestimmt.

4.9 Enzymatischer Verdau mittels Exonuklease III

Für den enzymatischen Verdau der thiophosphatverbrückten Oligonukleotide wurden die Primerverlängerungen wiederholt. Nach Ablauf der Reaktion wurde drei Mal mit je dem selben Volumen Roti®-Phenol extrahiert, um das Enzym zu entfernen. Die wässrige Lösung wurde über eine *illustra NAP-25 Column* entsalzt und anschließend bis zur Trockne eingedampft. Es wurde von einem vollständigen Umsatz der Primerverlängerungen ausgegangen und eine Stammlösung des modifizierten Oligonukleotids mit 750 nM hergestellt. Zu je 19 µL dieser Stammlösung wurde 1.0 µL Exonuklease III zugegeben und die Reaktionslösung für bestimmte Zeitspannen bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 20 µL EDTA-haltiger Ladepuffer (20 mM EDTA, pH = 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12% Ficoll, 0.01% Bromphenolblau, 0.02% Xylen Cyanol FF, 7.0 M Harnstoff) zugegeben um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden bis zu Beladung des Polyacrylamidgels eingefroren.

4.10 Postsynthetische Modifizierung mittels iEDDA

Für die Postsynthetische Ligation der tetrazinmodifizierten DNA Stränge wurden die Primerverlängerungs-Experimente in zwölf parallelen Ansätzen wiederholt. Nach Beendigung wurden die vereinigten Reaktionslösungen (240 µL) über eine *illustra NAP-25 Column* entsalzt und anschließend bis zur Trockne eingedampft. Es wurde von einer vollständigen Verlängerung ausgegangen und eine 10 µM wässrige Stammlösung hergestellt (18 µL). Für das **COMBO-Rhod** wurde eine Stammlösung in DMSO (2.0 mM) hergestellt. Die Reaktionen wurden in Wasser/DMSO 1:1 durchgeführt, indem jeweils 2.0 µL der beiden Lösungen vereinigt wurden und über eine bestimmte Zeit bei Raumtemperatur geschüttelt wurden. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 4.0 µL Beladungspuffer (20 mM EDTA, pH = 8.0, 89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 12% Ficoll, 0.01% Bromphenolblau, 0.02% Xylen Cyanol FF, 7.0 M Harnstoff) und durch die unmittelbar danach erfolgte Auftrennung durch ein 12%iges denaturierendes Polyacrylamidgel. Die Detektion des Fluoresceins erfolgte über eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 470 \pm 20$ nm. Die anschließende Emission wurde mit einem entsprechenden Bandpassfilter ($\lambda_{em} = 535 \pm 20$ nm) ausgelesen. Das Konjugationsprodukt wurde über die Anregung und Emission ($\lambda_{exc} = 540 \pm 10$ nm, $\lambda_{em} = 605 \pm 10$ nm) des Rhodamin B nachgewiesen.

VI Literaturverzeichnis

- [1] Nobelprize.org, *Vol. 2016*.
- [2] M. Kimoto, Y. Hikida, I. Hirao, *Isr. J. Chem.* **2013**, *53*, 450-468.
- [3] C. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8322-8323.
- [4] J. A. Piccirilli, S. A. Benner, T. Krauch, S. E. Moroney, *Nature* **1990**, *343*, 33-37.
- [5] A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 5640-5646.
- [6] D. Hutter, S. A. Benner, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9839-9842.
- [7] L. Zhang, Z. Yang, K. Sefah, K. M. Bradley, S. Hoshika, M.-J. Kim, H.-J. Kim, G. Zhu, E. Jiménez, S. Cansiz, I. T. Teng, C. Champanhac, C. McLendon, C. Liu, W. Zhang, D. L. Gerloff, Z. Huang, W. Tan, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6734-6737.
- [8] M. Ishikawa, I. Hirao, S. Yokoyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3931-3934.
- [9] T. Ohtsuki, M. Kimoto, M. Ishikawa, T. Mitsui, I. Hirao, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4922-4925.
- [10] I. Hirao, T. Ohtsuki, T. Fujiwara, T. Mitsui, T. Yokogawa, T. Okuni, H. Nakayama, K. Takio, T. Yabuki, T. Kigawa, K. Kodama, T. Yokogawa, K. Nishikawa, S. Yokoyama, *Nat. Biotech.* **2002**, *20*, 177-182.
- [11] I. Hirao, Y. Harada, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13298-13305.
- [12] S. Moran, R. X.-F. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10506-10511.
- [13] K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 954-959.
- [14] J. C. Morales, E. T. Kool, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 950-954.
- [15] J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2323-2324.
- [16] M.-J. Guo, M. J. Waring, S. Hildbrand, C. J. Leumann, L. W. McLaughlin, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 1863-1869.
- [17] D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585-11586.
- [18] Y. J. Seo, G. T. Hwang, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3246-3252.

- [19] A. M. Leconte, L. Chen, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12470-12471.
- [20] A. K. Ogawa, Y. Wu, M. Berger, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8803-8804.
- [21] A. K. Ogawa, Y. Wu, D. L. McMinn, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3274-3287.
- [22] Y. Wu, A. K. Ogawa, M. Berger, D. L. McMinn, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7621-7632.
- [23] D. A. Malyshev, Y. J. Seo, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14620-14621.
- [24] D. A. Malyshev, K. Dhimi, H. T. Quach, T. Lavergne, P. Ordoukhanian, A. Torkamani, F. E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 12005-12010.
- [25] Y. J. Seo, S. Matsuda, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5046-5047.
- [26] D. A. Malyshev, K. Dhimi, T. Lavergne, T. Chen, N. Dai, J. M. Foster, I. R. Correa, F. E. Romesberg, *Nature* **2014**, *509*, 385-388.
- [27] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228-1237.
- [28] K. Evans, D. Xu, Y. Kim, T. M. Nordlund, *J. Fluoresc.* **1992**, *2*, 209-216.
- [29] E. L. Rachofsky, R. Osman, J. B. A. Ross, *Biochemistry* **2001**, *40*, 946-956.
- [30] J. T. Stivers, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 3837-3844.
- [31] S. Lobsiger, S. Blaser, R. K. Sinha, H.-M. Frey, S. Leutwyler, *Nature Chem.* **2014**, *6*, 989.
- [32] G. Mata, N. W. Luedtke, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2462-2465.
- [33] G. Mata, N. W. Luedtke, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 699-707.
- [34] Y. Xie, T. Maxson, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11896-11897.
- [35] Y. Xie, A. V. Dix, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17605-17614.
- [36] Y. Xie, T. Maxson, Y. Tor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5053-5055.
- [37] M. Sholokh, R. Sharma, D. Shin, R. Das, O. A. Zaporozhets, Y. Tor, Y. Mély, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3185-3188.
- [38] D. Shin, R. W. Sinkeldam, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14912-14915.
- [39] M. Sajadi, T. Oberhuber, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, B. Dick, N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 44-45.

- [40] M. E. Vazquez, D. M. Rothman, B. Imperiali, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1965-1966.
- [41] V. Sharma, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7290-7293.
- [42] D. Mandal, S. Sen, D. Sukul, K. Bhattacharyya, A. K. Mandal, R. Banerjee, S. Roy, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 10741-10747.
- [43] J. Riedl, R. Pohl, N. P. Ernsting, P. Orsag, M. Fojta, M. Hocek, *Chemical Science* **2012**, 3, 2797-2806.
- [44] M. Weinberger, F. Berndt, R. Mahrwald, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2589-2599.
- [45] L. Dehmel, F. Berndt, M. Weinberger, M. Sajadi, I. Ioffe, H. A. Wagenknecht, N. P. Ernsting, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 6813-6820.
- [46] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441-448.
- [47] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 5463-5467.
- [48] J. M. S. Bartlett, D. Stirling, in *PCR Protocols* (Eds.: J. M. S. Bartlett, D. Stirling), Humana Press, Totowa, NJ, **2003**, 3-6.
- [49] R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, H. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487-491.
- [50] J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe, *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24, 3546-3551.
- [51] J. A. Brown, Z. Suo, *Biochemistry* **2011**, 50, 1135-1142.
- [52] M. B. Kermekchiev, L. I. Kirilova, E. E. Vail, W. M. Barnes, *Nucl. Acids Res.* **2009**, 37, e40.
- [53] V. Derbyshire, P. Freemont, M. Sanderson, L. Beese, J. Friedman, C. Joyce, T. Steitz, *Science* **1988**, 240, 199-201.
- [54] H. Kong, R. B. Kucera, W. E. Jack, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 1965-1975.
- [55] H. W. Jannasch, C. O. Wirsén, S. J. Molyneaux, T. A. Langworthy, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 3472-3481.
- [56] P. Mattila, J. Korpela, T. Tenkanen, K. Pitkämä, *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19, 4967-4973.
- [57] A. F. Gardner, W. E. Jack, *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30, 605-613.
- [58] M. W. Southworth, H. Kong, R. B. Kucera, J. Ware, H. W. Jannasch, F. B. Perler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 5181-5285.
- [59] A. C. Rodriguez, H.-W. Park, C. Mao, L. S. Beese, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 447-462.

- [60] A. Ghasemi, A. H. Salmanian, N. Sadeghifard, A. A. Salarian, M. K. Gholi, *Iranian Journal of Microbiology* **2011**, *3*, 118-122.
- [61] M. Nishioka, H. Mizuguchi, S. Fujiwara, S. Komatsubara, M. Kitabayashi, H. Uemura, M. Takagi, T. Imanaka, *J. Biotechnol.* **2001**, *88*, 141-149.
- [62] H. Sawai, A. Ozaki-Nakamura, M. Mine, H. Ozaki, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 309-316.
- [63] H. Sawai, A. N. Ozaki, F. Satoh, T. Ohbayashi, M. M. Masud, H. Ozaki, *Chem. Comm.* **2001**, 2604-2605.
- [64] K.-D. Gundermann, M. Drawert, *Chemische Berichte* **1962**, *95*, 2018-2026.
- [65] L. u. Bucsiová, P. Hrdlovič, *J. Macromol. Sci., Part A* **2007**, *44*, 1047-1053.
- [66] D. Majhi, S. K. Das, P. K. Sahu, S. M. Pratik, A. Kumar, M. Sarkar, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 18349-18359.
- [67] D. Lagnoux, E. Delort, C. Douat-Casassus, A. Esposito, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1215-1226.
- [68] J. L. Wolk, A. A. Frimer, *Molecules* **2010**, *15*, 5561.
- [69] B. K. Lee, M. R. Biscoe, S. L. Buchwald, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3672-3674.
- [70] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069.
- [71] K. Pankiewicz, A. Matsuda, K. A. Watanabe, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 485-488.
- [72] J. J. Chen, J. A. Walker II, W. Liu, D. S. Wise, L. B. Townsend, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8363-8366.
- [73] Z.-X. Wang, L. I. Wiebe, E. D. Clercq, J. Balzarini, E. E. Knaus, *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 1081-1088.
- [74] N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6661-6668.
- [75] J. G. Doyle Daves, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 201-206.
- [76] K. W. Wellington, S. A. Benner, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2006**, *25*, 1309-1333.
- [77] A. F. Littke, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6989-7000.
- [78] X. Wang, E. J. Salaski, D. M. Berger, D. Powell, Y. Hu, D. Wojciechowicz, K. Collins, E. Frommer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6941-6944.
- [79] F. Himmelsbach, B. S. Schulz, T. Trichtinger, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 59-72.
- [80] H. Lang, M. Gottlieb, M. Schwarz, S. Farkas, B. S. Schulz, F. Himmelsbach, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 2172-2185.

- [81] W. Pfeleiderer, F. Himmelsbach, R. Charubala, H. Schirmeister, A. Beiter, B. Schulz, T. Trichtinger, *Nucleosides and Nucleotides* **1985**, *4*, 81-94.
- [82] A. Takami, M. Iwakubo, Y. Okada, T. Kawata, H. Odai, N. Takahashi, K. Shindo, K. Kimura, Y. Tagami, M. Miyake, K. Fukushima, M. Inagaki, M. Amano, K. Kaibuchi, H. Iijima, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2115-2137.
- [83] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068.
- [84] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133.
- [85] J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 397-416.
- [86] A. M. Avino, R. Eritja, *Nucleosides and Nucleotides* **1994**, *13*, 2059-2069.
- [87] T. Soujanya, R. W. Fessenden, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3507-3512.
- [88] D. Noukakis, P. Suppan, *J. Lumin.* **1991**, *47*, 285-295.
- [89] C. Reichardt, *Chemical Reviews* **1994**, *94*, 2319-2358.
- [90] E. Krystkowiak, K. Dobek, A. Maciejewski, *J. Photochem. Photobiol. A* **2006**, *184*, 250-264.
- [91] T. Soujanya, R. W. Fessenden, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3507-3512.
- [92] G. Saroja, B. Ramachandram, S. Saha, A. Samanta, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2906-2911.
- [93] G. Saroja, B. Ramachandram, S. Saha, A. Samanta, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2906-2911.
- [94] G. Løber, *J. Lumin.* **1981**, *22*, 221-265.
- [95] M. Preuss, W. G. Schmidt, K. Seino, J. Furthmüller, F. Bechstedt, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 112-122.
- [96] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, T. J. Dwyer, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, A. Marx, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 612-614.
- [97] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, F. E. Romesberg, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18637-18643.
- [98] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990-1009.
- [99] S. Ludmann, A. Marx, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2016**, *70*, 203-206.
- [100] Z. Yang, A. M. Sismour, P. Sheng, N. L. Puskar, S. A. Benner, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 4238-4249.

- [101] Z. Yang, A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 3118-3127.
- [102] B. H. Rizkalla, A. D. Broom, M. G. Stout, R. K. Robins, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3975-3979.
- [103] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [104] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [105] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *2*, 565-598.
- [106] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [107] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [108] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [109] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [110] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [111] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153-2154.
- [112] C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007-11022.
- [113] C. Stubinitzky, G. B. Cserép, E. Bätzner, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11218-11221.
- [114] F. Schoenebeck, D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121-8133.
- [115] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60-70.
- [116] S. Arndt, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14580-14582.
- [117] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [118] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2885-2896.
- [119] J. Sauer, D. Lang, *Angew. Chem.* **1964**, *76*, 603.
- [120] J. Balcar, G. Chrisam, F. X. Huber, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1481-1484.
- [121] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [122] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.

- [123] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, K. Peewasan, G. B. Cserep, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**. [submitted]
- [124] G. B. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Synthesis* **2015**, *47*, 2738-2744.
- [125] J. Schoch, S. Ameta, A. Jäschke, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12536-12537.
- [126] S. Ameta, J. Becker, A. Jäschke, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4701-4707.
- [127] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8846-8847.
- [128] A. M. Pyka, C. Domnick, F. Braun, S. Kath-Schorr, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1438-1443.
- [129] K. Wang, D. Wang, K. Ji, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, B. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 909-915.
- [130] U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9168-9172.
- [131] H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederweiser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827-10829.
- [132] J. W. Wijnen, S. Zavarise, J. B. F. N. Engberts, M. Charton, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2001-2005.
- [133] Á. Eördögh, J. Steinmeyer, K. Peewasan, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, P. Kéle, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 457-464.
- [134] P. N. Asare-Okai, E. Augustin, D. Fabris, M. Royzen, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7844-7847.
- [135] A. Pinner, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1897**, *30*, 1871-1890.
- [136] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5222-5225.
- [137] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [138] H. Zhang, W. S. Trout, S. Liu, G. A. Andrade, D. A. Hudson, S. L. Scinto, K. T. Dicker, Y. Li, N. Lazouski, J. Rosenthal, C. Thorpe, X. Jia, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5978-5983.
- [139] J. A. Brazier, T. Shibata, J. Townsley, B. F. Taylor, E. Frary, N. H. Williams, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 1362-1371.
- [140] W. C. Still, M. Kahn und A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [141] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.

VII Anhang

Lehre

WS2012/13	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, Geoökologie und des Lehramts
04/2013 – 08/2013	Betreuung der Bachelorarbeit von Kevin Bossert: Thema: Synthese eines fluorogenen Substrats
SS2013	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, Geoökologie und des Lehramts
07/2013 – 10/2013	Betreuung der Bachelorarbeit von Tim Seifert: Thema: <i>Synthese eines 4-(N,N-Dimethylamino)phthalimid-Nukleosids</i>
10/2013 – 09/2014	Betreuung von Svenja Kusterer im ersten Ausbildungsjahr zur Chemielaborantin
WS2013/14	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie am Karlsruher Institut für Technologie
04/2014 – 06/2014	Betreuung der Vertieferarbeit von Jeannine Steinmeyer: Thema: <i>Synthese der C-Nukleoside von 4-Aminophthalimid und 2,4-Diaminopyrimidin</i>
09/2014 – 12/2014	Betreuung der Vertieferarbeit von Thuy-Vi Jasmin Quan: Thema: <i>Synthese des 4-(N,N-Dimethylamino)phthalimid-nukleosid-Triphosphats</i>
WS2014/15	Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, der Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie am Karlsruher Institut für Technologie

Publikationen

Marcus Merkel, Hans-Achim Wagenknecht, „Synthesis of a new 4-aminophthalimide nucleoside“, *XVIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components*, Český Krumlov/Tschechische Republik, **2014**.

M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H.-A. Wagenknecht, Copper-free postsynthetic labeling of nucleic acids by means of bioorthogonal reactions, *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 1541-1553.

C. Schwechheimer, M.Merkel, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, Synthetic Wavelength-Shifting Fluorescent Probes of Nucleic Acids . in: *K. Nakatani, Y. Tor (Eds.)*, **2016**.

Marcus Merkel, Stefanie Arndt, Damian Ploschik, Krisana Peewasan, Gergely B. Cserep, Ulrike Wenge, Peter Kele and Hans-Achim Wagenknecht, Scope and limitations of typical copper-free biorthogonal reactions with DNA: Reactive 2'-desoxyuridine triphosphates for postsynthetic labeling, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538

M. Merkel, L. Dehmel, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, „An Isosteric and Fluorescent DNA Base Pair Consisting of 4-aminophthalimide and 2,4-diaminopyrimidine as C-Nucleosides“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 384.

M. Merkel, L. Dehmel, N. P. Ernsting, H.-A. Wagenknecht, „Ein isosteres und fluoreszierendes DNA-Basenpaar aus 4-Aminophthalimid und 2,4-Diaminopyrimidin als C-Nucleoside“, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 392-396.

Konferenzen

- | | |
|---------|--|
| 06/2014 | XVIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Český Krumlov/Tschechische Republik, 2014 . (Poster) |
| 09/2014 | II. Doktorandenseminar der DNG, Bad Herrenalb (Poster) |
| 09/2015 | VII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Berlin, 2015 (Poster) |

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 und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe. Außerdem versichere ich die Übereinstimmung der elektronischen Version dieser Arbeit mit der schriftlichen, sowie die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut.

Karlsruhe, den 07.06.2016

Marcus Merkel