

NUKLEOSIDISCHE DIARYLTETRAZOLE ZUR LICHTINDUZIERTEN UND FLUOROGENEN MARKIERUNG VON DNA

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
M. Sc.

Benjamin David Lehmann
aus Karlsruhe

Karlsruhe, 2018

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bräse
Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2018

I have not failed. I've just found 10.000 ways that won't work.

Thomas A. Edison

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2015 bis Oktober 2018 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die sehr gute Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei:

- Dem Graduiertenkolleg 2039 (DFG) für die interdisziplinäre Vielfalt und die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.
- Meinen Arbeitskollegen Dr. Effi Bätzner, Dr. Peggy Bohländer, Dr. Martin Weiser, Dr. Philipp Ensslen, Dr. Marcus Merkel, Dr. Heidi Walter, Dr. Stefanie Arndt, Dr. Nadine Gaß, Dr. Krisana Peewasan, Dr. Barbara Reiß, Dr. Jeannine Steinmeyer, Dr. Damian Ploschik, Dr. Sergej Hermann, Linda Nötzel, Andrea Bijeljanin, Tamina Schneider, Benjamin Chaoui, Leonora Nurcaj, Andreas Dittmer, Isabella Weiß, Dennis Harijara, Daniel Sack, Christian Schwechheimer, Dr. Franziska Rönicke, Christoph Bickmann, Ulrike Reisacher, Lara Hirsch, Arthur Kuhlmann, Fabienne Speck, Yannic Fritz, Lisa Gramespacher, Benjamin Lehmann, Samantha Wörner, Sara Müller, Judith Winsauer, Julian Gebhard, Nathalie Wagener, Hülya Ucar, Fabian Lang, David Rombach, Katja Krell, Larissa Doll und Robert Hofsäß für die meist gutgelaunte Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft, zahlreiche Grillabende und dass ihr einfach für jeden Spaß zu haben seid.
- Claudia Sommer für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Dingen.
- Anette Hochgesand für die mühevollen Anfertigung von MALDI-Massenspektren und das Hinterhertelefonieren bei verschollenen Bestellungen.
- Dr. Andreas Rapp, Tanja Ohmer, Anne-Lena Emmerich und Pia Lang für das Messen der NMR-Proben.

- Damian, David, Ulrike und Fabienne für das Messen der NMR-Proben am 500 MHz Spektrometer.
- Dr. Norbert Foitzik und seinen Mitarbeiterinnen Ingrid Roßnagel und Angelika Mösle für die zeitnahe Anfertigung der Massenspektren.
- Dr. Patrick Weis für die ESI-Messungen der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide.
- Meinen Vertiefer- und Bachelorstudenten Stefan Marschner, Xiaofei Sun, Philipp Bohn und Judith Winsauer für die Unterstützung, das Interesse an meiner Forschung und die aufwändigen chromatographischen Aufreinigungen.
- Jeannine, Damian, Silvana und Lena für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bis kurz vor der Abgabe.
- Jeannine für den kurzweiligen Laboralltag, die interessanten Gespräche, die stetige Hilfsbereitschaft und den Sitznachbar mit der ernsthaft gehässigsten Lache im ganzen AKW.
- Larissa für die vielen Gespräche, deine immer gut gelaunte Art, das unbändige Kevin-Schwänzchen und die Entdeckung von Meereslebewesen in Labor 205.
- Yannic für zahlreiche „Kesselbatscher“ und feurige Getränke.
- Robert für die vielen, vielen, vielen Kaffeepausen und dein jederzeit offenes Ohr und dass du eigentlich bei allem dabei bist und das seit Anfang des Studiums.
- Damian für die stetige Hilfsbereitschaft, deine offene Art, polnische Schokoriegel und den neuesten Klatsch.
- David für seine unglaublich begeisterungsfähige Art, viele Tipps und eine interessante Musikauswahl.
- Samantha für das kurzweiligste Praktikum in der ganzen Promotion, die vielen Gespräche, 3-Fragezeichen und nicht zuletzt das „Tierchen“, dem einfach die Luft ausgegangen war.
- Heidi für deine offene und lebendige Art und für „Effi hätts gemacht“.

- Marcus für die vielen, vielen Abende auf dem Balkon am Anfang meiner Zeit im AKW und dein immer offenes Ohr.

Mein ganz besonderer Dank gilt all denen, die mir während meinem Studium mit ihrer Freundschaft und Unterstützung eine unvergessliche Zeit beschert haben. Danke an Michel, Robert, Thomas, Patrick, Stephan, Larissa, Silvana, Kathi und Timon.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie, bei meinen Großeltern, bei meinen Eltern und meinen Geschwistern Sarah, Lisa und Patrick bedanken, ohne die ich niemals der Mensch geworden wäre, der ich heute bin.

Abschließend möchte ich Lena für die unglaublich tolle gemeinsame Zeit danken und dafür, dass sie jederzeit für mich da ist, spontan für mich in den Zug springt und sich auch mal auf Neues einlässt. Danke für deine Unterstützung und dein Verständnis, vor allem in den letzten Wochen und den letzten Tagen & Nächten. Danke dafür, dass du so ein unglaublich toller Mensch bist. Du bist der Wahnsinn!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung.....	1
2	Theoretischer Hintergrund.....	5
2.1	Bioorthogonale Markierung	5
2.2	Lichtinduzierte Nitrilimin-Alken-Cycloaddition	11
3	Hauptteil	17
3.1	Synthese der Tetrazol-Bausteine.....	18
3.2	Synthese und optische Charakterisierung der Oligonukleotide.....	26
3.3	Lichtinduzierte, bioorthogonale Markierung der Oligonukleotide	28
3.4	Synthese modifizierter Nukleinsäuren durch enzymatische Primerverlängerung ...	42
3.4.1	Synthese des artifiziellen Triphosphats 17	42
3.4.2	Enzymatische Primerverlängerungsexperimente	43
4	Zusammenfassung und Ausblick	51
5	Experimenteller Teil.....	53
5.1	Materialien, Analytik und Geräte	53
5.2	Synthesevorschriften.....	59
5.3	Chemische Oligonukleotid-Synthese.....	72
5.3.1	Synthese modifizierter DNA	72
5.3.2	Charakterisierung modifizierter DNA	74
5.3.3	HPLC-Methoden	76
5.3.4	Sequenzen und Charakterisierung der modifizierten Oligonukleotide.....	76
5.4	Enzymatische Oligonukleotid-Synthese	77
5.5	Lichtinduzierte Markierungsexperimente	79
6	Abkürzungsverzeichnis	83
7	Literaturverzeichnis	85
8	Appendix.....	90
8.1	Publikationen.....	90

8.2	Posterbeiträge und Konferenzen	90
8.3	Lehre	91

1 Einleitung und Themenstellung

„Spinat erkennt Sprengstoff im Grundwasser“ lautete vor einiger Zeit der Titel eines Berichts bei Spiegel Online.^[1] Dieser reißerische Titel bezieht sich auf einen Artikel, der 2016 von einer amerikanischen Forschergruppe um *Strano* veröffentlicht wurde.^[2] Darin wird beschrieben, wie Spinatpflanzen mit fluoreszenten Nanosensoren aus einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWCTNs) ausgestattet wurden, die durch die Verknüpfung mit Bombolitin-Peptiden in der Lage sind, Nitroaromatenbelastungen im Grundwasser zu messen. Wird ein Nitroaromat an einen solchen Komplex gebunden, wird eine Konformationsänderung induziert, die letztlich zu einer Abschwächung der Emission im nahen Infrarotbereich führt. Diese Änderung im Fluoreszenzspektrum kann anschließend durch einen in der Nähe angebrachten Infrarot-Sensor quantifiziert werden.

Die Fluoreszenz dient nicht nur in der Pflanzen- oder Schadstoffdiagnostik als Informationsquelle, sondern ist auch in der medizinischen und biochemischen Forschung von herausragender Bedeutung. Bei der operativen Entfernung von Krebsgeweben können heutzutage auch exogene Fluorophore verabreicht werden. Diese reichern sich in Krebszellen an und helfen während der Operation dabei betroffenes Gewebe zu identifizieren.^[3]

Die entscheidende Bedeutung der fluoreszenten Bildgebung zeigt sich auch in der Vergabe des Nobelpreises für Chemie, der 2014 an *Eric Betzig*, *Stefan Hell* und *William Moerner* für die Entwicklung der supraauflösenden Fluoreszenzmikroskopie verliehen wurde.^[4] Diese erlaubt einen tieferen Einblick in zelluläre Prozesse, wodurch auch unser Verständnis von chemischen und biologischen Zusammenhängen vergrößert wird. Insbesondere der Einsatz von oligonukleotidbasierten Fluoreszenzsonden stellt bei der Aufklärung von zellulären Prozessen ein unverzichtbares Werkzeug dar.^[5] Die Kombination mit lichtinduzierten bioorthogonalen Markierungsreaktionen ermöglicht durch die raumzeitliche Kontrolle ein äußerst sensitives Werkzeug zur Untersuchung von biologischen Systemen.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die zwei tetrazolmodifizierten 2'-Desoxyuridine **1** und **2** synthetisiert werden, bei denen das Uracil direkt in die Tetrazol-Kernstruktur integriert wird (Abbildung 1). Dies soll einerseits die sterische Hinderung der Oligonukleotidstruktur verringern und andererseits durch das elektronenziehende Uracil-Gerüst eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima in Richtung des sichtbaren Lichts zu ermöglichen.

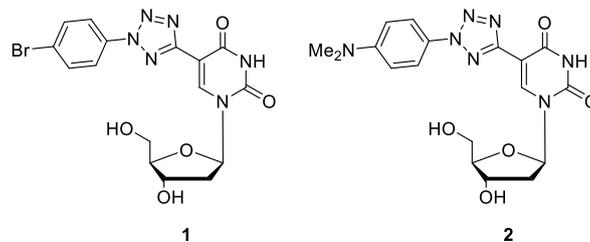
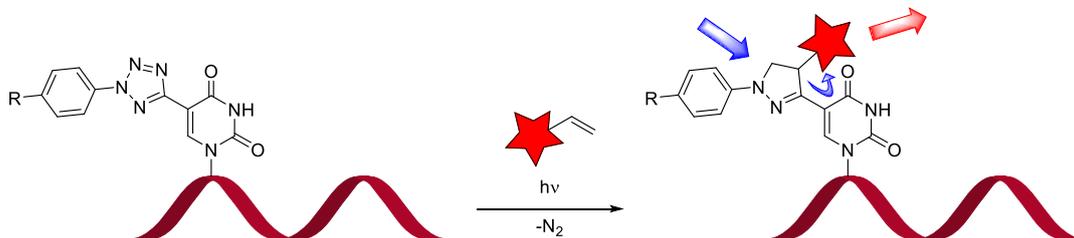


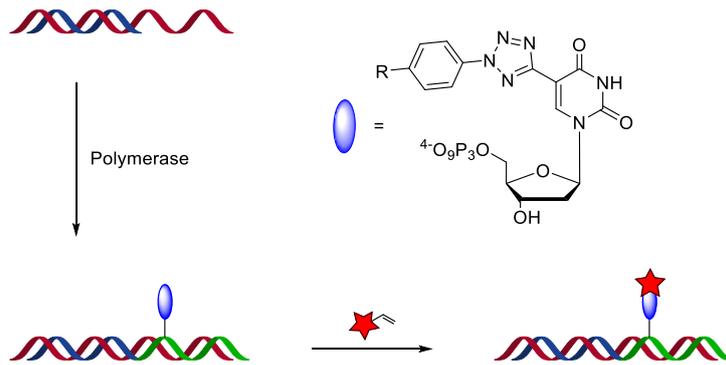
Abbildung 1: Strukturen der tetrazolmodifizierten 2'-Desoxyuridine **1** und **2**.

Beide Nucleoside sollen mittels festphasenbasierter DNA-Synthese in Oligonukleotide integriert und auf ihr Reaktionsverhalten bezüglich der lichtinduzierten Nitrilimin-Alken-Cycloaddition untersucht werden. Dabei soll die intrinsische Fluoreszenz des gebildeten Pyrazolins ausgenutzt und durch Wahl eines geeigneten Farbstoffs ein möglicher Elektronentransfer erprobt werden (Schema 1).



Schema 1: „Photoklick“-Reaktion zur Fluoreszenzmarkierung von DNA. Der verwendete Farbstoff soll dabei so gewählt werden, dass ein Energietransfer () vom Pyrazolin aus möglich ist.

Bei geeignetem Reaktivitäts- und Anregungsverhalten soll schließlich ein Nucleosid-triphosphat synthetisiert werden. Durch die Anwendung von enzymatischer Primerverlängerung soll geprüft werden, unter welchen Bedingungen der Einbau des artifiziellen Bausteins durch Polymerasen und eine nachfolgende bioorthogonale Markierung möglich ist (Schema 2).



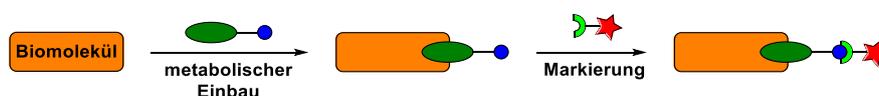
Schema 2: Einbau des artifiziellen Triphosphats durch enzymatische Primerverlängerung und anschließender „Photoclick“-Reaktion zur Markierung im DNA-Doppelstrang.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Bioorthogonale Markierung

Zelluläre Prozesse bestehen häufig aus einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher verschiedener Biopolymere, Ionen und Metaboliten. Es ist daher selten möglich, nur aufgrund der chemischen Struktur des isolierten Biomoleküls genaue Aussagen über dessen Funktionen im Organismus zu treffen. Daher werden Methoden benötigt, die erlauben, Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung zu verfolgen und zu beobachten.^[6]

Die wohl verbreitetste Methode zur Visualisierung von Proteinen stellt die Markierung mit fluoreszenten Proteinen, allen voran GFP (*green fluorescent protein*), dar. Die Entdeckung durch *Prasher et al.*^[7] und der Einsatz von GFP in genetischen Markierungsexperimenten, wofür 2008 *O. Shimomura*, *M. Chalfie* und *R. Tsien* mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurden,^[8-10] erlaubt die Untersuchung von zahlreichen zellulären Prozessen, wie beispielsweise die Transkription im Zellkern.^[11] Heute steht eine Reihe weiterer fluoreszenter Proteine zur Verfügung, mit denen sich ein großer Bereich des sichtbaren Spektrums abdecken lässt.^[12-14] Mit einer Größe von 25 kDa oder mehr, beeinflussen die angebrachten fluoreszenten Proteine die Struktur und damit auch die Funktionalität vieler Biomoleküle. Sie sind daher ungeeignet für die Markierung von Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, Metaboliten, Lipiden und posttranslational modifizierten Proteinen.^[15-16]



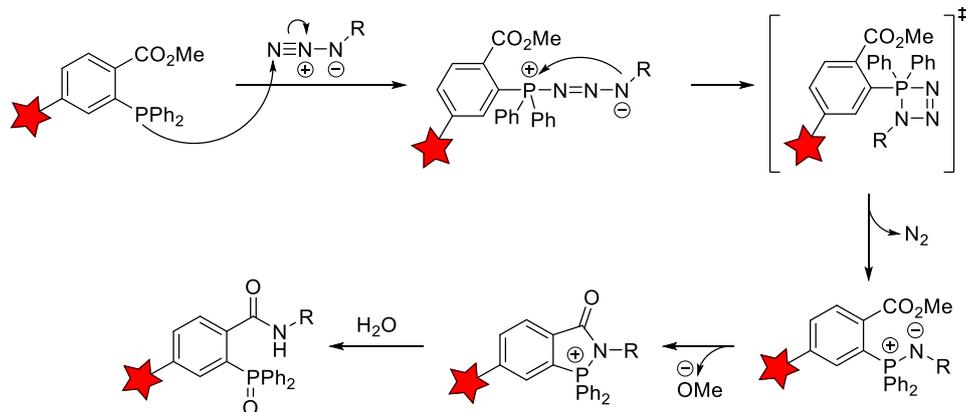
Schema 3: Schematische Darstellung einer bioorthogonalen Markierung. Ein chemischer Marker wird zunächst über den Zellmetabolismus in ein Biomolekül integriert, woraufhin dieses beispielsweise mit einem Fluorophor sichtbar gemacht werden kann.

Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren verstärkt an bioorthogonalen Methoden geforscht.^[16-19] Diese dürfen chemoselektiv nur das gewünschte Zielmolekül markieren und keine Kreuzreaktionen mit bereits in der Zelle vorhandenen Funktionalitäten eingehen. Sowohl das Produkt als auch die Reaktionspartner müssen dabei unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 6–8, wässrig, O₂) stabil sein und dürfen keine zytotoxische Wirkung

aufweisen. Hohe Reaktionsgeschwindigkeiten minimieren dabei die benötigten Reagenzmengen und den Stress, der auf das biologische System ausgeübt wird. Außerdem sollten die beteiligten funktionellen Gruppen so klein wie möglich sein, um Störungen auf biologische Funktionen zu minimieren.^[19]

Um eine bioorthogonale Methode zur Markierung in einem biologischen System einsetzen zu können, muss zunächst der chemische Marker metabolisch oder enzymatisch an der gewünschten Position in das Biomolekül eingebaut werden. Dabei handelt es sich meist um kleine funktionelle Gruppen, die in biologischen Systemen selten oder gar nicht anzutreffen sind. Anschließend wird in einer bioorthogonalen Reaktion beispielsweise ein Chromophor, der den entsprechenden selektiven Reaktionspartner trägt und zuvor in die Zelle eingeschleust wurde, mit dem Marker kovalent verknüpft (Schema 3).^[6]

Als erste bioorthogonale Reaktion gilt die von *Bertozzi et al.* entwickelte Staudinger-Ligation,^[20] bei der Alkylazide mit esterfunktionalisiertem Triphenylphosphin in wässriger Lösung zu stabilen Addukten verknüpft werden (Schema 4).

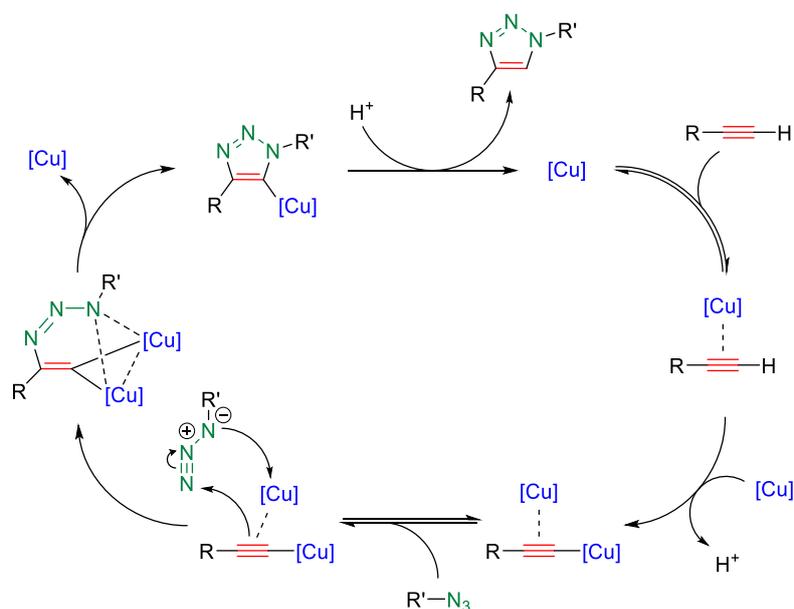


Schema 4: Mechanismus der von *Bertozzi et al.* entwickelten Staudinger-Ligation.^[20]

Obwohl diese Reaktion mit einer Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung im Bereich von $k_2 = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ als eine der langsamsten bioorthogonalen Markierungsmethoden gilt,^[17] ist sie auch heute noch sehr verbreitet, da sowohl organische Azide als auch Triarylphosphine in biologischen System nahezu nicht existent sind, was eine hervorragende Biokompatibilität zur Folge hat. Neben der Markierung von Zelloberflächen *in vitro*^[21] und in lebenden Mäusen^[20] durch *Bertozzi et al.*, konnten *Marx et al.* einen enzymatischen Einbau von azidmodifizierten Nukleotiden in DNA und nachfolgende Biotin-Markierung zeigen.^[22-23]

Nachdem das Prinzip der bioorthogonalen Markierung mit der Staudinger-Ligation als Prototyp erfolgreich umgesetzt wurde, haben sich eine Reihe weiterer Methoden etabliert.^[24]

Azide haben auch abseits der Staudinger-Ligation Verwendung zur Markierung von Biomolekülen gefunden. Bereits *Huisgen et al.* konnten in den 70er Jahren zeigen, dass Azide in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit terminalen Alkinen reagieren.^[25] Doch erst die Entdeckung der katalytischen und regioselektiven Wirkung von Cu^{I} -Salzen auf die Reaktion durch die Arbeitsgruppen von *Sharpless*^[26] und *Meldal*^[27] ermöglichte eine praktikable Anwendung. Die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) toleriert zahlreiche funktionelle Gruppen und Lösungsmittel und funktioniert über einen weiten pH- und Temperaturbereich.^[28] Es werden regioselektiv stabile 1,4-Triazole gebildet und sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreicht,^[29] was *Sharpless et al.* auf die Bildung von Kupfer(I)-Acetylid zurückführte.^[28] *Fokin et al.* postulierten vor einigen Jahren jedoch einen neueren Mechanismus, der die Regioselektivität und katalytische Wirkung mit einem dinuklearen Kupferintermediat erklärt (Schema 5).^[30]



Schema 5: Von *Fokin et al.* postulierter Mechanismus der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.^[30]

Der Einsatz von CuAAC ist in biologischen Systemen jedoch nur eingeschränkt möglich, da Kupfer(I) zytotoxische Wirkungen aufweist. Durch den Einsatz biokompatibler Liganden wie die Tris(triazolylmethyl)amin-Liganden THPTA^[31], BTES^[32] und BTTAA^[33] konnte die Zytotoxizität der Kupfer(I)-Spezies reduziert, sowie die Reaktionsgeschwindigkeit weiter erhöht werden (Abbildung 2).^[34]

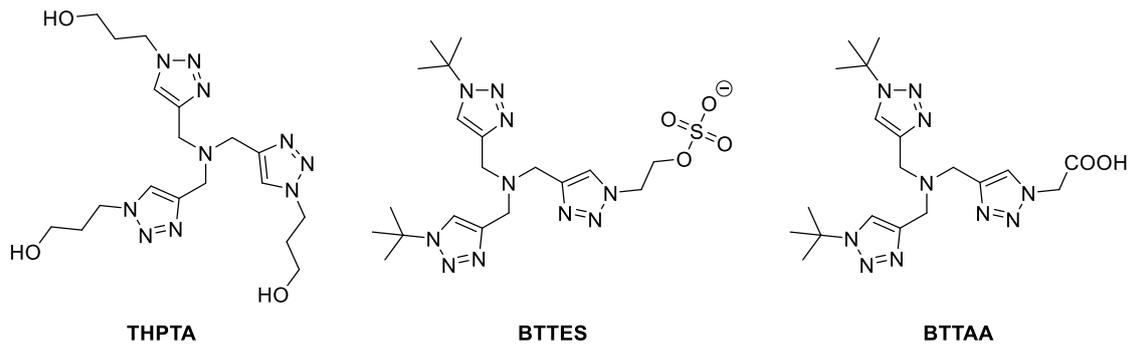


Abbildung 2: Tris(triazolylmethyl)amin-Liganden zur Minimierung der Zytotoxizität in der CuAAC.^[34]

Die CuAAC ist trotz ihrer Einschränkungen sicherlich die verbreitetste bioorthogonale Reaktion und wurde beispielsweise bereits zur Markierung von Proteinen, Glykanen und Lipiden eingesetzt.^[34] Sie hat sich weiterhin als Standardmethode zur postsynthetischen Modifizierung von Oligonukleotiden etabliert, wofür heutzutage auch eine Reihe kommerziell erhältlicher Bausteine verfügbar sind (Abbildung 3).^[35]

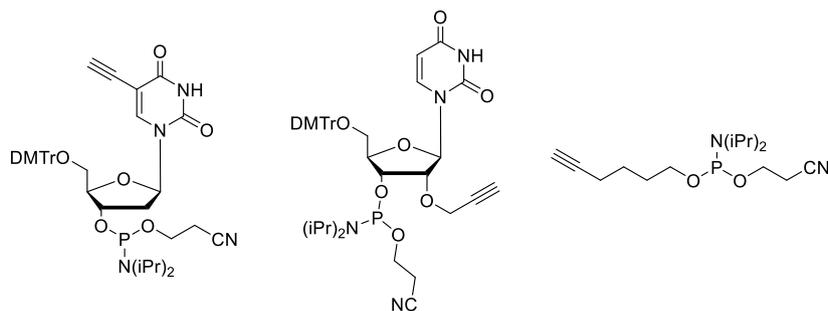


Abbildung 3: Gängige Phosphoramiditbausteine für CuAAC mit Oligonukleotiden.^[35]

Gänzlich auf zytotoxische Katalysatoren kann verzichtet werden, wenn die verwendeten Alkine durch eine eingebrachte Ringspannung aktiviert werden. *Bertozzi et al.* konnten zeigen, dass die sogenannte ringsspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC = *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) spontan unter physiologischen Bedingungen und ohne den Einsatz eines Katalysators abläuft.^[36] Mit einer Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $k_2 = 2.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Reaktion zwischen OCT und Benzylazid in CD_3CN) bewegte sich die erste veröffentlichte SPAAC in der gleichen Größenordnung wie die Staudinger-Ligation.^[36] Durch gezielte Modifikation stehen heute verschiedene gespannte Alkine zur Verfügung, die jedoch eine deutliche Beschleunigung gegenüber der Staudinger-Ligation erlauben (Abbildung 4).^[37-39] Die bislang höchste Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung $k_2 = 4.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für eine SPAAC wurde für den schwefelhaltigen siebengliedrigen Zyklus TMTH (Reaktion mit Benzylazid in CD_3CN) gemessen.^[38]

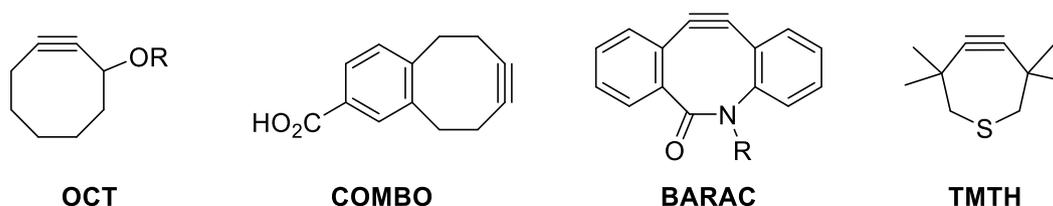
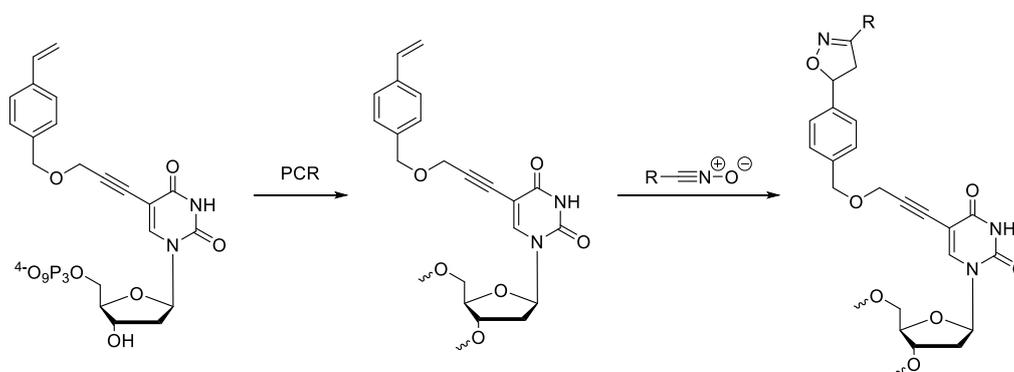


Abbildung 4: Strukturen verschiedener ringgespannter Alkine für die kupferfreie 1,3-dipolare Cycloaddition mit Aziden. Die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen SPAAC reichen von $k_2 = 2.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (OCT) bis hin zu $k_2 = 4.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (TMTH).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition sowohl für die Markierung von Zellmembranen in lebenden Zellen^[36] als auch in lebenden Zebrafischen^[40] eignet. *Wagenknecht et al.* zeigten weiterhin, dass sie für die postsynthetische Markierung von COMBO-modifizierter DNA in HeLa-Zellen einsetzbar ist.^[41]

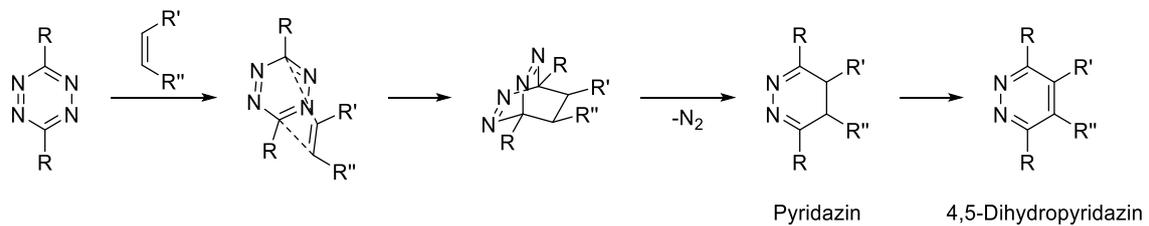
Ringgespannte Alkine lassen sich außerdem mit Nitronen in einer [3+2]-Cycloaddition analog zur Reaktion mit Aziden umsetzen.^[42] Die SPANC (*strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition*) verläuft bis zu 100 Mal schneller als die SPAAC,^[43] ist jedoch aufgrund der leichten Hydrolyse der Nitrone für den Einsatz *in vivo* derzeit noch problematisch. *Carell et al.* verwendeten diese Methode zur Markierung einer enzymatisch mit Styrenen modifizierten DNA (Schema 6).^[44-45]



Schema 6: Von *Carell et al.* durchgeführte SPANC an Oligonukleotiden.^[44-45]

Diels-Alder-Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA = *inverse electron demand Diels-Alder*) zwischen Tetrazinen und geeigneten Dienophilen kommen ebenfalls ohne den Einsatz eines Katalysators aus (Schema 7).^[46] Als Dienophile eignen sich dabei insbesondere Norbornene, Cyclopropene, Bicyclononine und *trans*-Cyclooctene. Die ersten bioorthogonalen Anwendungen wurden 2008 veröffentlicht. *Fox et al.* zeigten die erfolgreiche Markierung von Thioredoxin mittels iEDDA und bestimmten weiterhin die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung zwischen *trans*-Cycloocten (TCO) und

3,6-Di-(2-pyridyl)-tetrazin auf $k_2 = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[47] *Hilderbrand et al.* präsentierten im gleichen Jahr die Markierung von Zelloberflächen, wofür sie Norbornene als Dienophile einsetzten.^[48]



Schema 7: Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf.

Durch die Forschung verschiedener Arbeitsgruppen sind mittlerweile iEDDA-Reaktionen mit Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung bis zu $k_2 = 2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bekannt.^[49-50] *Wagenknecht et al.* veröffentlichten kürzlich den Einsatz von iEDDA für die Markierung von enzymatisch synthetisierter cyclopropenmodifizierter DNA.^[51] *Kath-Schorr et al.* gelang der Einbau von Cyclopropenen durch *in vitro* Transkription in RNA und anschließender Markierung mit einem Tetrazin.^[52] Alternativ zu Tetrazinen, können auch stabilere 1,2,4-Triazine zur DNA-Markierung eingesetzt werden.^[53] In Abbildung 5 wurden einige Dienophile für die iEDDA abgebildet.

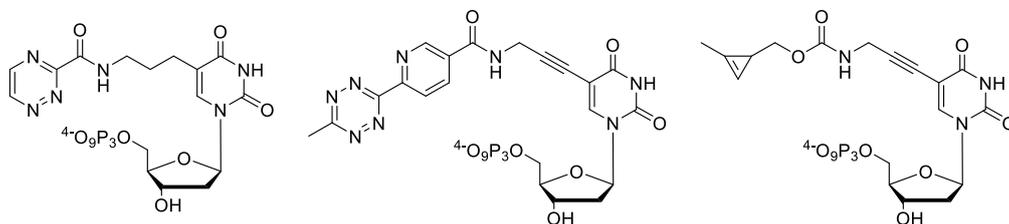
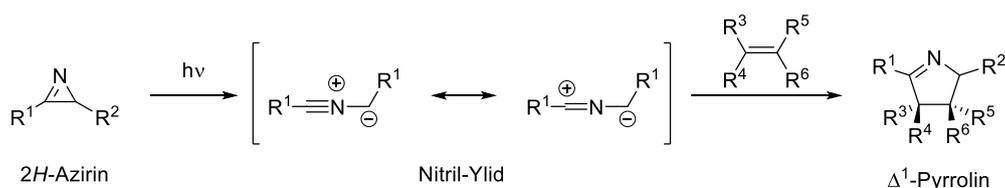


Abbildung 5: Dienophile für die iEDDA in Oligonukleotiden.^[51, 53-54]

Alle bisher genannten Reaktionen laufen spontan bei Aufeinandertreffen der Reaktanden ab. Sollen jedoch dynamische Zellprozesse beobachtet werden, so ist es von Vorteil, wenn Reaktionen gezielter gesteuert werden können. Dafür bieten sich insbesondere lichtinduzierte Reaktionen an, da hier beispielsweise durch punktuelle Bestrahlung mit einem Laser eine raumzeitliche Kontrolle über den Start der Reaktion möglich ist.

Ein Beispiel dafür stellt die lichtinduzierte Cycloaddition zwischen Nitril-Yliden und elektronenarmen Alkenen dar, die erstmals von *Lin et al.* zur Markierung von Proteinen *in vitro* angewendet wurde.^[55] Dabei öffnet sich ein 2*H*-Diarylazirin durch Bestrahlung mit harter UV-Strahlung zu einem hochreaktiven Nitril-Ylid, das sofort eine Cycloaddition mit einem elektronenarmen Alken eingeht, wobei ein Pyrrolin gebildet wird (Schema 8).

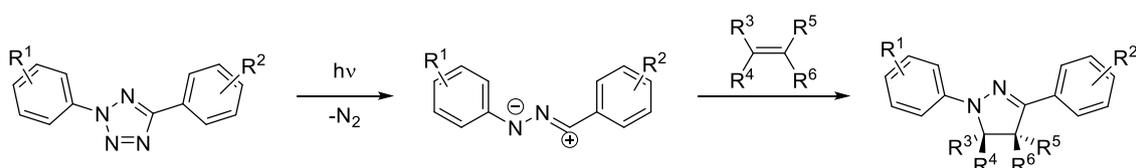


Schema 8: Lichtinduzierte Cycloaddition zwischen Nitril-Yliden und elektronenarmen Alkenen.

Barner-Kowollik et al. veröffentlichten 2015 erstmals ein pyrenmodifiziertes Azirin, das mit sichtbarem Licht zur Reaktion gebracht werden konnte, was den künftigen Einsatz *in vivo* vereinfachen dürfte.^[56]

2.2 Lichtinduzierte Nitrilimin-Alken-Cycloaddition

Ein weiteres prominentes Beispiel für eine lichtinduzierte bioorthogonale Reaktion stellt die Cycloaddition zwischen elektronenarmen Alkenen und Nitrilimininen dar. Bei der Anregung eines 2,5-disubstituierten Diaryltetrazols energiereicher Strahlung ($\lambda < 300$ nm) bildet sich durch Cycloreversion *in situ* ein Nitrilimin, welches rasch eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit aktivierten Alkenen eingeht (Schema 9). Während der Reaktion wird molekularer Stickstoff freigesetzt, wodurch die Cycloreversion irreversibel wird. Die Reaktion verläuft dabei regioselektiv unter Bildung eines 5-substituierten Pyrazolins.^[57]



Schema 9: Mechanismus der lichtinduzierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Nitrilimininen und Alkenen.

Die Reaktion wurde erstmals vor etwa 50 Jahren von *Huisgen et al.* beschrieben, war aufgrund der benötigten harten UV-Strahlung ($\lambda < 300$ nm) oder den alternativ hohen Temperaturen jedoch für den Einsatz in biologischen Systemen ungeeignet.^[58] Die Entwicklung von Diaryltetrazolen durch *Lin et al.*, die durch langwelligeres Licht ($\lambda = 365$ nm) zur Reaktion gebracht werden können, stellte hierfür einen entscheidenden Fortschritt dar, da die nötigen Anregungswellenlängen erstmals außerhalb der Absorptionsbereiche von Biomolekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen lagen.^[59] Die benötigte geringere Energie konnte dabei durch die Betrachtung der Kristallstrukturen von Nitrilimininen erklärt werden. Diese zeigen, dass die aromatischen Ringe in 2,5-substituierten Diaryltetrazolen nahezu perfekt planar angeordnet

sind. Dadurch kann das freie Elektronenpaar von elektronenschiebenden oder konjugierten Substituenten in *para*-Position des *N*-Phenylrings maximal mit dem delokalisierten π -System wechselwirken, wodurch die Grenzorbitale sich energetisch annähern. Dies bewirkt eine Verringerung der zur Anregung benötigten Energie, woraus letztlich eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums resultiert. Bei Anbringung in *ortho*-Position, wird die planare Anordnung gestört und somit die effektive Delokalisierung der π -Elektronen verringert, was wiederum zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums führt.^[59]

Mit dem Ziel, Tetrazole zu entwickeln, die durch sichtbares Licht ($\lambda > 400$ nm) zur Reaktion gebracht werden können, wurden in den letzten Jahren eine Reihe von neuen Strukturmotiven vorgestellt.^[60-63] Bislang existiert nur eine kleine Auswahl an Tetrazolen, die diese Kriterien erfüllen (Abbildung 6). *Barner-Kowolik et al.* stellte ein pyrenmodifiziertes Diaryltetrazol vor, das bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 410 - 420$ nm^[62] oder durch Hochkonversion sogar mit nahem Infrarotlicht der Wellenlänge $\lambda = 974$ nm^[64] mit Maleinimiden in einer lichtinduzierten Nitrilimin-Alken-Cycloaddition reagiert. Eine Reihe weiterer Tetrazole stammt aus der Gruppe um *Lin*, dabei ermöglicht die Verwendung von Oligothiophenen als Strukturmotiv den Einsatz eines Lasers mit der Wellenlänge $\lambda = 405$ nm.^[61, 63] Ebenfalls von *Lin et al.* wurde ein naphthalinmodifiziertes Tetrazol vorgestellt, das durch Zwei-Photonenanregung mit einem Femtosekundenlaser bei $\lambda = 700$ nm zur Reaktion gebracht werden kann.^[65]

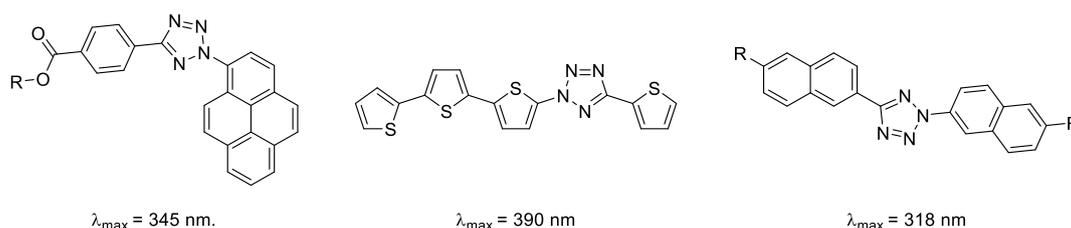


Abbildung 6: Diaryltetrazole, die durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht zur Reaktion gebracht werden können.^[61-62, 65]

Aufgrund hoher Reaktionsgeschwindigkeiten, milder Reaktionsbedingungen und hohen Gruppentoleranzen wird die 1,3-dipolare Cycloaddition von Nitrilimin an Alkene auch als „Photoklick“-Reaktion bezeichnet.^[16] Dabei handelt es sich um eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit normalem Elektronenbedarf (Typ I), wonach die Reaktionsgeschwindigkeit antiproportional mit der Größe der $\text{HOMO}_{\text{Dipol}}\text{-LUMO}_{\text{Dipolarophil}}$ -Lücke verknüpft ist.^[66] Es

konnte gezeigt werden, dass die energetische Anhebung des HOMO des Nitrilimin-Dipols durch elektronenschiebende oder konjugierende Substituenten zu erhöhten Reaktionsgeschwindigkeiten führt. Die Anbringung von elektronenziehenden Gruppen am Dipolarophil und die daraus resultierende Absenkung des LUMO zeigt dabei einen ähnlichen Effekt (Abbildung 7).^[67]

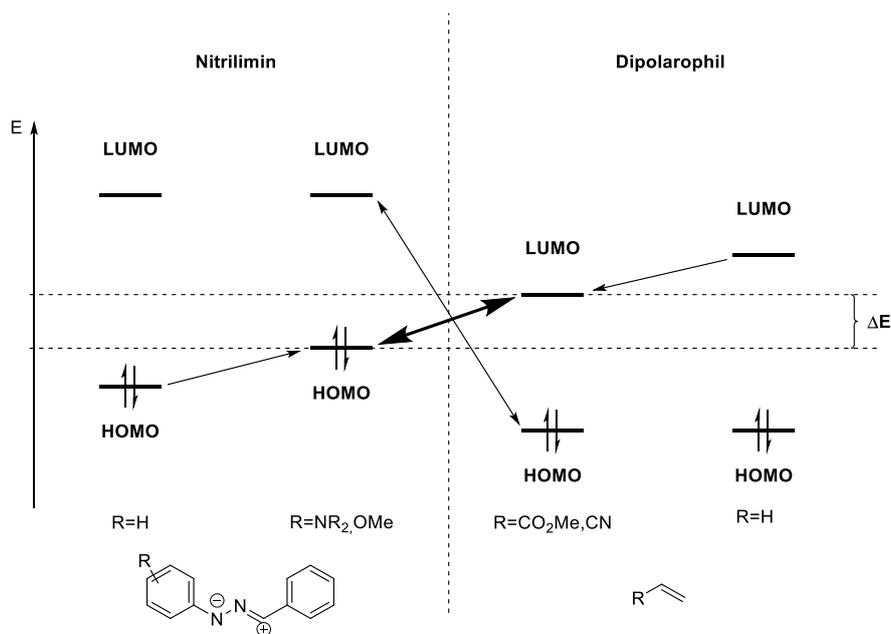
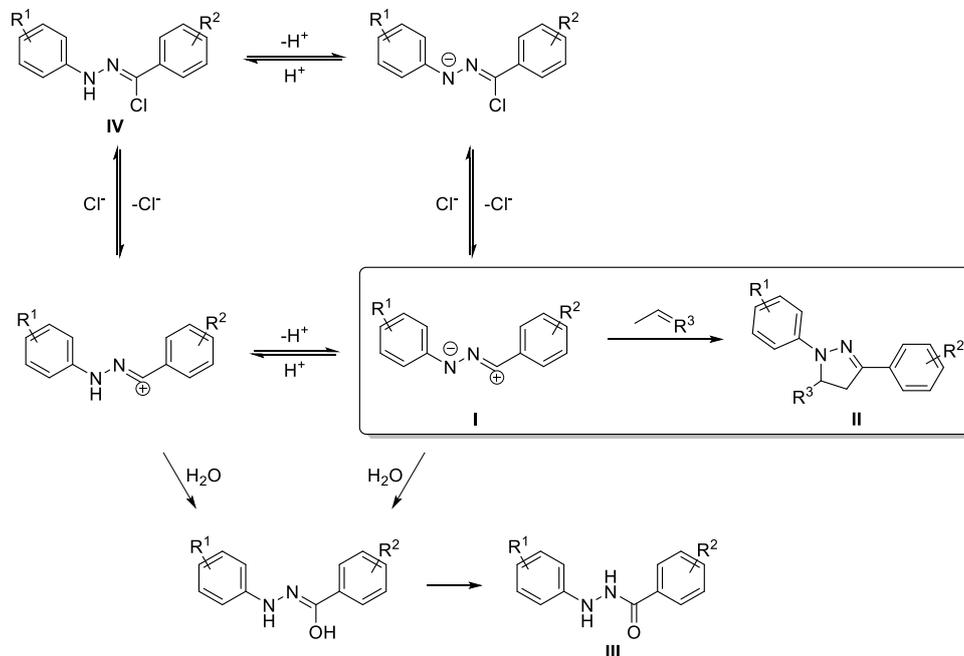


Abbildung 7: Energetische Darstellung der Einflüsse des Substitutionsmusters am Beispiel ausgewählter Substituenten an Nitrilimin und Dipolarophil.

„Photoklick“-Reaktionen weisen typischerweise Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf und zeigen damit vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten zur kupferkatalysierten Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen ($k_2 = 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[18] Vereinzelt wurde auch über Fälle mit höheren Geschwindigkeitskonstanten berichtet, beispielsweise gelang es *Lin et al.* durch den Einsatz eines besonders gespannten Cyclopropens als Dipolarophil Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von bis zu einer Größenordnung von $k_2 = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zu erreichen.^[68]

Diese hohe Reaktivität führt jedoch dazu, dass die Chemoselektivität nicht unter allen Bedingungen klar gegeben ist. Wird die Reaktion unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* durchgeführt, so können bei geeigneter Wahl der Reaktionspartner und des Lösungsmittels quantitative Ausbeuten erhalten werden. Doch bereits der Wechsel zu wässrigen Puffersystemen kann die Bildung von Nebenprodukten fördern. Durch die nukleophile Addition von Wasser kann sich zunächst das Hydrazon bilden, das dann, durch Keto-Enol-

Tautomerisierung, als Hydrazid **III** aus dem Gleichgewicht entzogen wird. Insbesondere in chloridhaltiger Lösung kann das Nitrilimin **I** durch intermediäre Bildung des Hydrazonoylchlorids **IV** zumindest zeitweise aus dem Gleichgewicht entzogen werden, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit zur Bildung des Pyrazolins **II** abnimmt (Schema 10).^[69]



Schema 10: Schematische Darstellung der möglichen Nebenreaktionen, die das Nitrilimin **I** in chloridhaltiger wässriger Umgebung eingehen kann.^[69]

Neben Wasser kann das Nitrilimin auch mit weiteren Nucleophilen wie beispielsweise Thiolen, Carbonsäuren und Aminen reagieren.^[70-74] Sind keine geeigneten Reaktionspartner vorhanden, so kommt es durch Dimerisierung zur Bildung eines 1,2,3-Triazols.^[75]

In den letzten Jahren hat sich die Photoklick Reaktion bereits als Methode zur bioorthogonalen Markierung von Proteinen etabliert, wobei inzwischen auch die Bedeutung in der Nucleinsäurechemie zugenommen hat.^[15, 76-78]

Die erste tetrazolmodifizierte DNA wurde 2014 von *Wagenknecht et al.* vorgestellt. Dabei wurde die Tetrazoleinheit über einen starren Alkynyl-Linker mit einem 2'-Desoxyuridin verknüpft und konnte durch Bestrahlung mit LEDs der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ in einer „Photoklick“-Reaktion mit einem maleinimidmodifizierten Cyaninfarbstoff umgesetzt werden. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung wurde auf $k_2 = 23 \pm 7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt und lag somit im erwarteten Bereich.^[79] Das Nucleotid konnte sowohl chemisch mittels

Festphasensynthese als auch enzymatisch über Primerverlängerungsexperimente in DNA eingebaut werden (Abbildung 8).^[51]

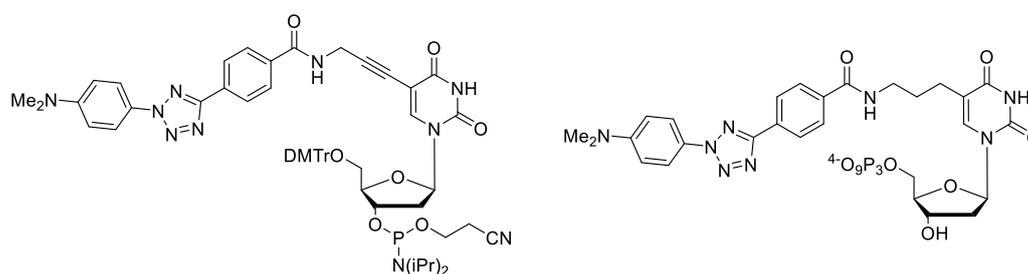
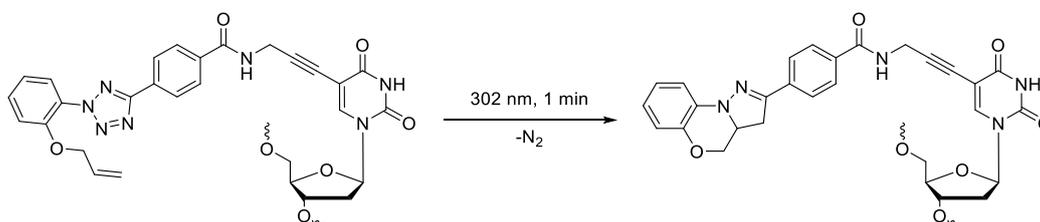


Abbildung 8: Die Strukturen der tetrazolmodifizierten 2'-Desoxyuridin-Bausteine von *Wagenknecht et al.* zur Markierung von Oligonukleotiden durch lichtinduzierte Nitrilimin-Alken-Cycloaddition.^[51, 79]

Darauf aufbauend, machten *Zhou et al.* sich die intrinsische Fluoreszenz der gebildeten Pyrazoline zu nutzen und stellten ein modifiziertes 2'-Desoxyuridin vor, das durch eine intramolekulare „Photoklick“-Reaktion einen starken *turn-on* Effekt zeigt (Schema 11).^[80] Dieser variiert im DNA-Duplex in Abhängigkeit von der gegenüberliegenden Base und kann dadurch zur Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen verwendet werden. Die Geschwindigkeitskonstante für die intramolekulare Reaktion wurde auf $k_2 = 0.05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt, womit sie im Vergleich zu anderen „Photoklick“-Reaktion langsam verläuft.



Schema 11: Schematische Darstellung der intramolekularen „Photoklick“-Reaktion von *Zhou et al.*^[80]

Auch zur Markierung von RNA wurde die „Photoklick“-Reaktion bereits verwendet. Durch Modifikation der 5'-Kappe einer miRNA, gelang *Rentmeister et al.* die Markierung mit einem Diaryltetrazol. Dies erlaubte die Detektion von endogener miRNA in Zellen.^[81] *Zhang et al.* konnten zeigen, dass eine am 3'-Ende modifizierte miRNA nicht in ihrer biologischen Funktion eingeschränkt wird. Nach Ausbildung der funktionellen Komplexe wurde die tetrazolmodifizierte miRNA durch „Photoklick“-Reaktion mit einem Biotin, das mit einem Monomethylfumarat modifiziert wurde, markiert. Dies erlaubte das Isolieren von bekannten und neuen Zielgenen für die beteiligte miRNA. Eine direkte Markierung mit Biotin-Molekül war nicht möglich, da dies die biologische Funktion einschränkte.^[82] Dieses Konzept wurde mit

einer intramolekularen „Photoklick“-Reaktion kombiniert, sodass eine Fluoreszenzmarkierung von 3'-tetrazolmodifizierter miRNA in Zellen ermöglicht wurde.^[83]

Die Kriterien der Bioorthogonalität werden durch die „Photoklick“-Reaktion nahezu lückenlos erfüllt. Potentielle Nebenreaktionen sollten für jedes Anwendungsgebiet genauer untersucht und abgewägt werden, können bei geeigneter Wahl der Reaktionspartner jedoch weitgehend vermieden werden. Die hohen Reaktionsgeschwindigkeiten erlauben eine schnelle und effiziente Markierung bei niedrigen Substratkonzentrationen, wobei die Durchführung in wässrigen Medien zu einer zusätzlichen Beschleunigung der Reaktion führt, was insbesondere für den Einsatz in biologischen Umgebungen von Vorteil ist.^[84] Die Reaktionspartner und die regioselektiv gebildeten Produkte weisen keine Toxizität auf, während vollständig auf den Einsatz von Übergangsmetallkatalysatoren verzichtet werden kann. Die intrinsische Fluoreszenz der gebildeten Pyrazoline erlaubt dabei Reaktionen genau zu verfolgen. Gemeinsam mit der Möglichkeit genau den Ort und den Zeitpunkt der Reaktion bestimmen zu können, ergibt sich mit der „Photoklick“-Reaktion damit eine interessante Alternative zu etablierten bioorthogonalen Markierungsmethoden.

3 Hauptteil

Um eine „Photoklick“-Reaktion an Oligonukleotiden zu ermöglichen, muss das verwendete Tetrazol durch Bestrahlung mit Licht außerhalb der typischen DNA-Absorption ($\lambda > 300$ nm) zur Reaktion gebracht werden können.

Daher sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei tetrazolmodifizierte 2'-Desoxyuridine **1** und **2** (Abbildung 9) synthetisiert werden. Durch die direkte Integration des Uracils in die Tetrazolstruktur soll einerseits die sterische Hinderung der Oligonukleotidstruktur verringert und andererseits durch das elektronenziehende Uracil-Gerüst eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima in Richtung des sichtbaren Lichts ermöglicht werden.

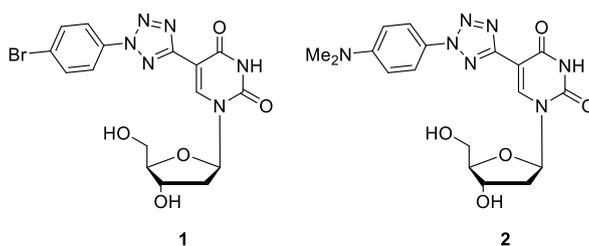
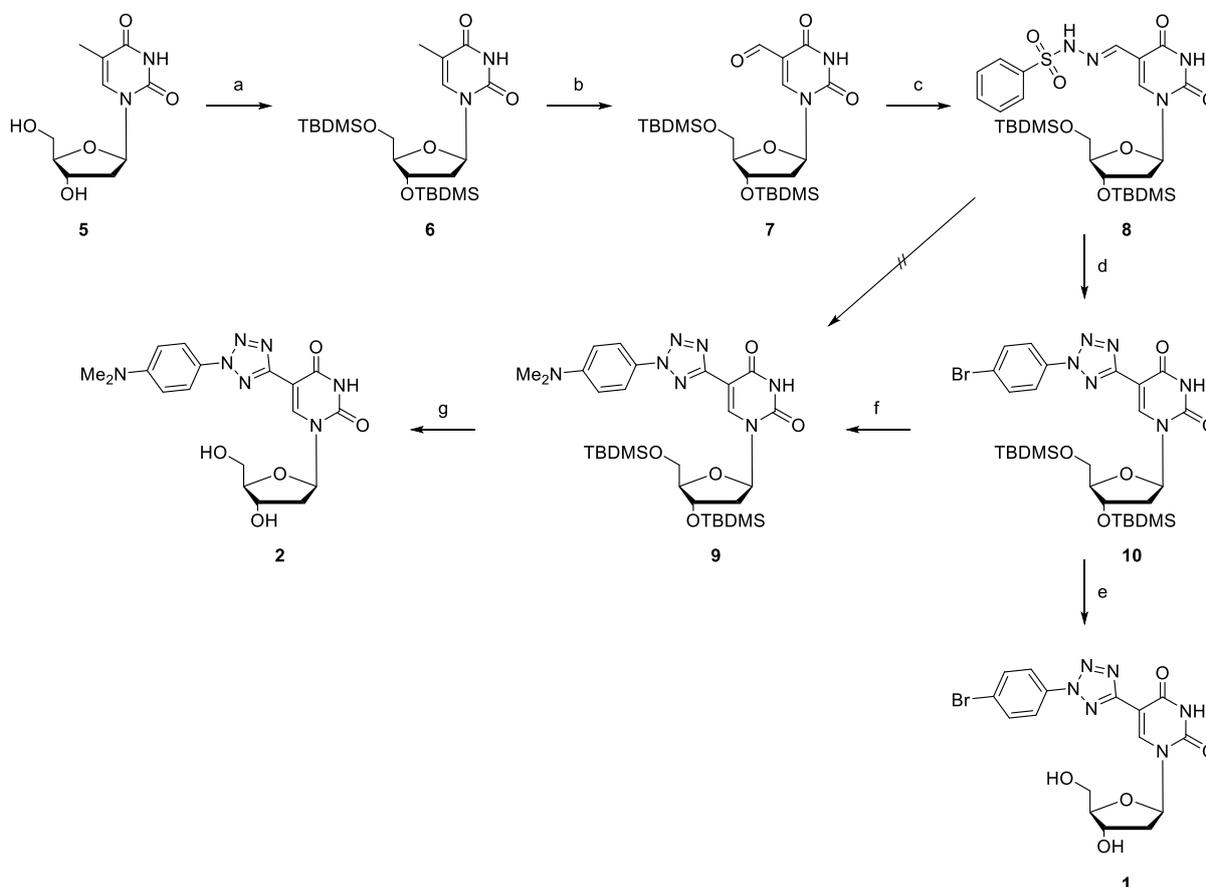


Abbildung 9: Strukturen der tetrazolmodifizierten 2'-Desoxyuridine **1** und **2**.

1 und **2** sollen anschließend durch festphasenbasierte DNA-Synthese in Oligonukleotide eingebaut und auf ihr Reaktionsverhalten in der lichtinduzierten Nitrilimin-Alken-Cycloaddition untersucht werden.

3.1 Synthese der Tetrazol-Bausteine

Nachfolgend sind die einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung der Tetrazol-Nukleoside **1** und **2** sowie der Phosphoramidit-Bausteine **3** und **4** erläutert.

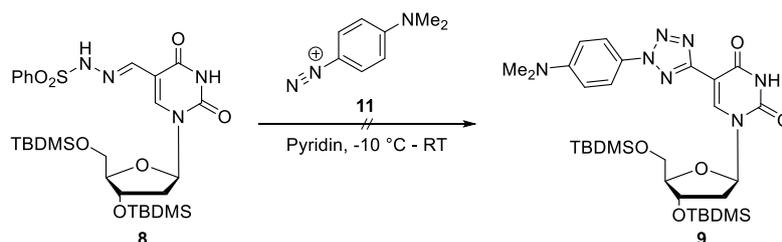


Schema 12: Syntheseroute zur Darstellung der tetrazolmodifizierten Nucleoside **1** und **2**. a) TBDMS-Cl, DMF, RT, 16 h, 98 %; b) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 2,6-Lutidin, MeCN/ H_2O (1:1), 65 °C, 4 h, 54 %; c) Phenylsulfonsäurehydrazid, EtOH, RT, 1 h, 84 %; d) 4-Brombenzoldiazoniumtetrafluoroborat, Pyridin, -10 °C – RT, 16 h, 58 %; e) TBAF, THF, RT, 15 min, 86 %; f) $\text{HNMe}_2 \cdot \text{HCl}$, NaOtBu, $\text{Pd}(\text{dba})_2$, JohnPhos, Toluol, 40 °C, 18 h, 29 %; g) TBAF, THF, 10 min, 74 %.

Ausgehend von Thymidin **5** wurden zunächst die 3'- und 5'-Hydroxygruppen durch Umsetzung mit TBDMS-Chlorid zum *tert*-Butyldimethylsilylether geschützt (Schema 12, Reaktion a). Die nachfolgende Oxidation zum geschützten 2'-Desoxy-5-formyluridin **7** basiert auf einer Vorschrift von *Engels et al.* (Schema 12, Reaktion b).^[85] Dabei wird die Methylgruppe des geschützten Thymidins **6** mit Kaliumperoxodisulfat zum Aldehyd oxidiert. Die Zugabe von Kupfersulfat aktiviert die Peroxodisulfationen, wodurch die Bildung von Sulfatradikalen beschleunigt wird.^[86] Die Base 2,6-Lutidin fängt einerseits die freigesetzten Protonen ab,^[87] fungiert zusätzlich aber auch als Phasentransferkatalysator.^[88] Die Ausbeute von 29 % des

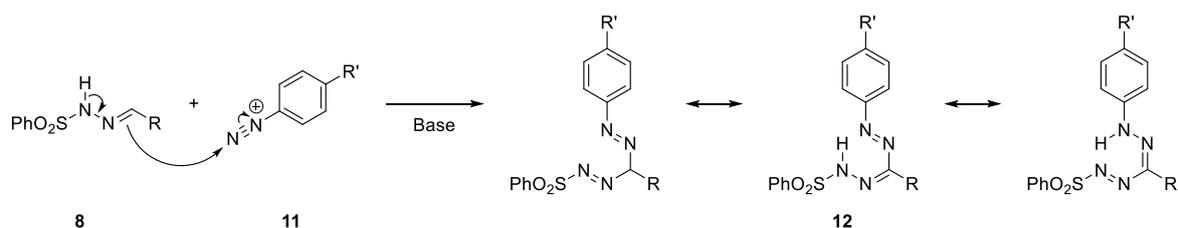
2'-Desoxy-5-formyluridins **7** (5-Formyl-dU) lag deutlich unter den in der Literatur angegebenen 50 %^[85] und lässt sich möglicherweise auf das unvollständig gelöste Kaliumperoxodisulfat zurückführen. Zur besseren Löslichkeit wurde daher das Natriumsalz verwendet, wodurch die Ausbeute in 4 Stunden auf 54 % gesteigert werden konnte. Längere Reaktionszeiten oder die Anwendung von mehr als 2 Äquivalenten Natriumperoxodisulfat führten zur weiteren Oxidation der Aldehyd-Gruppe und der Bildung von geschütztem 2'-Desoxy-5-carboxyuridin.^[85, 88] Die Ausbeute könnte möglicherweise durch den Einsatz anderer Phasentransferkatalysatoren, wie beispielsweise Pyridin, oder die Reaktionsführung unter Sauerstoffatmosphäre weiter erhöht werden,^[88] was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Im nächsten Schritt wurde das geschützte 5-Formyl-dU **7** durch Kondensation mit Phenylsulfonsäurehydrazid zum Hydrazon **8** umgesetzt (Schema 12, Reaktion c). Das Produkt wurde durch Zugabe von Wasser gefällt und konnte so mit einer Ausbeute von 84 % erhalten werden.



Schema 13: Geplante Synthese zur Darstellung des dimethylaminomodifizierten Tetrazols **9**.

Für die Synthese des Tetrazols **9** wurde zunächst das Diazoniumsalz **11** *in situ* aus *N,N*-Dimethyl-1,4-phenylendiamin und Natriumnitrit in salzsaurer Lösung generiert und zu einer Lösung von Hydrazon **8** in Pyridin gegeben (Schema 13). Dabei sollte ein mesomeriestabilisiertes Formazan **12** entstehen, welches entscheidend für die Bildung des 2,5-disubstituierten Tetrazols **9** (Schema 14) ist.

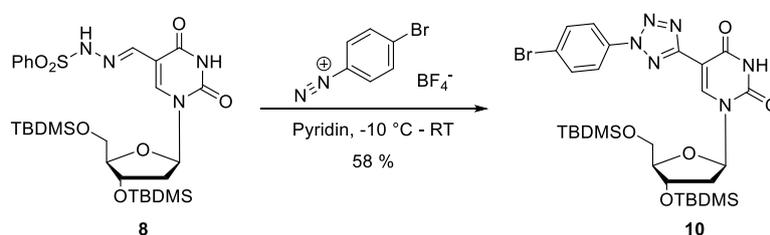


Schema 14: Bildung des mesomeriestabilisierten Formazans **12**.

Die erwartete Bildung des Tetrazols **9** blieb jedoch aus. Um auszuschließen, dass dies mit einer mangelnden Reinheit des generierten Diazoniumsalzes **11** zusammenhängt, wurde dieses in einem weiteren Versuch mit *tert*-Butylnitrit erzeugt, als Tetrafluoroborat gefällt und anschließend gewaschen und getrocknet, bevor es zur Reaktionslösung gegeben wurde. Auch in diesem Fall konnte kein Umsatz festgestellt werden.

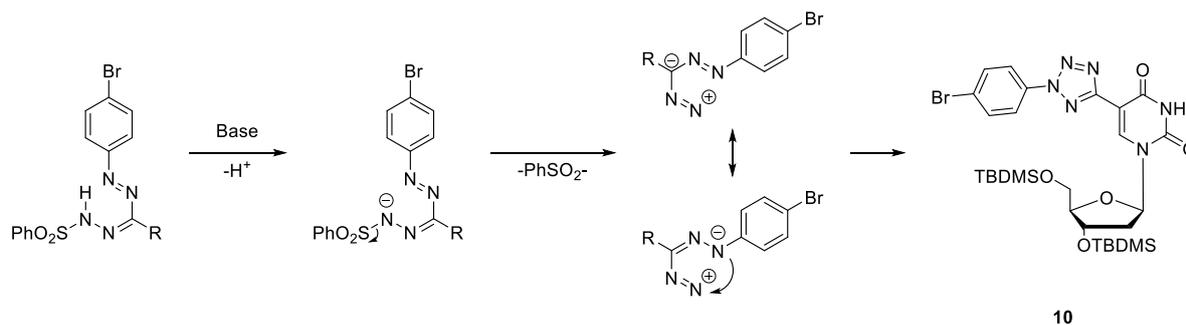
Durch den Dimethylaminosubstituenten wird Elektronendichte auf das Diazoniumsalz übertragen und somit dessen Elektrophilie deutlich herabgesetzt. Zusätzlich entziehen die Carbonylgruppen im Uracilgerüst Elektronendichte aus dem Hydrazone **8**. Der nukleophile Angriff kann schließlich nicht erfolgen und das Formazan **12** (Schema 14) wird nicht gebildet. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass insbesondere der Einsatz von elektronenarmen Diazoniumsalzen sowie elektronenreichen Hydrazonen zu guten Ausbeuten bei der Tetrazolsynthese führen sollte.

Daher wurde beschlossen, zunächst einen Bromidsubstituenten einzuführen und diesen in einem späteren Schritt zu ersetzen. Durch dessen elektronenziehende Eigenschaften wird die Elektrophilie des Diazoniumsalzes erhöht, womit die Bildung des Formazans erleichtert werden sollte.



Schema 15: Synthese des bromierten Tetrazols **10**.

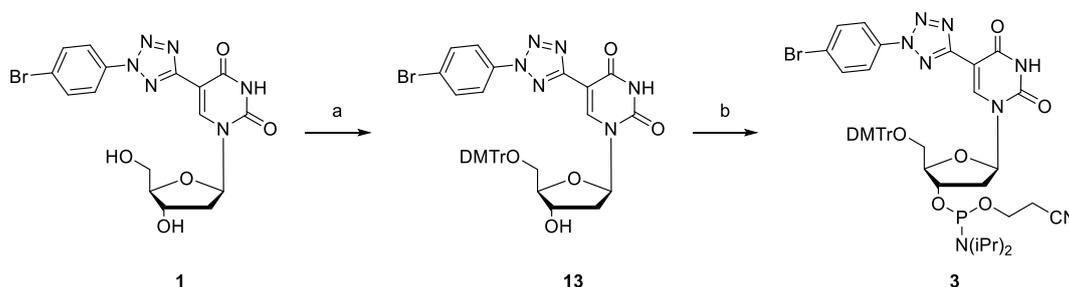
Die Reaktion wurde mit kommerziell erworbenem 4-Brombenzoldiazoniumtetrafluoroborat als Elektrophil erneut durchgeführt. Aufgrund der geänderten elektronischen Situation konnte das brommodifizierte Tetrazol **10** nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden erfolgreich in einer Ausbeute von 58 % isoliert werden (Schema 15).



Schema 16: S_N1 -artige Abspaltung von Phenylsulfinat mit nachfolgender Cyclisierung zum Tetrazol **10**.

Mechanistisch ist die Bildung des Tetrazols noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt, doch *Kakehi et al.*, die diese Methode der Tetrazol-Synthese entwickelt haben, ^[89-90] schlagen eine *Bamford-Stevens*-artige Reaktion vor, bei der zunächst ein Phenylsulfinat eliminiert wird. Dies wiederum bewirkt eine spontane Cyclisierung über eine 1,5-dipolare Cycloaddition des ansonsten stabilen Formazans (Schema 16).

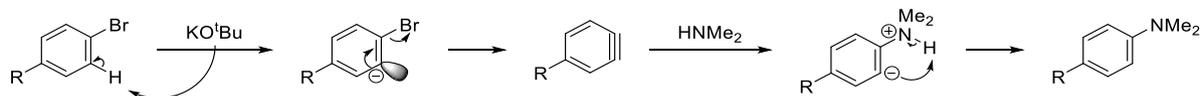
Das bromierte Nucleosid **1** wurde nach Entschützung mit TBAF schließlich über 5 Stufen in einer Gesamtausbeute von 22 % erhalten (Schema 12, Reaktion e).



Schema 17: Syntheseroute zur Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **3**. a) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 2 h, 89 %; b) 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminophosphorylchlorid, DIPEA, DCM, RT, 2 h, 78 %.

Um den Phosphoramidit-Baustein **3** zu erhalten, wurde das Nucleosid **1** zunächst nach Standardbedingungen an der 5'-Hydroxylgruppe dimethoxytrityliert und schließlich an der 3'-Position phosphityliert (Schema 17).

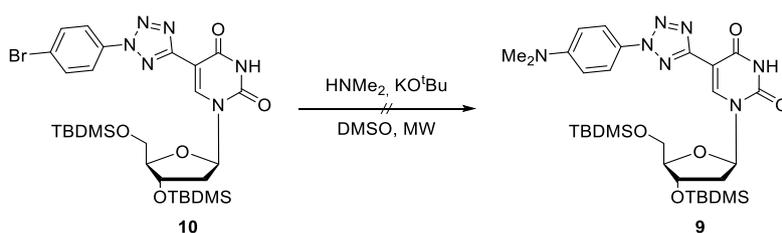
Zur Synthese des Tetrazols **2** sollte der Bromsubstituent im Nucleosid **10** zunächst durch eine Dimethylaminogruppe ersetzt werden. Hierzu diente eine Methode von *Tu et al.* als Orientierung, nach der Arylhalogenide ohne den Einsatz von Übergangsmetallkatalysatoren aminiert werden können.^[91]



Schema 18: Schematische Darstellung des Eliminierungs-Additions-Mechanismus.

Da die Kohlenstoff-Brom-Bindung des Moleküls in der gleichen Ebene wie das sp^2 -Orbital des benachbarten Kohlenstoffatoms liegt, kann aufgrund der Elektronegativität des Bromsubstituenten eine geringe Stabilisierung des sich bildenden Carbanions erreicht werden, wodurch sehr starke Basen dazu in der Lage sind das benachbarte Proton zu abstrahieren. Nachfolgend wird durch Bildung einer Arin-Zwischenstufe der Bromsubstituent eliminiert. Dieses sehr instabile Intermediat wirkt elektrophil, sollte also nukleophil von Dimethylamin angegriffen werden können (Schema 18).^[92] Durch den Einsatz eines polar aprotischen Lösungsmittels wie DMSO wird die Nucleophilie des Dimethylamins weiter erhöht, was die Reaktion weiter begünstigen sollte.^[93]

Um diese Hypothese zu testen, wurde das Nucleosid **10** in Gegenwart verschiedener Äquivalente von Kalium-*tert*-Butanolat und Dimethylamin in DMSO für 10 – 20 Minuten in einem Mikrowellenreaktor zum Sieden erhitzt (Schema 19).



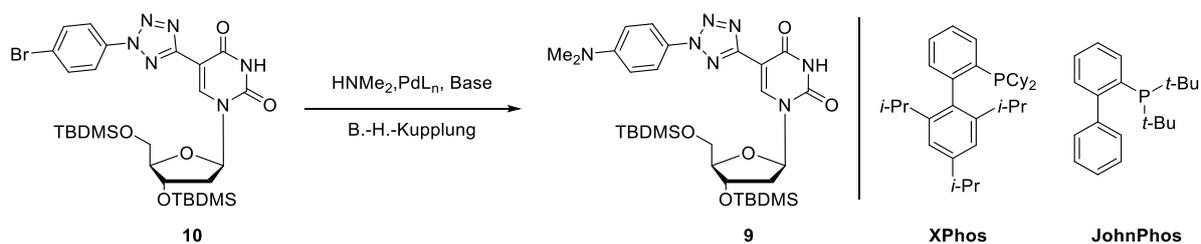
Schema 19: Fehlgeschlagene Reaktion zur Bildung des Nucleosids **9** nach einer Methode von *Tu et al.*^[91]

Das gewünschte Produkt **9** konnte jedoch nicht isoliert werden und auch bei den Reaktionskontrollen mittels Dünnschichtchromatographie konnte mit Schwefelsäure in Methanol kein Nucleosid **9** detektiert werden. Auch das Edukt konnte in keinem der Versuche identifiziert werden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass aufgrund zu harscher Bedingungen die glykosidische Bindung gebrochen wurde.

Da nukleophile Substitutionen an aromatischen Systemen nur bei starker elektronischer Aktivierung ablaufen, wurde beschlossen stattdessen eine Buchwald-Hartwig-Kupplung einzusetzen. Diese palladiumkatalysierte Reaktion ermöglicht die Verknüpfung eines Arylhalogenids mit einem primären oder sekundären Amin. Die große Auswahl an verfügbaren Katalysatoren verspricht dabei eine hohe Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Substraten bei milderen Reaktionsbedingungen.^[94-97]

Mechanistisch verläuft die Buchwald-Hartwig-Kupplung vergleichbar mit bekannten Kreuzkupplungen. Zunächst insertiert Palladium(0) in einer oxidativen Addition in die Halogen-Kohlenstoff-Bindung. Anschließend addiert das Amin an den dabei gebildeten Palladium(II)-Komplex und mithilfe einer Base wird Halogenwasserstoff eliminiert. Eine abschließende reduktive Eliminierung führt zur Bildung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung.^[98]

In der Literatur haben sich für Kupplungen von Dimethylamin mit Arylhalogeniden vor allem Biarylmonophosphinliganden wie XPhos^[99] oder JohnPhos^[100] als geeignet erwiesen (Schema 20, rechts).



Schema 20: (links) Einführung des Dimethylamino-Substituenten durch palladiumkatalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung, (rechts) Strukturen der Biarylmonophosphinliganden XPhos und JohnPhos.

Zu Beginn wurden für die Aminierung des bromierten Nucleosids **10** (Schema 20) Synthesebedingungen nach einer Vorschrift von Buchwald et al. getestet (Eintrag 1, Tabelle 1).^[99]

Tabelle 1: Verschiedene Reaktionsbedingungen der Buchwald-Hartwig-Reaktion zur Synthese des Nucleosids **9**.

#	Pd-Reagenz ^a	Ligand ^b	Base	Amin	LM	T [°C]	t [h]	Ausbeute
1	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	LHMDS 1.50 eq	HNMe ₂ 1.50 eq	THF	RT	16 – 24	0 – 49 % ^c
2	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	LHMDS 1.50 eq	HNMe ₂ 1.50 – 5.00 eq	THF	RT – 70	2 – 72	–
3	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	KO ^t Bu 1.50 eq	HNMe ₂ 1.50 eq	Toluol	RT – 110	2 – 24	–
4	Pd(OAc) ₂	(<i>t</i> -Bu ₃)Ph ^d	LHMDS 1.60 eq	HNMe ₂ 1.50 eq	THF	RT – 50	72	–

#	Pd-Reagenz ^a	Ligand ^b	Base	Amin	LM	T [°C]	t [h]	Ausbeute
5	Pd(dppf)Cl ₂	–	LHMDS 1.50 eq	HNMe ₂ 1.50 eq	THF	RT – 50	72	–
6	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	LHMDS 2.00 eq	HNMe ₂ 2.00 eq	THF	RT	16	17 %
7	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	LHMDS 4.00 eq	HNMe ₂ · HCl 2.00 eq	THF	RT	72	19 – 23 %
8	Pd ₂ (dba) ₃	JohnPhos	NaO ^t Bu 6.00 eq	HNMe ₂ · HCl 5.00 eq	Toluol	40	16	29 %
9	Pd ₂ (dba) ₃	JohnPhos	NaO ^t Bu 6.00 eq	HNMe ₂ · HCl 5.00 eq	DMF	40	16	–
10	Pd ₂ (dba) ₃	JohnPhos	NaO ^t Bu 6.00 eq	HNMe ₂ · HCl 5.00 eq	THF	40	16	–

^a 0.05 eq; ^b 0.10 eq; ^c nicht reproduzierbar; ^d als [(*t*-Bu)₃Ph]BF₄ eingesetzt; ^e Reaktion erfolgreich, aber glykosidische Bindung gebrochen.

Dabei konnte das Tetrazol **9** in einer Ausbeute von 49 % isoliert werden. Dieses Ergebnis konnte jedoch auch nach mehreren Versuchen nicht immer reproduziert werden. Von 10 Reaktionen ergaben zwei weitere Ausbeuten von 21 und 27 %, bei den restlichen Ansätzen konnte jedoch kein Umsatz beobachtet werden. Als Ursache hierfür wurde zunächst die Empfindlichkeit der Reaktion auf Spuren von Wasser vermutet, doch auch der Einsatz neuer Chemikalien und sorgfältiges Arbeiten unter wasser- und sauerstofffreien Bedingungen verbesserte die Reproduzierbarkeit nicht. Auch eine Erhöhung der Äquivalente an Dimethylamin, längere Reaktionszeiten oder erhöhte Temperaturen führten nicht zum gewünschten Umsatz (Eintrag 2, Tabelle 1).

Daher wurde beschlossen, den Einsatz anderer Basen, Lösungsmittel (Eintrag 3, Tabelle 1), Liganden (Eintrag 4, Tabelle 1) und Katalysatoren (Eintrag 5, Tabelle 1) zu testen. Doch auch dies führte nicht zum gewünschten Nukleosid **9**.

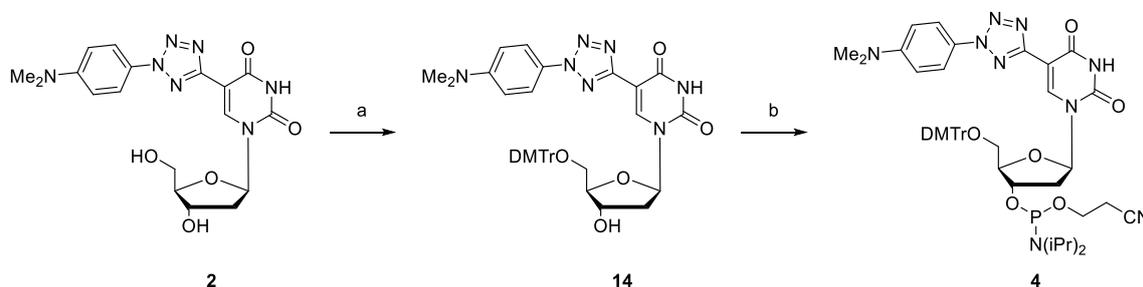
Da die starke Base LHMDS in der Lage ist, die Imid-Gruppe ($pK_a = 9.3$) des Uridin-Gerüsts zu deprotonieren, wurde in den folgenden Versuchen der Basenanteil erhöht. Der Einsatz von zwei Äquivalenten LHMDS führte schließlich erstmals zu reproduzierbaren Ausbeuten von 17 % (Eintrag 6, Tabelle 1).

Die hohe Flüchtigkeit des Dimethylamins stellt, insbesondere bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, ein Problem dar.^[101] Daher wurde in den nachfolgenden Reaktionen auf den Einsatz der Dimethylaminlösung verzichtet und stattdessen das Hydrochlorid verwendet. Dieses kann als Feststoff besser gehandhabt werden und setzt erst *in situ* durch Reaktion mit einem Äquivalent Base das gasförmige Dimethylamin frei. Erste Versuche mit vier

Äquivalenten Base und zwei Äquivalenten Dimethylamin-Hydrochlorid führten dabei bereits zu 19 – 23 % Ausbeute (Eintrag 7, Tabelle 1). Nach einer Methode von *Hocek et al.*^[102] wurden schließlich Natrium-*tert*-butanolat, Toluol und JohnPhos in Gegenwart von sechs Äquivalenten Dimethylamin-Hydrochlorid eingesetzt. Die Ausbeute des gewünschten dimethylamino-modifizierte Nucleosids **9** konnte auf diese Weise auf 29 % erhöht werden (Eintrag 8, Tabelle 1).

Um die Nucleophilie des Dimethylamins und somit die Ausbeuten zu erhöhen, wurde DMF als Lösungsmittel eingesetzt. Die Reaktionskontrolle zeigte jedoch auch nach 16 Stunden keinen Umsatz (Eintrag 9, Tabelle 1). Da Natrium-*tert*-butanolat in Toluol nur sehr schlecht löslich ist, wurde dieses in einem weiteren Ansatz in THF gelöst. Dies führte zwar zu einer erfolgreichen Aminierung, gleichzeitig wurde aufgrund der hohen Basizität jedoch die glykosidische Bindung gespalten (Eintrag 10, Tabelle 1).

Nach Entschützung der 5'- und 3'-Hydroxylgruppen mit TBAF konnte das dimethylaminomodifizierte Nucleosid **2** über insgesamt sechs Stufen in einer Gesamtausbeute von 6 % isoliert werden.

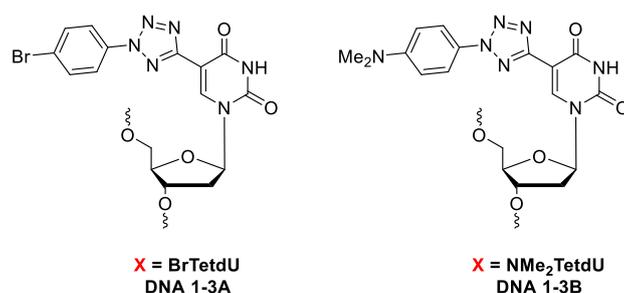


Schema 21: Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **4**. a) DMTrCl, Pyridin, 2 h, 93 %; b) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DCM, 2 h, 40 %.

Zur Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **4** wurde das Nucleosid **2** nach Standardbedingungen an der 5'-Hydroxylgruppe durch Umsetzung mit DMT-Chlorid geschützt und an der 3'-Position phosphityliert (Schema 21).

3.2 Synthese und optische Charakterisierung der Oligonukleotide

Die Phosphoramidit-Bausteine **3** und **4** wurden durch Anwendung der Phosphoramidit-Festphasen-Synthese in Oligonukleotide eingebaut. Dabei wurde für die Synthese von **DNA 1 – 3A** der bromierte Baustein **3** verwendet, während **DNA 1 – 3B** aus denselben Sequenzen mit dem dimethylaminomodifizierten Baustein **4** hergestellt wurde.



DNA 1A/B 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**X**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'

DNA 2A/B 5'-**X**-C-A-G-T-G-A-A-A-A-A-G-A-C-T-G-C-3'

DNA 3A/B 5'-**X**-T-T-C-A-C-T-G-A-G-C-A-G-T-C-T-T-3'

Abbildung 10: Die Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide **DNA 1A/B – 3A/B**. **X** markiert die Position der eingebauten Modifikation. **DNA 1 – 3A**: Nucleosid **1**; **DNA 1 – 3B**: Nucleosid **2**.

Dabei bestehen **DNA 1A/B** und **DNA 2A/B** zur besseren Vergleichbarkeit aus den gleichen Sequenzen, die bereits zuvor von Wagenknecht et al. zur optischen Charakterisierung verwendet wurden.^[79] **DNA 3A/B** wurde als zusätzliche Sequenz mit terminalem Einbau der Tetrazole gewählt um mögliche elektronische Effekte durch benachbarte 2'-Desoxyguanosine oder -cytidine zu vermeiden (Abbildung 10).

Für die Oligonukleotidsynthese unter Einsatz der artifiziellen Phosphoramiditbausteine **3** und **4** wurden die verwendeten Reagenzmengen der artifiziellen Phosphoramidite im Vergleich zum Standardprotokoll um 50 % erhöht, während die Kupplungszeiten von 56 Sekunden auf 1400 Sekunden verlängert wurden. Zur besseren Löslichkeit wurden die Phosphoramidite **3** und **4** statt in Acetonitril als 0.1 M Lösung in DCM vorgelegt.

Nach Abspaltung von der festen Phase mit einer wässrigen Ammoniumhydroxidlösung und Aufreinigung der synthetisierten Oligonukleotide wurden diese massenspektrometrisch nachgewiesen und anschließend gemeinsam mit den Nucleosiden **1** und **2** charakterisiert.

Tabelle 2: Berechnete und massenspektrometrisch nachgewiesene Massen der synthetisierten Oligonukleotide.

DNA	Berechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]
DNA 1A	5356.8	5357.6
DNA 2A	5432.9	5433.7
DNA 3A	5356.8	5356.1
DNA 1B	5321.9	-
	5159.9 (Nitril)	5152.0 (Nitril)
DNA 2B	5398.0	5405.0
DNA 3B	5321.9	5320.5

Zur Untersuchung der optischen Eigenschaften wurden Absorptionsspektren der Nukleoside **1** und **2** sowie der modifizierten Oligonukleotide aufgenommen. In Abbildung 11 sind exemplarisch die Absorptionsspektren von **DNA 3A/B** im Vergleich zu den Monomeren gezeigt. Dabei ist bei **DNA 3A** (rote Kurve) neben der charakteristischen Absorption der DNA bei $\lambda = 260$ nm deutlich eine Schulter im Bereich von $\lambda = 300 - 320$ nm zu erkennen. Diese kann der Tetrazolabsorption zugeordnet werden, deren Maximum im Nukleosid **1** bei $\lambda = 286$ nm liegt.

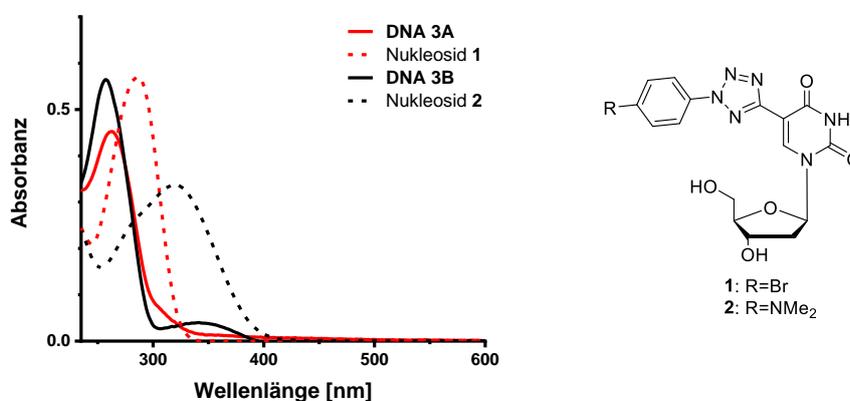


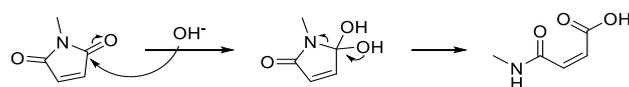
Abbildung 11: Absorptionsspektren der tetrazolmodifizierten Nukleoside **1** und **2** (25 μ M in 10 % Acetonitril, H₂O, 20 °C) im exemplarischen Vergleich mit den Oligonukleotiden **DNA 3A/B** (2.5 μ M DNA in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C).

Aufgrund des Dimethylaminosubstituenten in Nukleosid **2** wird mehr Elektronendichte in das aromatische System geschoben und dadurch dessen HOMO energetisch erhöht. Der *push-pull*-Effekt im Zusammenspiel mit dem elektronenarmen Uracil-Gerüst wird verstärkt. Dies bewirkt eine bathochrome Verschiebung der Absorption, deren Maximum in diesem Fall bei $\lambda = 320$ nm liegt. Das Absorptionssignal ist im Vergleich zu Nukleosid **1** stark verbreitert und reicht bis knapp über $\lambda = 400$ nm in den sichtbaren Spektralbereich. Somit sollte eine

lichtinduzierte Markierungsreaktion mit sichtbarem Licht möglich sein. In **DNA 3B** ist das Maximum der Tetrazolabsorption durch die Wechselwirkung mit den Nachbarbasen bei $\lambda = 341 \text{ nm}$ zu finden und somit deutlich von der DNA-Absorption separiert.^[103]

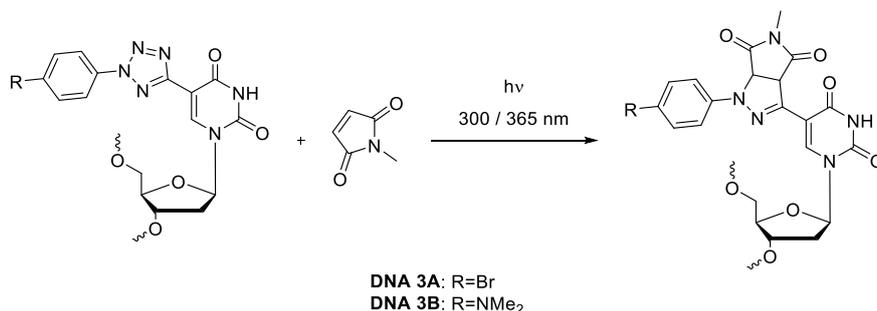
3.3 Lichtinduzierte, bioorthogonale Markierung der Oligonukleotide

Die synthetisierten Oligonukleotide sollten in einer lichtinduzierten 1,3-dipolaren Nitrilimin-Alken-Cycloaddition markiert werden. Als Dipolarophile für diese Reaktion eignen sich vor allem elektronenarme Alkene, wie das hier verwendete Maleinimid, dessen Carbonylgruppen die Doppelbindungen stark positiv polarisieren. Die daraus resultierende starke Aktivierung ist maßgeblich dafür, dass das Molekül häufig als Reaktionspartner in 1,3-dipolaren Cycloadditionen eingesetzt wird.^[104] Aus diesem Grund unterliegen Maleinimide auch leicht nukleophilen Ringöffnungen und neigen insbesondere in wässrigen Lösungen zur Hydrolyse (Schema 22).^[105-106]



Schema 22: Mechanismus der hydrolytischen Ringöffnung am Beispiel von *N*-Methylmaleinimid.

Zunächst wurden Markierungsexperimente mit *N*-Methylmaleinimid (NMM) als einfachstem Vertreter der Molekülklasse durchgeführt (Schema 23). Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Wasser und Acetonitril (9:1) verwendet.



Schema 23: Schematische Darstellung der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA 3A/B** und NMM.

DNA 3B wurde zusammen mit 5 Äquivalenten NMM durch Bestrahlung mit einer LED bei $\lambda = 365 \text{ nm}$ zur Reaktion gebracht. Der Verlauf der Reaktion wurde dabei mittels Absorptionsspektroskopie verfolgt (Abbildung 12). Bei fortschreitender Reaktion konnte dabei wie erwartet eine Abnahme der Absorption der von der DNA-Absorption separierten Tetrazol-

Bande bei $\lambda = 340$ nm beobachtet werden. Der erwartete Anstieg einer Absorptionsbande des gebildeten Pyrazolins blieb dahingegen aus. Ein analoges Verhalten konnte auch bei Bestrahlung von **DNA 3A** beobachtet werden.

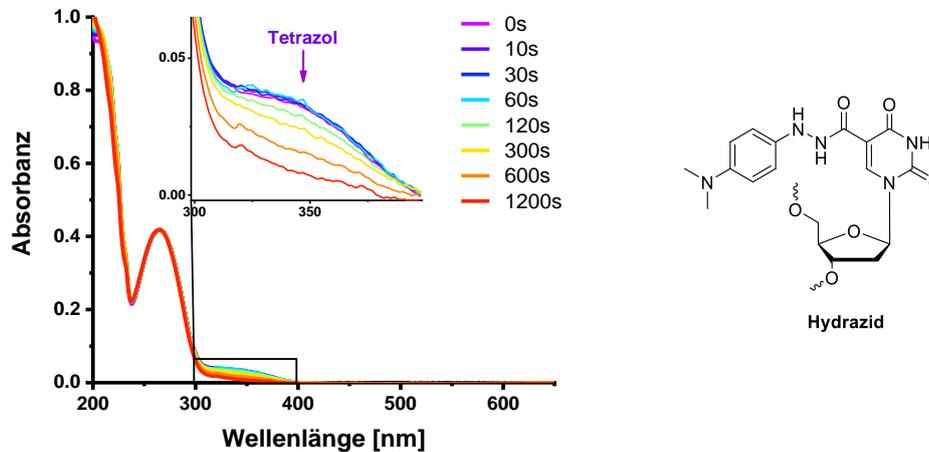


Abbildung 12: (links) Absorptionsspektren während dem Verlauf der „Photoklick“ zwischen **DNA 3B** und 5 eq NMM bei Belichtung mit $\lambda = 365$ nm (2.5 μ M DNA in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril (9:1), 20 °C). (rechts) Struktur des bei der Reaktion gebildeten Hydrazids.

Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass sich ausschließlich das Hydrazid bildet, welches durch die Addition von Wasser an das Nitrilimin entsteht. Daher muss davon ausgegangen werden, dass das Nitrilimin aufgrund seiner geringen Größe in der ungeordneten Struktur des DNA-Einzelstrangs nicht vom Reaktionspartner erreicht werden kann.

Aufgrund dessen wurden weitergehende Experimente unter Verwendung eines 10 mM Natriumphosphatpuffers und 250mM NaCl als Lösungsmittel durchgeführt. Die ionische Umgebung führt dazu, dass auch einzelsträngige DNA eine geordnete Struktur ausbilden kann, wodurch möglicherweise das Tetrazol besser zugänglich für eine Reaktion mit NMM wird. **DNA 3A** wurde in Gegenwart von 1.50 Äquivalenten NMM durch Bestrahlung mit einer LED bei $\lambda = 300$ nm zur Reaktion gebracht. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie verfolgt (Abbildung 13).

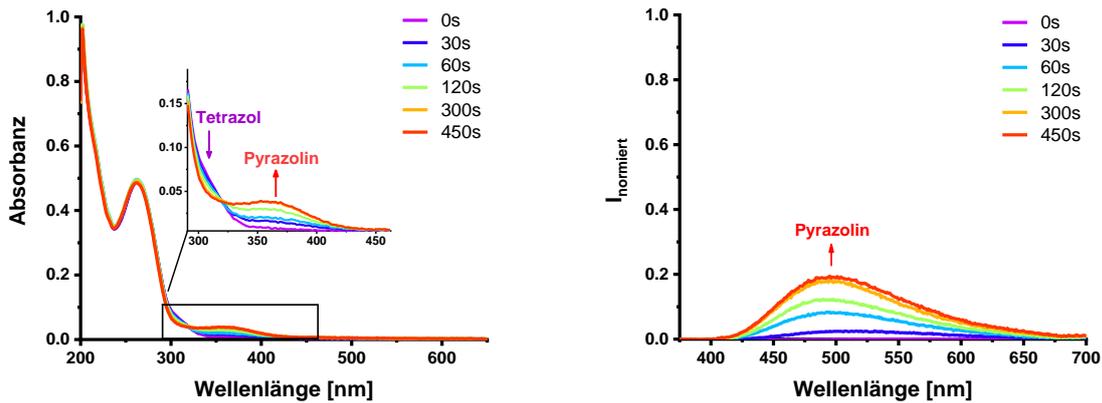


Abbildung 13: Verlauf der Absorption (links) und Emission (rechts) während der „Photoklick“-Reaktion von **DNA 3A** in Gegenwart von 1.50 eq NMM bei Belichtung mit $\lambda = 300$ nm (2.5 μ M DNA in 10 mM Na-P_i, 250 mM NaCl, pH = 7, 10 % Acetonitril, 20 °C).

Die Tetrazol-Absorption von **DNA 3A** bei $\lambda = 310$ nm nahm im Verlauf der Reaktion ab, gleichzeitig war der Anstieg einer neuen Absorptionsbande bei $\lambda_{\text{max}} = 358$ nm zu beobachten, die dem in der Reaktion gebildeten Pyrazolin zugewiesen werden kann. Durch Anregung in diesem Absorptionsmaximum kann die Bildung des Pyrazolins zusätzlich über dessen ansteigende Emission ($\phi_F = 0.027$, $\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm) beobachtet werden. Dabei zeigt sich das von der „Photoklick“-Reaktion bekannte fluorogene Verhalten. ^[107]

Die Auftrennung des Reaktionsgemisches über analytische RP-HPLC zeigt, dass neben dem erwarteten Pyrazolin zwei weitere Produkte gebildet wurden (Abbildung 14). Die Hauptfraktion konnte mittels massenspektrometrischer Analyse als Hydrazid identifiziert werden. Wie bereits besprochen, neigen Maleinimide zur nukleophilen Ringöffnung (Schema 22), weshalb das gebildete Pyrazolin teilweise hydrolysiert. Da die eingebrachte Modifikation weiterhin kovalent verknüpft bleibt, stellt es ebenfalls ein zielführendes Konjugationsprodukt dar.

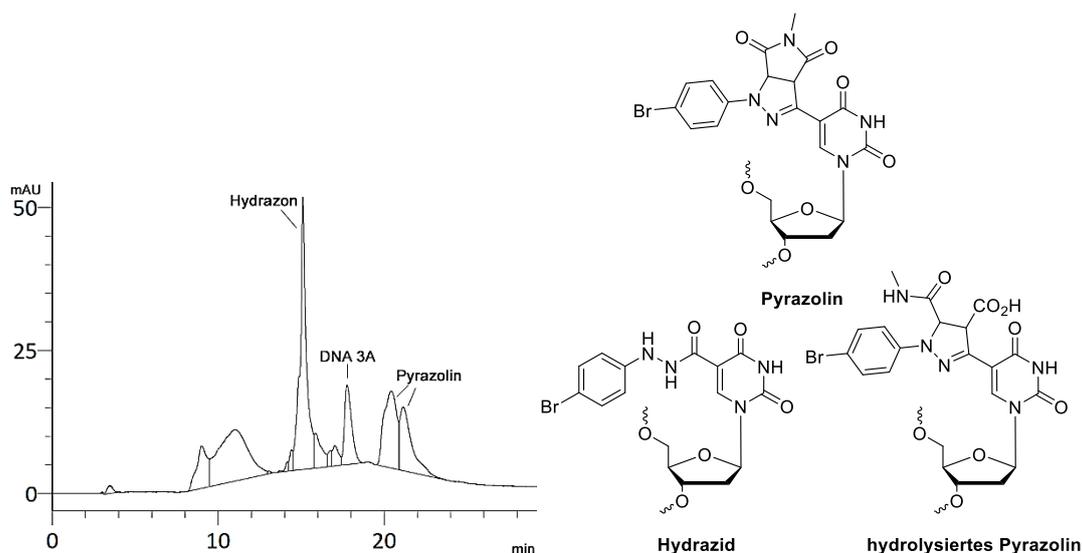


Abbildung 14: (links) Analytisches HPLC-Chromatogramm der „Photoklick“-Reaktion von **DNA 3A** mit NMM nach 450 s und Belichtung mit $\lambda = 300$ nm; (rechts) Strukturen der identifizierten Produkte.

DNA 3B wurde unter analogen Bedingungen zur Reaktion gebracht, als Anregungsquelle diente hierbei eine LED mit $\lambda = 365$ nm (Abbildung 15). Auch hier kann die Reaktion durch die Verringerung der Absorption des Tetrazols bei $\lambda = 340$ nm und das Erscheinen einer Bande mit einem Maximum bei $\lambda = 367$ nm verfolgt werden. Weiterhin zeigt sich auch hier bei Anregung eine im Verlauf der Reaktion steigende Emission, die im Vergleich jedoch weniger intensiv ausfällt ($\phi_F = 0.0163$, $\lambda_{exc} = 400$ nm).

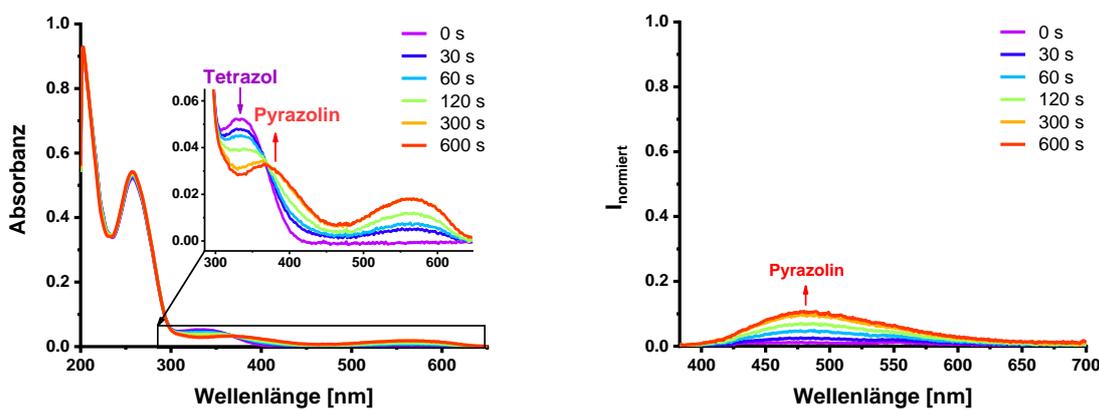
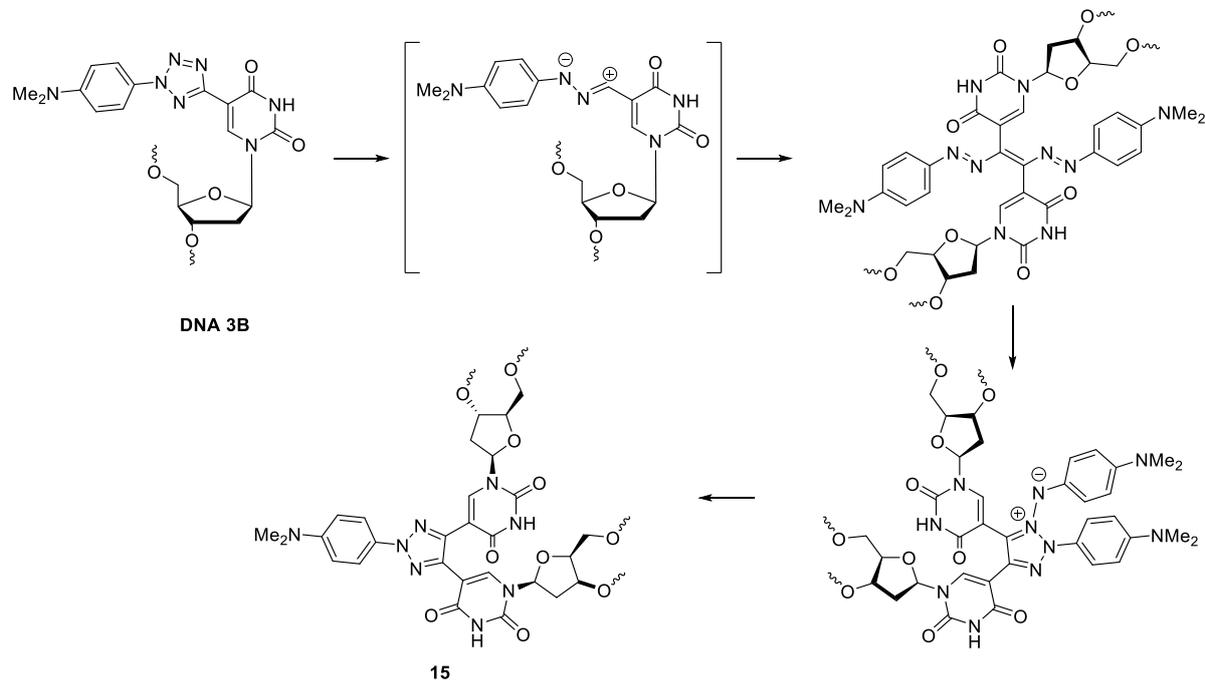


Abbildung 15: Verlauf der Absorption (links) und Emission (rechts) während der „Photoklick“-Reaktion von **DNA 3B** in Gegenwart von 1.50 eq NMM bei Belichtung mit $\lambda = 300$ nm (2.5 μ M DNA in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 10 % Acetonitril, 20 °C).

Zusätzlich kann die Bildung eines weiteren Signals mit einem Maximum bei $\lambda = 567$ nm beobachtet werden. Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, sind Nitrilimine in Abwesenheit

eines ausreichend aktivierten Reaktionspartners dafür bekannt, dass sie Dimere ausbilden (Schema 24).^[75]



Schema 24: Möglicher Mechanismus zur Bildung des Dimers **15** bei der Belichtung von **DNA 3B**.^[75]

Deren erweitertes konjugiertes System hätte eine deutliche bathochrome Verschiebung der Absorption zur Folge und könnte daher die Ursache für die beobachtete Absorption im Bereich 500 – 600 nm darstellen. Die Masse des 1,2,3-Triazols **15**, die auf 10453.8 Dalton berechnet wurde, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Das Experiment wurde daher mit bis zu 5 Äquivalenten NMM wiederholt, wodurch eine Dimerisierung unterdrückt werden sollte. Dies führte jedoch ebenfalls zur Bildung der oben genannten Absorptionssignale.

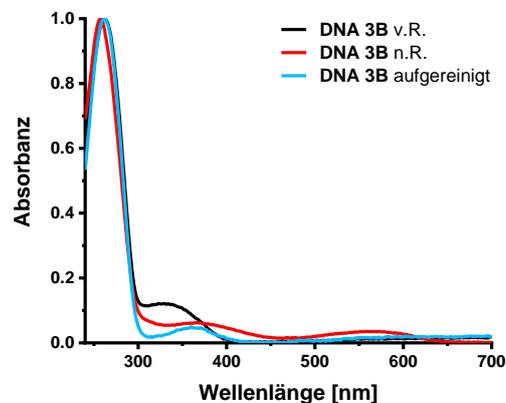


Abbildung 16: Absorptionsschema von **DNA 3B** vor, nach und entsalzt nach der „Photoklick“-Reaktion mit NMM (10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 10 % Acetonitril, 20 °C).

Um überschüssiges NMM aus der Reaktionslösung zu entfernen, wurde dieses chromatographisch aufgereinigt und nach Lyophilisieren und erneuter Aufnahme in Puffer (10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C) untersucht (Abbildung 16). Da durch die Aufreinigung lediglich kleinere Moleküle (und DNA < 10 Basenpaare) abgetrennt wurden, sollten sämtliche DNA-Stränge sowie deren Markierungsprodukte weiterhin zu beobachten sein. Das Signal bei $\lambda = 567$ nm ist nach der Auftrennung jedoch nicht mehr vorhanden, daher kann das Dimer **15** als Ursache für die beobachtete Absorption im Bereich 500 – 600 nm ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Optimierung der Reaktion sollte im nächsten Schritt die „Photoklick“-Reaktion im Doppelstrang getestet werden. Hierzu wurde **DNA 3A** mit dem unmodifizierten Gegenstrang hybridisiert und anschließend 1.50 Äquivalente NMM in Acetonitril zugegeben. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 300$ nm kommt es auch hier zur „Photoklick“-Reaktion und dem bereits beobachteten Veränderungen der Absorptionsspektren (Abbildung 17). Die Emission des ansonsten fluoreszenten Pyrazolins wird im Doppelstrang nahezu vollständig gelöscht. Offenbar findet eine Wechselwirkung zwischen der doppelsträngigen DNA mit dem Pyrazolin statt, wodurch dessen Energie strahlungsfrei abgegeben wird. Die Ausbeute fiel mit 17 % jedoch im Vergleich zur „Photoklick“-Reaktion der einzelsträngigen **DNA 3A** deutlich geringer aus, weshalb der Einsatz von DNA-Duplexen wieder verworfen wurde.

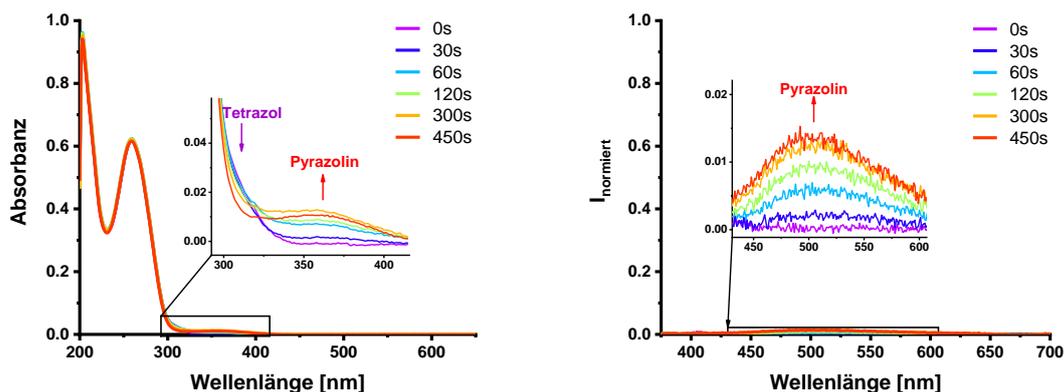


Abbildung 17: Verlauf der Absorption (links) und Emission (rechts) während der „Photoklick“-Reaktion von **DNA 3A** im Doppelstrang in Gegenwart von 1.50 eq NMM bei Belichtung mit $\lambda = 300$ nm (2.5 μM DNA in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 10 % Acetonitril, 20 °C).

Die breite Emission des bei den „Photoklick“-Reaktionen von **DNA 3A/B** gebildeten Pyrazolins reicht von 400 – 650 nm (Abbildung 13 und Abbildung 15), weshalb dieses als möglicher Elektronendonator für verschiedene Chromophore geeignet sein könnte.

Als Reaktionspartner wurde daher das Maleinimid **16** gewählt, das mit einem sulfonierten Cyanin-3-Farbstoff verknüpft wurde. Dieses absorbiert maßgeblich im Bereich zwischen 400 und 600 nm, wodurch eine nahezu vollständige Überlappung mit der Pyrazolin-Emission erreicht wird (Abbildung 18). Aufgrund der geladenen Struktur ist der Farbstoff wasserlöslich, weshalb Markierungsreaktionen ohne den Einsatz von organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden können. Dies resultiert in einer besseren Löslichkeit der DNA und verhindert deren Aggregation.

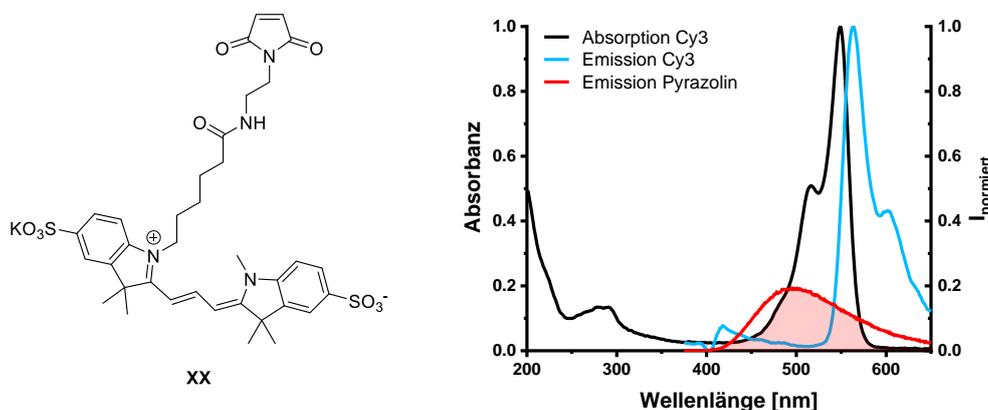


Abbildung 18: Struktur des verwendeten sulfonierten Cyanin-Farbstoffs mit verknüpftem Maleinimid-Linker **16** sowie das zugehörige Absorptions- und Emissionsspektrum (12.5 μ M Sulfo-Cy3 **16** in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C, λ_{exc} = 358 nm).

Bei der Reaktion mit dem sulfonierten Cy3-Maleinimid **16** zeigen die Absorptionsspektren sowohl für **DNA 3A** als auch **DNA 3B** das gleiche Verhalten wie bei der zuvor durchgeführten Reaktion mit NMM (Abbildung 19).

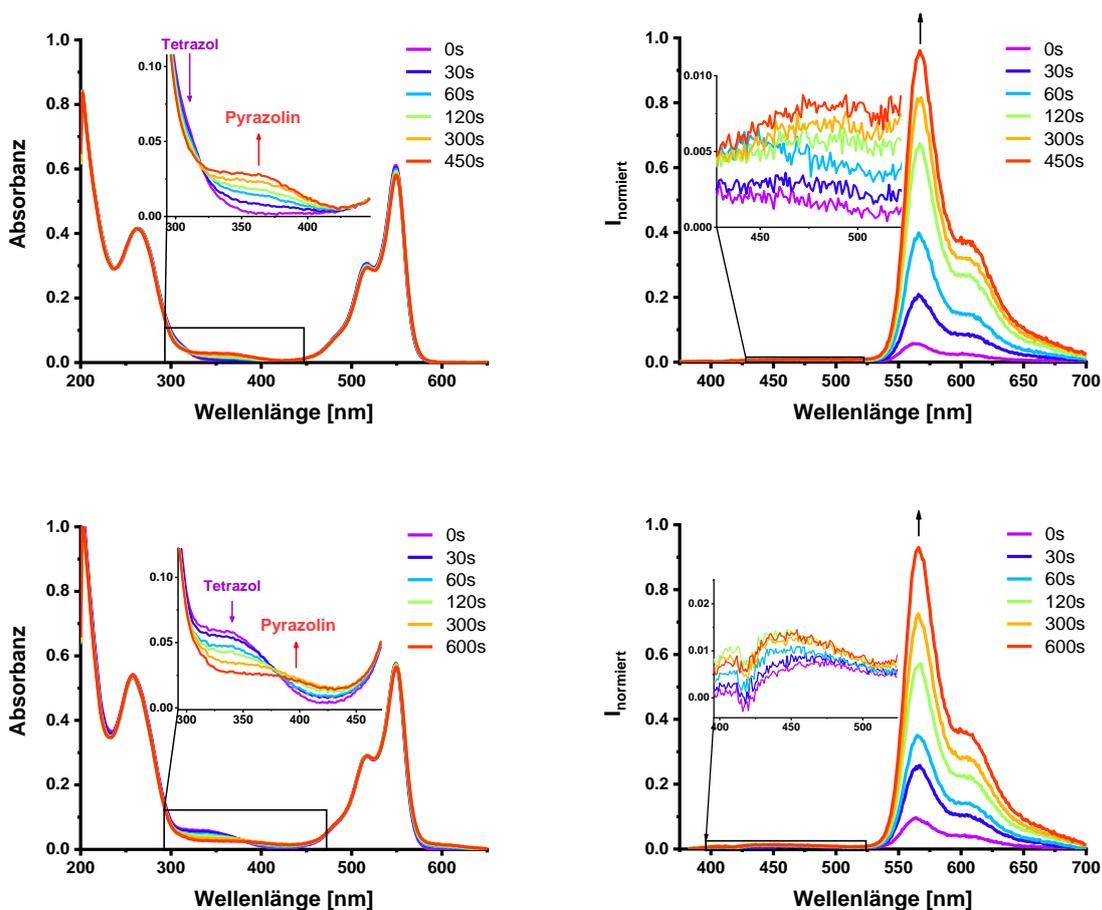


Abbildung 19: Verlauf der Absorption (links) und Emission (rechts) während der „Photoclick“-Reaktion von **DNA 3A** (oben, Belichtung mit $\lambda = 300$ nm) bzw. **DNA 3B** (unten, Belichtung mit $\lambda = 365$ nm) in Gegenwart von 1.50 eq **Cy3-Maleinimid 16** (2.5 μ M DNA in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C).

Wird das Absorptionsmaximum des gebildeten Pyrazolins ($\lambda = 358$ nm für **DNA 3A** bzw. $\lambda = 367$ nm für **DNA 3B**) angeregt, kann eine nahezu vollständige Löschung der Pyrazolinemission beobachtet werden. Gleichzeitig nimmt die Intensität der Farbstofffluoreszenz im Bereich von 550 – 700 nm mit steigender Pyrazolinkonzentration drastisch zu. Während der Reaktion zwischen **DNA 3A** und Sulfo-Cyanin-3-maleinimid **16** konnte dabei die Intensität um mehr als das 17-fache gesteigert werden, wurde **DNA 3B** verwendet wurde eine Steigerung um den Faktor 10 erreicht. Dabei zeigte die Fluoreszenzquantenausbeute des Pyrazolins an **DNA 3A** nach der Reaktion keine Änderung im Vergleich zur Reaktion mit NMM ($\phi_F = 0.028$, $\lambda_{exc} = 400$ nm), was auf einen effizienten Energietransfer hindeutet. Im Fall der **DNA 3B** sank die Fluoreszenzquantenausbeute auf 48 % des zuvor gemessenen Wertes ($\phi_F = 0.008$, $\lambda_{exc} = 400$ nm).

Die geringere Energietransfer-Effizienz könnte durch einen *twisted intramolecular charge transfer* (TICT) verursacht werden. Insbesondere Dialkylaminosubstituenten wie in

Nukleosid **2** sind dafür bekannt, dass sie sich bei Photoanregung um bis zu 90° aus der Gerüstebene des Fluorophors herausdrehen, wodurch ein Großteil der Anregungsenergie durch strahlungsfreie Prozesse verloren geht.^[108] Ein möglicher Ansatz um dies zu unterbinden wäre beispielsweise die Verwendung eines gespannten Aziridin-Substituenten (Abbildung 20). Dieser würde die Größe des Tetrazol-Nukleosids nur minimal beeinflussen und könnte neben einer höheren Fluoreszenzquantenausbeute auch eine größere Stokes-Verschiebung bewirken. Dies wiederum würde es ermöglichen, den gebildeten Pyrazolin-Farbstoff auch als Donor für weitere Farbstoffe einzusetzen.

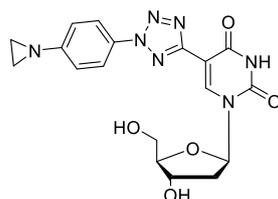


Abbildung 20: Vorgeschlagene Struktur für ein dialkylaminosubstituiertes Tetrazol-Nukleosid, das nach einer „Photoklick“-Reaktion ein Pyrazolin mit besseren Donoreigenschaften bilden könnte.

Die Anregungsspektren, die während der „Photoklick“-Reaktion von **DNA 3A** aufgenommen wurden, zeigten neben der direkten Anregung des Farbstoffes ($\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$) zwischen 300 – 400 nm die zusätzliche indirekte Anregung durch das Pyrazolin. Diese nahm im Verlauf der Reaktion um etwa den Faktor zwei zu und bestätigt damit den vorliegenden Energietransfer (Abbildung 21).

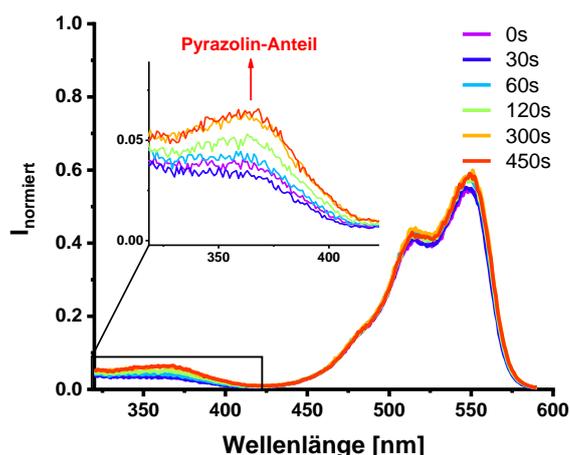


Abbildung 21: Anregungsspektren während des Verlaufs der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA 3A** und Sulfo-Cyanin-3-Maleimid **16**. (2.5 μL DNA, 3.75 μM **16** in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C, $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$).

Mittels RP-HPLC konnten für die „Photoklick“-Reaktion von **DNA 3A** gute Ausbeuten bis zu 74 % nachgewiesen werden. Für **DNA 3B** konnten Ausbeuten bis zu 62 % erreicht werden.

Mithilfe massenspektrometrischer Methoden ist es gelungen, die Markierungsprodukte zweifelsfrei zu identifizieren (Abbildung 22, Tabelle 3).

Tabelle 3: Massenspektrometrische Charakterisierung (ESI) der Markierungsprodukte von **DNA 3A/B** mit dem sulfonierten Cyanin-3-Maleinimid **16**.

DNA	Dipolarophil	Produkt	ber. Masse [Da]	gef. Masse [Da]
DNA3A	Cy3	Pyrazolin	6066.05	6066.1
		Hydrolisiertes Pyrazolin	6084.06	6084.0
DNA3B	Cy3	Pyrazolin	6031.18	
		Hydrolisiertes Pyrazolin	6049.19	6072.1 (+Na)

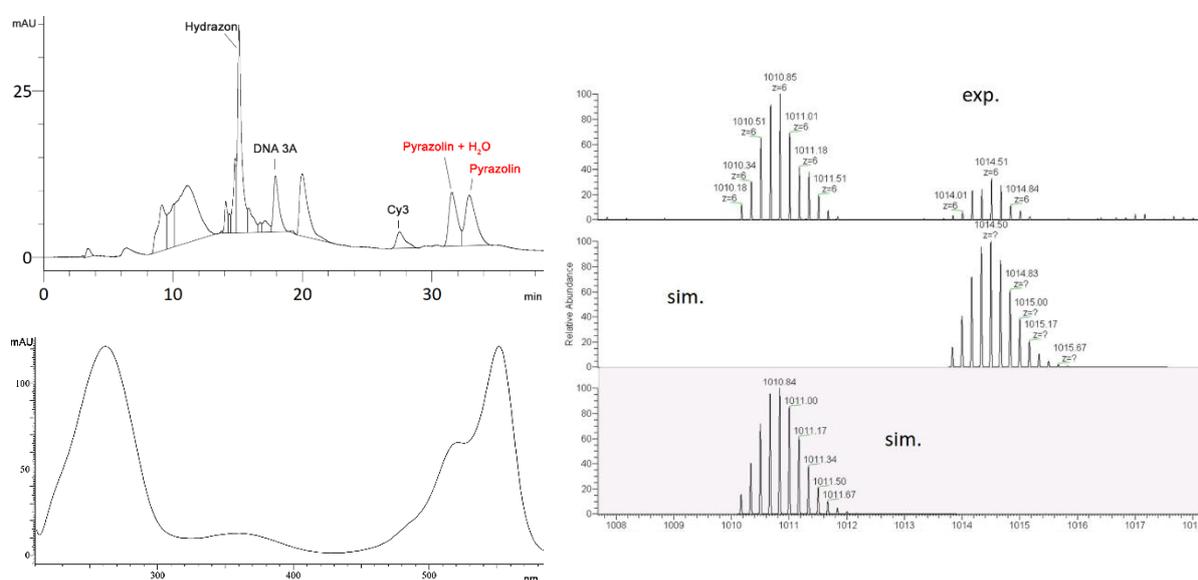


Abbildung 22: (links oben) Analytisches HPLC-Chromatogramm nach der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA 3A** und dem sulfonierten Cyanin-3-Maleinimid **16**. (links unten) Absorptionsspektrum des isolierten Pyrazolins. (rechts) Experimentelle und simulierte Massenspektren des 6-fach geladenen Molekülions (ESI).

Anschließend wurden auch die intern modifizierten Oligonukleotide **DNA 1A/B** in lichtinduzierten Markierungsreaktionen umgesetzt. Im Verlauf der Reaktion von **DNA 1A** zeigt das Absorptionsspektrum erneut ein Absinken der Tetrazol-Absorption, während gleichzeitig die Pyrazolin-Absorption steigt (Abbildung 23). Entgegen der bisherigen Ergebnisse ist in diesem Fall auch bei Verwendung des farbstoffmodifizierten Maleinimids **16** ein deutlicher Anstieg der Pyrazolin-Emission zu beobachten, während die Intensität der Farbstoff-Fluoreszenz nur noch um einen Faktor von rund 10 steigt. Die interne Modifikation beeinflusst offensichtlich die sterische Umgebung derart, dass sich der Farbstoff nicht mehr optimal ausrichten und dadurch kein vollständiger Energietransfer mehr stattfinden kann.

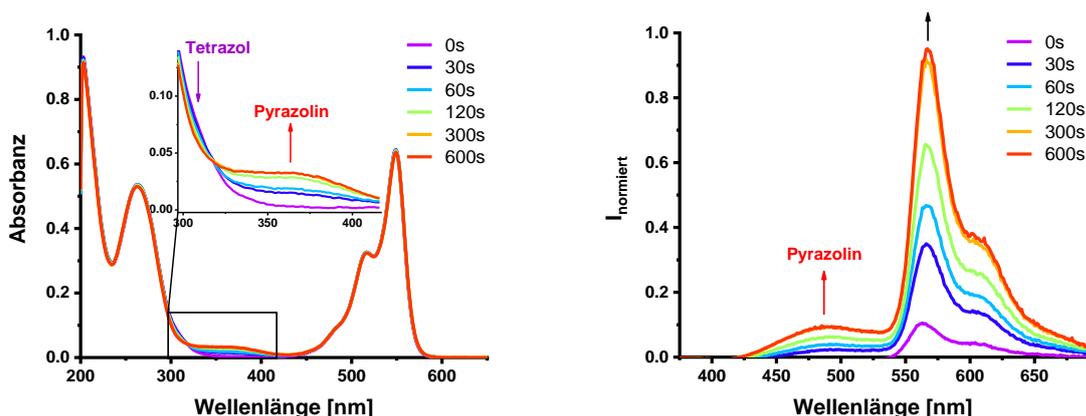


Abbildung 23: Während dem Verlauf der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA 1A** und dem substituierten Maleinimid **16** aufgenommene Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts). Bedingungen: 2.5 μM DNA 1A, 3.75 μM **16** in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C, λ_{exc} = 358 nm.

DNA 1B zeigt unter den gleichen Bedingungen unerwarteterweise keine „Photoklick“-Reaktion mit dem Maleinimid **16**. Offensichtlich ist die sterische Hinderung durch die Nachbarbasen in Kombination mit den zusätzlichen Methylresten am Tetrazol zu groß. Diese könnten sich durch sterischen Zwang aus der Ebene herausdrehen und dadurch eine weitere Abschirmung des Tetrazolgerüsts bewirken, was die ausbleibende Konjugation mit dem Maleinimid **16** erklären könnte.

Die breite Absorption des Tetrazols in den dimethylaminomodifizierten Oligonukleotiden reicht bis knapp an den sichtbaren Spektralbereich (Abbildung 11, Seite 27). Daher wurde getestet, ob **DNA 2B** auch durch die Bestrahlung mit Licht größerer Wellenlängen zur Reaktion gebracht werden kann. Dabei konnte beobachtet werden, dass auch die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 385$ nm sowie mit $\lambda = 405$ nm zur Bildung des Pyrazolins führten, aber insbesondere bei der Bestrahlung mit $\lambda = 405$ nm deutlich längere Belichtungszeiten benötigt würden, um einen signifikanten Umsatz zu erzielen (Abbildung 24). Dies ist nicht weiter überraschend, da neben einer deutlich geringeren Extinktion an der Belichtungswellenlänge auch energieärmeres Licht zur Initiierung der Reaktion verwendet wurde.

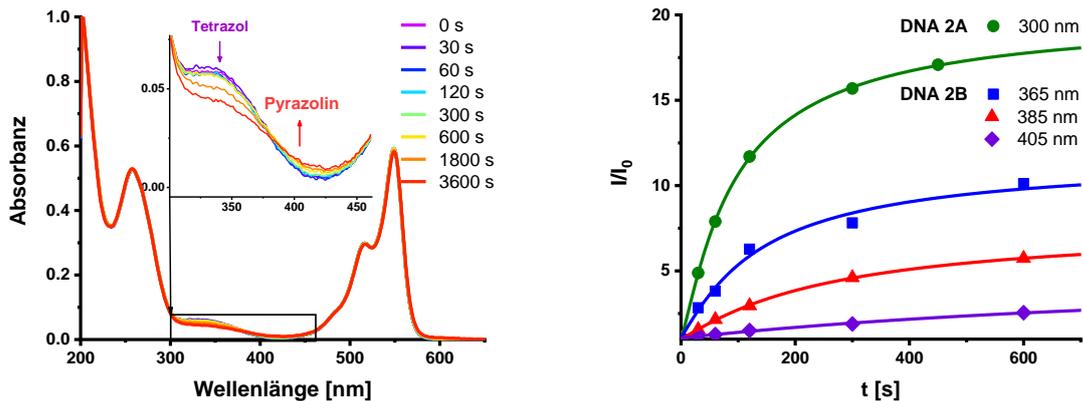


Abbildung 24: (links) Während dem Verlauf der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA 2B** und dem substituierten Maleinimid **16** aufgenommene Absorptionsspektren. (rechts) Steigende Intensität der Cy3-Emission durch indirekte Anregung vom Pyrazolin im Verlauf der „Photoklick“-Reaktionen von **DNA 2A** (300 nm) und **DNA 2B** (365 nm, 385 nm, 400 nm). Bedingungen: 2.5 μM **DNA 1A**, 3.75 μM **16** in 10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7, 20 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 358$ nm (**DNA 2A**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 367$ nm (**DNA 2B**). I_0 steht für die Intensität vor Reaktionsbeginn.

Zur besseren Veranschaulichung der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten wurde daher der Anstieg der Farbstoffemission bei Anregung des Pyrazolins im Verlauf der „Photoklick“-Reaktion bei Belichtung mit unterschiedlichen Wellenlängen aufgetragen (Abbildung 24, rechts). Auch wenn die Reaktion bei Bestrahlung mit $\lambda = 405$ nm im Vergleich sehr langsam abläuft, ist es ein großer Fortschritt, dass die Reaktion durch sichtbares Licht induziert werden kann. Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, sind bislang nur wenige Beispiele für eine derartige „Photoklick“-Reaktion mit sichtbarem Licht bekannt. Nukleosid **2** ist dabei durch das Einbinden der Uracil-Struktur deutlich kleiner als das von *Barner-Kowollik et al.* vorgestellte Pyren-Tetrazol (Abbildung 25, PyTet).^[62] Dies bietet insbesondere bei der Anwendung in Oligonukleotiden Vorteile, da auf den Einsatz eines Linkers verzichtet werden kann und die natürliche Struktur der DNA durch sterische Einflüsse weniger gestört wird.

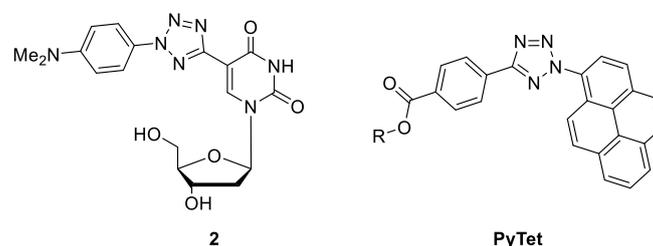
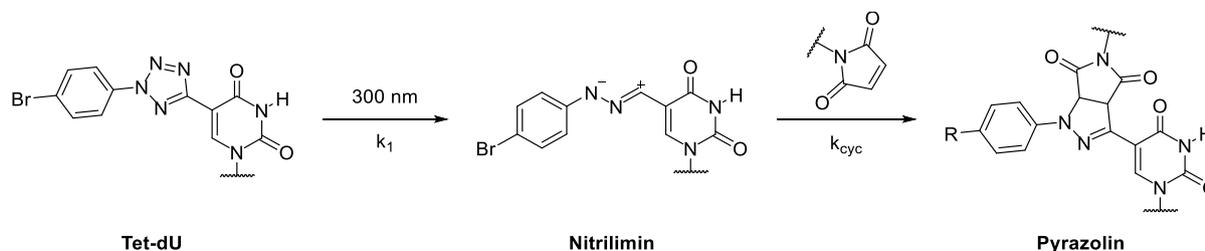


Abbildung 25: Nukleosid **2** und das von *Barner-Kowollik et al.* entwickelte Pyren-Tetrazol.^[62]

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, sind hohe Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten unverzichtbar für den Einsatz von bioorthogonalen Reaktionen, da nur dann auch mit toxisch unbedenklichen Mengen an Reagenzien in lebenden Zellen Markierungsreaktionen in

möglichst kurzer Reaktionszeit durchgeführt werden können. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitätsverläufe bei verschiedenen Wellenlängen in Abbildung 24 bietet hierfür bereits einen qualitativen Überblick. Aufgrund der unterschiedlichen Strahlungsquellen und unterschiedlicher Fluoreszenzquantenausbeuten sollten die Reaktionsverläufe verschieden modifizierter DNA-Stränge jedoch nur unter Vorbehalt miteinander verglichen werden.



Schema 25: Schematische Darstellung der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA 3A** und Sulfo-Cyanin-3-Maleinimid **16**. Die Cycloaddition zwischen dem Nitrilimin und dem Dipolarophil stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt k_{cyc} dar.

Um konkrete Daten zu erhalten, wurden exemplarisch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von **DNA 3A/B** bestimmt. Hierzu wurden diese jeweils mit 5 und 10 Äquivalenten Sulfo-Cyanin-3-Maleinimid **16** für unterschiedliche Zeitintervalle belichtet. Die Proben wurden durch Entsalzen von überschüssigem Farbstoff befreit, getrocknet und über RP-HPLC analysiert. Die so erhaltenen Ausbeuten wurden gemäß dem Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung (Kapitel 5.5, Seite 79) linearisiert und gegenüber der Reaktionszeit aufgetragen (Abbildung 26).

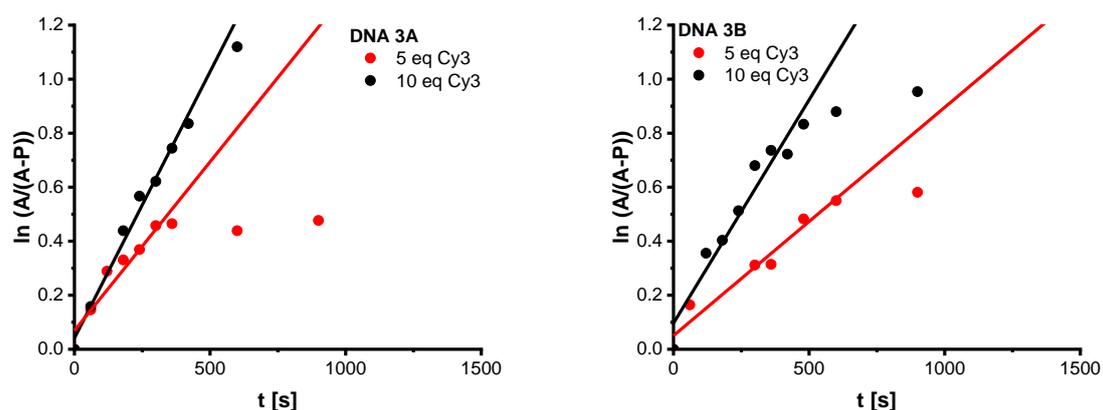


Abbildung 26: Lineare Auftragung der erhaltenen Ausbeuten nach dem Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung. A: Tetrazolkonzentration, P: Produktkonzentration.

Daraus ergeben sich nach Berücksichtigung der Dipolarophil-Konzentrationen die durchschnittlichen Reaktionsgeschwindigkeiten zweiter Ordnung. Diese sind mit $k_2 = 89 \pm 13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für **DNA 3A** und $k_2 = 67 \pm 6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für **DNA 3B** deutlich höher als das zuvor von

Wagenknecht et al. veröffentlichte Diaryltetrazol ($k_2 = 23 \pm 7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^[79] und bieten eine wichtige Alternative zur CuAAC ($k_2 = 10\text{--}200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[18]

Zusammenfassend konnte der erfolgreiche Einsatz der tetrazolmodifizierten Oligonukleotide in der bioorthogonalen lichtinduzierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkenen und Nitrilimininen gezeigt werden. Das bromierte Nukleosid **1** zeigte dabei hervorragende Reaktivitäten bei Belichtung mit $\lambda = 300 \text{ nm}$, sowohl bei interner als auch terminaler Markierung von **DNA 1-3A**. Im Vergleich konnte das dimethylaminomodifizierte Nukleosid **2** bei einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeitskonstante nur für terminale Markierungen von Oligonukleotiden eingesetzt werden, konnte jedoch auch durch sichtbares Licht ($\lambda = 405 \text{ nm}$) zur Reaktion gebracht werden, was insbesondere für den Einsatz in lebenden Zellen einen beträchtlichen Vorteil verspricht. Beide Nukleoside zeigten dabei in einzelsträngiger DNA doppelt fluorogenes Verhalten. Durch das während der Reaktion gebildete Pyrazolin erfolgt ein effizienter Energietransfer auf den über die „Photoklick“-Reaktion eingebrachten Cyanin-Farbstoff. Dessen Emission erfährt daher mit einer *Stokes*-Verschiebung von rund 200 nm im Verlauf der Reaktion einen drastischen *turn-on* Effekt mit bis zu 17-fachen Intensitätssteigerungen.

Die vorgestellten Tetrazole **1** und **2** könnten daher mit der „Photoklick“-Reaktion und deren raumzeitlichen Kontrolle eine ernsthafte Alternative zu etablierten Markierungsmethoden in lebenden Zellen darstellen.

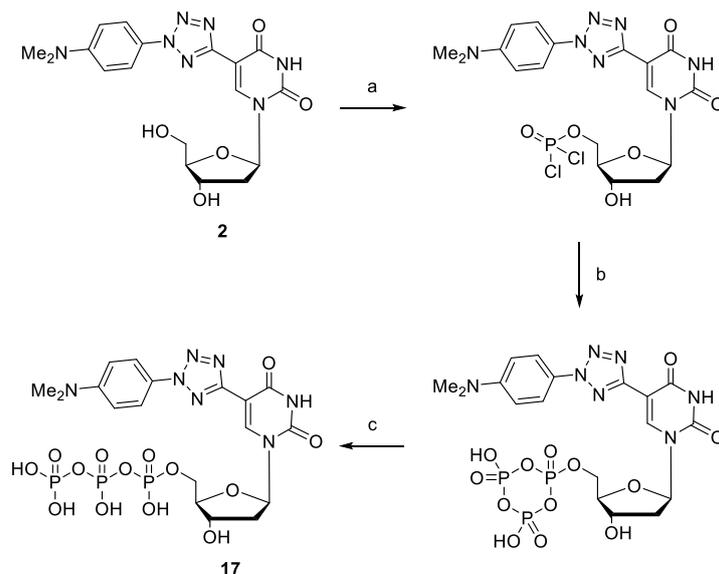
3.4 Synthese modifizierter Nukleinsäuren durch enzymatische Primerverlängerung

Damit das volle Potential einer bioorthogonalen Reaktion ausgenutzt werden kann, sollte der artifizielle Baustein schließlich enzymatisch in Oligonukleotide eingebaut werden. Ein prominentes Beispiel ist dabei das von *Luedtke et al.* vorgestellte 5'-azidomodifizierte 2'-Desoxyuridin, das in der Zelle durch Kinasen phosphoryliert und durch zelleigene Polymerasen in der Synthese neuer Oligonukleotide eingesetzt wurde, was durch anschließende Markierungsversuche gezeigt werden konnte.^[109]

Aufgrund der Möglichkeit das Nukleosid **2** durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ in einer „Photoklick“-Reaktion zu markieren, sollte dieses zunächst in das Triphosphat **17** überführt werden. Anschließend sollte durch die Anwendung von Primerverlängerungsexperimenten verifiziert werden, unter welchen Bedingungen der Einbau und die Markierung des artifiziellen Triphosphats **17** durch Polymerasen möglich ist.

3.4.1 Synthese des artifiziellen Triphosphats **17**

Erste Synthesen von Nukleosidtriphosphaten begannen mit der Phosphorylierung von 2',3'-geschützten Nukleosiden, da das hochreaktive Phosphorylchlorid zu Mehrfachphosphorylierungen neigt. Erst *Yoshikawa et al.* gelang, durch den Einsatz von Trialkylphosphaten als Lösungsmittel, die selektive Monophosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe von ungeschützten Nukleosiden.^[110] Diese Selektivität resultiert dabei vermutlich aus der Bildung eines reaktiven Intermediats aus Trialkylphosphat und Phosphorylchlorid. Durch nachfolgende Hydrolyse des Dichlorophosphats gelang es *Yoshikawa et al.* Nukleosidmonophosphate mit Ausbeuten von bis zu 90 % zu erhalten.^[111] Darauf aufbauend entwickelte *Ludwig et al.* eine Synthese von Triphosphaten in drei Schritten.^[112] Das intermediär gebildete Dichlorophosphat wird dabei mit Pyrophosphatanionen zu einem cyclischen Anhydrid umgesetzt, wodurch nach abschließender Hydrolyse das Triphosphat gebildet wird.



Schema 26: Synthese des tetrazolmodifizierten Nucleosidtriphosphats **17** ausgehend vom Nucleosid **2**. Die Intermediate wurden nicht isoliert und wurden nur der Vollständigkeit wegen abgebildet. a) POCl_3 , Me_3PO_4 , Protonenschwamm, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 4 h; b) $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, Bu_3N , DMF, RT, 15 min; c) H_2O , TEAB-Puffer, RT, 4 h. Gesamtausbeute 9 %.

Das Triphosphat **17** wurde nach der oben vorgestellten Methode ausgehend vom Nucleosid **2** in einer Gesamtausbeute von 9 % dargestellt und massenspektrometrisch nachgewiesen (Schema 26).

3.4.2 Enzymatische Primerverlängerungsexperimente

Nach der Synthese des artifiziellen Nucleosidtriphosphats **17** sollte dieses mittels Primerverlängerung enzymatisch in Oligonukleotide eingebaut werden. Dazu werden kurze Oligonukleotide (Primer) mit einem längeren Templatstrang hybridisiert und anschließend durch Polymerasen komplementär zur Sequenz des Templatstrangs verlängert. Dabei wird zwischen „*Standing Start*“- und „*Running Start*“-Experimenten unterschieden.

Im ersten Fall (Templat **T1**, Primer **P1**, Abbildung 27) wird das artifizielle Triphosphat **17** als erstes Nucleotid eingebaut und der DNA-Strang durch die Polymerase mit den natürlichen Triphosphaten auf eine Gesamtlänge von 35 Nucleotiden vervollständigt. Diese Vorgehensweise ermöglicht es die Akzeptanz der Polymerase für den artifiziellen Baustein zu untersuchen. Bei „*Running Start*“-Experimenten (**T2/P1** und **T3/P2**, Abbildung 27) erfolgt der Einbau des artifiziellen Triphosphats erst an einer späteren Position. Templat **T2** unterscheidet sich von **T1** nur durch die Anordnung der Nucleotide und soll die Untersuchung der Reaktivität

der intern eingebauten Modifikation ermöglichen. Templat **T3** besteht hingegen aus 24 Nukleotiden, die Modifikation wird hier am 3'-Terminus angebracht.

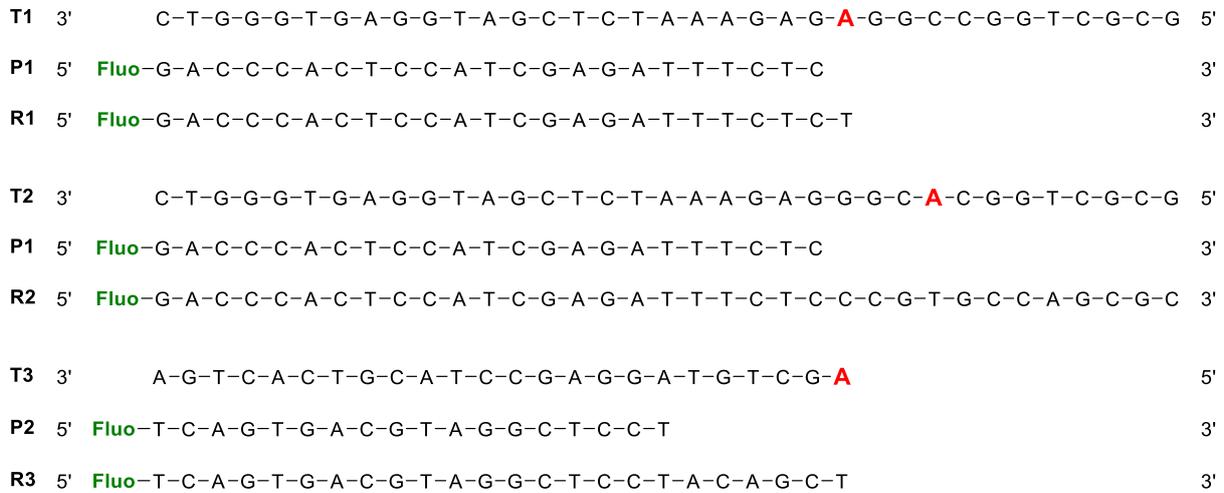


Abbildung 27: Primer-/Templatpaare mit denen enzymatische Primerverlängerungsexperimente durchgeführt wurden. Die Primer **P1** und **P2** sowie die Referenzstränge **R1–R3** sind am 5'-Ende mit Fluorescein (grün) markiert, um eine Fluoreszenzauswertung bei $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$ zu ermöglichen. Das rot markierte Adenosin zeigt die Position für den komplementären Einbau des artifiziellen Triphosphats **17** an.

Zur Auswertung der Primerverlängerungsexperimente wurden die Proben nachfolgend über eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Zur Visualisierung der enzymatisch synthetisierten DNA und der zugehörigen Markierungsprodukte wurde die Emission in Abhängigkeit der zu untersuchenden Modifikation mit einem *Stella 8300* Fluoreszenzimager der Firma *Raytest* ausgelesen.

Zunächst wurde **17** in „*Standing Start*“-Experimenten eingesetzt, um eine geeignete Polymerase für die weiteren Verlängerungsexperimente zu finden.

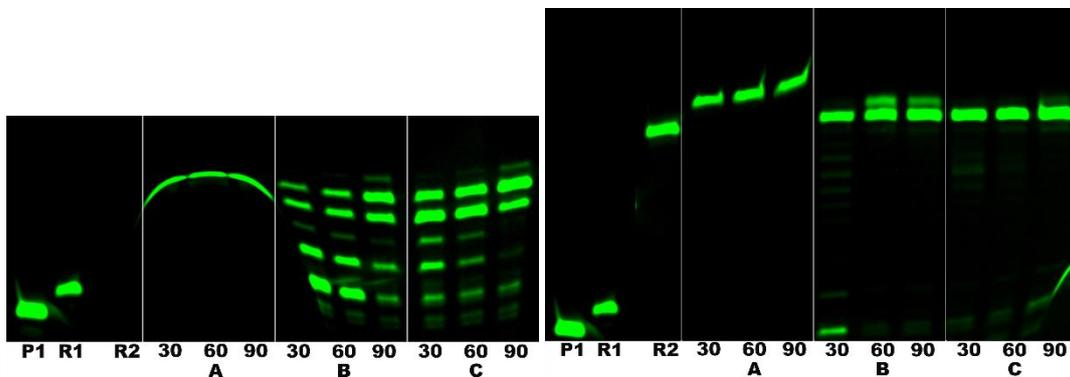


Abbildung 28: „*Standing Start*“-Experimente mit **P1/T1**. Alle Proben wurden für je 30, 60 oder 90 min bei 69 °C inkubiert. A: Hemo KlenTaq Polymerase; B: Vent(-exo) Polymerase; C: Deep Vent(-exo) Polymerase; (links) nur mit dem artifiziellen Triphosphat **17**; (rechts) dATP + dGTP + dCTP + **17**.

Wird den eingesetzten Polymerasen für die Verlängerungsexperimente nur der artifizielle Baustein zur Verfügung gestellt, kommt es häufig zum Mehrfacheinbau. Dies ist auch in der gelelektrophoretischen Auswertung (Abbildung 28, links) für die Polymerasen Vent(-exo) und Deep Vent(-exo) zu beobachten. Durch den verwendeten Reaktionspuffer der Hemo KlenTaq Polymerase wurden die verlängerten Oligonukleotide während der Gelelektrophorese nicht klar voneinander getrennt, weshalb keine Aussage über die Einbaueffizienz getroffen werden kann. Werden den Polymerasen zusätzlich auch die natürlichen Nukleotide (ohne TTP) zur Verfügung gestellt, so zeigen alle drei getesteten Polymerasen bereits nach 30 Minuten die nahezu vollständige Verlängerung auf 35 Nukleotide (Abbildung 28, rechts). Nach etwa 60 Minuten Inkubationszeit ist zu erkennen, dass Vent(-exo) das vollständig verlängerte Produkt um ein weiteres Nukleotid verlängert, bei Hemo KlenTaq ist dieser Überhang bereits nach 30 Minuten vollständig eingebaut.

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass die Polymerasen auch in der Lage sind, den artifiziellen Baustein **17** in „*Running Start*“-Experimenten an einer späteren Position einzufügen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 29 dargestellt.

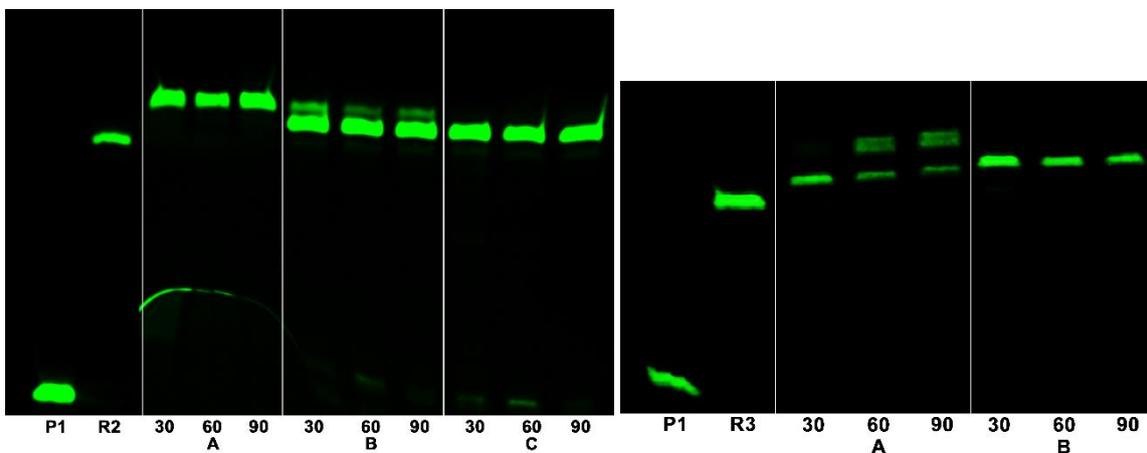


Abbildung 29: „*Running Start*“-Experimente mit **P1/T2**. Alle Proben wurden für je 30, 60 oder 90 min inkubiert. (links) 69 °C; A: Hemo KlenTaq Polymerase; B: Vent(-exo) Polymerase; C: Deep Vent(-exo) Polymerase; dATP + dGTP + dCTP + **17**. (rechts) 37 °C; A: Vent(-exo) Polymerase; B: Deep Vent(-exo) Polymerase; dATP + dGTP + dCTP + **17**.

Die „*Running Start*“-Experimente zeigen vergleichbare Ergebnisse zu den zuvor durchgeführten „*Standing Start*“-Versuchen (Abbildung 29, links). Während durch Deep Vent(-exo) bereits nach 30 Minuten ein nahezu vollständig verlängertes Produkt gebildet wurde, führen sowohl die Hemo KlenTaq als auch die Vent(-exo) Polymerase zum Einbau eines Überhangs. Um die Primerverlängerung auch unter physiologisch relevanten Bedingungen zu

testen, wurden die „*Running Start*“-Experimente bei 37 °C, statt den zuvor verwendeten 69 °C, durchgeführt (Abbildung 29, rechts). Auf den Einsatz der Hemo KlenTaq Polymerase wurde aufgrund des Einbaus des Überhangs verzichtet. Überraschenderweise zeigten sowohl Vent(-exo) als auch Deep Vent(-exo) eine vollständige Primerverlängerung nach 30 Minuten, obwohl das Arbeitsoptimum der beiden Polymerasen bei 72 °C liegt. Da die Polymerase Vent(-exo) auch bei 37 °C einen Überhang generiert, wurden die nachfolgenden Primerverlängerungsexperimente ausschließlich mit der Polymerase Deep Vent(-exo) durchgeführt.

Nachdem gezeigt wurde, dass das artifizielle Nukleotid **17** von den eingesetzten Polymerasen akzeptiert und zu enzymatischen Primerverlängerung eingebaut wird, wurden nachfolgend die ersten Markierungsexperimente durchgeführt. Als Dipolarophil wurde ein sulfonierter Cyanin-Farbstoff **17** mit einem Maleimidlinker eingesetzt, der zuvor bereits bei den Markierungsexperimenten der chemisch synthetisierten DNA-Stränge erfolgreich verwendet wurde (Kapitel 3.3).

Die Primerverlängerung wurde in einem größeren Ansatz mit Deep Vent(-exo) für 90 Minuten bei 69 °C durchgeführt. Aus der Probe wurden anschließend 400 µL entnommen, ohne weitere Aufarbeitung mit 10 bzw. 100 Äquivalenten des sulfonierten Cyanin-Farbstoffs **17** versetzt und unter konstantem Rühren mit LEDs der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm belichtet. Nach den angegebenen Zeitintervallen wurde jeweils eine Probe entnommen, mit Ladepuffer versetzt und zur Analyse auf ein Polyacrylamidgel (Abbildung 30, links) aufgetragen.

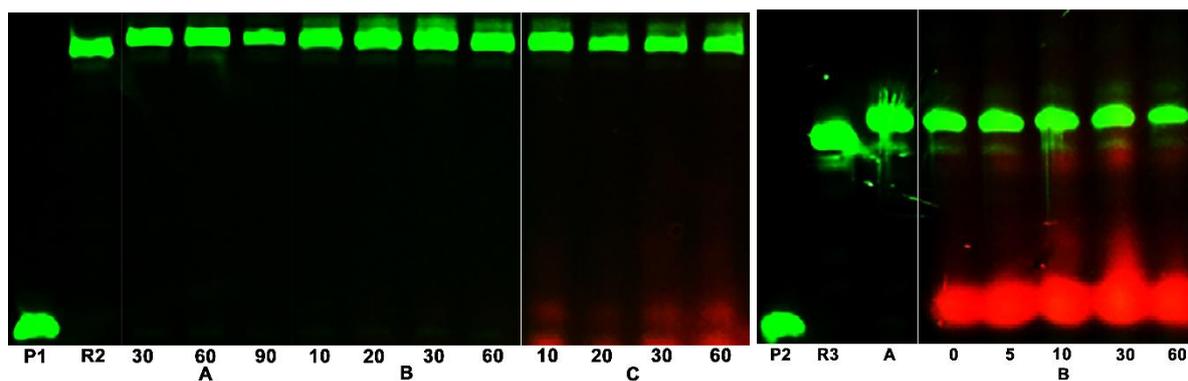


Abbildung 30: Gelelektrophoretische Analyse von Markierungsexperimenten an der enzymatisch synthetisierten und postsynthetisch markierten DNA. Für die Markierungsexperimente wurden die verlängerten Proben nach Zugabe von 100 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid **17** für die angegebenen Minuten mit $\lambda = 365$ nm belichtet. (links) Alle Proben wurden für je 30, 60 oder 90 min bei 69 °C inkubiert; „Running Start“ mit **P1/T2**; A: Proben ohne Farbstoff als Referenz; B: 10 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid **17**; C: 100 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid **17**; (rechts) „Running Start“ mit **P2/T3**; A: Probe ohne Farbstoff als Referenz; B: 10 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid **17**; Überlagerung der Fluorescein- ($\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20$ nm) und Cy3-Spur ($\lambda_{\text{exc}} = 540 \pm 10$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 10$ nm).

Zu erwarten wäre, dass bei erfolgreicher Markierung ein neues Signal mit geringerer Gelmobilität erscheint, das sowohl im grünen (Fluorescein) als auch im roten Kanal (Cy3) eine Emission aufweist. Bei der durchgeführten „Photoklick“-Reaktion konnte jedoch auch nach 60 Minuten Belichtungszeit und 100 Äquivalenten des eingesetzten Farbstoffs **17** kein Markierungsprodukt nachgewiesen werden. Teilweise kann eine Bande mit einer geringeren Mobilität erkannt werden. Diese weist jedoch keine Fluoreszenz im roten Kanal auf, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass es sich um das bereits beschriebene Nebenprodukt Hydrazid (Kapitel 2.2) handelt. Die ausbleibende „Photoklick“-Reaktion könnte durch die sterische Abschirmung von **2** durch die Helix auftreten, wodurch das gebildete Nitrilimin nicht von dem Maleinimid-Linker **17** angegriffen werden kann.

Aus diesem Grund wurde eine Primerverlängerung durchgeführt, bei der die Modifikation terminal am 3'-Ende angebracht wird, um auf diese Weise die Zugänglichkeit zu vereinfachen (**P2/T3**). Das aufgenommene Polyacrylamidgel zeigte jedoch auch in diesem Fall kein Markierungsprodukt mit kolokalisierten Signalen der Emission von Fluorescein und Cy3 (Abbildung 30, rechts). Die diffuse Verteilung der roten Emission ist dabei auf Abbauprodukte des Cyanin-Farbstoffs zurückzuführen.

Um auszuschließen, dass die ausbleibende „Photoklick“-Reaktion mit dem verwendeten Reaktionspuffer der Polymerase zusammenhängt, wurden die Primerverlängerungsexperimente wiederholt, ein Teil der Probe vor der Markierung entsalzt und nach Lyophilisierung in deionisiertem Wasser aufgenommen. Parallel dazu wurde aus einem

zweiten Teil der Proben die enzymatisch verlängerte DNA gefällt und nach Trocknen ebenfalls in Millipore-Wasser aufgenommen. Anschließend wurden die Markierungsexperimente unter den oben genannten Bedingungen wiederholt, doch auch in diesen Fällen konnte kein Markierungsprodukt nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Experimenten mit der chemisch synthetisierten DNA (Kapitel 3.3), bei denen lediglich in natriumchloridhaltigem Phosphatpuffer eine „Photoklick“-Reaktion mit dem sulfonierten Cyanin-3-Maleinimid **17** beobachtet wurde, sollte dieses Konzept auch auf die enzymatisch dargestellten Oligonukleotide übertragen werden.

Aufgrund dessen wurden für die weitergehenden Experimente die enzymatisch verlängerten Proben erneut durch Entsalzen vom Reaktionspuffer getrennt und in einem Natriumphosphatpuffer (10 mM Na-Pi, 250mM NaCl, pH = 7) aufgenommen. Daraufhin wurden die Markierungsexperimente mit **P2/T3** zur terminalen Modifizierung wiederholt (Abbildung 31).

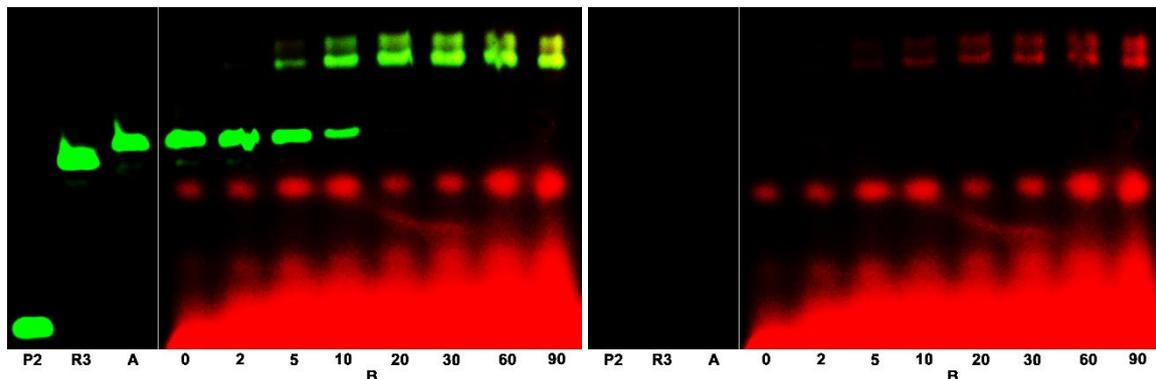


Abbildung 31: Gelelektrophoretische Analyse von Markierungsexperimenten an der enzymatisch verlängerten DNA. Alle Proben wurden für je 30 min bei 37 °C inkubiert, entsalzt und in Puffer (10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7) aufgenommen. Für die Markierungsexperimente wurden die verlängerten Proben nach Zugabe von 100 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid für die angegebenen Minuten mit $\lambda = 365$ nm belichtet. Deep Vent(-exo) Polymerase; „Running Start“ mit **P2/T3**; A: Probe ohne Farbstoff als Referenz; B: 100 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid. (links) Überlagerung der Fluorescein- ($\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 20$ nm) und Cy3-Spur ($\lambda_{\text{exc}} = 540 \pm 10$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 10$ nm); (rechts) Cy3-Spur ($\lambda_{\text{exc}} = 540 \pm 10$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 10$ nm).

Nach einer Belichtungszeit von 5 Minuten konnte die Bildung von zwei neuen Signalen beobachtet werden, wobei bereits nach 20 Minuten ein vollständiger Umsatz zu erkennen war. Da beide Signale kolokalisierte Cy3- und Fluorescein-Emission zeigen, muss es sich bei einem der Signale offensichtlich um das gewünschte Pyrazolin handeln, das bei der „Photoklick“-Reaktion entsteht. Aufgrund der Tatsache, dass auch im zweiten Signal sowohl

die Fluorescein- als auch die Cy3-Emission zu beobachten waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um das hydrolysierte Produkt handelt. Dies bestätigt auch noch einmal die Ergebnisse aus den „Photoklick“-Reaktionen an der chemisch synthetisierten DNA, bei der das durch Ringöffnung am Maleinimid entstehende Nebenprodukt bereits nachgewiesen wurde (Kapitel 3.3). Die Ausbeute der „Photoklick“-Reaktion betrug nach 30 Minuten etwa 90 % (Pyrazolin + hydrolysiertes Pyrazolin).

Nachdem es gelungen war, die terminal modifizierte DNA durch den Einsatz der „Photoklick“-Reaktion in wässrigem Phosphatpuffer (10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7) erfolgreich durchzuführen, sollte abschließend noch einmal die Markierung der intern tetrazol-modifizierten DNA getestet werden. Hierzu wurde erneut eine Primerverlängerung von **P1/T2** durchgeführt, entsalzt, in Puffer aufgenommen und mit 100 Äquivalenten Sulfo-Cy3-Maleinimid **17** versetzt, bevor das Reaktionsgemisch mit LEDs der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm belichtet wurde.

Auch hier ist die Bildung von zwei neuen Signalen zu erkennen, diese erscheinen jedoch erst nach einer 20-minütigen Reaktionszeit (Abbildung 32).

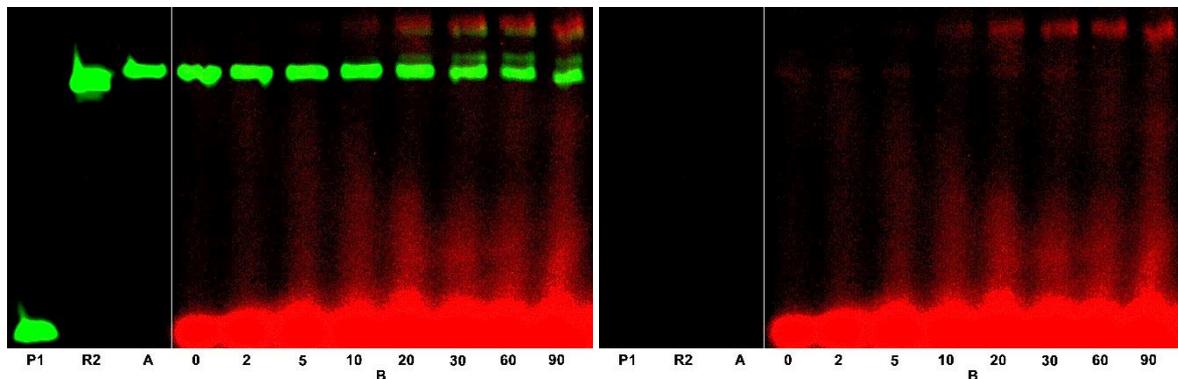


Abbildung 32: Gelelektrophoretische Analyse von Markierungsexperimenten an der enzymatisch verlängerten DNA. Alle Proben wurden für je 30 min bei 37 °C inkubiert, entsalzt und in Puffer (10 mM Na-Pi, 250 mM NaCl, pH = 7) aufgenommen. Für die Markierungsexperimente wurden die verlängerten Proben nach Zugabe von 100 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid für die angegebenen Minuten mit $\lambda = 365$ nm belichtet. Deep Vent(-exo) Polymerase; „Running Start“ mit **P1/T2**; A: Probe vor dem Entsalzen; B: 100 eq Sulfo-Cy3-Maleinimid. (links) Überlagerung der Fluorescein- ($\lambda_{exc} = 470 \pm 20$ nm; $\lambda_{em} = 535 \pm 20$ nm) und Cy3-Spur ($\lambda_{exc} = 540 \pm 10$ nm; $\lambda_{em} = 605 \pm 10$ nm); (rechts) Cy3-Spur ($\lambda_{exc} = 540 \pm 10$ nm; $\lambda_{em} = 605 \pm 10$ nm).

Eines der beiden Produkte wies dabei nur die Fluorescein-Emission auf. Aufgrund der im Vergleich zum vollverlängerten, unmarkierten Produkt, geringen Mobilität handelt es sich wahrscheinlich um das bereits weiter oben besprochene Hydrazid. Das zweite neue Signal weist einerseits deutlich größere Änderungen in seiner Mobilität, andererseits auch neben der

Fluorescein- eine zusätzliche Cy3-Emission auf. Die Ausbeute nach 90 Minuten Belichtungszeit wurde auf etwa 27 % bestimmt. Das Signal, das dem Hydrazid zugewiesen wurde, kommt auf einen Anteil von 17 %, während auch nach 90 Minuten Reaktionszeit noch etwa 56 % der unmarkierten DNA vorhanden waren. Diese Experimente zeigen, dass eine Markierung mittels „Photoklick“-Reaktion bei intern modifizierten Oligonukleotiden unvollständig und im Vergleich zu terminal modifizierten sehr viel langsamer abläuft.

Interessanterweise konnte bei der „Photoklick“-Reaktion an **DNA 1B** keine Produktbildung nachgewiesen werden, während die Markierung bei der enzymatisch synthetisierten DNA zumindest in geringer Ausbeute funktionierte.

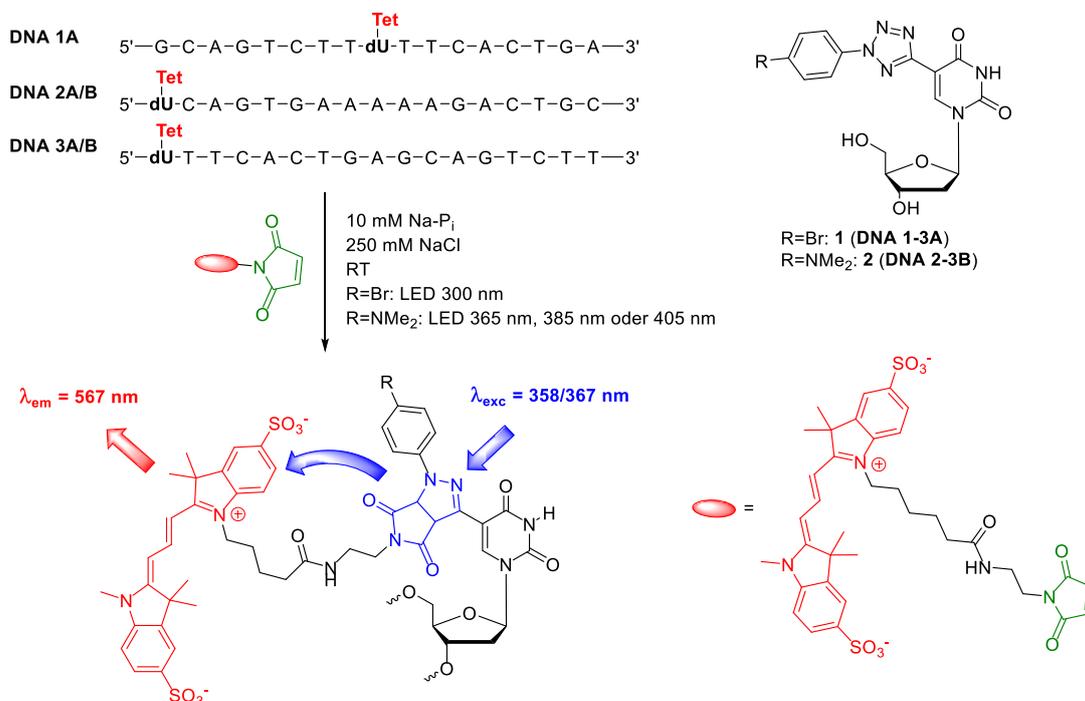
Dabei unterscheiden sich die Reaktionsgemische nur in zwei Punkten. Einerseits wurden für die „Photoklick“-Reaktion an der enzymatisch verlängerten DNA ein deutlicher Überschuss von 100 Äquivalenten Sulfo-Cyanin-3-Maleinimid **17** eingesetzt, **DNA 1B** hingegen nur mit 5 Äquivalenten **17** umgesetzt. Möglicherweise kann dieser Versuch in der Zukunft noch einmal mit einem größeren Überschuss von **17** wiederholt werden, auch wenn für die restlichen chemisch synthetisierten DNA-Stränge bereits ein Überschuss von 1.5 Äquivalenten zur erfolgreichen Umsetzung führte. Weiterhin wurde nur einzelsträngige **DNA 1B** für die „Photoklick“-Experimente verwendet, nachdem erste exemplarische Markierungsreaktionen mit doppelsträngiger **DNA 3A** und NMM zwar zur Bildung des Pyrazolins führten, dabei jedoch deutlich schlechtere Ausbeuten als die Reaktionen von einzelsträngiger **DNA 3A** lieferten.

Zusammenfassend wurde das artifizielle Triphosphat **17** sehr gut von den eingesetzten Polymerasen akzeptiert und von diesen effizient und sequenzspezifisch unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C in Oligonukleotide eingebaut. Durch die nachfolgende „Photoklick“-Reaktion mit dem sulfonierten Cyanin-3-Maleinimid **17** konnte bewiesen werden, dass die Tetrazoleinheit die Bedingungen der Triphosphatsynthese und der Primerverlängerung toleriert. Durch Bestrahlung mit LEDs der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ konnte bei terminaler Markierung bereits in 30 Minuten eine Ausbeute von rund 90 % erreicht werden. Auch die interne Markierung von modifizierten Oligonukleotiden konnte erfolgreich durchgeführt werden. Diese verläuft im Vergleich jedoch deutlich langsamer und lieferte nach 90 Minuten lediglich 27 % des markierten Oligonukleotids.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die beiden neuen nukleosidischen Tetrazole **1** und **2** konnten über die die Phosphoramidit-Methode erfolgreich in DNA eingebaut und durch anschließende „Photoklick“-Reaktion bioorthogonal und postsynthetisch fluoreszenzmarkiert werden.

Erste Modellversuche mit *N*-Methylmaleinimid als Reaktionspartner zeigten dabei eine breite Emission des gebildeten Pyrazolins im Bereich zwischen $\lambda = 400 - 650$ nm, weshalb für nachfolgende Markierungsreaktionen der maleinimidmodifizierte sulfonierte Cyanin-Farbstoff **17** gewählt wurde. Durch den daraus resultierenden Energietransfer zeigen beide Nukleotide in einzelsträngiger DNA ein doppelt fluorogenes Verhalten mit *Stokes*-Verschiebungen von rund 200 nm (Schema 27). Dabei kann im Verlauf der Reaktion durch Anregung des gebildeten Pyrazolins eine bis zu 17-fache Intensitätssteigerung beobachtet werden. Die etwas verringerte Energietransfereffizienz von **2** kann möglicherweise durch die Flexibilität des Dimethylaminosubstituenten begründet werden. Die Einführung eines starreren Aziridinsubstituenten würde einen möglichen *TICT* unterdrücken, wodurch die optischen Eigenschaften weiter verbessert werden können.



Schema 27: Schematische Darstellung der „Photoklick“-Reaktion an DNA 1-3A/B.

Das brommodifizierte Nukleosid **1** kann durch Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 300$ nm knapp außerhalb der DNA-Absorption zur Reaktion gebracht werden. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der „Photoklick“-Reaktion wurde exemplarisch für die terminal modifizierte **DNA 3A** bestimmt und beträgt bei der Reaktion mit dem maleinimidmodifizierten Cyanin-Farbstoff **17** $k_2 = 89 \pm 13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit ist sie erheblich höher als beim zuvor von *Wagenknecht et al.* veröffentlichten Tetrazol ($k_2 = 23 \pm 7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) zur DNA-Markierung.^[79]

Das Absorptionsmaximum des dimethylaminomodifizierten Nukleosids **2** ist im Vergleich zu **1** bathochrom verschoben und kann deutlich separiert von der DNA-Absorption angeregt werden. Als erstes in der DNA-Markierung eingesetztes Tetrazol konnte **2** auch mit sichtbarem Licht der Wellenlänge $\lambda = 405$ nm zur Reaktion gebracht werden. Deutlich effizienter verläuft die Reaktion jedoch mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm oder $\lambda = 385$ nm. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wurde zum besseren Vergleich exemplarisch für die terminal modifizierte **DNA 3B** bestimmt und fällt mit $k_2 = 67 \pm 6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ etwas kleiner aus.

Die besten Ergebnisse wurden bei beiden Nukleosiden durch die Markierung des Einzelstrangs in Phosphatpuffer (10 mM Na-P_i, 250 mM NaCl, pH = 7) erzielt. Im Doppelstrang wurden dabei deutlich geringere Ausbeuten erzielt, während bei der Reaktion in reinem Wasser lediglich das Hydrazid gebildet wurde.

Nukleosid **2** wurde aufgrund der besseren optischen Eigenschaften und höheren Anregungswellenlängen zunächst triphosphoryliert und anschließend sehr effizient und sequenzspezifisch von den verwendeten DNA-Polymerasen unter physiologischen Bedingungen in Oligonukleotide eingebaut. Anschließende Markierungsexperimente erreichten dabei Ausbeuten von rund 90 % nach 30 Minuten. Entgegen der zuvor im Einzelstrang-Versuch erhaltenen Experimente, zeigt Nukleosid **2** im Doppelstrang eine erfolgreiche „Photoklick“-Reaktion mit Ausbeuten von rund 27 % nach 90 Minuten.

Auf Basis der vorgestellten Ergebnisse bieten die nukleosidischen Tetrazole **1** und **2** mit der lichtinduzierten Nitrilimin-Alken-Cycloaddition und deren raumzeitlichen Kontrolle eine ernsthafte Alternative zu etablierten Markierungsmethoden. Insbesondere die erfolgreichen Primerverlängerungsexperimente und die anschließende Fluoreszenzmarkierung im Doppelstrang legen nahe, dass die Nukleoside auch zur metabolischen Markierung in Zellen geeignet sein könnten.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien, Analytik und Geräte

Lösungsmittel und Reagenzien

Die zur Synthese benötigten Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Sigma Aldrich*, *TCI Chemicals*, und *VWR* erworben und wiesen dabei mindestens die Qualitätsstufe „zur Synthese“ auf. Sie wurden ohne vorhergehende Reinigung eingesetzt.

In Synthesen benötigte Lösungsmittel wurden mindestens in der Qualitätsstufe *p.a.* (*pro analysi*; zur Analyse) verwendet. Zur Aufarbeitung und Reinigung wurden technische Lösungsmittel eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden von *Acros Organics* bezogen und über Molekularsieb und unter einer Argonatmosphäre gelagert und verwendet.

HPLC-Trennungen wurden mit hochreinen (*HPLC grade*) Lösungsmitteln von Fischer und VWR durchgeführt. Das dabei verwendete Wasser wurde zuvor frisch in einer *Millipore*-Anlage *Q8* der Firma *Merck* entionisiert und ultrafiltriert.

Deuterierte Lösungsmittel wurden kommerziell von der Firma *euriso-top* erworben.

Reaktionsführung

Reaktionen wurden, wenn angegeben, unter Argonatmosphäre (Schweißargon 5.0, 99.999 % Reinheit) durchgeführt. Glasapparaturen wurden vor Verwendung im Hochvakuum mehrfach ausgeheizt.

Lösungsmittel wurden bei 40 °C am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Wurden Lösungsmittelgemische eingesetzt, wurden die einzelnen Komponenten volumetrisch abgemessen.

Reaktionen, an denen lichtempfindliche Substanzen beteiligt waren, wurden generell unter Lichtausschluss durchgeführt. Hierfür wurden Reaktionskolben, Chromatographiesäulen, Reagenzgläser und Rotationsverdampfer mit Aluminiumfolie ummantelt, Braunglaskolben oder schwarze Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet.

Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator *CMC-2 Alpha RVC* der Firma *Martin Christ* eingengt oder getrocknet. Abhängig vom Lösungsmittel wurden dabei verschiedene Einstellungen gewählt: Ammoniak (35 °C, 100 mbar, 30 min), Wasser (RT, 0.1 mbar, 8 h). Größere Volumina von wässrigen Lösungen wurden nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff an einer *Martin Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage getrocknet.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Reaktionskontrolle wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (Kieselgel 60, F₂₅₄, Schichtdicke: 0.25 mm) der Firma *Merck* eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm oder Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Die jeweiligen verwendeten Laufmittelgemische wurden zusammen mit dem R_f -Wert der entsprechenden Verbindung angegeben.

Die chemische Entwicklung der DC-Platten erfolgte im Falle von Nukleosiden durch Verwendung einer 3 %-igen methanolischen Schwefelsäurelösung und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön.

Flash-Chromatographie (FC)

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Rohprodukte wurde nach einer Methode von *W. C. Still*^[113] unter Anlegung leichten Überdrucks durchgeführt. Als stationäre Phase diente dabei Kieselgel (Korngröße 40 – 63 μm , Porengröße 60 Å) der Firma *Sigma Aldrich*. Substanzen wurden entweder im Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert (*dry load*) aufgetragen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Reinigung der chemisch synthetisierten Oligonukleotide, des Triphosphats sowie der Oligonukleotid-Farbstoff-Gemische erfolgten an zwei verschiedenen Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Systemen (reversed phase *high performance liquid chromatography*, *RP-HPLC*) der Firma *Shimadzu* (1: Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AT*, Steuereinheit *SCL-10A*, Multidiodenarray *SPD-M10A*, Fluoreszenzdetektor *RF-10AXL*, Säulenofen von *Knauer*, Software *Class VP*; 2: Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AT*, Steuereinheit *SCL-10A*, Multidiodenarray *SPD-M20A*, Säulenofen *CTO-10AS*, Software

LabSolutions). Für semipräparative Trennungen wurde eine *Supelco-Discovery® BIO Wide Pore* C-18-Säule (250 × 10 mm, 5 µm) mit einer Flussrate von 2.5 mL/min und für analytische Trennungen eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 × 4.6 mm, 3 µm) mit einer Flussrate von 1.0 mL/min eingesetzt.

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wurden die Säulen zunächst mit 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH = 6.5, Laufmittel A) äquilibriert und mit verschiedenen Gradienten von Acetonitril (Laufmittel B) eluiert. Für die Aufreinigung des Triphosphats wurde Triethylammonium-Bicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer, pH = 8.3, Laufmittel A) verwendet und ebenfalls mit Acetonitril (Laufmittel B) eluiert. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ nm sowie der charakteristischen Absorptionsmaxima der jeweiligen artifiziellen Bausteine.

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte DNA-Stränge sowie fluoresceinmodifizierte Primer und Template für die Primerverlängerungsexperimente wurden von *Metabion* HPLC-gereinigt sowie lyophilisiert bezogen. Die DNA wurde vor Verwendung in entionisiertem Wasser gelöst.

Thermocycler

Primerverlängerungsexperimente wurden in einem *TGradient Thermal Cycler* der Firma *Biometra* mit beheizter Deckeleinheit und temperierbarem Silberblock für 96 × 0.2 mL Reaktionsgefäße durchgeführt.

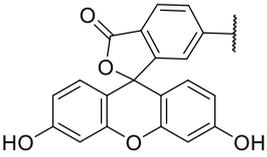
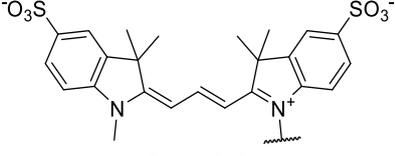
Gelelektrophorese

Denaturierende Gelelektrophorese zur hochauflösenden Auftrennung der primerverlängerten Oligonukleotide und den damit durchgeführten bioorthogonalen Markierungsexperimenten wurden in einer *Sequi-Gen GT Sequencing Cell* (38 × 50 cm) mit *PowerPac HV* der Firma Bio-Rad bei 50 °C und 50 W für etwa 90 Minuten durchgeführt. Gelmischungen (12 % Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 19:1; 8.3 M Harnstoff, 2.65 mM TEMED, 2 mM EDTA, 89mM TRIS, 89 mM Borsäure, pH = 8.0) wurden durch Zugabe von 4 mM Ammoniumpersulfat polymerisiert und mit TBE-Puffer (89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH = 8.0) äquilibriert und betrieben.

Fluoreszenzbildgebung

Die Polyacrylamidgele wurden zur Visualisierung der enzymatisch synthetisierten DNA und der zugehörigen Markierungsprodukte mithilfe eines *Stella 8300* Fluoreszenzimagers der Firma *Raytest* ausgelesen. Die Wahl der Anregungswellenlänge, des Emissionsfilters und der Belichtungszeit erfolgten dabei in Abhängigkeit des entsprechenden Fluorophors (Tabelle 4). Der Abstand zur Belichtung wurde dabei größtmöglich gewählt (Stage 4). Die Emission wurde mit einer CCD-Kamera (gekühlt auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufgenommen. Zur Auswertung diente die Software *AIDA Image Analyzer* von *Raytest*. Die Quantifizierung der bioorthogonalen Markierungsexperimente erfolgte mit dem *1D Multi Labeling* Modus.

Tabelle 4: Gewählte Parameter zur Auswertung der Polyacrylamidgele.

Farbstoff	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	Belichtungszeit
 Fluorescein	470 ± 20	535 ± 20	1 min
 Sulfo-Cy3	540 ± 10	605 ± 20	3 min

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Kernspinresonanzspektren wurden an einem *Bruker Avance 400* (400 MHz ^1H -NMR, 101 MHz ^{13}C -NMR) oder einem *Bruker Avance 500* (500 MHz ^1H -NMR, 126 MHz ^{13}C -NMR, 202 MHz ^{31}P -NMR) aufgenommen. Hierzu wurden die zu analysierenden Substanzen in deuteriertem Lösungsmittel aufgenommen und in Probenröhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm überführt. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in Referenz zu Tetramethylsilan (TMS) in *parts per million* (ppm) angegeben. Zur Kalibrierung diente dabei das Restprotonensignal (^1H -NMR) bzw. das jeweilige Lösungsmittelsignal (^{13}C -NMR):

- CDCl_3 : ^1H -NMR: $\delta = 7.26$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 77.2$ ppm
- DMSO-d_6 : ^1H -NMR: $\delta = 2.50$ ppm ^{13}C -NMR: $\delta = 39.5$ ppm

Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet und die gemessenen Signale wurden anhand ihrer Signalaufspaltung charakterisiert: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint. = Quintett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett. Die Kopplungskonstanten J wurden als Betrag in Hertz (Hz) angegeben.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden durch die analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie des KIT aufgenommen. Die Molekülmassen wurden mittels FAB-MS (*fast atom bombardment*) an einem *Finnigan* MAT 95 Massenspektrometer oder MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionisation*) an einem *Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* aufgenommen. Die Massen von DNA und der zugehörigen Markierungsprodukte wurden entweder per MALDI-TOF oder ESI (LTQ-XL Orbitrap spectrometer, Thermo Scientific) gemessen.

Die Angabe der Molekülfragmente erfolgte als Masse zu Ladungsverhältnis m/z .

Absorptionsspektroskopie (UV/VIS)

Die Absorptionsspektren wurden an einem *Lambda 750* Absorptionsspektrometer mit einem *PTP 6+6* Peltier-Element der Firma *Perkin Elmer* und einem Thermostat *F4391* der Firma *Haake* aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 20 °C und wurden in Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Alle Spektren wurden gegen die Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

Fluoreszenzspektroskopie

Emissionsspektren wurden an einem *Horiba Scientific Fluoromax-4* Fluoreszenzspektrometer aufgenommen und gegen das Raman-Signal von Wasser kalibriert. Die Messungen wurden bei 20 °C vorgenommen und gegen die Raman-Streuung des Lösungsmittels korrigiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden folgende Einstellungen verwendet: *increment* 1.0 nm, *increment time* 0.2 s, *integration time* 0.1 s, *slits* 7 nm.

Belichtungsexperimente

Die Belichtungsexperimente wurden ebenfalls in handelsüblichen Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Als Strahlungsquelle dienten

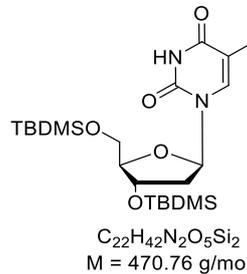
dabei verschiedene (Hochleistungs-) UV-LEDs (Tabelle 5). Während den Belichtungsexperimenten wurde kontinuierlich gerührt und die Temperatur konstant bei 20 °C gehalten.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten LEDs.

Hersteller	Bezeichnung	$\lambda_{nominell}$ [nm]	λ_{max} [nm]	Emissionsbereich [nm]	Strahlungsleistung [mW]
<i>Nikkiso</i>	<i>VPS1A1</i>	300		285 – 330	30
	<i>NVSU233AT</i>	365	369	350 – 420	1030
<i>Nichia</i>	<i>NCSU034B</i>	385	388	365 – 435	540
	<i>NCSU275T</i>	405	407	375 – 460	1400

5.2 Synthesevorschriften

3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-thymidin (6):

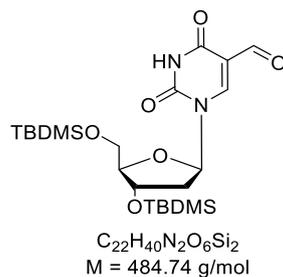


Unter Argonatmosphäre wurden 10.0 g (1.00 eq, 41.3 mmol) Thymidin **5** und 11.8 g (4.20 eq, 173 mmol) Imidazol in 100 mL trockenem DMF gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 13.1 g (2.10 eq, 86.7 mmol) TBDMS-Chlorid hinzugegeben und für weitere 12 h gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf 100 mL Wasser gegeben, der entstehende Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen wurden 19.1 g (40,5 mmol, 98 %) des Produkts als farbloser Feststoff erhalten.

DC (Hexan/EE, 2:1): $R_f = 0.53$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[114]

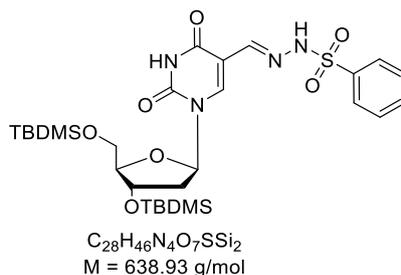
3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-formyl -2'-desoxythymidin (7):



Zu einer Lösung von 10.0 g (1.00 eq, 21.2 mmol) des geschützten Thymidins **6** in 110 mL Acetonitril wurden 12.3 mL (5.00 eq, 106 mmol) 2,6-Lutidin gegeben. Eine weitere Lösung von 10.1 g (2.00 eq, 41.5 mmol) Natriumperoxodisulfat und 2.12 g (0.4 eq, 8.49 mmol) Kupfersulfat-Pentahydrat in 110 mL Wasser wurde vorbereitet und die beiden Lösungen zusammengegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h auf 65 °C erhitzt und dabei kräftig gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit dem gleichen Volumen EE verdünnt. Anschließend wurde die organische Phase mit 3 × 150 mL gesättigter wässriger EDTA-Lösung, 2 × 100 mL Salzsäure (10 %), 2 × 100 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und 2 × 100 mL Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/EE 4:1) aufgereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 5.55 g **7** (11.4 mmol, 54 %) als hellbrauner Feststoff isoliert.

DC (Hexan/EE, 2:1): $R_f = 0.47$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[85]

3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(phenylsulfonylhydrazon)-thymidin (8):

Es wurden 3.10 g (1.00 eq, 6.38 mmol) geschütztes 5-Formyl-2'-desoxyuridin **7** in möglichst wenig EtOH gelöst und mit 1.10 g (1.00 eq, 6.38 mmol) Phenylsulfonylhydrazid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend der entstandene Niederschlag abfiltriert. Nach Waschen mit kaltem EtOH und anschließendem Trocknen im Hochvakuum wurden 3.42 g **8** (5.36 mmol, 84 %) als farbloser Feststoff isoliert.

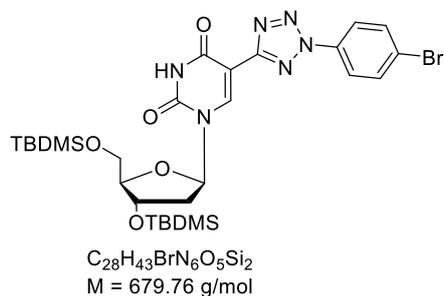
DC (Hexan/EE, 2:1): $R_f = 0.21$.

1H NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.65 (s, 1H, NH), 11.41 (s, 1H, NH), 7.87 – 7.79 (m, 3H, H_{Ar} + CH), 7.77 (s, 1H, H-6), 7.70 – 7.57 (m, 3H, H_{Ar}), 6.00 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'-H), 4.37 – 4.31 (m, 1H, 4'-H), 3.93 – 3.87 (m, 1H, 3'-H), 3.72 – 3.64 (m, 2H, 5'-H), 2.23 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 2'-H), 0.85 (d, $J = 26.0$ Hz, 18H, Si-tBu), 0.12 – 0.00 (m, 12H, Si-CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 161.7, 149.5, 140.2, 139.2, 136.9, 133.1, 129.2, 127.0, 107.2, 87.5, 86.1, 72.3, 62.9, 25.7, 25.7, 17.9, 17.7, -4.8, -4.9, -5.5, -5.6.

FAB MS: m/z (%): 639.2 (18) [MH^+].

HRMS ($C_{28}H_{47}N_4O_7SSi_2$): ber. 639.2699 [MH^+], gef. 639.2699.

3',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-(2-(4-bromophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (10):

Es wurden 2.45 g (1.00 eq, 3,83 mmol) des Sulfonylhydrazons **8** in 30 mL Pyridin gelöst und die Lösung 3 × mit der *freeze-pump-thaw*-Methode entgast. Nach Abkühlen der Lösung auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden portionsweise 1.25 g (1.20 eq, 4.60 mmol) 4-Brombenzoldiazonium-tetrafluoroborat zugegeben und für weitere 30 min unter Kühlung gerührt. Anschließend wurde die Lösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 mL EE verdünnt und mit 2 × 80 mL 1 M Salzsäure und 80 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , Hexan/EE 4:1) aufgereinigt. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 1.51 g **10** (2.22 mmol, 58 %) als rötlicher Schaum isoliert.

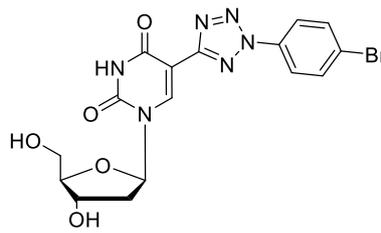
DC (Hexan/EE, 2:1): $R_f = 0.38$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ (ppm) = 11.78 (s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H-6), 7.99 – 7.93 (m, 2H, H_{Ar}), 7.84 – 7.78 (m, 2H, H_{Ar}), 6.07 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'-H), 4.33 – 4.26 (m, 1H, 4'-H), 3.82 (q, $J = 3.5$ Hz, 1H, 3'-H), 3.72 (dd, $J = 11.5, 3.6$ Hz, 1H, 5'-H), 3.64 (dd, $J = 11.5, 3.6$ Hz, 1H, 5'-H), 2.26 – 2.13 (m, 2H, 2'-H), 0.79 (s, 9H, Si-tBu), 0.63 (s, 9H, Si-tBu), 0.00 (d, $J = 2.3$ Hz, 6H, Si- CH_3), -0.13 (d, $J = 15.2$ Hz, 6H, Si- CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 160.0, 159.8, 149.6, 141.7, 135.2, 133.2, 123.1, 121.8, 101.5, 87.3, 85.4, 71.7, 62.4, 25.7, 25.6, 17.9, 17.7, -4.8, -5.0, -5.7, -5.7.

FAB MS: m/z (%): 681.2 (100) [MH^+].

HRMS ($C_{28}H_{44}BrN_6O_5Si_2$): ber. 679.2090 [MH^+], gef. 679.2089.

5-(2-(4-Bromophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (1):

$C_{16}H_{15}BrN_6O_5$
 $M = 451.24 \text{ g/mol}$

Zu einer Lösung von 750 mg (1.00 eq, 1.10 mmol) **10** in 18 mL abs. THF wurden unter Argonatmosphäre 2.76 mL (2.50 eq, 2.76 mmol) einer 1 M TBAF-Lösung in abs. THF gegeben. Nach 15 min wurde ein Spatel Kieselgel zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Es konnten 427 mg **1** (0.946 mmol, 86 %) als farbloser Schaum isoliert werden.

DC (DCM/MeOH, 10:1): $R_f = 0.31$.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 11.81 (s, 1H, NH), 8.80 (s, 1H, H-6), 8.05 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.21 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'-H), 5.30 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.08 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.29 (q, $J = 4.1$ Hz, 1H, 4'-H), 3.86 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, 3'-H), 3.61 (qt, $J = 11.7, 4.0$ Hz, 2H, 5'-H), 2.23 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 2'-H).

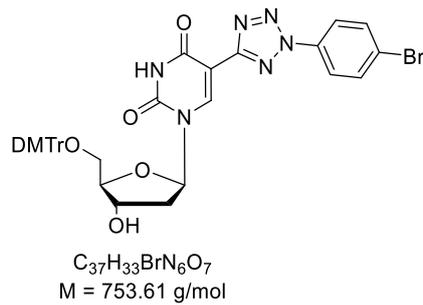
^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 160.0, 159.9, 149.7, 142.5, 135.3, 133.1, 123.0, 121.8, 101.5, 87.8, 85.2, 70.2, 60.9, 40.4.

FAB MS: m/z (%): 451.1 (25) [MH^+].

HRMS ($C_{16}H_{16}BrN_6O_5$): ber. 451.0366 [MH^+], gef. 451.0364.

UV/Vis: $\epsilon_{260nm} = 13370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{287nm} = 22480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-5-(2-(4-bromophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (13**):**



Nach dreimaligem koevaprieren in absolutem Pyridin wurden 500 mg (1.00 eq, 1.11 mmol) **1** in 15 mL absolutem Pyridin gelöst und 413 mg (1.10 eq, 1.22 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von MeOH gestoppt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 50:1 + 0.1 % Et₃N) aufgereinigt. Es konnten 745 mg **13** (0.988 mmol, 89 %) als farbloser Schaum gewonnen werden.

DC (DCM/MeOH, 10:1): $R_f = 0.58$.

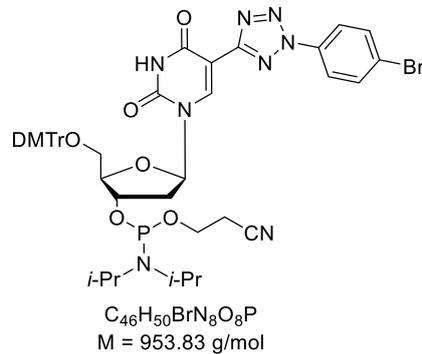
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.88 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H-6), 7.74 – 7.67 (m, 4H, H_{Ar}), 7.33 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.24 – 7.13 (m, 6H, H_{Ar}), 7.07 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_{Ar}), 6.73 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H_{Ar}), 6.18 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, 1'-H), 5.39 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.31 (p, $J = 4.8$ Hz, 1H, 4'-H), 3.96 (q, $J = 3.8$ Hz, 1H, 3'-H), 3.64 (d, $J = 1.5$ Hz, 6H, 2 × O-CH₃), 3.21 (tt, $J = 10.6, 5.9$ Hz, 2H, 5'-H), 2.40 – 2.26 (m, 2H, 2'-H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 160.0, 159.5, 157.9, 157.9, 149.6, 144.5, 141.43, 136.1, 135.5, 135.3, 135.0, 132.8, 129.6, 129.5, 128.3, 127.8, 127.6, 126.5, 123.9, 122.6, 121.5, 113.0, 112.9, 101.6, 85.8, 85.8, 85.5, 69.7, 63.1, 54.9.

FAB MS: m/z (%): 754.2 (100) [MH⁺].

HRMS (C₃₇H₃₄BrN₆O₇): ber. 752.1594 [MH⁺], gef. 752.1596.

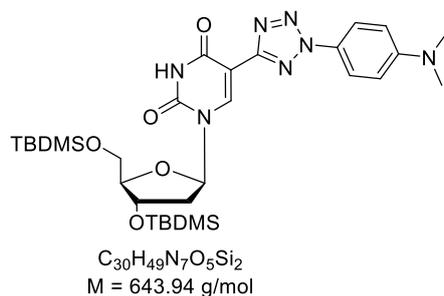
3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-4,4'-dimethoxytrityl-5-(2-(4-bromophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (3**):**



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Argonatmosphäre 248 mg (1.00 eq, 0.329 mmol) **13** in 5 mL trockenem DCM gelöst. Anschließend wurden 168 μ L (3.00 eq, 0.987 mmol) DIPEA und 110 μ L (1.50 eq, 0.494 mmol) 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamino-phosphanylchlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend direkt auf eine Kieselgelsäule überführt und säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH 20:1 + 0.1 % Et_3N) aufgereingt. Es wurden 245 mg **3** (0.257 mmol, 78 %) als farbloser Schaum erhalten.

^{31}P NMR (202 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 147.62, 147.32.

MALDI MS: m/z: ber. $C_{46}H_{51}BrN_6O_8P$ [$MH^+ - N_2$] 925.27, gef. 927.60 [$MH^+ - N_2$].

3',5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-(2-(4-dimethylaminophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (9):

In einem ausgeheizten Schlenk Kolben wurden zunächst 250 mg (1.00 eq, 0.368 mmol) **10** in Benzol gelöst und über Nacht lyophilisiert. Nach Zugabe von 10.6 mg (0.05 eq, 0.0184 mmol) $Pd(dba)_2$ und 17.5 mg (0.10 eq, 0.0368 mmol) JohnPhos wurde der Schlenk Kolben erneut mehrfach evakuiert und mit Argon befüllt. Anschließend wurden 150 mg (5.00 eq, 1.84 mmol) Dimethylaminohydrochlorid sowie 369 mg (6.00 eq, 2.21 mmol) Natrium-*tert*-butanolat hinzugefügt. Nach Zugabe von 5 mL trockenem Toluol wurde für 16 h kräftig bei 40 °C gerührt. Das erhaltene violettfarbene Reaktionsgemisch wurde mit dem doppelten Volumen Diethylether verdünnt und auf gesättigte NH_4Cl -Lösung gegossen. Die wässrige Phase wurde mit 3 × 20 mL Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , Hexan:EE, 5:1) aufgereinigt. Es konnten 68.7 mg (0.107 mmol, 29 % Ausbeute) des Produkts als violettfarbener Schaum erhalten werden.

DC (Hexan/EE, 1:1): $R_f = 0.30$.

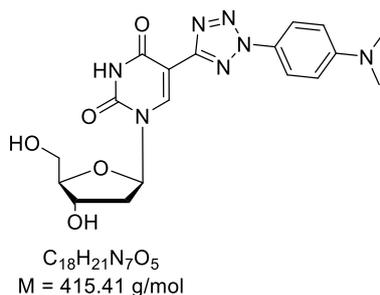
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.53 (s, 1H, H-6), 7.97 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.76 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.33 (dd, $J = 7.8, 5.8$ Hz, 1H, 1'-H), 4.44 (dt, $J = 5.2, 2.4$ Hz, 1H, 4'-H), 4.04 (q, $J = 2.9$ Hz, 1H, 3'-H), 3.87 (dd, $J = 11.3, 3.3$ Hz, 1H, 5'-H), 3.78 (dd, $J = 11.3, 3.0$ Hz, 1H, 5'-H), 3.04 (s, 6H, 2 × N- CH_3), 2.42 (m, 1H, 2'-H), 2.13 (m, 1H, 2'-H), 0.90 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.78 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.09 (d, $J = 5.5$ Hz, 6H, Si- CH_3), 0.02 (d, $J = 27.6$ Hz, 6H, Si- CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 160.0, 158.7, 151.2, 149.5, 141.3, 129.3, 128.6, 126.7, 121.5, 120.3, 113.3, 111.9, 103.7, 88.8, 86.6, 72.8, 63.2, 42.0, 40.5, 29.8, 26.1, 26.0, 25.9, 18.5, 18.2, 1.2, -4.5, -4.9, -5.4, -5.5.

FAB MS: m/z (%): 644.4 (12) [MH^+].

HRMS ($C_{30}H_{50}N_7O_5Si_2$): ber. 664.3407 [MH⁺], gef. 664.3404.

5-(2-(4-Dimethylaminophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (2**):**



Zu einer Lösung von 305 mg (1.00 eq, 0.474 mmol) **9** in 7 mL abs. THF wurden unter Argonatmosphäre 1.18 mL (2.50 eq, 1.18 mmol) einer 1 M TBAF-Lösung in THF gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde direkt auf Kieselgel aufgezogen und anschließend mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Es konnten 146 mg **2** (0.351 mmol, 74 %) als farbloser Schaum isoliert werden.

DC (DCM/MeOH, 20:1): $R_f = 0.12$.

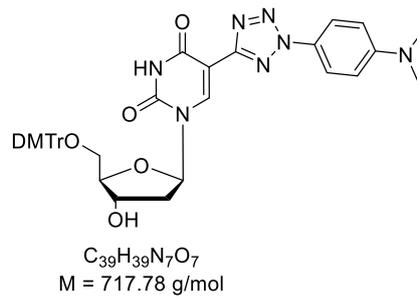
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.76 (s, 1H, NH), 8.69 (s, 1H, H-6), 7.87 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.90 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'-H), 5.29 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.06 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.29 – 4.23 (m, 1H, 4'-H), 3.85 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, 3'-H), 3.59 (qt, $J = 11.7, 4.1$ Hz, 2H, 5'-H), 3.01 (s, 6H, 2 × N-CH₃), 2.24 – 2.19 (m, 2H, 2'-H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 160.1, 159.1, 151.1, 149.8, 142.0, 125.5, 121.0, 112.1, 102.1, 87.7, 85.1, 70.2, 61.0.

FAB MS: m/z (%): 416.2 (35) [MH⁺].

HRMS (C₁₈H₂₂N₇O₅): ber. 416.1682 [MH⁺], gef. 416.1681.

UV/Vis: $\epsilon_{260\text{nm}} = 5790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{320\text{nm}} = 10860 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl,5-(2-(4-dimethylaminophenyl)-2'-desoxyuridin (14):

Nach dreimaligem koevaprieren in absolutem Pyridin wurden 500 mg (1.00 eq, 1.20 mmol) **2** in 15 mL absolutem Pyridin gelöst und portionsweise 489 mg (1.20 eq, 1.44 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von MeOH gestoppt. Nach Entfernen der Lösungsmittel unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 50:1 + 0.1 % Et₃N) aufgereinigt. Es konnten 801 mg **14** (1.12 mmol, 93 %) als farbloser Schaum gewonnen werden.

DC (DCM/MeOH, 20:1): $R_f = 0.35$.

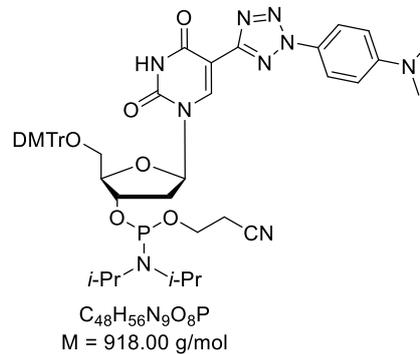
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.83 (s, 1H, NH), 8.34 (s, 1H, H-6), 7.64 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.37 (s, 2H, H_{Ar}), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.24 – 7.12 (m, 6H, H_{Ar}), 7.08 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_{Ar}), 6.79 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{Ar}), 6.75 (dd, $J = 8.9, 3.7$ Hz, 4H, H_{Ar}), 6.17 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 1'-H), 5.37 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.26 (quin, $J = 4.8$ Hz, 1H, 4'-H), 3.95 (q, $J = 3.9$ Hz, 1H, 3'-H), 3.65 (s, 6H, 2 × O-CH₃), 3.00 (s, 6H, 2 × N-CH₃), 2.36 – 2.26 (m, 2H, 2'-H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ (ppm) = 160.6, 159.1, 158.3, 151.3, 150.1, 145.1, 141.5, 135.9, 135.7, 130.1, 130.0, 128.8, 128.1, 128.0, 127.0, 125.9, 121.3, 113.5, 113.5, 112.3, 102.6, 100.0, 86.3, 86.2, 85.9, 70.5, 55.4.

FAB MS: m/z (%): 718.3 (43) [MH⁺].

HRMS (C₃₉H₄₀N₇O₇): ber. 718.2989 [MH⁺], gef. 718.2989.

3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-4,4'-dimethoxytrityl,5-(2-(4-dimethylaminophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridin (4**):**

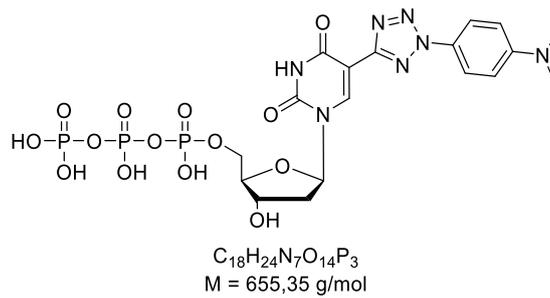


In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Argonatmosphäre 45 mg (1.00 eq, 0.0627 mmol) **14** in 2 mL trockenem DCM gelöst. Anschließend wurden 32 μ L (3.00 eq, 0.188 mmol) DIPEA und 21 μ L (1.50 eq, 0.0940 mmol) 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamino-phosphanylchlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend direkt auf eine Kieselgelsäule überführt und säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH 20:1 + 0.1 % Et_3N) aufgereingt. Es wurden 23 mg **4** (0.0251 mmol, 40 %) als farbloser Schaum erhalten.

DC (DCM/MeOH, 20:1): $R_f = 0.41$.

^{31}P NMR (202 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm) = 147.57, 147.26.

MALDI MS: m/z: ber. $[MH^+ - N_2]$ 890.40, gef. 890.35 $[MH^+ - N_2]$.

5-(2-(4-Dimethylaminophenyl)-2H-tetrazol-5-yl)-2'-desoxyuridintriphosphat (17):

Tributylamin und Trimethylphosphat (TMP) wurden über Nacht zur Vorbereitung in einem ausgeheizten Kolben über Molekularsieb getrocknet. In einen weiteren ausgeheizten Kolben mit Septum und Kanüle wurden 25 mg (1.00 eq, 60.0 nmol) **2** und 19.3 mg (1.50 eq, 90.0 nmol) fein gemörserter Protonenschwamm gegeben und über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Die Reagenzien wurden in 572 μL TMP gelöst und das Reaktionsgemisch auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt. Anschließend wurden 5.89 μL (1.05 eq, 63.0 nmol) POCl_3 in einer Portion hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 3 h unter Kühlung kräftig gerührt. Nach erneuter Zugabe von 2.24 μL (0.4 eq, 24.0 nmol) POCl_3 wurde für eine weitere Stunde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Parallel dazu wurden in einem ausgeheizten Kolben 198.1 mg (6.00 eq, 361 nmol) Tributylammoniumpyrophosphat im Hochvakuum für 1 h getrocknet. Anschließend wurde dieses in 55 μL Tributylamin und 750 μL DMF gelöst und ebenfalls unter kräftigem Rühren in einem Schuss zur Reaktionslösung gegeben. Das Eisbad wurde entfernt, das Reaktionsgemisch für 15 min gerührt und über einen Zeitraum von etwa 40 min langsam in 3 mL 100 mM TEAB-Puffer (pH = 8.0) getropft. Nach Ende der Zugabe wurde erneut für 3 h gerührt. Schließlich wurde die Lösung in flüssigem Stickstoff ausgefroren und über mehrere Tage lyophilisiert. Der Rückstand wurde über RP-HPLC (Laufmittel A: 50 mM TEAB, pH = 8.3, Laufmittel B: Acetonitril, Gradient: 0 – 50 % B in 60 min) aufgereinigt. Die Ausbeute wurde photometrisch über die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt (7.69 nmol, 9 %).

MALDI MS: m/z: ber. $C_{18}H_{24}N_7O_{14}P_3$ $[\text{MH}^+]$ 655.06; gef. 653.23 $[\text{MH}^+]$, 627.24 $[\text{MH}^+-\text{N}_2]$.

5.3 Chemische Oligonukleotid-Synthese

5.3.1 Synthese modifizierter DNA

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte nach der festphasenbasierten Phosphoramidit-Methode an einem DNA-Synthesizer *H-6* der Firma *K&A Laborgeräte*. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Phosphoramidit-Bausteine, Reagenzien und CPG-Säulen (*Controlled Pore Glass*, 500 Å, Beladung 1 µmol) wurden von *Glen Research*, *Alfa Aesar* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die Phosphoramidit-Bausteine der natürlichen Basen wurden in Acetonitril ($c = 0.067 \text{ M}$) und die synthetisierten Tetrazol-Bausteine in Dichlormethan ($c = 0.1 \text{ M}$) gelöst.

Die Reihenfolge und variablen Mengen, in der die Reagenzien während der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt werden, sind im Kupplungsprotokoll festgelegt. Die Volumina der eingesetzten Reagenzien werden dabei über die Pumpdauer (Angabe in 100 ms-Schritten) angegeben. Für die artifiziellen Tetrazol-Bausteine wurde ein gegenüber den natürlichen Basen verändertes Protokoll verwendet (Tabelle 6). Dabei wurden die Reagenzmengen und die Verweildauer auf der festen Phase variiert, sowie ein zusätzlicher Spülschritt zum Entfernen des verwendeten Dichlormethans eingebaut.

Tabelle 6: Syntheseprotokoll zur Kupplung der Phosphoramidit-Bausteine. Da für die eingesetzten artifiziellen Tetrazol-Bausteine (rot) Anpassungen gegenüber dem Standardprotokoll (blau) für die natürlichen Basen dA, T, dG und dC notwendig waren, wurden entsprechende Bereiche farblich markiert. Quellen: TCA: 3 % Dichloressigsäure in DCM; GAS: Argon; ACN: Acetonitril; TET: 0.45 M Tetrazol in DCM; AMD: Phosphoramidit-Baustein in Acetonitril; CP_A: Essigsäureanhydrid in THF/Pyridin; CP_B: N-Methylimidazol in THF/Pyridin; OXI: Iod in Wasser/THF/Pyridin. Ziele: COL: über die Säule; TRM: über die Säule in die Detektorkammer; M_W: über den Reagenzienblock.

Quelle	Ziel	Pumpdauer [s]	Wartezeit [s]
Detritylierung			
TCA	COL	0.4	
TCA	TRM	1.2	10
TCA	TRM	1.4	10
TCA	TRM	1.5	12
TCA	TRM	1.5	12
GAS	TRM	3.0	
ACN	M_W	1.0	
ACN	COL	2.0	4
GAS	COL	3.0	
ACN	M_W	0.2	

Quelle	Ziel	Pumpdauer [s]	Wartezeit [s]
ACN	COL	2.0	
GAS	M_W	1.0	
GAS	COL	3.5	
Kupplung			
GAS	COL	1.5	2
TET	COL	0.2	2
TET / TET + DCM	COL	0.1 / 0.4	
AMD + TET	COL	0.8	6 / 300
AMD + TET	COL	0.2 / 0.8	0 / 300
TET + DCM	COL	0.4	300
DCM	COL	2.0	
ACN	COL	2.0	
ACN	M_W	1.0 / 2.0	
GAS	M_W	1.0 / 2.0	
ACN	M_W	1.0	50 / 230
ACN	COL	1.0	
GAS	COL	3.5	
GAS	M_W	2.0	
Capping			
CP_A + CP_B	COL	2.0	15
CP_A + CP_B	COL	0.3	15
GAS	COL	2.0	
ACN	M_W	0.2	
ACN	COL	1.2	
GAS	M_W	1.0	2
GAS	COL	3.0	
Oxidation			
OXI	COL	2.0	
ACN	M_W	1.0	18
GAS	COL	3.0	
ACN	M_W	0.2	
ACN	COL	1.6	2
GAS	COL	3.0	
ACN	M_W	0.2	
ACN	COL	1.5	5
ACN	COL	1.5	5
GAS	M_W	1.0	
GAS	COL	3.0	

Aufarbeitung

Die CPG-Säulen wurden zunächst an einer Lyophilisierungsanlage getrocknet und geöffnet. Die feste Phase wurde zur Abspaltung der modifizierten Oligonukleotide in Mikroreaktionsgefäße überführt, mit 700 μL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung versetzt und für 24 h auf 35 °C erwärmt. Anschließend wurde der Ammoniak in einer Vakuumzentrifuge (35 °C, 100 mbar, 30 min) entfernt, bevor die Proben anschließend vollständig getrocknet wurden (RT, 0.1 mbar, 10 h). Zum Abtrennen des CPG-Granulats wurde dieses zunächst mit 400 μL Wasser kräftig aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Der Rückstand wurde mit 2 \times 200 μL Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen erneut am Vakuumkonzentrator getrocknet (RT, 0.1 mbar, 10 h).

Aufreinigung

Der Rückstand wurde in 300 μL Wasser aufgenommen und mittels semipräparativer *reversed Phase* HPLC (*Supelco Discovery® BIO Wide Pore C18-Säule*, 250 \times 10 mm, 5 μm Partikelgröße) von Abbruchsträngen und Verunreinigungen getrennt. Die Säule wurde dazu mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5, Laufmittel A) äquilibriert und graduell mit Acetonitril (Laufmittel B) bei einer Laufgeschwindigkeit von 2.5 mL pro Minute betrieben. Die Fraktionen wurden in Mikroreaktionsgefäßen aufgefangen und deren Reinheit über MALDI-TOF bestimmt. Anschließend wurden diese vereinigt und im Vakuumkonzentrator getrocknet (RT, 0.1 mbar, 10 h).

5.3.2 Charakterisierung modifizierter DNA

Massenspektren der synthetisierten DNA wurden mittels MALDI-TOF an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* im linear negativen Modus aufgenommen. Als Matrix wurde eine Mischung aus 3-Hydroxypicolinsäure (ges. Lösung in 50 % Acetonitril) und Diammoniumcitrat (0.1 M in Wasser) im Volumenverhältnis 9:1 eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration der Oligonukleotid-Stammlösungen wurde das *Lambert-Beersche* Gesetz angewendet. Hierfür wurde zunächst die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäuremodus bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{260} einer unmodifizierten DNA berechnet sich dabei wie folgt:

$$\varepsilon_{260} = (dA \cdot \varepsilon_{dA} + T \cdot \varepsilon_{dT} + dC \cdot \varepsilon_{dC} + dG \cdot \varepsilon_{dG}) \cdot 0.9$$

Die Faktoren dA, T, dC und dG stehen dabei für die Anzahl der jeweiligen natürlichen Nucleoside und ε die zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 260$ nm. Mit dem Korrekturfaktor 0.9 wird die Hypochromizität berücksichtigt.

Tabelle 7: Molare Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 260$ nm der eingesetzten natürlichen und artifiziellen DNA-Bausteine.

DNA-Baustein	ε_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
dA	15.4
T	8.8
dG	11.7
dC	7.3
2	5.8
1	13.3

Bei modifizierter DNA muss der jeweilige molare Extinktionskoeffizient ε_{260} des artifiziellen Bausteins addiert werden (Tabelle 7). Die molaren Extinktionskoeffizienten ε_{260} der verschiedenen eingesetzten Oligonukleotide sind in Kapitel 5.3.4 aufgeführt.

Hybridisierung

Die modifizierten Oligonukleotide wurden zusammen mit äquimolaren Mengen des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPi, pH = 7) und 250 mM Natriumchlorid-Lösung für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

5.3.3 HPLC-Methoden

In Tabelle 8 sind die verwendeten HPLC-Methoden zur Aufreinigung der synthetisierten DNA aufgeschlüsselt.

Tabelle 8: Übersicht über die HPLC-Methoden zur Aufreinigung der synthetisierten Oligonukleotide.

DNA	Modifikation	Laufzeit [min]	Gradient	Detektionswellenlängen
DNA 1A	1	0 – 40	0 – 30 %	260 nm, 290 nm
		40 – 60	30 %	
DNA 2A/3A	1	0 – 30	0 – 30 %	260 nm, 290 nm
		30 – 50	30 %	
DNA 1B	2	0 – 40	0 – 30 %	260 nm, 290 nm, 320 nm
		40 – 60	30 %	
DNA 2B/3B	2	0 – 30	0 – 30 %	260 nm, 290 nm, 320 nm
		30 – 50	30 %	

5.3.4 Sequenzen und Charakterisierung der modifizierten Oligonukleotide

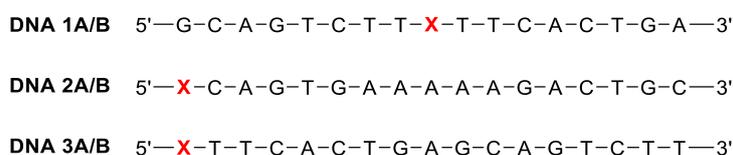


Abbildung 33: Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide. X markiert die Position der eingebauten Modifikation. DNA 1A – 3A: Nukleosid 1; DNA 1B – 3B: Nukleosid 2.

Tabelle 9: Überblick über die molaren Massen und molaren Extinktionskoeffizienten der synthetisierten DNA-Stränge.

DNA	Berechnete Masse [g/mol]	Gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DNA 1A	5356.8	5357.6	160.3
DNA 2A	5432.9	5433.7	188.1
DNA 3A	5356.8	5356.1	160.3
DNA 1B	5321.9	-	152.7
	5159.9 (Nitril)	5152.0 (Nitril)	
DNA 2B	5398.0	5405.0	180.5
DNA 3B	5321.9	5320.5	152.7

5.4 Enzymatische Oligonukleotid-Synthese

Vor den enzymatischen Primerverlängerungsexperimenten wurde zunächst der Templat- (900 nM) mit dem Fluorescein-markierten Primerstrang (750 nM) im jeweils auf die Polymerase angepassten Reaktionspuffer hybridisiert (Tabelle 10). Hierzu wurden diese in einem *TGradient Thermal Cycler* der Firma *Biometra* für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend kontrolliert und langsam über mindestens eine Stunde wieder auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Reaktionspuffer für die jeweiligen Polymerasen sowie deren optimale Arbeitstemperaturen.

Polymerase	Puffer	Optimale Arbeitstemperatur
Hemo KlenTaq	60 mM Tricin, 5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3.5 mM MgCl ₂ , 6 % Glycerol, pH = 8.7	68 °C
Vent (exo-) Deep Vent (exo-)	20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.1 % Triton [®] X-100, pH = 8.8	72 °C

Es wurden die jeweiligen natürlichen Nukleotide (dA, dG, dC), das artifizielle Nukleosidtriphosphat **17** (jeweils 400 µM) sowie die jeweilige Polymerase zur Reaktionsmischung zugegeben. Anschließend wurden die Proben erneut im *Thermocycler* inkubiert, dabei wurden Reaktionszeiten sowie Temperaturen an die jeweils verwendete Polymerase angepasst.

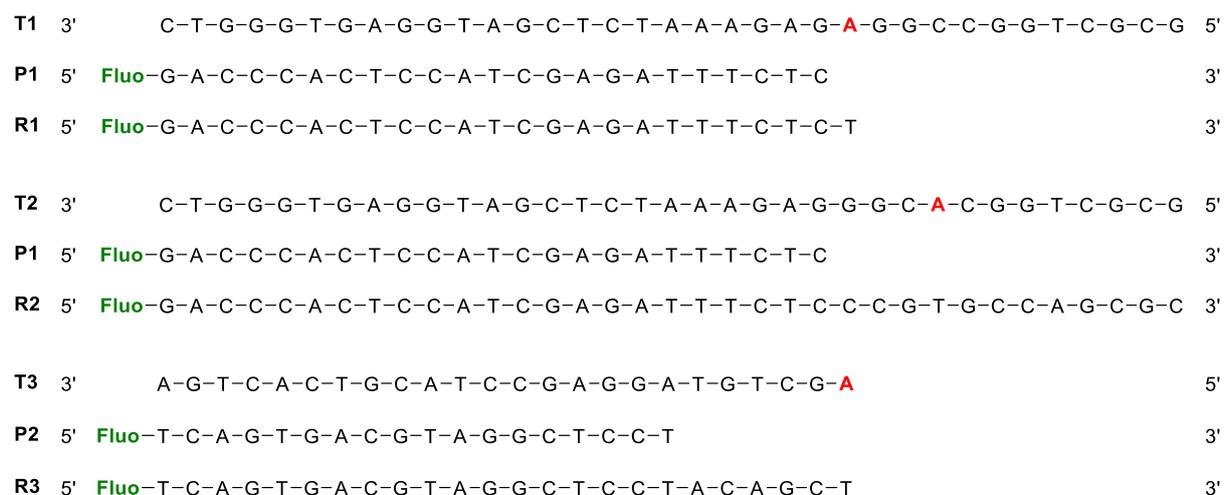


Abbildung 34: Primer-/Templatpaare mit denen enzymatische Primerverlängerungsexperimente durchgeführt wurden. Die Primer **P1** und **P2** sowie die Referenzstränge **R1–R3** sind am 5'-Ende mit Fluorescein (grün) markiert, um eine Fluoreszenzauswertung bei $\lambda_{em} = 514$ nm zu ermöglichen. Das rot markierte Adenosin zeigt die Position für den komplementären Einbau des artifizialen Nukleotids **17**.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden zur gelelektrophoretischen Analyse direkt mit dem gleichen Volumen Ladepuffer (20 mM EDTA, 89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 4 % Ficoll, 0.1 % Bromphenolblau, 0.02 % Xylencyanol FF, 8.3 M Harnstoff) versetzt oder für nachfolgende Markierungsexperimente entsalzt. Hierzu wurden die Reaktionslösungen auf eine zuvor mit entionisiertem Wasser äquilibrierte *illustra* NAP-5 Säule von *GE-Healthcare* aufgetragen und mit Wasser eluiert. Die Proben wurden lyophilisiert und in wässrigem Na-P_i Puffer aufgenommen (10 mM Na-P_i, 250 mM NaCl, pH = 7).

Gelelektrophorese

50 mL frisch vorbereiteter Gelmischung (12 % Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 19:1; 8.3 M Harnstoff, 2.65 mM TEMED, 2 mM EDTA, 89mM TRIS, 89 mM Borsäure, pH = 8.0) wurde durch Zugabe von 4 mM Ammoniumpersulfat die Polymerisation gestartet. Nach dem Gießen des Acrylamidgels wurde die Polymerisation für 30 min bei Raumtemperatur vervollständigt. Anschließend wurde das Gel mit Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE-Puffer, 89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH = 8.0) als Elektrolyt für mindestens 45 min äquilibriert. Nach gründlichem Spülen der Geltaschen mit Elektrolytlösung wurden 10 – 20 µL Probenvolumen (mit Ladepuffer versetzt) aufgetragen und die Gelelektrophorese für etwa 90 min bei 50 W und einer Betriebstemperatur von 50 °C durchgeführt.

Zur Auswertung wurden die Polyacrylamidgele schließlich in einem *Stella 8300* Fluoreszenzimager der Firma *Raytest* analysiert. Die verwendeten Parameter wurden dabei in Abhängigkeit des zu untersuchenden Fluorophors gewählt und bereits in Kapitel 5.1 aufgeführt.

5.5 Lichtinduzierte Markierungsexperimente

Zur postsynthetischen, bioorthogonalen Markierung von chemisch synthetisierter DNA mittels lichtinduzierter „Photoklick“-Reaktion wurde das Reaktionsgemisch (2.5 μ M tetrazol-modifizierte DNA, 12.5 μ M Sulfo-Cyanin-3-maleinimid, 10 mM Na-P_i, 250 mM NaCl, pH = 7) in eine 10 mm Quartzglasküvette überführt und für definierte Zeitintervalle mit verschiedenen (UV-) LEDs (300 nm, 365 nm, 385 nm sowie 405 nm) bei 20 °C und konstantem Rühren bestrahlt. Die Proben wurden anschließend lyophilisiert und mittels analytischer *RP-HPLC* über eine *Supelcosil* LC-318-Säule (250 × 4.6 mm, 3 μ m) aufgetrennt und analysiert. Die Produktkonzentrationen wurden über die Absorption bei λ = 260 nm bestimmt.

Zusätzliche Experimente mit N-Methylmaleinimid als Dipolarophil wurden aus Gründen der Löslichkeit mit 10 % Acetonitril (ansonsten identische Zusammensetzung der Proben) durchgeführt.

Tabelle 11: Mittels ESI-MS gefundene Massen der identifizierten Markierungsprodukte.

DNA	Dipolarophil	Produkt	Masse ber. [Da]	Masse gef. [Da]
DNA3A	16	Pyrazolin	6066.05	6066.1
		Hydrolisiertes Pyrazolin	6084.06	6084.0
DNA3B	16	Pyrazolin	6031.18	
		Hydrolisiertes Pyrazolin	6049.19	6072.1 (+Na)

Enzymatisch verlängerte DNA (750 nM) wurde nach Entsalzen und Aufnahme in Na-P_i Puffer (10 mM Na-P_i, 250 mM NaCl, pH = 7) mit 100 Äquivalenten Sulfo-Cy3 versetzt und mit zwei Hochleistungs-UV-LEDs (365 nm) bei 20 °C und unter kontinuierlicher Durchmischung bestrahlt. Nach definierten Zeitintervallen wurde eine Probe entnommen und mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt um eine nachfolgende gelelektrophoretische Analyse zu ermöglichen.

Zur Bestimmung der Reaktionskonstante 2. Ordnung der „Photoklick“-Reaktion wurde **DNA3A/B** jeweils in Gegenwart von 5 und 10 Äquivalenten Sulfo-Cyanin-3-Maleinimid **16** mit zwei Hochleistungs-UV-LEDs (365 nm) bestrahlt. Jeweils nach einer Minute Bestrahlung wurde eine definierte Probenmenge entnommen, lyophilisiert, entsalzt und über analytische *RP-HPLC* aufgetrennt. Die Produktkonzentrationen wurden dabei über die jeweilige Absorption bei 260 nm bestimmt.

Tabelle 12: Ausbeuten der Markierungsexperimente an **DNA3A/B** nach unterschiedlichen Belichtungszeiten bei jeweils 5 und 10 Äquivalenten Sulfo-Cyanin-3-Maleinimid **16**.

Bestrahlungsdauer [min]	5 eq Cy3 (16)		10 eq Cy3 (16)	
	Produktkonzentration [μM]	Ausbeute [%]	Produktkonzentration [μM]	Ausbeute [%]
DNA3A				
1	0.38	15	0.42	17
5	0.67	27	1.23	49
10	1.06	42	1.46	58
15	1.10	44	1.54	62
DNA3B				
1	0.42	17	0.37	15
5	0.90	36	1.16	46
10	0.86	34	1.68	67
15	0.91	36	1.85	74

Da die Bildung des Nitrilimins durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänger sehr schnell abläuft, kann die „Photoklick“-Reaktion als Reaktion pseudo-erster Ordnung betrachtet werden.^[78] Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Cycloaddition zwischen dem gebildeten Nitrilimin und dem Dipolarophil.

$$d[\text{Nitrilimin}]dt = -k_{obs}[\text{Nitrilimin}] \quad (1)$$

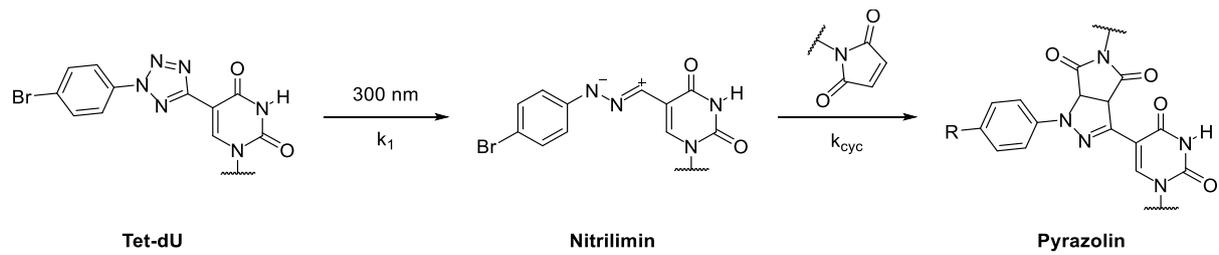
$$\ln\left(\frac{[\text{Nitrilimin}]_t}{[\text{Nitrilimin}]_0}\right) = -k_{obs}t \quad (2)$$

$$[\text{Nitrilimin}]_t = [\text{Nitrilimin}]_0 - [\text{Pyrazolin}]_t = [\text{Tet-dU}]_0 - [\text{Pyrazolin}]_t \quad (3)$$

$$\ln\left(\frac{[\text{Tet-dU}]_0}{[\text{Tet-dU}]_0 - [\text{Pyrazolin}]_t}\right) = k_{obs}t \quad (4)$$

$$k_{obs} = k_{cyc}[\text{Sulfo-Cy3}] \quad (5)$$

Durch die Betrachtung als Reaktion pseudo-erster Ordnung ergibt sich mit Gleichung 4 eine lineare Beziehung zwischen der Produktkonzentration und der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} . Wird dieser Wert nun durch die jeweils eingesetzte Dipolarophil-Konzentration dividiert, so kann über Gleichung 5 die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{cyc} errechnet werden. Über die aus den Messungen mit verschiedenen Dipolarophil-Konzentrationen erhaltenen Werte wurde schließlich gemittelt um die finalen Werte zu erhalten.



Schema 28: Schematische Darstellung der „Photoklick“-Reaktion zwischen **DNA3A** und Sulfo-Cyanin-3-Maleinimid **16**. Die Cycloaddition zwischen dem Nitrilimin und dem Dipolarophil stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt k_{cyc} dar.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	konz.	konzentriert(e)
δ	chemische Verschiebung	Lsgm	Lösungsmittel
Å	Angström	m	medium, Multiplett
abs.	absolut	M	Molar
Ac	Acetyl-Rest	Me	Methyl
Äquiv.	Äquivalent(e)	MHz	Megahertz
Ar	Aromat(isch)	min	Minute
ber.	berechnet	mind	Mindestens
bzw.	beziehungsweise	mL	Milliliter
c	Konzentration	mmol	Millimol
cm	Zentimeter	MS	Massenspektroskopie
d	Tage, Dublett	<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
d. h.	das heißt	nm	Nanometer
DC	Dünnschichtchromatographie	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
DCM	Dichlormethan	org.	organisch(e)
DMF	Dimethylformamid	p.a.	<i>per analysis</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure	Ph	Phenyl
dNTP	2'-Desoxyribonucleosidtriphosphat	ppm	<i>parts per million</i>
EE	Essigsäureethylester	Pr	Propyl
EI	Elektronenstoß-Ionisation	q	Quartett
Et	Ethyl	Quant.	quantitativ
<i>et al.</i>	und andere	quart.	quartenär
etc.	<i>etcetera</i>	R	Rest
g	Gramm	<i>R_f</i>	<i>ratio of fronts</i>
gef.	gefunden	RNA	Ribonucleinsäure
h	Stunde	RT	Raumtemperatur
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>	s	strong, Singulett
HV	Hochvakuum	Smp.	Schmelzpunkt
Hz	Hertz	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<i>i</i>	<i>iso</i>	sog.	Sogenannt(e,er)
IR	Infrarotspektroskopie, -spektrum	<i>t, tert</i>	Tertiär, Triplet

techn.	Technisch
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan; Trimethylsilyl
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett(es, er)
V	Volt
vs	very strong
vw	very weak
vgl.	vergleich(e)
w	weak
z. B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

- [1] "Spinat erkennt Sprengstoff im Grundwasser", online unter <http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/fluoreszenz-spinat-erkennt-sprengstoff-im-grundwasser-a-1119146.html>, abgerufen am 03.09.2018.
- [2] M. H. Wong, J. P. Giraldo, S.-Y. Kwak, V. B. Koman, R. Sinclair, T. T. S. Lew, G. Bisker, P. Liu, M. S. Strano, *Nat. Mater.* **2016**, *16*, 264.
- [3] D. Jocham, H. Stepp, R. Waidelich, *Eur. Urol.* **2008**, *53*, 1138-1150.
- [4] L. Möckl, D. C. Lamb, C. Bräuchle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13972-13977.
- [5] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487-5502.
- [6] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
- [7] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, *111*, 229-233.
- [8] M. Chalfie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5603-5611.
- [9] O. Shimomura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5590-5602.
- [10] R. Y. Tsien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612-5626.
- [11] M. Dunder, U. Hoffmann-Rohrer, Q. Hu, I. Grummt, L. I. Rothblum, R. D. Phair, T. Misteli, *Science* **2002**, *298*, 1623-1626.
- [12] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567.
- [13] V. V. Verkhusha, K. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 289.
- [14] A. Miyawaki, A. Sakaue-Sawano, T. Kogure, *Lighting up cells: Labelling proteins with fluorophores, Vol. Suppl*, **2003**.
- [15] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828-839.
- [16] C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007-11022.
- [17] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.
- [18] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16-20.
- [19] M. King, A. Wagner, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 825-839.
- [20] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [21] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [22] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1828-1830.

- [23] A. Baccaro, S. H. Weisbrod, A. Marx, *Synthesis* **2007**, 2007, 1949-1954.
- [24] M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 475.
- [25] H. Rolf, *Angew. Chem. Int. Ed. in English* **1963**, 2, 565-598.
- [26] R. V. V., G. L. G., F. V. V., S. K. Barry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [27] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [28] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210-216.
- [29] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14570-14576.
- [30] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, 340, 457-460.
- [31] H. Vu, P. S. I., M. Celia, F. M. G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9879-9883.
- [32] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. S. d. Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8051-8056.
- [33] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16893-16899.
- [34] L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, 21, 1393.
- [35] G. P. M. E., W. C. T., M. Antonio, C. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350-8358.
- [36] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046-15047.
- [37] C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9199-9208.
- [38] d. A. Gabriela, S. E. M., N. Hitomi, P. K. K., B. C. R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2443-2447.
- [39] V. B. R., K. Mihály, H. Krisztina, B. Szabolcs, K. Péter, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 822-828.
- [40] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, 320, 664-667.
- [41] Á. Eördögh, J. Steinmeyer, K. Peewasan, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Bioconjug. Chem.* **2016**, 27, 457-464.
- [42] C. S. McKay, J. Moran, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 931-933.
- [43] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 805-815.
- [44] K. Gutmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, 11, 2405-2408.
- [45] K. Gutmiedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 6877-6883.
- [46] D. L. Boger, *Chem. Rev.* **1986**, 86, 781-793.
- [47] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518-13519.

- [48] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [49] K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317-10320.
- [50] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646-9649.
- [51] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538.
- [52] F. Eggert, S. Kath-Schorr, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7284-7287.
- [53] P. Krisana, W. Hans-Achim, *Chembiochem* **2017**, *18*, 1473-1476.
- [54] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H. A. Wagenknecht, *Chembiochem* **2015**, *16*, 1541-1553.
- [55] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7993-7995.
- [56] M. J. O., S. F. G., B. J. P., B. K. Christopher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10284-10288.
- [57] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155-4158.
- [58] C. J. S., E. Albrecht, H. Rolf, S. Reiner, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60-70.
- [59] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3725-3728.
- [60] Z. Yu, L. Y. Ho, Z. Wang, Q. Lin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5033-5036.
- [61] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9920-9922.
- [62] P. Lederhose, K. N. R. Wust, C. Barner-Kowollik, J. P. Blinco, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5928-5931.
- [63] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5496-5499.
- [64] P. Lederhose, Z. Chen, R. Müller, J. P. Blinco, S. Wu, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12195-12199.
- [65] Z. Yu, T. Y. Ohulchansky, P. An, P. N. Prasad, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16766-16769.
- [66] K. N. Houk, J. Sims, C. R. Watts, L. J. Luskus, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7301-7315.
- [67] Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330-5333.
- [68] Z. Yu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4153-4156.
- [69] X. S. Wang, Y.-J. Lee, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3176-3179.
- [70] Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J.-S. Lee, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2002-2006.

- [71] W. Feng, L. Li, C. Yang, A. Welle, O. Trapp, P. A. Levkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8732-8735.
- [72] A. Herner, J. Marjanovic, T. M. Lewandowski, V. Marin, M. Patterson, L. Miesbauer, D. Ready, J. Williams, A. Vasudevan, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14609-14615.
- [73] S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang, T. Luo, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702-4705.
- [74] Y. Tian, M. P. Jacinto, Y. Zeng, Z. Yu, J. Qu, W. R. Liu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6078-6081.
- [75] S. Stewart, R. Harris, C. Jamieson, *Synlett* **2014**, *25*, 2480-2484.
- [76] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832-2835.
- [77] X. Shang, R. Lai, X. Song, H. Li, W. Niu, J. Guo, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2859-2864.
- [78] W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654-9655.
- [79] S. Arndt, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14808-14811.
- [80] Z. He, Y. Chen, Y. Wang, J. Wang, J. Mo, B. Fu, Z. Wang, Y. Du, X. Zhou, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8545-8548.
- [81] J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chemical Science* **2015**, *6*, 1362-1369.
- [82] J. Li, L. Huang, X. Xiao, Y. Chen, X. Wang, Z. Zhou, C. Zhang, Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15943-15949.
- [83] L. Huang, Y. Chen, L. Chen, X. Xiao, X. Wang, J. Li, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6452-6455.
- [84] G. Molteni, M. Orlandi, G. Broggin, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1* **2000**, 3742-3745.
- [85] J. Krim, C. Grünewald, M. Taourirte, J. W. Engels, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 480-486.
- [86] C. S. Liu, K. Shih, C. X. Sun, F. Wang, *Sci. Total Environ.* **2012**, *416*, 507-512.
- [87] T. Itahara, Y. Fujii, M. Tada, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3421-3424.
- [88] Y. Hu, L. Zhou, W. Lu, *Synthesis* **2017**, *49*, 4007-4016.
- [89] I. Suketaka, T. Yumo, K. Akikazu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 762-766.
- [90] I. Suketaka, T. Yumo, K. Akikazu, K. Ken-ichi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1920-1923.
- [91] L. Shi, M. Wang, C.-A. Fan, F.-M. Zhang, Y.-Q. Tu, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3515-3517.
- [92] J. Clayden, N. Greeves, S. G. Warren, *Organische Chemie*, 2. Aufl. ed., Springer Spektrum, Berlin, **2013**.

- [93] J. A. Vinson, **1967**.
- [94] A. S. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7901-7902.
- [95] A. S. Guram, R. A. Rennels, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed. in English* **1995**, *34*, 1348-1350.
- [96] F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969-5970.
- [97] J. Louie, J. F. Hartwig, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612.
- [98] J. P. Wolfe, S. Wagaw, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7215-7216.
- [99] B. K. Lee, M. R. Biscoe, S. L. Buchwald, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3672-3674.
- [100] S. Hosokawa, T. Ogura, H. Togashi, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 333-337.
- [101] J. J. Li, Z. Wang, L. H. Mitchell, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3606-3607.
- [102] M. Štefko, L. Slavětínská, B. Klepetářová, M. Hocek, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 442-449.
- [103] G. Løber, *J. Lumin.* **1981**, *22*, 221-265.
- [104] R. M. Giuliano, in *Cycloaddition Reactions in Carbohydrate Chemistry, Vol. 494*, American Chemical Society, **1992**, pp. 1-23.
- [105] S. Matsui, H. Aida, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* **1978**, 1277-1280.
- [106] R. G. Barradas, S. Fletcher, J. D. Porter, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 1400-1404.
- [107] C. P. Ramil, Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 89-95.
- [108] X. Liu, Q. Qiao, W. Tian, W. Liu, J. Chen, M. J. Lang, Z. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6960-6963.
- [109] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *Chembiochem* **2014**, *15*, 789-793.
- [110] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068.
- [111] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3505-3508.
- [112] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133.
- [113] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [114] N. Gaß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6661-6668.

8 Appendix

8.1 Publikationen

B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht, „Fluorogenic ‘photoclick’ labelling of DNA using a Cy3 dye“, *Org. Biomol. Chem.*, **2018**, *16*, 7579-7582.

U. Reisacher, L. Antusch, R. Hofsäß, C. Schwechheimer, B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht, „Light-induced functions in DNA“, *Current Opinion in Chemical Biology* **2017**, *40*, 119 – 126.

8.2 Posterbeiträge und Konferenzen

09/2015 VII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Berlin, **2015** (Poster)

08/2016 Chemical Biology 2016, Heidelberg, **2016** (Poster)

09/2017 VIII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Mainz, **2017** (Poster)

10/2017 Symposium on molecular architectures for fluorescent imaging of cells, Karlsruhe, **2017** (Poster)

8.3 Lehre

WS 2015/16	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT
10/2015 – 02/2016	Betreuung des Vertiefungspraktikums von Stefan Marschner Thema: Synthese eines neuen 2,5-substituierten Diaryltetrazoles und Untersuchungen zur „Photoklick“-Reaktion
02/2016 – 05/2016	Betreuung der Bachelorarbeit von Xiaofei Sun Thema: <i>Synthese von nukleosidischen Tetrazolen</i>
WS 2016/17	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT
10/2016 – 03/2017	Betreuung des Vertiefungspraktikums von Philipp Bohn Thema: <i>Studien zur Synthese nukleosidischer Tetrazole</i>
05/2017 – 08/2017	Betreuung des Vertiefungspraktikums von Judith Winsauer Thema: <i>Optimierung der Synthese von tetrazolmodifizierten Nukleosiden</i>
WS 2017/18	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT
WS 2017/18	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie und der Chemischen Biologie am KIT

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, 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. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt und die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist.

Karlsruhe, den 05.09.2018

Benjamin Lehmann