

# **Triazinmodifizierte Triphosphate für die Mehrfachmarkierung von DNA und Cyclopropenone als photoaktivierbare Nukleoside**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

**DISSERTATION**

von

**M. Sc. Ulrike Reisacher**

Aus Waiblingen, Baden-Württemberg

**Karlsruhe, 2019**

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2019



*Meiner Familie*



*„Ein Mensch hat dreierlei Wege zu handeln:  
Erstens durch Nachdenken – das ist der edelste;  
Zweitens durch Nachahmen – das ist der leichteste;  
Und drittens durch Erfahrung – das ist der bitterste.“*

**Konfuzius**



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2016 bis Juni 2019 am Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit meine Doktorarbeit an einem solch interessanten Thema durchführen zu können. Darüber hinaus möchte ich mich für die stetige Ansprechbarkeit und die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken, welche es mir ermöglicht haben meine eigenen Ideen zu entwickeln und umzusetzen und auf diese Weise über mich hinauszuwachsen.

Weiterhin möchte ich mich bei den folgenden Personen bedanken:

- Claudia Sommer für die vielen persönlichen Gespräche und außerdem ihre unendliche Hilfsbereitschaft bei all den organisatorischen und formellen Angelegenheiten.
- Annette Hochgesand für ihre Geduld mit meinen vielen MALDI-Proben.
- Der Analytik-Abteilung, im Einzelnen Dr. Andreas Rapp für die Hilfestellung bei Problemen mit den NMR-Spektrometern sowie Angelika Möhle und Lara Hirsch für das Anfertigen der Massenspektren.
- Dr. Patrick Weis für die ESI-Messungen, auch wenn meine Proben leider nicht wollten.
- Dr. Franziska Rönicke für ihre Mühe bei der Durchführung der Zellexperimente.
- Dr. Bastian Groitl und Dr. Ralf Strasser von der Dynamic Biosensors GmbH für das Messen der kinetischen Daten.
- Richard von Budberg für das Anfertigen jeglicher Glasgeräte und das Reparieren, wenn Randuli mal wieder zugeschlagen hat.
- Jakob Mayer für die weiteren Reparaturen und den geschenkten Fahrradmantel.
- Damian, Christoph und Samantha für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Meinen Arbeitskollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Zusammenarbeit, die schönen Abende und gemeinsamen AK-Ausflüge: Dr. Markus Merkel, Dr. Stefanie Arndt, Dr. Nadine Gaß, Dr. Heidi Walter, Dr. Krisana Peewasan, Dr. Barbara Reiß, Dr. Damian Ploschik, Dr. Sergej Hermann, Dr. Jeanine Steinmeyer, Dr. Benjamin Lehmann, Dr. Robert Hofsäß, Dr. David Rombach, Dr. Christian Schwechheimer, Dr. Franziska Rönicke, Yannic Fritz, Fabienne Speck, Arthur Kuhlmann, Samantha

Wörner, Sara Müller, Fabian Lang, Judith Winsauer, Julian Gebhard, Joana Krämer, Hülya Ucar, Fabian Weick, Larissa Doll, Katja Krell, Christoph Bickmann, Daniel Sack, Manuel Schupp, Dennis Harijan und Lara Hirsch.

- Insbesondere Damian und Sersch – meinen Laboreltern – für die lange gemeinsame Laborzeit, die vielen lustigen Gespräche und die Aufmunterung, wenn mal wieder gar nichts geklappt hat. Und wer weiß, vielleicht wird's ja doch eines Tages die Hütte auf den Bergen!
- Lara und Denise, dafür, dass im Anschluss O11 zu einem „Frauenlabor“ wurde.
- Den Machern des Bierjournals und allen, die sich daran beteiligt haben, vor allem Damian, Sersch, Dodo, Dominik, Christoph und Daniel.
- Allen aus dem Erdgeschoss für die gemeinsamen Mittagspausen und Kaffeeplaudereien; Damian für das Schokokisok, wenn die Nerven mal wieder blank lagen, und Manu, dafür, dass er diese Tradition weiterführt.
- Christoph für die gemeinsame Extrawanderung in Obergurgl.
- Larissa für die coole Zeit in San Diego, auch wenn ich meinen Flug fast verpasst hätte.
- Leonie, Katharina und Yasmin für die lustigen wöchentlichen Mittagessen und den neusten Klatsch und Tratsch.
- Teresa für die unvergessliche gemeinsame Zeit vom ersten Semester an, sowohl in der Uni als auch sonst überall. Dass du immer ein offenes Ohr für mich hast und ich mich immer auskotzen durfte.

An dieser Stelle möchte ich mich außerdem bei meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern Dorothea und Hansulrich, dafür bedanken, dass ihr mich die ganze Zeit über unterstützt habt.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Mitbewohnern Andi, Steffen, Manu, Luisa, Theresa, Jojo und auch Jul und Bianca dafür, dass ihr die freie Zeit während meiner Promotion so perfekt ausgefüllt habt.

Zu guter Letzt möchte ich Jojo für die wunderschöne gemeinsame Zeit danken. Dafür, dass du immer für mich da bist und es schaffst mich zum Lachen zu bringen. Durch dich ist mir immer klar, was wirklich wichtig ist im Leben und ich will keinen der gemeinsamen Momente vermissen!





## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Themenstellung .....	3
3. Theoretischer Hintergrund .....	5
3.1 Bioorthogonalität.....	5
3.2 Bioorthogonale Markierungsmethoden .....	7
3.2.1 Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) .....	9
3.2.2 Ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) .....	16
3.2.3 Photoaktivierbare Markierungsmethoden.....	20
3.3 Enzymatischer Zugang zu modifizierter DNA .....	23
4. Triazinmodifizierte Nukleotide zur bioorthogonalen Markierung von DNA.....	27
4.1 Triazinmodifizierter 2'-Desoxyuridin-Baustein 1.....	27
4.1.1 Synthese des triazinmodifizierten 2'-Desoxyuridins 14 .....	27
4.1.2 Triphosphatsynthese und enzymatischer Einbau in Oligonukleotide .....	30
4.1.3 Bioorthogonale Markierungsexperimente .....	35
4.2 Triazinmodifizierter 7-Deaza-dATP-Baustein 2 .....	45
4.2.1 Synthese des triazinmodifizierten 7-Deaza-dATPs 2 .....	45
4.2.2 Enzymatischer Einbau in Oligonukleotide .....	47
4.2.3 Bioorthogonale Markierungsexperimente .....	49
4.3 Duale bioorthogonale Markierung mit unterschiedlichen Modifikationen.....	55
4.4 PCR-Experimente .....	67
4.4.1 Triazinmodifizierte Triphosphate für die DNA-Amplifikation .....	68
4.4.2 Bioorthogonale Mehrfachmarkierung.....	80
4.5 Zusammenfassung .....	82

<b>5. Cyclopropenone als photoaktivierbare Vorstufen für die SPAAC .....</b>	<b>85</b>
<b>5.1 Synthese des cyclopropenonmodifizierten Nucleosids 3 .....</b>	<b>86</b>
<b>5.2 Untersuchungen einer photoinduzierten SPAAC .....</b>	<b>94</b>
<b>5.3 Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>105</b>
<b>7. Experimentalteil.....</b>	<b>109</b>
<b>7.1 Materialien und Geräte .....</b>	<b>109</b>
<b>7.2 Synthesevorschriften .....</b>	<b>116</b>
<b>7.3 Enzymatische DNA-Synthese .....</b>	<b>163</b>
<b>7.3.1 Primerverlängerungsexperimente .....</b>	<b>163</b>
<b>7.3.2 PCR-Experimente .....</b>	<b>166</b>
<b>7.3.3 Kinetische Messungen.....</b>	<b>169</b>
<b>7.4 Bioorthogonale Markierung .....</b>	<b>170</b>
<b>7.4.1 Postsynthetische Markierung mittels iEDDA .....</b>	<b>170</b>
<b>7.4.2 Photoinduzierte SPAAC an Cyclopropenonen.....</b>	<b>171</b>
<b>7.5 Zelleexperimente .....</b>	<b>172</b>
<b>7.6 Anhang .....</b>	<b>174</b>
<b>7.6.1 Absorptionsspektren der Nucleoside.....</b>	<b>174</b>
<b>7.6.2 Ergänzende massenspektrometrische Analysen.....</b>	<b>175</b>
<b>7.6.3 Ergänzende PAGE-Analysen.....</b>	<b>180</b>
<b>7.6.4 Weiterführende Absorptionsspektren .....</b>	<b>184</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>187</b>
<b>9. Appendix .....</b>	<b>197</b>
<b>9.1 Publikationen.....</b>	<b>197</b>
<b>9.2 Auszeichnungen und Stipendien .....</b>	<b>197</b>

<b>9.3 Posterbeiträge und Konferenzen .....</b>	<b>198</b>
<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>199</b>



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
Å	Angström
abs.	absolut
APS	Ammoniumpersulfat
Äq	Äquivalente
ATT	6-Aza-2-thiothymin
BCN	Bicyclononin
BODIPY	Borondipyrrromethen-Fluorophor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
COMBO	Carboxymethylmonobenzocycloktin
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cyp	Cyclopropen
d	Dublett
DA	Diels-Alder-Cycloaddition
dA	2'-Desoxyadenosin
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytosintriphosphat
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIBO	Dibenzocycloktinol
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Zellmedium ( <i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i> )
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat

dq	Dublett vom Quartett
dt	Dublett vom Triplet
dU	2'-Desoxyuridin
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoßionisation
ent.	entsalzt
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
EtOH	Ethanol
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
FC	Flash-Chromatographie
Fluo	Fluorescein
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
H	Hexan
h	Stunde
HeLa	Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie ( <i>Henrietta Lacks</i> )
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital ( <i>highest occupied molecular orbital</i> )
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HR	hochauflösend ( <i>high resolution</i> )
Hz	Hertz
I	Intensität
iEDDA	Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf ( <i>inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition</i> )
k	Geschwindigkeitskonstante
kV	Kilovolt
konz.	konzentriert
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge

LED	Leuchtdiode ( <i>light emitting diode</i> )
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital ( <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> )
M	Molarität
m	Multipllett
mA	Milliampere
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
Na-P <sub>i</sub>	Natriumphosphat-Puffer
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernsprinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
Nor	Norbornen
norm.	normiert
Nt	Nukleotide
ON	Oligonukleotide
P	Primer
p	Pentett
p.a.	analysenrein ( <i>pro analysi</i> )
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

PEG	Polyethylenglycol
PEX	Primerverlängerung ( <i>primer extension</i> )
pH	pH-Wert
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Protonenschwamm ( <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,8-naphthalendiamin)
q	Quartett
quant.	quantitativ
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RP	Umkehrpahse ( <i>reversed phase</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	Singulett
SAX	<i>strong anion exchange</i>
SPAAC	Ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition ( <i>strain promoted azide alkyne cycloaddition</i> )
T	Templat
t	Zeit
t	Triplett
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCO	<i>trans</i> -Cyclooctin
TDA-1	Tris[2-methoxyethoxy]ethyl]amin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	1,2,4,5-Tetrazin
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
TMDIBO	Tetramethoxydibenzocyclooctinol
TMS	Trimethylsilyl

TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vis	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
W	Watt
wässr.	wässrig
wt%	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

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

[a] *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

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



## 1. Einleitung

*„This evening is certainly the second most wonderful moment in my life. The first was our discovery of the structure of DNA. At that time we knew that a new world had been opened and that an old world which seemed rather mystical was gone.“* Dies sagte James Watson in seiner Rede auf dem Nobel-Bankett in Stockholm 1962.<sup>[1]</sup> Die Entdeckung der DNA geht bereits auf das 19. Jahrhundert zurück,<sup>[2]</sup> wenngleich sie als Erbgutträger erst 1944 durch *Oswald Avery* nachgewiesen werden konnte.<sup>[3-4]</sup> Seit jeher sind Naturwissenschaftler fasziniert von der Struktur und Funktionsweise der DNA. So überrascht es nicht, dass der Nobelpreis 1962 an *Watson, Crick* und *Wilkins* für die Aufklärung der DNA-Struktur verliehen wurde. Dass die immense Informationsfülle unseres Erbguts auf einem Makromolekül aus lediglich vier verschiedenen Nukleobasen besteht, scheint schier unvorstellbar. Dennoch beinhaltet sie die Informationen für alle biologischen Prozesse, auf denen unser Leben basiert, und ist daher für die Forschung in vielerlei Hinsicht von besonderem Interesse. So ist beispielsweise für die Untersuchung von Erbkrankheiten ein detailliertes Verständnis der ablaufenden zellulären Prozesse auf molekularer Ebene von großer Bedeutung. Ein weitreichendes Wissen treibt somit auch die gezielte pharmakologische Entwicklung voran.

Doch dafür bedarf es Techniken, die es erlauben, die beteiligten Biomoleküle möglichst in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen. Zu diesem Zweck ist eine gezielte Visualisierung der Zielmoleküle innerhalb der Zellen notwendig. Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, liegt in der Verwendung von Fluoreszenzsonden. Eines der häufig eingesetzten Werkzeuge stellt das grünfluoreszierende Protein (GFP) dar.<sup>[5]</sup> Wird das GFP-Gen mit der für ein Protein codierenden DNA-Sequenz fusioniert, so lassen sich die daraus resultierenden Fusionsproteine durch die grüne Fluoreszenz in der Zelle lokalisieren und beobachten. Trotz der wichtigen Bedeutung dieser Markierungsmethode, für dessen Entwicklung unter anderem *Roger Tsien* 2008 der Nobelpreis verliehen wurde,<sup>[6]</sup> handelt es sich hierbei um keine allgemein anwendbare Musterlösung. Zum einen können auf diese Weise nur Proteine markiert werden. Für weitere Biomoleküle, wie beispielsweise Nukleinsäuren, aber auch Kohlenhydrate oder Lipide, müssen andere Wege gefunden werden. Zum anderen kann die biologische Funktion der Biomoleküle *in vivo* durch die Größe der eingeführten Funktionalität beeinflusst werden.

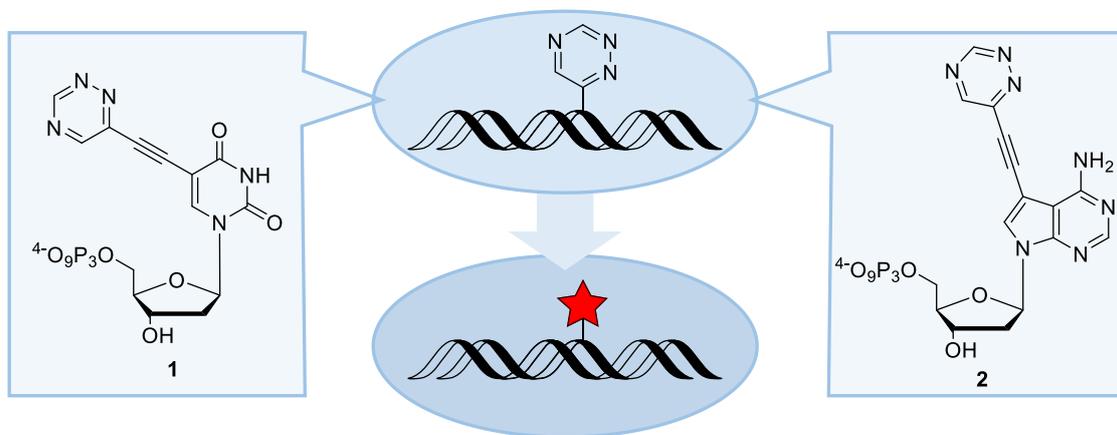
Eine Alternative, um dennoch eine Visualisierung durch Fluoreszenz zu ermöglichen, kann durch das chemische Einbringen von Chromophoren erreicht werden. Um einen möglichst geringen Einfluss auf das zu untersuchende Biomolekül auszuüben, bieten sich sogenannte postsynthetische Methoden an. Hierbei handelt es sich um Techniken, in denen eine kleine chemische Funktion synthetisch in das Biomolekül eingebracht und erst im Anschluss für die Detektion mit dem Fluorophor konjugiert wird. Für ein solches Vorgehen werden selektive bioorthogonale Konjugationsmethoden benötigt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von solchen postsynthetischen Markierungsmethoden für Nucleinsäuren, welche für die selektive Visualisierung in biologischen Systemen genutzt werden können.

## 2. Themenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Methoden für die Entwicklung der kupferfreien bioorthogonalen Markierung von DNA erarbeitet werden. Hierfür gliedert sich die Arbeit in zwei Teile.

Im ersten Teil sollten die neuen triazinmodifizierten Nukleosid-Triphosphate **1** und **2** synthetisiert und enzymatisch in die DNA eingebaut werden. Diese sollten postsynthetisch über eine Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen bioorthogonal markiert werden.

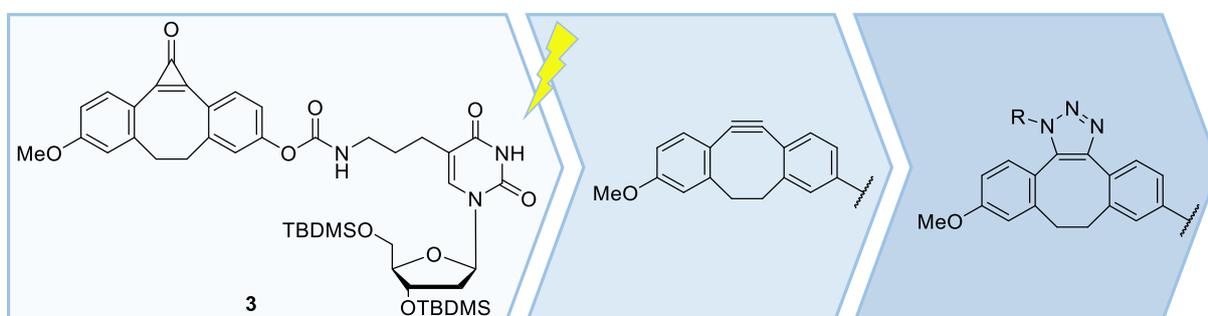


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des enzymatischen Einbaus der Zielstrukturen **1** und **2** in Oligonukleotide, welche postsynthetisch durch eine iEDDA bioorthogonal markiert werden können.

Dabei wurde eine Verknüpfung der Triazinfunktion über einen kurzen Alkinlinker gewählt, um eine optimale enzymatische Anwendung zu erreichen. Den wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Bausteinen stellt die zugrundeliegende Struktur der Nukleobase dar. Das Triphosphat **1** leitet sich vom natürlichen Thymidin (bzw. 2'-Desoxyuridin) ab, wohingegen **2** auf 2'-Desoxyadenosin basiert. Durch die Analogie in der Modifikation sollten Vergleiche zwischen beiden Bausteinen im Hinblick auf ihre enzymatische Kompatibilität sowie ihre Funktionsweise in einer iEDDA ermöglicht werden. Zu diesem Zweck sollten beide in Primerverlängerungsexperimenten und in der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden. In PCR-Experimenten muss das artifizielle Triphosphat nicht nur eingebaut werden, sondern auch als Templat für die weitere Amplifikation dienen. Eine zusätzliche Herausforderung liegt dabei in der Mehrfachmarkierung der amplifizierten DNA.

Des Weiteren sollte eine duale bioorthogonale Markierung durch den Einsatz von **1** in Kombination mit einem literaturbekannten orthogonalen Cyclopropan realisiert werden, um das Anwendungsspektrum bioorthogonaler Reporter zu erweitern.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung des cyclopropanmodifizierten Nukleosids **3**. Hierbei sollte der synthetische Zugang zu nukleosidischen Cyclopropanen eröffnet werden, um eine potentielle Anwendung für die postsynthetische DNA-Markierung durch eine photoinduzierte ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) zu ermöglichen. Aufgrund der enormen Größe des Cyclopropanons sollte dieses über einen flexiblen Alkyllinker mit der 5-Position eines 2'-Desoxyuridin verknüpft werden.



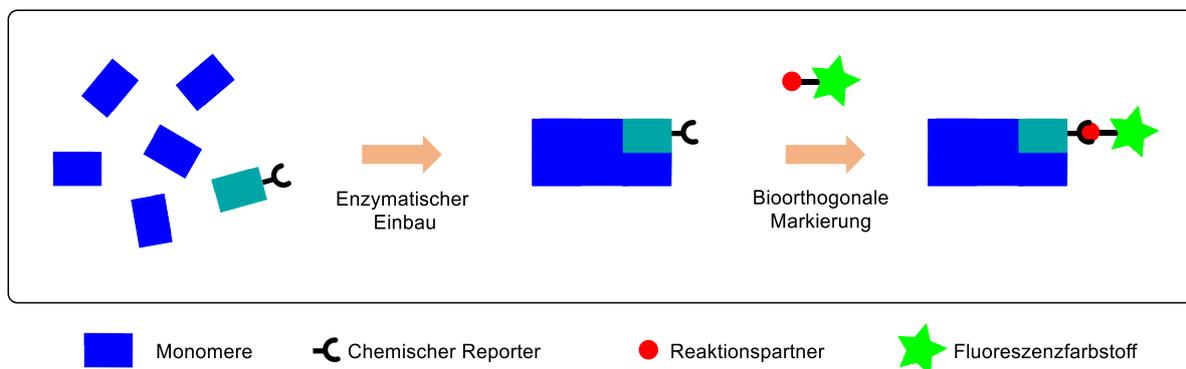
**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der photoinduzierten SPAAC ausgehend vom Zielmolekül **3**.

### 3. Theoretischer Hintergrund

#### 3.1 Bioorthogonalität

Der Begriff der Bioorthogonalität wurde Anfang des 21. Jahrhunderts im Kontext der Markierung von Biomolekülen in ihrer natürlichen Umgebung geprägt und beschreibt im Allgemeinen chemische Reaktionen, welche nicht mit den natürlichen Prozessen in biologischen Systemen interagieren.<sup>[7-8]</sup> Was dies für die Entwicklung der sogenannten bioorthogonalen Reaktionen bedeutet und wie diese für die Markierung von Biomolekülen genutzt werden können soll im Folgenden erläutert werden.

Die Strategie der bioorthogonalen Markierung kann grundlegend in zwei separate Schritte unterteilt werden (Abbildung 3): Im ersten Schritt wird das Monomer eines Biopolymers (z.B. ein Nucleosid, Monosaccharid oder eine Aminosäure) mit einem chemischen Reporter versehen und idealerweise metabolisch in das Biopolymer eingebaut. Anschließend folgt in einem zweiten Schritt die Verknüpfung mit einem passenden Reaktionspartner.



**Abbildung 3:** Konzept der bioorthogonalen Markierung: Ein mit einem chemischen Reporter modifiziertes Monomer wird enzymatisch in ein Biopolymer eingebaut. Anschließend findet die selektive Markierung mit einem Reaktionspartner statt, welcher eine Sonde (hier: Fluoreszenzfarbstoff) trägt.

Wichtig ist hierbei nicht nur, dass das modifizierte Monomer die eigentliche Struktur und somit die Funktion des Biomoleküls nicht beeinträchtigt, sondern auch die Akzeptanz dieses Monomers durch die für den metabolischen Einbau zuständigen Enzyme. Aus diesem Grund wird deutlich, weshalb ein einfacher Weg über die direkte Anbindung typischerweise meist großer biologischer Sonden, beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe, nicht zielführend ist. Durch die zweistufige, postsynthetische Markierung kann als chemischer Reporter folglich eine

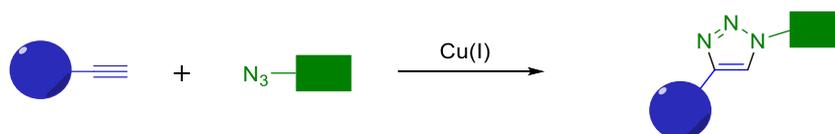
kleine Funktionalität gewählt werden, welche wahrscheinlicher vom biologischen System akzeptiert und erst im Anschluss kovalent mit der biologischen Sonde verknüpft wird.<sup>[8]</sup>

Darüber hinaus müssen solche Markierungsreaktionen einige Kriterien erfüllen, um als bioorthogonal gelten zu können.<sup>[8-10]</sup> Eine wichtige Rolle spielt die Chemoselektivität der Reaktion. Die eingesetzten funktionellen Gruppen sollten selektiv ausschließlich miteinander reagieren und dabei nur ungiftige bzw. bestenfalls keine Nebenprodukte bilden. Reaktionen mit natürlichen Nukleophilen, wie sie in Zellen vorkommen, sollten gänzlich vermieden werden, um eine unspezifische Markierung auszuschließen, was die Wahl der Funktionalität stark einschränkt. Ein weiteres essentielles Kriterium betrifft die Biokompatibilität. Reaktionen müssen unter physiologischen Bedingungen, also bei physiologischer Temperatur, Normaldruck, unter O<sub>2</sub>-Atmosphäre und in wässrigem, pH-neutralem Milieu stattfinden können. Darüber hinaus sollten die verwendeten Funktionalitäten sowie das gebildete Konjugat metabolisch stabil sein und keine Zelltoxizität aufweisen. Ein letztes Kriterium stellt die Geschwindigkeitskonstante der verwendeten Reaktion dar.<sup>[10-11]</sup> Da die meisten bioorthogonalen Reaktionen eine Kinetik 2. Ordnung besitzen, sind diese nicht nur von der Geschwindigkeitskonstante, sondern auch von den Konzentrationen beider Reaktionspartner abhängig. Eine schnell ablaufende Reaktion ermöglicht folglich nicht nur die Markierung biologischer Prozesse, welche auf extrem kurzen Zeitskalen bis in den Mikrosekunden-Bereich ablaufen,<sup>[12]</sup> sondern bietet generell die Möglichkeit, die Konzentrationen der Reaktanden gering zu halten. Hierdurch können mögliche, durch hohe Konzentrationen hervorgerufene Probleme, beispielsweise in Bezug auf die Zelltoxizität oder Löslichkeit der Reaktanden, vermieden werden. Zudem benötigt die Detektion von Biomolekülen, welche nur in geringem Maße in Zellen vorkommen, eine hohe Geschwindigkeit um eine ausreichende Markierungseffizienz zu erreichen. Kann der Einsatz höherer Konzentrationen an Markierungsreagenzien, beispielsweise aufgrund einer zu langsamen Geschwindigkeit, nicht vermieden werden, so entsteht außerdem häufig ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis des Detektionssignals. Dies kann jedoch durch aktivierbare Sonden, beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe, welche erst durch Konjugation ein detektierbares Signal ergeben, umgangen werden.<sup>[13]</sup>

Trotz dieser vielen Beschränkungen konnten in den letzten Jahren einige geeignete Reaktionen entwickelt werden, welche im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

### 3.2 Bioorthogonale Markierungsmethoden

Bioorthogonale Reaktionen werden im Allgemeinen häufig unter dem Begriff der „Click“-Chemie zusammengefasst. Diese Bezeichnung wurde durch *Sharpless* geprägt und umfasst einige Kriterien, wie hohe Ausbeuten, milde Reaktionsbedingungen, breite Anwendbarkeit und eine hohe Spezifität.<sup>[14]</sup> Obwohl es eine Vielzahl an Reaktionen gibt, welche diese Kriterien erfüllen, ist das wohl bekannteste Beispiel die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). Diese Reaktion geht auf die ursprünglich von *Huisgen* entdeckte 1,3-dipolare Cycloaddition zurück, welche jedoch aufgrund der meist benötigten hohen Temperaturen keine biologische Anwendung fand.<sup>[15]</sup> Erst als *Sharpless*<sup>[16]</sup> und *Meldal*<sup>[17]</sup> 2002 eine kupferkatalysierte Variante vorstellten, welche eine Reaktionsführung unter milden Bedingungen ermöglichte, wuchs das Interesse an dieser Cycloaddition als Strategie zur Markierung von Biomolekülen.



**Schema 1:** Allgemeine Darstellung der kupferkatalysierten Cycloaddition zwischen terminalen Alkinen und Aziden (CuAAC) zur Bildung von 1,2,3-Triazolen.

Der Einsatz von Cu(I)-Salzen für diese Katalyse ist jedoch nicht unproblematisch: Kupfer(I) fördert durch Redoxreaktionen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was wiederum zu oxidativen Schäden innerhalb der Zellen führt, und gilt daher als zelltoxisch.<sup>[18]</sup> Obwohl dies im Gegensatz zu den Prinzipien der Bioorthogonalität steht, fand die CuAAC eine breite Anwendung<sup>[19]</sup> im Bereich der bioorthogonalen Markierung von Proteinen, Glykanen, Lipiden sowie Nukleinsäuren<sup>[20-21]</sup> und wurde sogar in lebenden Zellen angewandt.<sup>[22-23]</sup> Für eine effiziente Markierung wurden üblicherweise mehrzählige Liganden eingesetzt, welche nicht nur zu einer Reduktion der Zelltoxizität beitragen, sondern auch die Kupfer(I)-Ionen stabilisieren und deren Löslichkeit in Wasser verbessern.<sup>[24]</sup> Ein prominentes Beispiel stellt das Polytriazol TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) dar.<sup>[25]</sup>

Um in Bezug auf die Bioorthogonalität dennoch gänzlich auf zelltoxische Reagenzien zu verzichten, wurden verschiedene kupferfreie Methoden entwickelt.

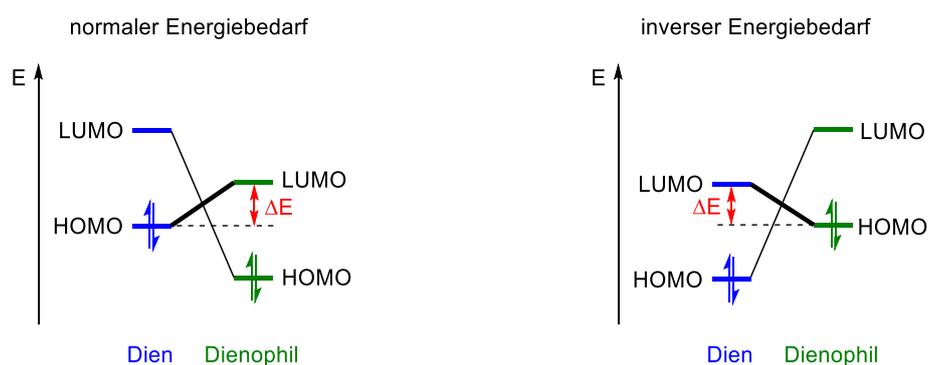
Eine Möglichkeit hierfür ist die Kondensation zwischen Aldehyden oder Ketonen und primären Aminen.<sup>[26]</sup> Carbonyle können mit primären Aminen in leicht saurem wässrigem Milieu Schiff'sche Basen bilden, wobei diese Gleichgewichtsreaktion meist auf Seite des freien Carbonyls liegt. Werden jedoch Amine eingesetzt, welche durch den  $\alpha$ -Effekt aktiviert sind, wie es bei Hydraziden oder Alkoxaminen der Fall ist, so wird das Gleichgewicht auf Seite des gebildeten Imins (Hydrozon bzw. Oxim) verschoben.<sup>[27]</sup> Zwar liegt ein Vorteil dieser Reaktion in der geringen Größe der Aldehyde und Ketone,<sup>[8, 28]</sup> Nachteile liegen allerdings in der Anforderung nach einem optimalen pH-Wert (möglichst zwischen 5 und 6),<sup>[10]</sup> der Anfälligkeit der entstehenden Oxime und vor allem Hydrazone gegenüber Hydrolyse<sup>[29]</sup>, sowie der meist zu geringen erreichten Geschwindigkeit.<sup>[13]</sup> Der jedoch wichtigste Nachteil liegt in der Tatsache, dass Carbonylfunktionen vielseitig im Zellinneren anzutreffen sind, z.B. in Pyruvat oder Oxalacetat aber auch in Nukleinsäuren, wodurch die Bioorthogonalität auch in diesem Fall eingeschränkt ist und lediglich eine extrazelluläre Anwendung erlaubt.<sup>[30-31]</sup>

Eine weitere Möglichkeit der kupferfreien Markierung besteht in der von *Bertozzi* entwickelten Staudinger-Ligation zwischen Aziden und Phosphinen.<sup>[32]</sup> Hierbei wird zunächst ein Aza-Ylid aus einem Azid und einem Triphenylphosphin gebildet, welches entweder hydrolysiert oder durch ein Elektrophil kovalent gebunden wird.<sup>[33-34]</sup> Die Anwendung der eigentlichen Staudinger-Reaktion für die bioorthogonale Chemie wurde durch das Anbringen des Elektrophils direkt an das Phosphin ermöglicht, was im Weiteren als Staudinger-Ligation bezeichnet wird.<sup>[32]</sup> Sowohl Azide als auch Phosphine tauchen als Funktionalitäten innerhalb von Zellen nicht auf, zeigen eine geringe Toxizität und reagieren hochselektiv miteinander. Dies macht die hohe Biokompatibilität der Staudinger-Ligation deutlich, weshalb diese selbst für Anwendung in lebenden Tieren verwendet werden kann.<sup>[35]</sup> Die einzigen Nachteile liegen in einer Anfälligkeit des Phosphins gegenüber Oxidation, sowie einer vergleichsweise geringen Geschwindigkeit.<sup>[36]</sup>

Die jedoch wohl bekanntesten kupferfreien Methoden stellen die Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA), die ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) sowie die „Photoclick“-Reaktion dar, welche auch aufgrund der Relevanz für diese Arbeit in den folgenden Unterkapiteln genauer thematisiert werden.

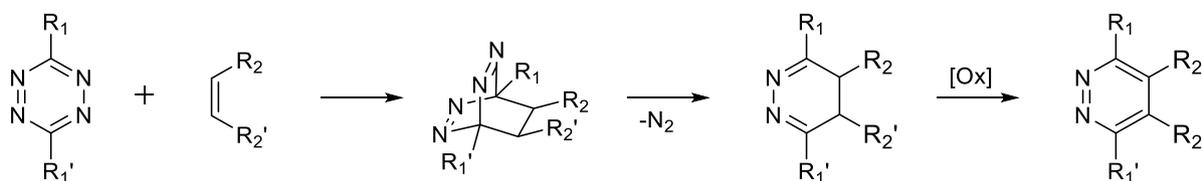
### 3.2.1 Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA)

Diels-Alder Reaktionen stellen im Allgemeinen [4+2]-Cycloadditionen zwischen Dienen und Dienophilen dar, wobei entsprechend der beteiligten Orbitale zwischen solchen mit normalem und mit inversem Elektronenbedarf unterschieden wird (Abbildung 4). Bei der normalen Diels-Alder-Cycloaddition, wie sie von *Diels* und *Alder* entwickelt wurde, reagiert das HOMO des Diens mit dem LUMO des Dienophils.<sup>[37]</sup> Bei der von *Lindsey* erforschten Variante mit inversem Elektronenbedarf reagiert hingegen das LUMO des Diens mit dem HOMO des Dienophils.<sup>[38]</sup>



**Abbildung 4:** Grenzorbitale für Diels-Alder-Cycloadditionen mit normalem (links) oder inversem (rechts) Elektronenbedarf.

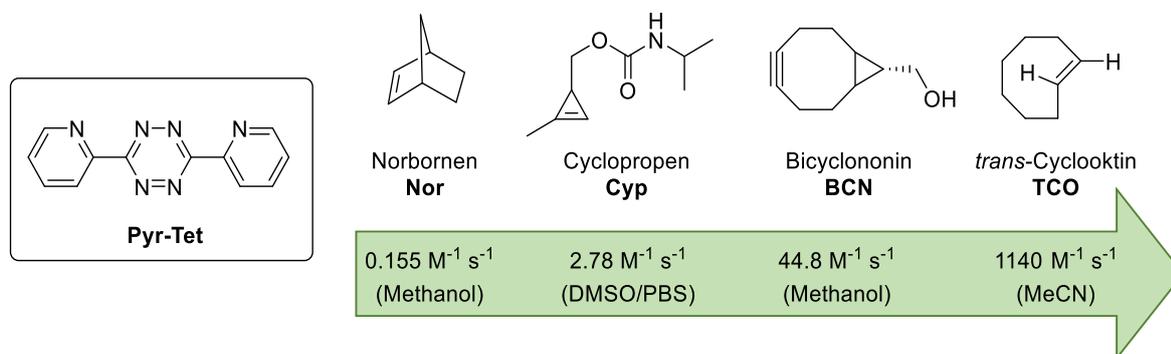
Um eine möglichst effiziente Reaktion zu ermöglichen, ist es wichtig die Energiedifferenz zwischen den beteiligten Grenzorbitalen möglichst gering zu halten. Diese Energiedifferenz kann durch gezieltes Design der Reaktionspartner optimiert werden:<sup>[38]</sup> Zum einen kann das LUMO des Diens energetisch abgesenkt werden, indem Heteroatome (Stickstoff, Sauerstoff) in das  $\pi$ -System integriert werden. Die Verwendung von 1,2,4,5-Tetrazinen als Diene erlaubt hohe Geschwindigkeiten und erklärt damit die Relevanz dieser Molekülklasse für die iEDDA. Der allgemeine Reaktionsverlauf mit Tetrazinen als Dien ist in Schema 2 dargestellt.



**Schema 2:** Allgemeiner Verlauf einer Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) zwischen einem Tetrazin und einem Alken.

Zunächst wird durch die [4+2] Cycloaddition ein bicyclisches Intermediat gebildet, welches durch Freisetzung von Stickstoff zu einem Dihydropyridazin führt. Hieran kann sich, je nach chemischer Struktur, eine Oxidation zum aromatischen Pyridazin anschließen. Dieser Mechanismus verdeutlicht einen weiteren Vorteil der 1,2,4,5-Tetrazine: als einziges, ungiftiges Nebenprodukt wird Stickstoff gebildet, welcher diese Reaktion zudem irreversibel macht und entropisch begünstigt.

Eine weitere Möglichkeit, um die Kinetik der iEDDA zu optimieren, liegt darin, das HOMO des beteiligten Dienophils energetisch anzuheben. Dies kann zum einen durch elektronenschiebende Substituenten und zum anderen durch das Einführen von Ringspannung erreicht werden. Geeignete Dienophile für die iEDDA sind *trans*-Cyclooctene (TCO),<sup>[39]</sup> Bicyclononine (BCN),<sup>[40]</sup> Norbornene<sup>[41]</sup> und Cyclopropene<sup>[42]</sup> (Schema 3).<sup>[21]</sup>



**Schema 3:** Vergleich der Geschwindigkeiten der Dienophile Norbornen (**Nor**),<sup>[41]</sup> Cyclopropen (**Cyp**),<sup>[42]</sup> Bicyclononin (**BCN**)<sup>[40]</sup> und *trans*-Cyclooctin (**TCO**)<sup>[39]</sup> in einer iEDDA mit **Pyr-Tet** unter Angabe der verwendeten Lösungsmittel.

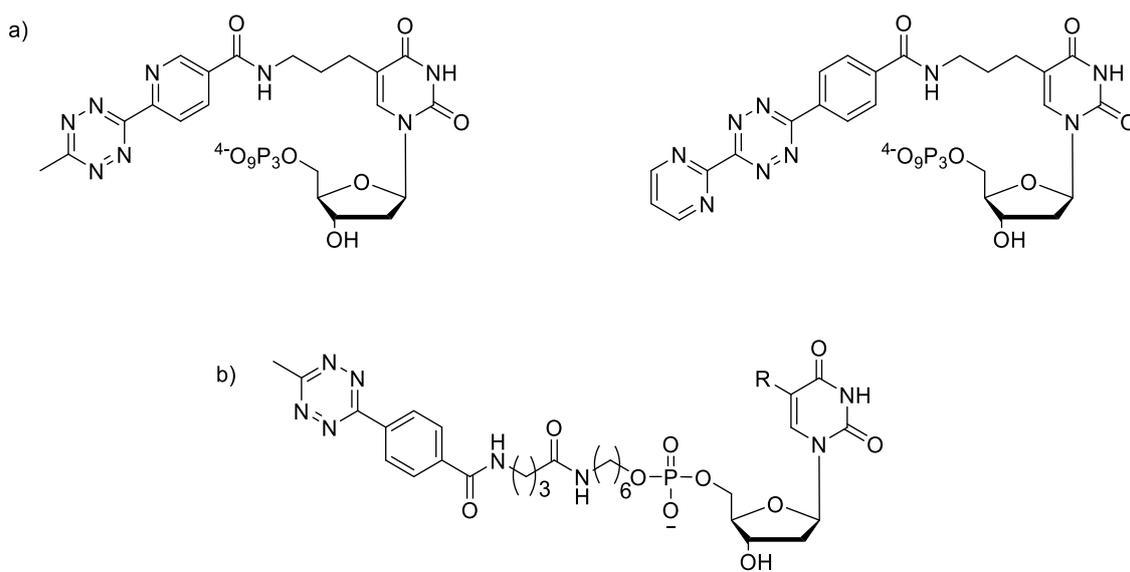
Wie der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die iEDDA mit dem Tetrazin **Pyr-Tet** verdeutlicht, handelt es sich bei Norbornenen um die langsamsten der dargestellten Dienophile. Dennoch wurden diese bereits in lebenden Zellen, zum Beispiel zur Markierung menschlicher Brustkrebszellen, eingesetzt.<sup>[43]</sup> Auch Nukleinsäuren konnten mit Hilfe von Norbornen markiert werden, wobei das norbornenmodifizierte Nucleosid entweder chemisch per Festphasensynthese<sup>[44-45]</sup> oder enzymatisch<sup>[46-47]</sup> als Triphosphat in Oligonukleotide eingebaut wurde. Hierbei konnten durch optimierte Systeme Geschwindigkeitskonstanten von bis zu 20 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> erreicht werden.<sup>[48]</sup> Das Cyclopropen zeigt eine um den Faktor 10 höhere Geschwindigkeitskonstante. 1-Methylcyclopropene wurden von *Prescher* und *Devaraj* für die iEDDA mit Tetrazinen entwickelt.<sup>[49-50]</sup> Die Verwendung dieses Dienophils im Bereich der

Protein- und Kohlenhydrat-Markierung, selbst in *in vivo* Experimenten, ist bereits weit verbreitet<sup>[49, 51]</sup>, wohingegen es nur wenige Beispiele für die Anwendung an Nukleinsäuren gibt. *Devaraj et al.* nutzten cyclopropenmodifizierte Oligonukleotide für templatgestützte Ligationen mit tetrazinmarkierten Oligonukleotiden.<sup>[52]</sup> Darüber hinaus wurden verschiedene cyclopropenmodifizierte Nukleotide für den enzymatischen Einbau und die anschließende Markierung von DNA<sup>[53-54]</sup> sowie RNA<sup>[55]</sup> verwendet. Eine wiederum schnellere Kinetik zeigt das BCN, was auf eine Erhöhung der Ringspannung durch die zusätzliche Anellierung des Cyclopropylrings zurückzuführen ist. BCN-modifizierte Aminosäuren wurden bereits für Markierungen von Proteinen *in vivo* verwendet, wobei eine Geschwindigkeitskonstante von  $k = 1245 \pm 45 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde.<sup>[56]</sup> Das einzige Beispiel einer bioorthogonalen Reaktion an Nukleinsäuren, bei der die BCN-Funktion in das Biomolekül eingebracht wurde, stammt von *Jäschke et al.* und beschreibt ein Nukleotid, welches an der 5'-Phosphatgruppe funktionalisiert wurde.<sup>[57]</sup> Dieses konnte für den enzymatischen 5'-terminalen Einbau in RNA und eine anschließende iEDDA mit einem Tetrazin verwendet werden. Darüber hinaus können cyclische Alkine wie das BCN aber auch Cycloadditionen mit Aziden eingehen (SPAAC),<sup>[58]</sup> weshalb dies bei der Kombination verschiedener bioorthogonaler Reaktionen bedacht werden muss.

Die jedoch mit Abstand höchsten Geschwindigkeitskonstanten wurden bei Cycloadditionen zwischen Tetrazinen und TCO-Derivaten gemessen. Trotz ihrer extremen Reaktivität sind die *trans*-Cyclooctene synthetisch einfach durch Photoisomerisierung des entsprechenden unreaktiven *cis*-Isomers<sup>[59]</sup> zugänglich.<sup>[60-61]</sup> Die bereits beachtliche Geschwindigkeit dieser Reaktion konnte von *Fox et al.* durch zusätzliche Ringsysteme weiter erhöht werden (Schema 4).<sup>[62]</sup> Die hierbei verwendeten Reaktionspartner sind zudem wasserlöslich, was bekannterweise die Geschwindigkeit der iEDDA weiter fördert.<sup>[41]</sup> Die Wasserlöslichkeit des PEGylierten Tetrazins (**Tet-PEG**) ermöglichte dabei die Erhöhung der Geschwindigkeit im Vergleich zu einem analogen Tetrazin ohne PEG-Linker um einen Faktor von 2 bis 4.<sup>[62]</sup> Durch die Anellierung von *cis*-Ringen, wie es bei d-TCO und s-TCO der Fall ist, wird die Struktur in die Halbsessel-Konformation gezwungen, welche energetisch höher liegt als die Kronenkonformation und somit die höheren Reaktionsgeschwindigkeiten ermöglicht (Schema 4b). Bei dem dioxolanfusionierten TCO (d-TCO) handelt es sich zudem um ein vergleichsweise stabiles TCO-Derivat, wodurch es auch für *in vivo* Markierungen von tetrazinmodifiziertem GFP verwendet werden konnte.<sup>[62]</sup>



*et al.* hingegen verwendeten ein Nucleosid mit einer Tetrazinmodifikation an der 5'-Phosphatgruppe (Schema 5b), welches in Kombination mit dem bereits erwähnten cyclopropenmodifizierten Oligonucleotid für eine templatgestützte Ligation verwendet wurde.<sup>[52]</sup> Hierbei werden ein cyclopropen- und ein tetrazinmodifizierter Einzelstrang konjugiert, sobald diese an ein komplementäres Templat binden, wodurch gezielt DNA-Sequenzen detektiert werden können.

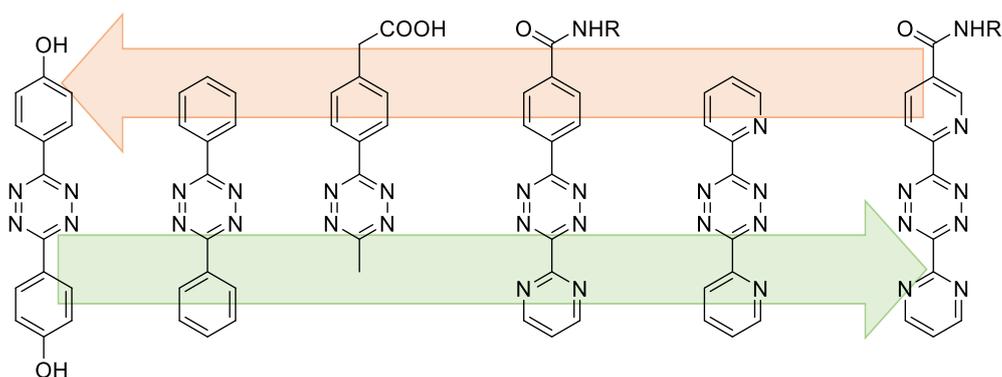


**Schema 5:** Strukturen verschiedener tetrazinfunktionalisierter Nucleotide. a) Von *Wagenknecht et al.* synthetisierte Nucleotide mit der Tetrazinmodifikation an der 5-Position der Nucleobase.<sup>[54, 68]</sup> B) von *Devaraj et al.* genutztes Nucleotid mit der Modifikation am 5'-Phosphatrest.<sup>[52]</sup>

Dabei machte sich die Gruppe um *Devaraj* für ihre Experimente eine weitere Eigenschaft der Tetrazine zu Nutze, indem sie diese als fluorogene Sonden einsetzte.<sup>[69]</sup> Tetrazine sind in der Lage die Fluoreszenz eines benachbarten Fluorophors zu löschen. Die erfolgreiche iEDDA resultiert schließlich in einem Abreagieren der Tetrazineinheit und einem damit verbundenen Anstieg der Emission des verwendeten Fluorophors.<sup>[70]</sup> Hierdurch wird ein möglichst geringes Hintergrundsignal erreicht, weshalb dies insbesondere für *in vivo* Anwendungen von besonderem Interesse ist.<sup>[71-74]</sup> *Wombacher et al.* gelang es die Bandbreite an fluorogenen, wasserlöslichen Tetrazinfarbstoffen zu erweitern und selbst in lebenden Zellen ohne aufwendige Waschschrte gute Fluoreszenzsignale zu erhalten.<sup>[74]</sup>

Dennoch sind einige Anwendungen aufgrund der bereits erwähnten Labilität mancher Tetrazine eingeschränkt. Daher wurden in den letzten Jahren einige Studien hinsichtlich der

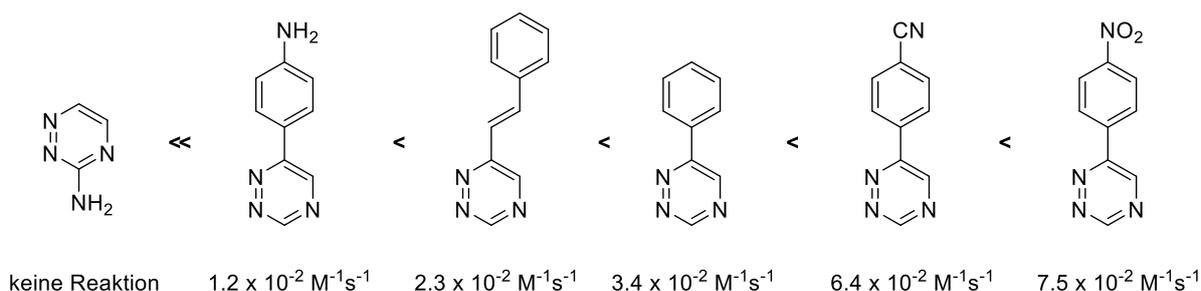
Reaktivität und Stabilität verschiedener Tetrazine durchgeführt, welche maßgeblich durch die verwendeten Substituenten beeinflusst werden. Dabei wirkt sich der Einfluss elektronenziehender Substituenten zwar positiv auf die Reaktivität, jedoch negativ auf die Stabilität aus, was anhand ausgewählter Tetrazine in Schema 6 verdeutlicht ist.<sup>[75]</sup> Eine eventuelle sterische Hinderung durch zu große Substituenten sollte bei der Wahl eines geeigneten Tetrazins ebenfalls bedacht werden.<sup>[68]</sup>



**Schema 6:** Strukturen ausgewählter 1,2,4,5-Tetrazine<sup>[39-41, 76-79]</sup> und deren relative Reaktivität (Tendenz in grün gezeigt) sowie Stabilität (Tendenz in rot gezeigt).

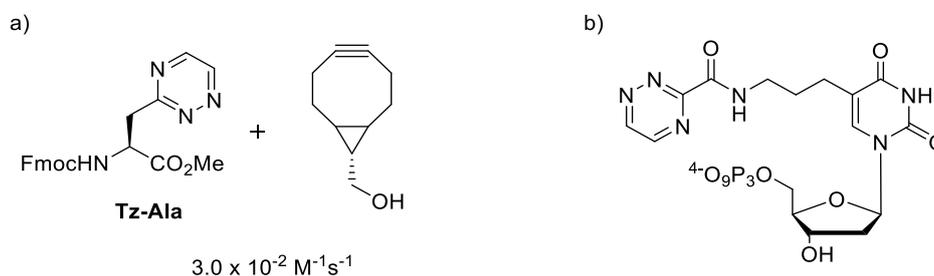
Eine Alternative zu den zwar schnellen, aber instabilen Tetrazinen stellen die 1,2,4-Triazine dar.<sup>[80]</sup> Sie wurden 2015 von *Prescher* und *Houk* als stabile bioorthogonale Reporter für die Proteinmarkierung in wässrigem Milieu und in Anwesenheit biologischer Nukleophile vorgestellt.<sup>[81]</sup> Diese wurden ausgewählt aufgrund der Annahme, dass sie unter physiologischen Bedingungen eine höhere Stabilität zeigen, da sie auch als Motive in Naturstoffen entdeckt wurden. Zudem sagten DFT Berechnungen eine höhere Reaktivität von 1,2,4-Triazinen gegenüber 1,2,3-Triazinen voraus. Aus diesen Gründen wurde eine Reihe unterschiedlicher einfachsubstituierter 1,2,4-Triazine hergestellt und bezüglich ihrer Reaktivität mit TCO untersucht. Diese Strukturen sind entsprechend ihrer Reaktivität in Schema 7 angeordnet. Dabei führten elektronenärmere Triazine zu höheren Geschwindigkeitskonstanten als elektronenreichere, analog zu den Tendenzen, wie sie für die Tetrazine beobachtbar sind. Dennoch zeigten diese Triazine mit Geschwindigkeitskonstanten von bis zu  $(7.5 \pm 2.0) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  eine deutlich geringere Reaktivität als die verwandten Tetrazine, was jedoch auch Vorteile mit sich bringt. So stellten sich Triazine als unreaktiv gegenüber gespannten Alkenen, wie den Norbornenen oder Cyclopropenen, heraus, wodurch eine zusätzliche Ebene der Orthogonalität geschaffen wird.

## Theoretischer Hintergrund



**Schema 7:** Strukturen verschiedener 1,2,4-Triazine und deren Geschwindigkeitskonstanten mit TCO (MeCN/PBS).<sup>[81]</sup>

Zudem ermöglicht es die erlangte Stabilität einfachsubstituierte Triazine zu verwenden, was für die Gesamtmodifikation eine geringere Größe erlaubt und daher vorteilhaft für *in vivo* Anwendungen ist. *Webb et al.* realisierten dieses Prinzip mit ihrer triazinmodifizierte Aminosäure basierend auf L-Alanin (**Tz-Ala**, Schema 8a).<sup>[82]</sup> Sie konnten diese mit einem BCN für die iEDDA kombinieren ( $k = (3.0 \pm 0.03) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), obwohl es sich bei diesem um ein weniger reaktives Dienophil als TCO handelt. Welchen Einfluss die Orientierung des Triazins, also eine Substitution in der 3- oder 6-Position, auf die Reaktivität hat, wurde bisher jedoch nicht weiter untersucht.



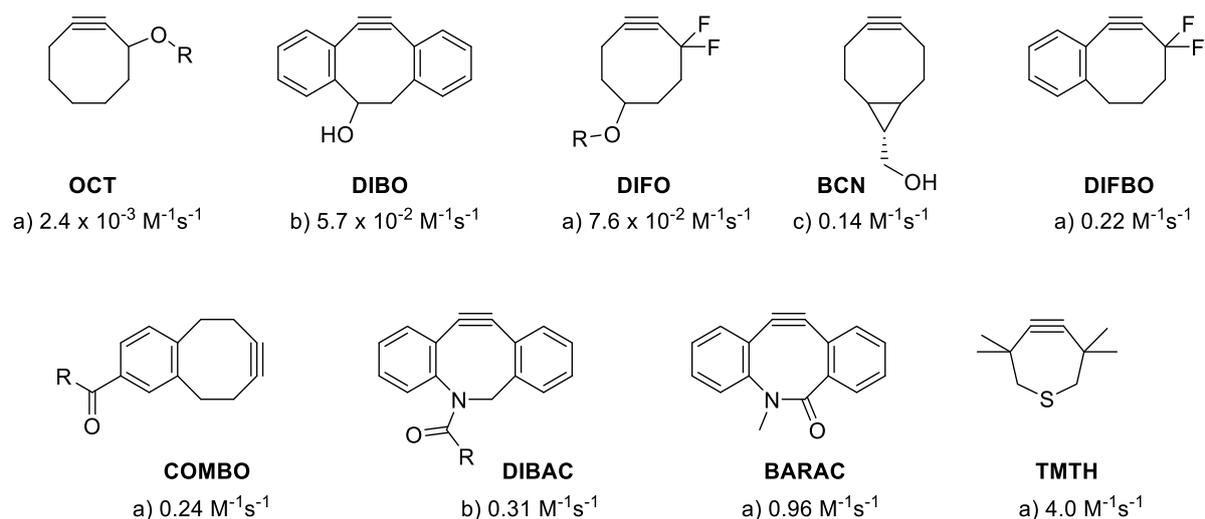
**Schema 8:** a) Triazinmodifiziertes Alanin und die dazugehörige Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit BCN (10 % H<sub>2</sub>O in MeCN).<sup>[82]</sup> b) Triazinmodifiziertes dUTP.<sup>[83]</sup>

Ein weiterer Vorteil der Triazine liegt in ihrer leichten Zugänglichkeit. Einfache Vorstufen sind kommerziell erhältlich und können beispielsweise mittels Kreuzkupplungen derivatisiert werden. Dennoch gibt es kaum Anwendungen für deren bioorthogonale Markierung. *Wagenknecht et al.* verwendeten ein mit einem Triazin funktionalisiertes dUTP für die postsynthetische Markierung von Nukleinsäuren (Schema 8b). Das artifizielle Nukleotid wurde für diesen Zweck enzymatisch in Oligonukleotide eingebaut und schließlich mit einem BCN-modifizierten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dieses Triazin, welches in der 3-Position über

eine Amidbindung an das Nucleosid verknüpft ist, zeigte dabei hohe Ausbeuten von bis zu 82 %, jedoch keine gute Akzeptanz der Polymerasen für den enzymatischen Einbau.<sup>[83]</sup>

### 3.2.2 Ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)

Die ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition beschreibt eine [3+2]-dipolare Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden zur Bildung von Triazolen, analog zur CuAAC, wobei gänzlich auf einen Katalysator verzichtet wird. Obwohl *Wittig* und *Krebs* die besondere Reaktivität von Aziden mit gespannten Alkinen bereits 1961 untersuchten,<sup>[84]</sup> wurde dieses Potential für den Einsatz als bioorthogonale Reaktion erst 2004 von *Bertozzi et al.* erkannt.<sup>[85]</sup> In den vergangenen Jahren wurden dabei einige unterschiedliche Cyclooctine entwickelt, um eine bestmögliche Reaktivität zu erhalten. Die wichtigsten Vertreter sind in Schema 9 dargestellt.

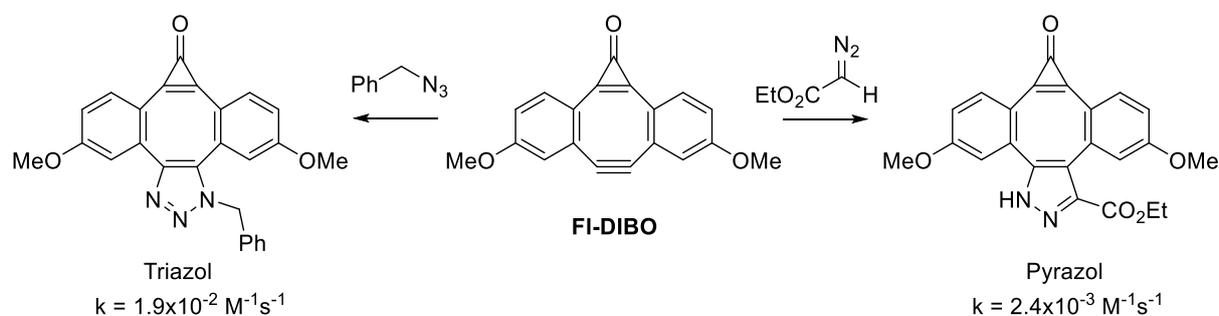


**Schema 9:** Strukturen verschiedener Cyclooctine und die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Reaktion mit Benzylazid (gemessen in a)  $\text{CD}_3\text{CN}$ , b)  $\text{CD}_3\text{OD}$ , c)  $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ ; 3:1): Cyclooctin (**OCT**),<sup>[85]</sup> Dibenzocyclooctinol (**DIBO**),<sup>[86]</sup> Difluorocyclooctin (**DIFO**),<sup>[87]</sup> Bicyclononin (**BCN**),<sup>[58]</sup> Difluorobenzocyclooctin (**DIFBO**),<sup>[88]</sup> Carboxymethylbenzocyclooctin (**COMBO**),<sup>[89]</sup> Azadibenzocyclooctin (**DIBAC**),<sup>[90]</sup> Biarylazacyclooctinon (**BARAC**)<sup>[91]</sup> und Tetramethylthiacycloheptin (**TMTH**).<sup>[92]</sup>

Zum einen kann die Reaktivität durch das Anbringen elektronenziehender Gruppen, z.B. Fluoride, erhöht werden, wie es bei DIFO und DIFBO der Fall ist. Zum anderen kann eine zusätzliche Ringspannung durch Anellierung von Phenyl- oder Cyclopropyl-Ringen erreicht werden. Durch das zusätzliche Einbringen von Heteroatomen, die einen  $\text{sp}^2$ -Charakter aufweisen, wie es bei DIBAC und BARAC der Fall ist, kann die Reaktivität weiter gefördert

werden. BARAC stellt das *bis dato* schnellste Cyclooctin für die SPAAC dar.<sup>[93]</sup> Die Reaktivität wird zudem durch die Ringgröße beeinflusst, so sind Cyclononine meist zu unreaktiv, wohingegen Cycloheptine meist zwar reaktiv, aber deshalb instabil sind. Die Arbeitsgruppe um *Bertozzi* entwickelte verschiedene Thiacycloheptine, in denen durch die Substitution eines Kohlenstoffs durch das größere Schwefelatom die Ringspannung leicht verringert wird. So konnten sie ein Tetramethylthiacycloheptin (TMTH) entwickeln, welches eine ausreichende Stabilität und dennoch eine höhere Kinetik ( $k = 4.0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) als alle bisherigen publizierten Cyclooctine aufweist.<sup>[92]</sup> Dabei muss je nach Anwendung ein Kompromiss zwischen Reaktivität und Größe gefunden werden. BCN erfüllt ein solches Kriterium, in dem es durch den anellierten Cyclopropylring die nötige Reaktivität erhält, obwohl auf voluminöse aromatische Ringsysteme verzichtet wird.<sup>[93]</sup>

Ähnlich zu den im vorherigen Kapitel vorgestellten Tetrazinen wurden auch für die SPAAC fluorogene Sonden entwickelt, um eine potentielle biologische Anwendung zu verbessern. So konnten *Boons et al.* ein Dibenzocyclooctin-Derivat mit einer Cyclopropenongruppe (FI-DIBO, Schema 10) synthetisieren,<sup>[94]</sup> welches durch Reaktion mit geeigneten Dipolarophilen einen signifikanten Anstieg in der Quantenausbeute (bis zu 160-fach) sowie in der Fluoreszenzintensität (bis zu 13000-fach) erreichte.<sup>[95]</sup>

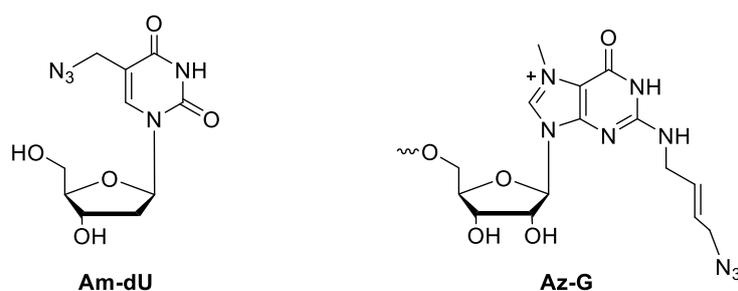


**Schema 10:** Dibenzocyclooctin-Derivat mit Cyclopropenongruppe (FI-DIBO) für den Einsatz als fluorogene Sonde für die SPAAC mit Aziden und Diazoverbindungen.<sup>[94-95]</sup>

Dabei untersuchten sie nicht nur die Reaktion mit Aziden, sondern auch mit mono- und disubstituierten Diazoverbindungen, Nitronen und Nitriloxiden. Am vielversprechendsten waren hierbei Experimente mit monosubstituierten Diazoverbindungen, welche durch Tautomerisierung schließlich zu aromatischen Pyrazolen führten. Wenn auch diese Reaktion langsamer ablief als jene mit Aziden, so sind sie dennoch vorteilhaft aufgrund ihrer

physikalischen Eigenschaften. Darüber hinaus können Cycloalkine auch mit weiteren funktionellen Gruppen eine Vielzahl an Cycloadditionen eingehen: [1+2]-Cycloadditionen mit Carbenen, [2+2+2]-Cycloadditionen mit Nitrilen, [2+2]-Cycloadditionen mit Ketenen oder [4+2]-Cycloadditionen mit Tetrazinen und Triazinen (siehe Kapitel 3.2.1).<sup>[96]</sup> Dennoch ist die Cycloaddition mit Aziden die wohl bekannteste und am häufigsten eingesetzte. Hierfür sind vermutlich verschiedene Kriterien verantwortlich:<sup>[8, 16, 97]</sup> So handelt es sich bei Aziden um relativ kleine Modifikationen, welche in den natürlichen biologischen Systemen nicht vorkommen und unter physiologischen Bedingungen (wässriges Milieu, O<sub>2</sub>-Atmosphäre) eine hohe Stabilität zeigen. Zudem handelt es sich um weiche Elektrophile, welche nicht mit Aminen oder anderen harten Nucleophilen, wie sie häufig in zellulärer Umgebung auftreten, reagieren. Sie sind zwar prinzipiell empfindlich gegenüber einer Reduktion durch freie Thiole (z.B. im Cystein), jedoch ist für solch eine Nebenreaktion meist eine erhöhte Temperatur erforderlich. Zusätzlich zu dieser bemerkenswerten Biokompatibilität sind viele organische Azide synthetisch einfach zugänglich.

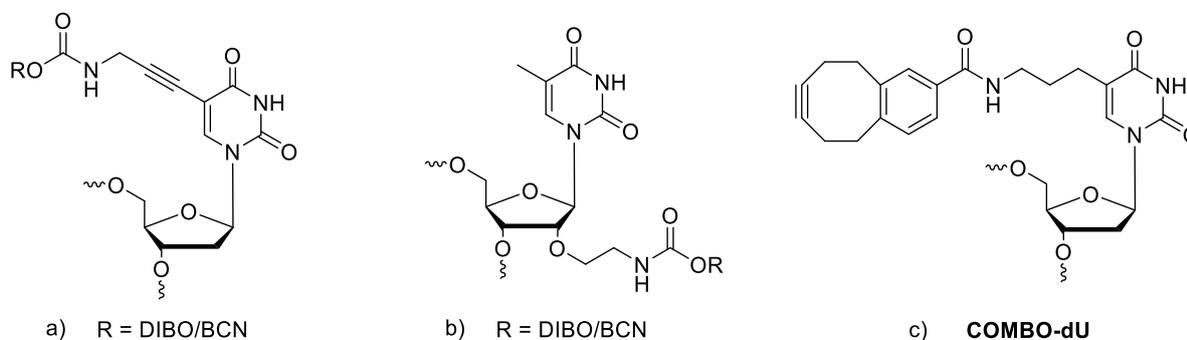
Dementsprechend lassen sich in der Literatur einige Beispiele für Anwendungen der SPAAC als bioorthogonale Reaktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und selbst in lebenden Tieren finden.<sup>[93]</sup> Im Folgenden werden anhand der Schemata 11 und 12 ausgewählte Beispiele für azido- und cycloalkinmodifizierte Nucleinsäuren vorgestellt.



**Schema 11:** ausgewählte Beispiele azidomodifizierter Nucleinsäuren als bioorthogonale Reporter für die SPAAC.<sup>[98-99]</sup>

Luedtke *et al.* publizierten 2014 ein azidomodifiziertes dU (Am-dU), welches ein Beispiel für eine besonders kleine Modifikation darstellt und als Nucleosid erfolgreich für *in vivo* Markierungen eingesetzt werden konnte.<sup>[98]</sup> Die Gruppe um Rentmeister verwendete ein azidomodifiziertes Guanosin (Az-G), wobei die Azidomodifikation enzymatisch auf die 5'-Kappe eukaryotischer mRNA transferiert wurde. Mit diesem chemo-enzymatischen Ansatz

konnten sie native mRNA in eukaryotischen Zelllysaten mit einem DIBO-modifizierten Fluoreszenzfarbstoff markieren.<sup>[99]</sup> *Brown et al.* hingegen verwendeten DIBO nicht als Farbstoffmodifikation, sondern nutzten dies für die Funktionalisierung von Nukleosiden (Schema 12). Dabei entwickelten sie DIBO- und BCN-modifizierte Derivate, mit der Funktion entweder in der 5-Position der Nukleobase (a) oder der 2'-Position der Ribose (b).<sup>[100-101]</sup> Erstere konnten sowohl als Phosphoramidit als auch als Triphosphat in Oligonukleotide eingebaut und für Markierungen in der großen Furche der DNA genutzt werden. Derivatisierungen an der 2'-Position hingegen wurden für die selektive Markierung der kleinen Furche genutzt, wobei diese Modifikationen lediglich chemisch per Festphasensynthese eingebaut werden konnten.



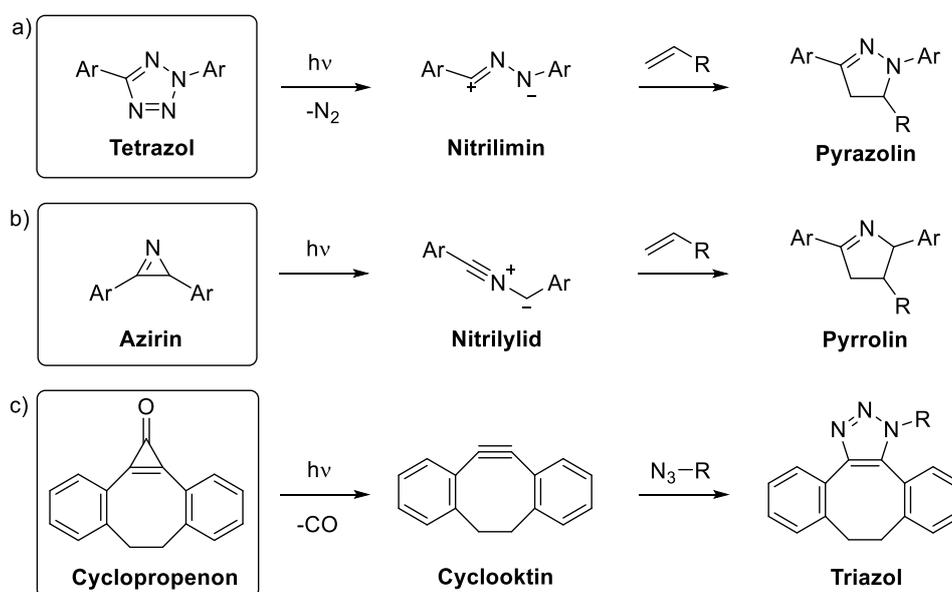
**Schema 12:** ausgewählte Beispiele cyclooctinmodifizierter Nucleinsäuren für die SPAAC.<sup>[100-102]</sup>

Ein COMBO-modifiziertes Nucleosid (COMBO-dU) konnte von *Wagenknecht et al.* als Phosphoramidit chemisch in Oligonukleotide eingebaut werden. Dabei wurde deutlich, dass auch die Art, wie eine Modifikation mit einem Baustein verknüpft wird, eine Rolle spielt. So zeigte das Markierungsprodukt des abgebildeten Nucleosids (Schema 12c), in welchem die COMBO-Modifikation über einen flexiblen Alkyllinker verknüpft ist, bessere optische Eigenschaften als jenes mit einem starren Alkyllinker. Darüber hinaus konnten diese modifizierten Oligonukleotide schließlich in Zellen eingeschleust und auch *in vivo* mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.<sup>[102]</sup>

Trotz der Vielfalt an bestehenden Anwendungen der SPAAC und der iEDDA, gibt es stets weitere Möglichkeiten für eine Optimierung der bioorthogonalen Markierung. Im Folgenden Kapitel soll auf eine dieser Möglichkeiten, welche sich auf die Photoinduzierbarkeit und die damit verbundene Steuerung der eingesetzten Markierung bezieht, eingegangen werden.

### 3.2.3 Photoaktivierbare Markierungsmethoden

Die Photoaktivierbarkeit einer bioorthogonalen Reaktion erlaubt es, exakt über den Zeitpunkt und Ort zu bestimmen, an dem die Reaktion gestartet werden soll. Somit können modifizierte Monomere beispielsweise in den gewünschten Organismus eingebracht werden und sind dabei solange unreaktiv, bis durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge der Start der Reaktion ausgelöst wird. Eine Übersicht über ausgewählte photoaktivierbare Markierungsmethoden ist in Schema 13 gezeigt.



**Schema 13:** Schematische Darstellung verschiedener photoaktivierbarer Reaktionen: a) „Photoclick“-Reaktion mit Tetrazolen, b) lichtinduzierte Azirin-Ligation, c) photoaktivierbare SPAAC mit Cyclopropenenen.

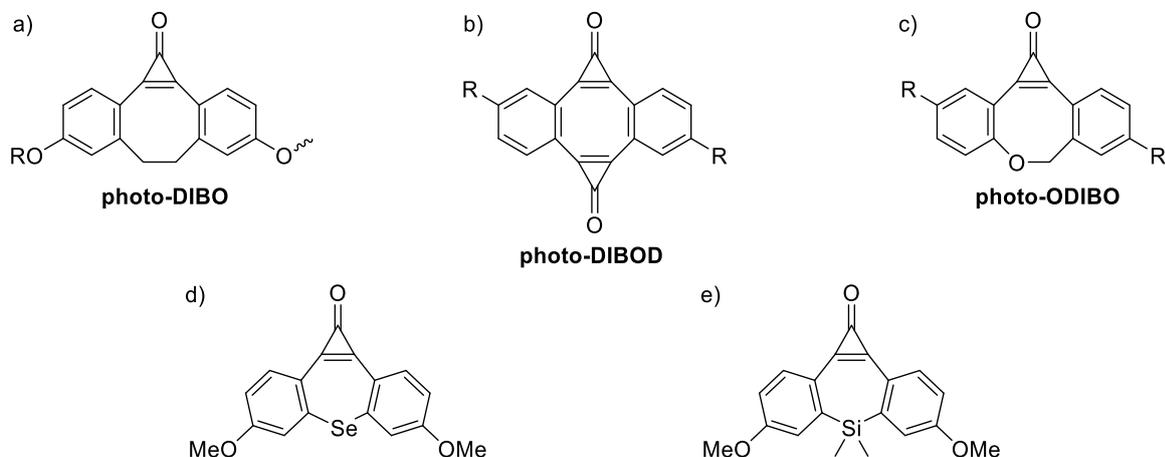
Die sogenannte „Photoclick“-Reaktion beschreibt die Photolyse von Diaryltetrazolen, wobei durch Abspaltung von Stickstoff ein reaktives Nitrilimin gebildet wird, welches wiederum mit elektronenarmen Alkenen zu Pyrazolinen reagieren kann.<sup>[103]</sup> Dabei spielt die Substitution der Arylreste am Tetrazolgerüst eine wesentliche Rolle, um die benötigte Wellenlänge für die Bestrahlung möglichst im langwelligen Bereich zu halten. Dies ist wiederum für biologische Anwendungen wünschenswert, um Schäden innerhalb der Zellen zu vermeiden.<sup>[104-105]</sup> *Wagenknecht et al.* stellten verschiedene tetrazolmodifizierte Nucleoside für die Photoclick-Reaktion in DNA vor,<sup>[54, 106]</sup> wobei diese teilweise zusätzlich als fluorogene Bausteine dienen können.<sup>[107]</sup> Darüber hinaus wurden auch Ribonucleotide erfolgreich für „Photoclick“-Reaktionen eingesetzt.<sup>[108-109]</sup> Optimierte Tetrazol-Alken-Systeme können sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten von bis zu  $k = (34000 \pm 1300) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  erreichen,<sup>[105]</sup> allerdings geht

die hohe Reaktivität des Nitrilimins mit einer geringen Chemoselektivität einher. So können Nitrilimine mit Wasser,<sup>[110]</sup> Carbonsäuren<sup>[111]</sup> oder Nukleophilen,<sup>[112]</sup> wie Aminen und Thiolen, reagieren, was die Bioorthogonalität dieser Markierungsmethode in Frage stellt.

Weitere photoaktive Verbindungen sind 2H-Azirine (Schema 13b). Durch Bestrahlung mit Licht vollziehen sie eine Ringöffnung, wobei reaktive Nitrilylide gebildet werden. Diese können mit Alkenen reagieren, wobei als Produkte Pyrroline entstehen.<sup>[113]</sup> Ähnlich den Tetrazolen kann die benötigte Wellenlänge für die Bestrahlung durch die gewählten Substituenten beeinflusst werden.<sup>[114]</sup> So konnten Azirine für die Markierung von Proteinen eingesetzt werden.<sup>[115]</sup> Es wurden zwar azirinmodifizierte 2'-Desoxyuridine synthetisiert und in Bezug auf ihre antivirale Aktivität untersucht, jedoch nie für die Markierung von Nukleinsäuren eingesetzt.<sup>[116-117]</sup>

Das letzte Beispiel zeigt die Klasse der Cyclopropenone (Schema 13c). Diese können durch Pyrolyse, verschiedene Katalysatoren oder durch Belichtung in die entsprechenden Alkine überführt werden. Genauere Studien zum Ablauf der Photodecarbonylierung von Cyclopropenonen wurde von der Arbeitsgruppe um *Popik* durchgeführt.<sup>[118]</sup> Dabei trägt die Struktur der Substituenten wesentlich zur Stabilität, dem Absorptionsverhalten und den Quantenausbeuten für die Photolyse des entsprechenden Cyclopropenons bei. Es zeigten sich insbesondere aromatische Substituenten als vorteilhaft, wodurch Quantenausbeuten von bis zu 78 % erreicht werden konnten. Darüber hinaus konnten *Popik et al.* zeigen, dass auch eine Zwei-Photonen-Anregungen zur Photodecarbonylierung genutzt werden kann.<sup>[119]</sup> Ein Einbetten des Cyclopropenons in ein cyclisches System, wie beispielsweise dem Cyclooctan, ermöglichte schließlich den Einsatz für bioorthogonale Reaktionen. Das in einem solchen Fall durch Photolyse entstehenden Cyclooctin kann schließlich mit Aziden eine SPAAC eingehen. Dies wurde erstmals 2009, ausgehend von einem auf DIBO-basierenden Cyclopropenon (photo-DIBO), von *Popik* und *Boons* für die Markierung lebender Zellen genutzt (Schema 14a).<sup>[120]</sup> Eine Besonderheit stellt das photo-DIBOD dar, ein zweifaches Cyclopropenon (b). Hierbei konnte eine selektive Decarbonylierung nur einer der beiden Cyclopropenon-Einheiten erreicht werden. Diese Selektivität wird durch eine signifikant niedrigere Quantenausbeute für die doppelte im Vergleich zur einfachen Decarbonylierung ermöglicht. Nach erfolgter Konjugation mit einem Azid durch eine SPAAC konnte schließlich die zweite Photolyse durchgeführt werden. Das hierbei erhaltene Cyclooctin ist nun nicht mehr nur mit zwei Benzolringen anelliert, sondern zudem mit einem Triazol aus der ersten SPAAC, wodurch

eine besondere Ringspannung erreicht wird. Die nachfolgende zweite SPAAC besitzt selbst in organischen Lösungsmitteln eine Geschwindigkeitskonstante von  $k = (34 \pm 1) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und ist somit schneller alle in Kapitel 3.2.2 vorgestellten Cycloalkine.<sup>[121]</sup>

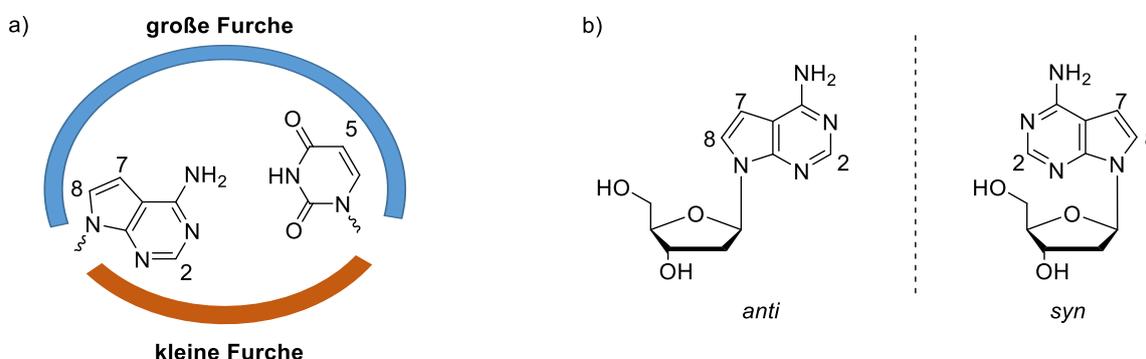


**Schema 14:** Strukturen ausgewählter Cyclopropenone für die photoinduzierte SPAAC basierend auf a) Dibenzocyclooctin (**photo-DIBO**),<sup>[120, 122]</sup> b) Dibenzocyclooctadiin (**photo-DIBOD**),<sup>[121, 123]</sup> c) Oxadibenzocyclooctin (**photo-ODIBO**),<sup>[124-125]</sup> d) Dibenzoselenacycloheptin<sup>[126]</sup> und e) Dibenzosilicycloheptin.<sup>[127]</sup>

Ebenso existieren Cyclopropenonstrukturen basierend auf Cycloheptinen. Ein Selen-Cycloheptinderivat (d) wurde von *Bertozzi et al.* vorgestellt, eignet sich aber aufgrund der Instabilität des durch Photolyse gebildeten Alkins nicht für eine bioorthogonale Anwendung.<sup>[126]</sup> Das von *Klán et al.* publizierte Silicium-Derivat (e) hingegen zeigte gute Quantenausbeuten (bis zu 71 %) und eine hohe Reaktivität gegenüber Aziden.<sup>[127]</sup> Die bisher höchsten gemessenen Geschwindigkeiten für solche photoinduzierten SPAAC konnten mit dem photo-ODIBO (siehe Schema 14c) erreicht werden, ein Cyclopropenon basierend auf Oxadibenzocyclooctin. Hierbei konnten in wässrigen Lösungen Geschwindigkeitskonstanten von bis zu  $(45.1 \pm 2.6) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Reaktion mit Benzylazid gemessen werden.<sup>[128]</sup> Dieser Baustein konnte zudem eingesetzt werden, um naszierende azidomodiifizierte RNA in zellulärer Umgebung zu markieren.<sup>[124]</sup> Darüber hinaus finden sich jedoch keine Anwendungen im Bereich der Nukleinsäuremarkierung und keine Beispiele für cyclopropenonmodifizierte Monomere. Dennoch bieten diese aufgrund ihrer hohen Stabilität und Biokompatibilität ein großes Potential für biologische Anwendung.

### 3.3 Enzymatischer Zugang zu modifizierter DNA

Generell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten Nucleinsäuren zu funktionalisieren. Dabei werden modifizierte Nucleoside entweder chemisch als Phosphoramidite mittels Festphasensynthese oder enzymatisch als Nucleosidtriphosphate durch Polymerasen in Oligonucleotide eingebaut. Erstere benötigen eine ausreichende Stabilität unter harschen Bedingungen, wie Säuren, Basen und Oxidationsmittel, wodurch die Wahl der einzubringenden Modifikation sehr eingeschränkt ist. Des Weiteren zielen bioorthogonale Reaktionen auf Anwendungen in Zellen und sogar lebenden Organismen ab, weshalb ein enzymatischer Einbau bevorzugt ist. Hierbei ist es notwendig, dass das modifizierte Nucleosidtriphosphat von Polymerasen erkannt und toleriert wird. Um dies zu gewähren, müssen einige strukturelle Aspekte beachtet werden. Prinzipiell ist es möglich Modifikationen am Phosphatrückgrat, an der Ribose oder an der Nucleobase vorzunehmen. Aus Relevanz für diese Arbeit soll im Folgenden lediglich auf Modifikationen an der Nucleobase eingegangen werden. Modifikationen in der 5-Position von Pyrimidinen<sup>[129]</sup> ragen in die große Furche der DNA und werden daher häufig genutzt. Eine vergleichbare Situation liegt für die 7-Position der Purine vor. Die Orientierung dieser Positionen ist in Schema 15a hervorgehoben. Eine Funktionalisierung des N7 der Purin-Nucleoside resultiert jedoch in einer positiven Ladung, was wiederum zu einer Depurinierung führen kann.<sup>[130]</sup> Dies kann durch die Verwendung von 7-Deaza- und 8-Aza-7-deaza-Derivaten umgangen werden, wobei letztere aufgrund ihrer zusätzlich reduzierten Elektronendichte zu Änderungen in der Zuckerkonformation führen.<sup>[131-132]</sup> Die Verwendung von 7-Deaza-Derivaten hat sich folglich für die Modifizierung von Purin-Nucleosiden durchgesetzt.<sup>[133]</sup>



**Schema 15:** Verschiedene Positionen für die Modifikation von Nucleobasen. a) Orientierung eines Basenpaares innerhalb der DNA am Beispiel von dU und 7-Deaza-dA. B) *anti*- und *syn*-Konformation von 7-Deaza-dA.

Modifikationen in der 8-Position von Purinen hingegen stören meist die helikale DNA-Struktur, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass diese modifizierten Nucleoside anstelle der *anti*- die *syn*-Konformation bevorzugen (Schema 15b).<sup>[134-135]</sup> Es konnten zwar in der 8-Position modifizierte dATP-Derivate für enzymatische Synthesen genutzt werden,<sup>[136-138]</sup> diese zeigen aber im Allgemeinen eine sehr geringe Akzeptanz durch Polymerasen.<sup>[135, 139]</sup> Obwohl Modifikationen, welche in die große Furche ragen, meist gut von Polymerasen toleriert werden, ist es auf der anderen Seite von Interesse jene einzubringen, die in die kleine Furche ragen, um beispielsweise DNA-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Eine Adressierung der kleinen Furche kann üblicherweise über die 2'- und 4'-Position der Ribose erfolgen, was jedoch im Gegensatz zur enzymatischen DNA-Synthese steht.<sup>[140-142]</sup> *Hocek et al.* gelang es hierfür dATP-Derivate mit Modifikationen in der 2-Position der Purinbase zu synthetisieren, welche von Polymerasen erfolgreich in Oligonucleotide eingebaut wurden, solange die Modifikation möglichst klein gehalten wurde.<sup>[140, 143]</sup> Generell kann die Größe der Modifikation einen Einfluss auf die enzymatische Akzeptanz haben. So ist es ratsam Modifikationen, welche möglicherweise eine optimale Wechselwirkung im aktiven Zentrum der Polymerase stören könnten, wie geladene oder voluminöse Gruppen, über einen flexiblen Linker an das Nucleosid zu knüpfen.<sup>[144-145]</sup> Auf diese Weise gelang es *Marx et al.* ein dUTP-Derivat enzymatisch in die DNA einzubauen, welches in der 5-Position über einen Linker mit einem vollständigen Enzym verknüpft ist.<sup>[146]</sup> Dabei lässt sich aus den verschiedenen Studien ein eindeutiger Trend ablesen, dass Polymerasen der B-Familie besser geeignet sind als solche der A-Familie.<sup>[147]</sup> Polymerasen lassen sich anhand ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Familien unterteilen, wobei die Familien A und B für die Prozessierung modifizierter Nucleotide die wichtigste Rolle spielen. *Marx et al.* konnten Kristallstrukturen zweier verschiedener Polymerasen, der KlenTaq- und der KOD-DNA-Polymerase, beim Einbau eines modifizierten dATPs untersuchen und dabei die Gründe für diese unterschiedliche Akzeptanz herausarbeiten.<sup>[148]</sup> Die KlenTaq-DNA-Polymerase ist ein Vertreter der A-Familie, die KOD-DNA-Polymerase ein Vertreter der B-Familie. Wie die Analysen der Kristallstrukturen zeigten, adaptierte der DNA-Duplex in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums im Fall der KlenTaq-Polymerase die A-Form, wodurch die große Furche der DNA verengt wird und weniger Platz für Modifikationen bleibt, welche in die große Furche ragen. Im Fall der KOD-DNA-Polymerase

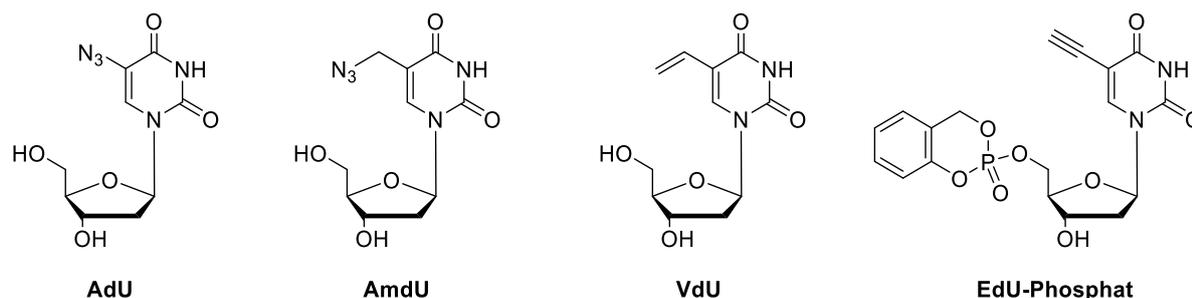
hingegen nimmt der DNA-Duplex eine B-Form an, wodurch die große Furche vergrößert wird und mehr Raum für Modifikationen bleibt.

In dieser Arbeit wurden DNA-Polymerasen aus beiden Familien verwendet, welche im Folgenden kurz zusammengefasst sind. Die Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase ist eine in der Aminosequenz verkürzte Mutante der aus dem Bakterium *Thermococcus aquaticus* isolierten Taq-DNA-Polymerase, welche keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt und als einzige der hier verwendeten Polymerasen zur A-Familie gehört.<sup>[149]</sup> Alle weiteren Polymerasen gehören der Familie B an. Bei der Vent (exo-)-DNA-Polymerase, isoliert aus *Thermococcus litoralis*, und der Deep Vent (exo-)-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus Spezies GB-D* handelt es sich um Polymerasen, welche genetisch so verändert wurden, dass sie keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität mehr aufweisen.<sup>[150]</sup> Auch die KOD XL-DNA-Polymerase, eine Mutante der KOD-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermococcus kodakaraensis*, wurde genetisch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität entfernt.<sup>[151]</sup>

Auch wenn es mittlerweile einige Polymerasen gibt, die eine hohe Toleranz teilweise auch gegenüber großen Modifikationen zeigen, so ist eine geringe Größe der Modifikation dennoch wünschenswert, da hierdurch eine weitere biologische Anwendung, die metabolische Markierung, möglich ist.

Hierfür ist jedoch nicht der Einbau ausgehend vom Nukleotid, sondern vom Nukleosid notwendig. Da auch ungeladene Nukleoside die Zellmembran meist nicht unabhängig passieren können, kommen sogenannte Membrantransporter zum Einsatz.<sup>[152]</sup> Nach erfolgreicher Aufnahme in die Zelle muss das Nukleosid schrittweise zum Triphosphat phosphoryliert werden. Dabei werden von den Enzymen Thymidin-Kinase, Monophosphat-Kinase und Diphosphat-Kinase jeweils Monophosphorylierungen durchgeführt. Als Triphosphat kann der Baustein schließlich durch DNA-Polymerasen in die DNA eingebaut werden.<sup>[153]</sup>

Dieses Prinzip wurde erstmals von *Luedtke et al.* verwirklicht, indem er azido- und azidomethylmodifiziertes 2'-Desoxyuridin (AdU und AmdU, siehe Schema 16) in Zellen einschleuste und zeigte, dass die modifizierten Nukleoside von den entsprechenden Enzymen umgesetzt und in die DNA integriert wurden.<sup>[98]</sup>



**Schema 16:** Strukturen ausgewählter Nukleoside für die metabolische Markierung: Azido-2'-desoxyuridin (**AdU**), Azidomethyl-2'-desoxyuridin (**AmdU**), Vinyl-2'-desoxyuridin (**VdU**) und ein maskiertes Ethinyl-2'-desoxyuridin (**EdU-Phosphat**).

Analog konnte auch ein vinylmodifiziertes 2'-Desoxyuridin (VdU) von *Xie et al.*<sup>[154]</sup> sowie ein Ethinyl-dU (EdU) von *Poulsen et al.* für eine metabolische Markierung eingesetzt werden.<sup>[153]</sup> Darüber hinaus verwendete die Gruppe um *Poulsen* ein analoges ethinylmodifiziertes Derivat, welches in der 5'-Position ein Phosphatester trägt (EdU-Phosphat). Ester sind in der Lage, die polare Hydroxylgruppe zu maskieren, wodurch das Pronukleotid mittels passiver Diffusion in der Lage ist, die Zellmembran zu überqueren. Im Zellinneren werden diese Gruppen schließlich durch Esterasen hydrolysiert. Je nach Design der gewählten 5'-Modifikation kann durch die Hydrolyse direkt das Nukleosidmonophosphat erhalten werden. Dadurch wird nicht nur der Transport über die Zellmembran erleichtert, sondern auch der erste Schritt, die Phosphorylierung durch die Thymidin-Kinase umgangen. Mittlerweile gibt es weitere Ansätze um Pronukleotide zu synthetisieren, welche Zellmembranen passieren können und anschließend durch Esterasen direkt in das entsprechende Mono-, Di- oder Triphosphat überführt werden.<sup>[155]</sup>

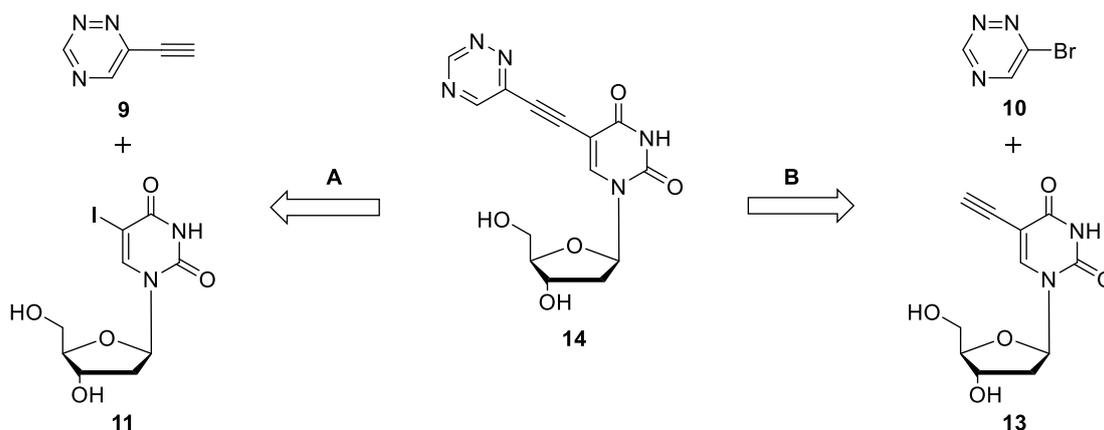
Aus den hier gezeigten Beispielen wird deutlich, dass insbesondere für das Zusammenspiel mehrerer Enzyme in lebenden Zellen eine möglichst kleine Modifikation vorteilhaft ist.

## 4. Triazinmodifizierte Nukleotide zur bioorthogonalen Markierung von DNA

### 4.1 Triazinmodifizierter 2'-Desoxyuridin-Baustein 1

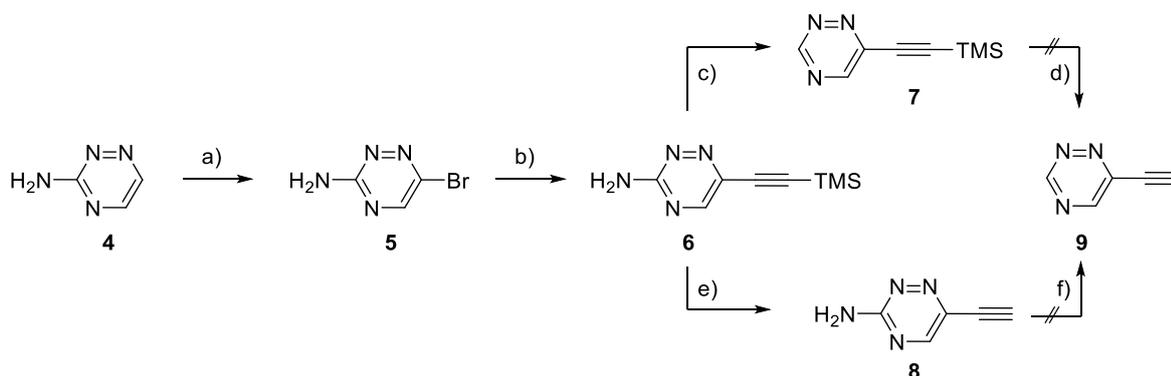
#### 4.1.1 Synthese des triazinmodifizierten 2'-Desoxyuridins 14

Schema 17 zeigt zwei mögliche Syntheserouten für die Darstellung des gewünschten triazinmodifizierten 2'-Desoxyuridins **14** aus einem Triazin- (**9** bzw. **10**) und einem 2'-Desoxyuridinbaustein (**11** bzw. **13**) über eine Sonogashira-Kupplung.



**Schema 17:** Retrosynthetische Übersicht zur Darstellung des triazinmodifizierten 2'-Desoxyuridins **14**.

Für Syntheseroute A dienen das 6-Ethynyl-1,2,4-triazin (**9**) sowie das kommerziell erhältliche 5-Iod-2'-desoxyuridin (**11**) als Kupplungspartner. Die Darstellung von **9** sollte ausgehend vom kommerziell erhältlichen 3-Amino-1,2,4-triazin **4** durchgeführt werden (Schema 18).



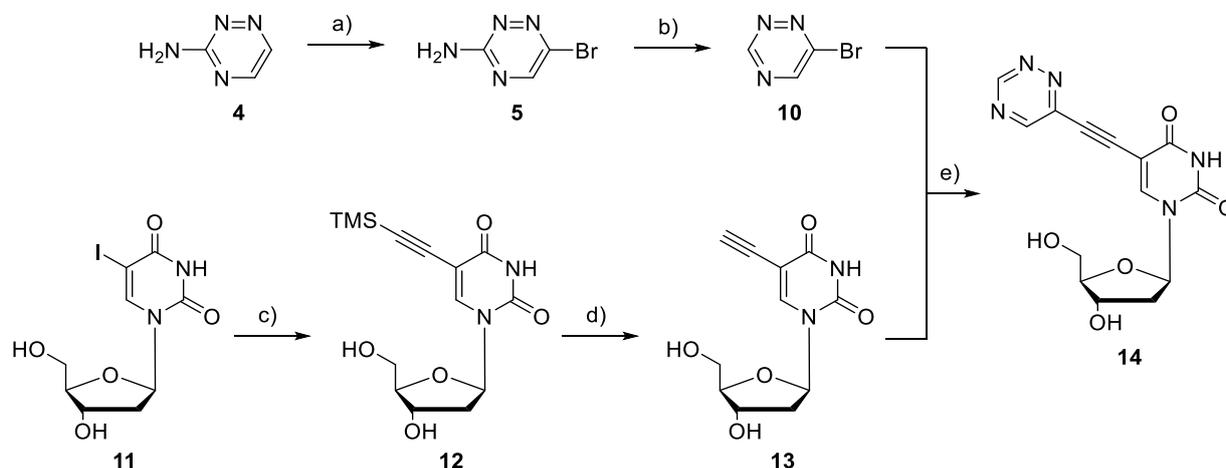
**Schema 18:** Syntheseroute zur Darstellung von **9**: a) NBS, MeCN/H<sub>2</sub>O, 1 h, 0 °C – RT, 74 %; b) CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS-Acetylen, NEt<sub>3</sub>, MeCN, ü.N., RT, 81 %; c) Isoamylnitrit, THF, 5 h, 65 °C, 25 %; d) Entschützung der TMS-Gruppe mit TBAF oder NEt<sub>3</sub>\*3HF; e) TBAF (1 M in THF), THF, 60 min, RT, 90 %; f) Desaminierung mit Isoamylnitrit.

Im ersten Schritt wurde eine Bromierung in der 6-Position unter Verwendung von NBS durchgeführt.<sup>[156]</sup> Nach einer Reaktionszeit von 1 h und anschließender Aufarbeitung mittels Extraktion konnte **5** als brauner Feststoff in einer Ausbeute von 74 % isoliert werden. Dieses wurde anschließend einer Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen unterworfen. Hierfür wurde Triethylamin als Base verwendet, welches zusammen mit Acetonitril zudem als Lösungsmittel fungierte, sowie Kupfer(I)iodid und Dichlorobis(triphenylphosphin)-palladium(II) als Katalysatoren. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt, wodurch **6** als brauner Feststoff in einer Ausbeute von 81 % erhalten wurde.

Die beiden letzten Schritte zur gewünschten Verbindung **9** umfassen eine Desaminierung und die Abspaltung der TMS-Gruppe. Für die Desaminierung in der 3-Position wurde **6** in einem Druckreaktionsgefäß in trockenem THF gelöst und mit Isoamylnitrit für 6 h auf 65 °C zur Reaktion gebracht. Nach anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung konnte **7** als gelbes Öl in einer Ausbeute von 25 % erhalten werden. Die nachfolgende Abspaltung der TMS-Gruppe wurde zunächst mit TBAF in THF durchgeführt. Hierbei konnte anhand von DC-Analysen zwar eine vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials beobachtet werden, dennoch gab es keinen Hinweis auf ein neues Produkt. Auch der Einsatz von Triethylamin Trihydrofluorid führte zu vollem Umsatz des Edukts jedoch ohne jegliche Produktbildung. Um auszuschließen, dass die Entschützung ein Problem darstellt, wurden die letzten beiden Reaktionsschritte in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Bei der Entschützung von **6** mit Hilfe von TBAF in THF konnte das gewünschte Produkt **8** nach einer Reaktionszeit von 60 min bei Raumtemperatur und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 90 % erhalten werden. Die abschließende Desaminierung mittels Isoamylnitrit wurde entsprechend der Reaktion von **6** zu **7** durchgeführt. Auch in diesem Fall konnte zwar eine vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials, jedoch keine Bildung eines Produktes beobachtet werden. **9** konnte folglich auf keine der beiden genannten Varianten erfolgreich hergestellt werden, was auf eine möglicherweise unzureichende Stabilität dieser Verbindung zurückzuführen ist. Eine direkte Anbindung von **8** an 5-Iod-2'-desoxyuridin (**11**) wäre prinzipiell möglich, allerdings konnte in vorhergehenden Experimenten gezeigt werden, dass eine abschließende Desaminierung mit Hilfe von Isoamylnitrit mit Nukleosiden nicht kompatibel scheint. Das Entfernen der elektronenschiebenden Aminogruppe ist dennoch wichtig, um

keine negative Auswirkung auf die Geschwindigkeit des Triazins in einer iEDDA zu erhalten (Vergleich hierzu Kapitel 3.2.1).

Für Syntheseroute B dienten, wie in Schema 19 dargestellt, 6-Bromo-1,2,4-triazin (**10**) und 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (**13**) als Kupplungspartner.



**Schema 19:** Synthese von **14** über Syntheseroute B: a) NBS, MeCN/H<sub>2</sub>O, 1 h, 0 °C – RT, 74 %; b) Isoamylnitrit, THF, 5 h, 65 °C; c) CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS-Acetylen, NEt<sub>3</sub>, MeCN, ü.N., RT, 76 %; d) TBAF (1 M in THF), THF, 30 min, RT, quant.; e) CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, DMF, ü.N., RT, 66 %.

Für die Synthese der Alkinkomponente **13** wurde im ersten Schritt 5-Iod-2'-desoxyuridin (**11**) in einer Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen umgesetzt. Hierfür wurde mit Kupfer(I)iodid und Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als Katalysatoren sowie Triethylamin als Base gearbeitet. Nach erfolgter Reaktion bei Raumtemperatur über Nacht konnte **12** als hellbrauner Schaum in 76 % Ausbeute erhalten werden. Anschließend wurde die TMS-Gruppe unter Verwendung von TBAF abgespalten. Die Reaktion wurde für 30 min in THF bei Raumtemperatur durchgeführt und vor der Aufreinigung mit Kieselgel versetzt, um überschüssige Fluorid-Ionen abzufangen. Hierbei konnte **13** als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute erhalten werden.

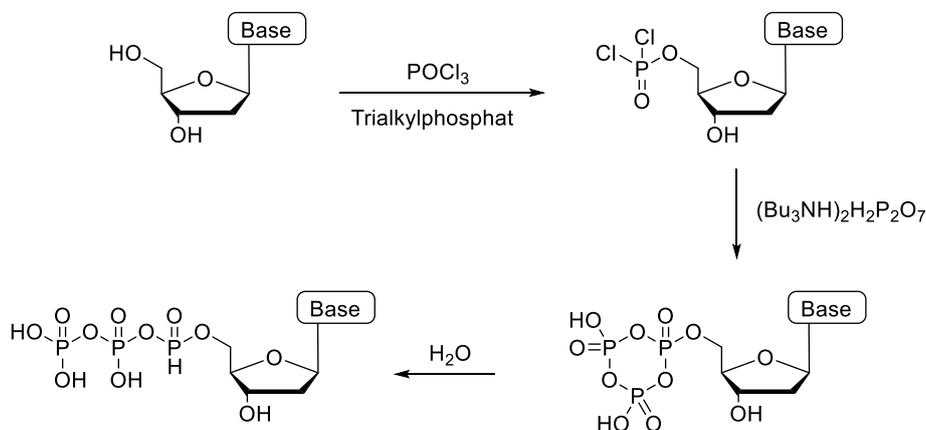
Für die Synthese des halogenierten Triazins **10** wurde zunächst, wie bereits in Syntheseroute A (Schema 18) beschrieben, die Bromierung von 3-Amino-1,2,4-triazin (**4**) in der 6-Position durchgeführt. Das dabei isolierte Produkt **5** wurde anschließend einer Desaminierung unterworfen, welche entsprechend einer Vorschrift von *Prescher et al.*<sup>[81]</sup> durchgeführt wurde. Hierzu wurde **5** in einem Druckreaktionsgefäß mit einem Überschuss an Isoamylnitrit in THF für 5 h auf 65 °C erhitzt. Da es sich bei **10** um eine flüchtige Komponente handelt, wurde sowohl das Rohprodukt als auch das säulenchromatographisch gereinigte Produkt nicht

vollständig getrocknet, sondern lediglich die Reaktionsmischung bei 40 °C und 200 mbar eingengt. Aus diesem Grund war eine Ausbeutebestimmung nicht möglich und in der nachfolgenden Reaktion wurde mit einem Überschuss an **10** gearbeitet.

Für diese abschließende Sonogashira-Kupplung wurde **13** in trockenem DMF gelöst, mit Triethylamin, Kupfer(I)iodid und dem Palladium-Katalysator versetzt und durch Einleiten von Argon für 10 min entgast. Zu diesem Gemisch wurde frisch synthetisiertes **10** hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Rohprodukt über Säulenchromatographie gereinigt. Da das Produkt noch Triethylammonium-Salze beinhaltete, wurde es mit  $K_2CO_3$  behandelt und erneut säulenchromatographisch aufgereinigt. Somit konnte das reine Produkt als gelber Feststoff in 66 % Ausbeute erhalten werden.

#### 4.1.2 Triphosphatsynthese und enzymatischer Einbau in Oligonukleotide

Da die Überführung von Nukleosiden in die entsprechenden Triphosphate eine essentielle Rolle für diese Arbeit spielt, wird die hierfür verwendete Ludwig-Methode anhand von Schema 20 kurz erläutert.

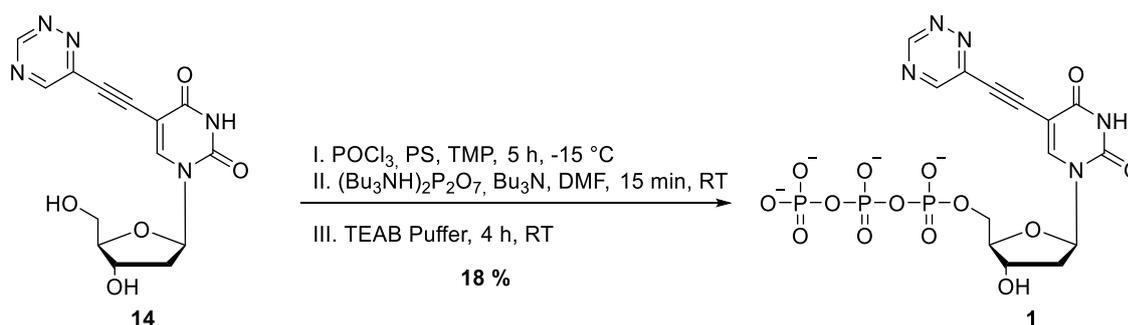


**Schema 20:** Schematische Darstellung der Nucleosidtriphosphatsynthese nach Yoshikawa und Ludwig.<sup>[157-158]</sup>

Zunächst wird durch einen nukleophilen Angriff am Phosphorylchlorid ein Dichlorophosphatintermediat gebildet. Da Phosphorylchlorid ein äußerst reaktives Reagenz ist, verursachte dieser Schritt durch die geringe Selektivität häufig Probleme. *Yoshikawa et al.* konnten schließlich zeigen, dass unter Einsatz von Trialkylphosphaten als Lösungsmittel die Selektivität eines Angriffs der 5'-Hydroxygruppe verbessert werden konnte.<sup>[157]</sup> Vermutlich

bildet sich ein Komplex zwischen dem Trialkylphosphat und Phosphorylchlorid, der aus sterischen Gründen bevorzugt von der primären 5'-Hydroxygruppe angegriffen wird. Ludwig *et al.* nutzten diese Methode und setzten das erhaltene Dichlorointermediat ohne wässrige Aufarbeitung direkt mit einem Pyrophosphatanion zu einem cyclischen Anhydrid um. Dieses kann schließlich unter neutralem pH-Wert zum Nukleosidtriphosphat hydrolysiert werden.<sup>[158]</sup>

Das in Kapitel 4.1.1 beschriebene triazinmodifizierte 2'-Desoxyuridin **14** wurde schließlich mit dieser Methode in das entsprechende 5'-Nukleosidtriphosphat **1** überführt (Schema 21).



**Schema 21:** Synthese des triazinmodifizierten 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphats **1** nach der Ludwig-Methode.

Hierfür wurde das Nukleosid gemeinsam mit *proton-sponge*<sup>®</sup> (PS; *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-naphthalendiamin), welcher eingesetzt wird, um die bei der Phosphorylierung freiwerdende Säure abzufangen, über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Beides wurde in Trimethylphosphat gelöst und im ersten Schritt mit Phosphorylchlorid versetzt. Um die Bildung eines Dimers zu vermeiden, wurde bei tiefer Temperatur ( $-15\text{ }^\circ\text{C}$ ) gearbeitet. Anschließend wurde das Tributylammonium-Pyrophosphat zugegeben und nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur durch den Einsatz eines Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Puffers hydrolysiert. Eine Aufreinigung über *reversed-phase* (RP)-HPLC ergab zunächst keine ausreichende Reinheit und das isolierte Produkt wurde daher zusätzlich mittels Ionenaustauscher (*strong anion exchange*; SAX)-HPLC gereinigt. Auf diese Weise konnte das reine Triphosphat **1** in einer für diese Reaktion guten Ausbeute von 18 % erhalten werden.

Der Einbau dieses modifizierten Triphosphats in Oligonukleotide sollte nun mittels DNA-Polymerasen erfolgen, weshalb zunächst die Toleranz derer gegenüber der Modifikation getestet werden musste.

Zu diesem Zweck wurde ein sogenanntes Primerverlängerungsexperiment durchgeführt. Im ersten Schritt werden ein Templat und ein kürzerer komplementärer Primer hybridisiert.

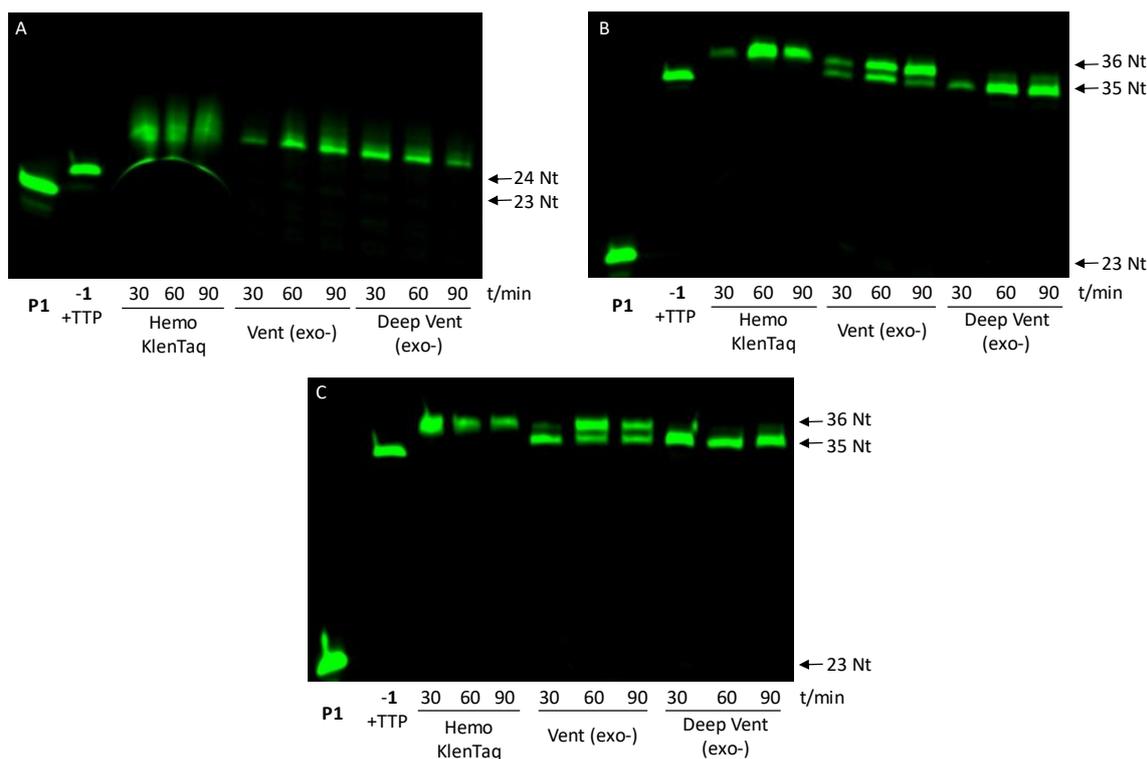
Anschließend erfolgt nach Zugabe der DNA-Polymerase sowie der verschiedenen benötigten Triphosphate die Verlängerung des Primers komplementär zum Templat. Das Resultat dieses Aufbaus ist eine reine Elongation des Primers und folglich keine Amplifikation, was dieses Experiment von der PCR (Polymerasenkettenreaktion) unterscheidet. Grundsätzlich wird zwischen dem sogenannten Standing- und Running-Start-Experiment unterschieden. Die hierfür verwendeten Sequenzen sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Sequenzen des verwendeten fluoresceinmarkierten Primers **P1** sowie der Template **T1** für das Standing- und **T2** für das Running-Start-Experiment.

Im Standing-Start-Experiment (**T1**) beginnt die Verlängerung des Primers mit dem Einbau des modifizierten Triphosphats, wohingegen im Running-Start-Experiment (**T2**) dieses erst im Laufe der Verlängerung inkorporiert wird. Beide Template sind so konzipiert, dass die Modifikation nur einmal als komplementäre Base zum Adenosin eingebaut werden kann. Um nun die Effizienz des Einbaus zu untersuchen, wurden die kommerziell erhältlichen DNA-Polymerasen Vent (exo-), Deep Vent (exo-) und Hemo KlenTaq gewählt. Die Auswertung erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Um diese visuell zu vereinfachen, wurde ein Primer gewählt, welcher am 5'-Ende mit Fluorescein (**Fluo**) funktionalisiert wurde. Dadurch ist es möglich, die erhaltenen PAGE-Gele mit Hilfe eines Fluoreszenzimagers mit Licht geeigneter Wellenlänge (hier im Absorptionsbereich des Fluoresceins) zu bestrahlen und die resultierende Fluoreszenz mit einem geeigneten Emissionsfilter aufzunehmen. Dies ermöglicht die Visualisierung des Primers sowie aller verlängerter Primerstränge.

Zunächst wurden zwei verschiedene Standing-Start-Experimente durchgeführt (Abbildung 6), bei denen entweder nur das modifizierte Triphosphat **1** (Abbildung 6A) oder ein Triphosphat-Mix aus **1**, dATP, dGTP und dCTP (B) verwendet wurden. Als Verlängerungstemperatur wurde 69 °C gewählt, da dies im Bereich der einzelnen Temperaturoptima der verschiedenen DNA-Polymerasen liegt (Vent (exo-) und Deep Vent (exo-): 72 °C; Hemo KlenTaq: 68 °C).

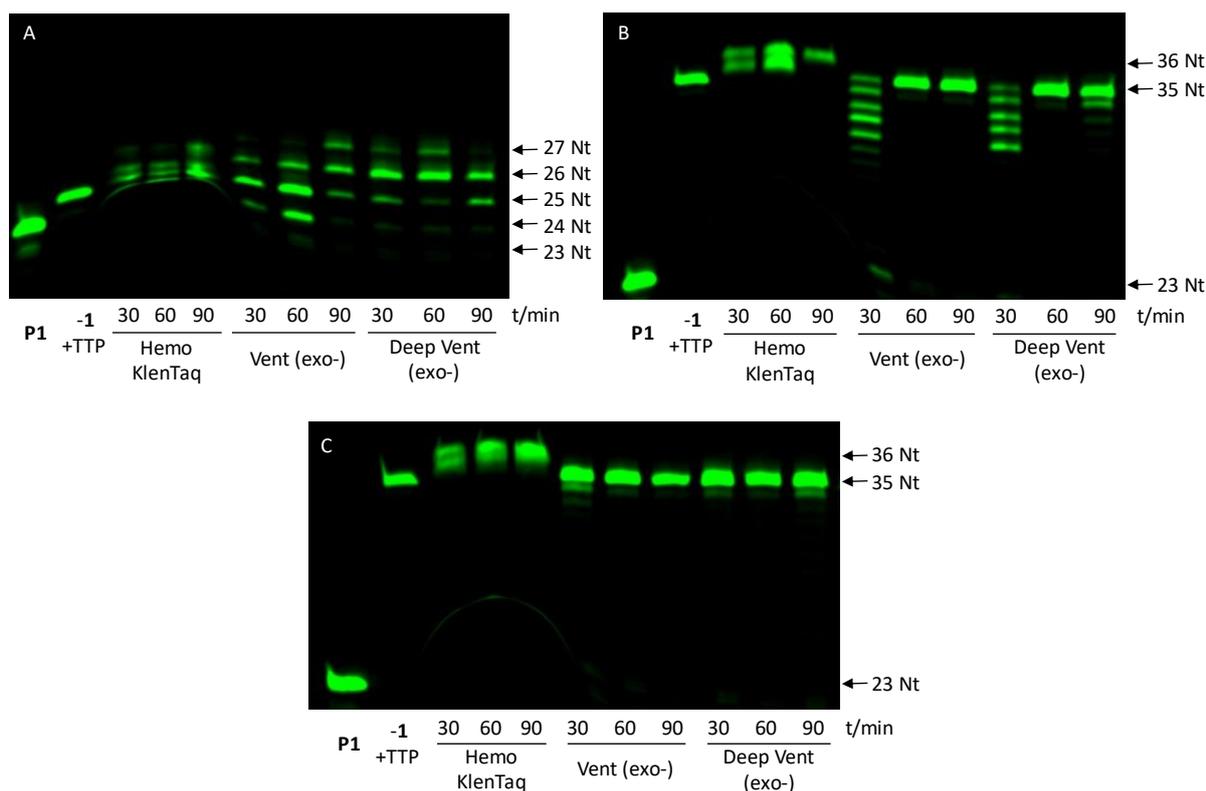


**Abbildung 6:** PAGE-Analyse des Einbaus von **1** bei 69 °C mittels verschiedener DNA-Polymerasen für unterschiedliche Elongationszeiten. Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ . (A) Standing-Start-Experiment mit **P1** (23 Nt), **T1** und **1**. „-1/+TTP“: um 1 TTP verlängerter **P1** (24 Nt). (B) Standing-Start-Experiment mit **P1** (23 Nt), **T1**, **1**, dATP, dGTP und dCTP. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollverlängerter **P1** (35 Nt). (C) Running-Start-Experiment mit **P1** (23 Nt), **T2**, **1**, dATP, dGTP und dCTP. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollverlängerter **P1** (35 Nt).

Bei alleiniger Verwendung des Triazin-dUTPs **1** (Abbildung 6A) ist in allen drei Fällen ein erfolgreicher Einbau beobachtbar. Bei einem Vergleich der Laufhöhen mit dem Referenzstrang, der um ein Nukleotid verlängerte Primer, wird deutlich, dass zusätzlich zu der komplementär eingebauten Base noch ein weiterer unspezifischer Einbau stattgefunden hat. Wurde **1** mit den übrigen natürlichen Triphosphaten (dATP, dGTP, dCTP) gemischt (B), so hat mit allen getesteten DNA-Polymerasen eine vollständige Verlängerung des Primers stattgefunden. Bei einem Vergleich des Volllängenproduktes der Deep Vent (exo-)-DNA-Polymerase mit dem vollständig mit natürlichen Triphosphaten verlängerten Primer (-1/+TTP) ist ein leichter Unterschied der Gelretention erkennbar. Dies ist auf die zusätzliche Größe der eingebauten Triazinmodifikation zurückzuführen, welche zu einer geringeren gelelektrophoretischen Mobilität führt. Bei einem Vergleich mit dem Volllängenprodukt der Vent (exo-)-DNA-Polymerase ist zudem eine weitere Bande mit geringerer Mobilität sichtbar,

wobei es sich um einen von der Polymerase eingebauten 3'-Überhang handelt. Im Fall der Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase ist lediglich das Produkt mit einer zusätzlichen Base erkennbar. Dies stellt laut den Herstellerangaben ein übliches Ergebnis für diese Polymerase dar. Anschließend wurde ein Running-Start-Experiment durchgeführt, bei dem die Modifikation im Laufe der Verlängerung in den Strang eingebaut wird (C). Auch hier konnte mit allen drei Polymerasen eine vollständige Verlängerung des Primers bereits innerhalb von 30 min erzielt werden. Mit der Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase wurde erneut ausschließlich das vollverlängerte Produkt inklusive 3'-Überhang gebildet. Dieser ist auch bei Verwendung der Vent (exo-)-DNA-Polymerase erkennbar, allerdings erst mit zunehmender Inkubationszeit (60 min).

Da ein mögliches Ziel dieser artifiziellen Nukleotide die Anwendung in Zellexperimenten darstellt, ist der Einbau unter physiologischen Bedingungen von Interesse. Daher wurden die beschriebenen Experimente bei 37 °C wiederholt und ebenfalls gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 7). Ähnlich zu dem Standing-Start-Experiment bei 69 °C wurde bei 37 °C der modifizierte Baustein von allen Polymerasen akzeptiert und, wenn keine der natürlichen Triphosphate hinzugegeben wurden, darüber hinaus mehrfach eingebaut (A). Wenn zusätzlich zu **1** auch die übrigen natürlichen Triphosphate (dATP, dGTP und dCTP) zugegeben wurden (B), war eine vollständige Verlängerung des Primers zu beobachten. Unter Verwendung der Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase ist abermals ein 3'-Überhang beobachtbar. Bei Betrachtung der Vent (exo-)- und Deep Vent (exo-)-DNA-Polymerasen wird deutlich, dass in diesem Experiment eine Elongationszeit von 30 min nicht ausreichte, um die vollständige Verlängerung des Primers zu erreichen, wodurch eine Verteilung mehrerer Produkte mit unterschiedlicher Länge beobachtet werden konnte. Erst nach 60 min war ein einheitliches Produkt auf Laufhöhe des vollständig verlängerten Primers sichtbar. Im Running-Start-Experiment (C) war dieser Trend jedoch nicht erkennbar, bereits nach 30 min konnte mit allen drei Polymerasen eine Vollverlängerung erzielt werden.

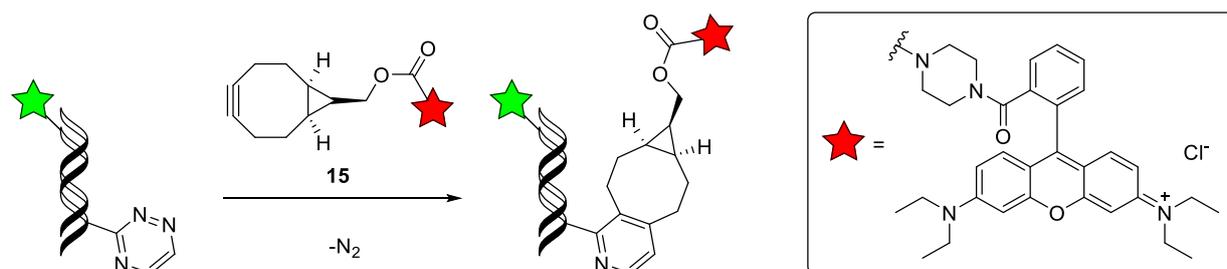


**Abbildung 7:** PAGE-Analyse des Einbaus von **1** bei 37 °C mittels verschiedener DNA-Polymerasen bei variierenden Elongationszeiten. Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ . (A) Standing-Start-Experiment mit **P1** (23 Nt), **T1** und **1**. „-1/+TTP“: um 1 TTP verlängerter **P1** (24 Nt). (B) Standing-Start-Experiment mit **P1**, **T1**, **1**, dATP, dGTP und dCTP. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollverlängerter **P1** (35 Nt). (C) Running-Start-Experiment mit **P1**, **T2**, **1**, dATP, dGTP und dCTP. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollverlängerter **P1** (35 Nt).

Aufgrund dieser Screenings wurde für die folgenden Markierungsexperimente das Primer-Templat-Paar **P1/T2**, die DNA-Polymerase Vent (exo-) und eine Elongationszeit von 30 min bei 37 °C gewählt.

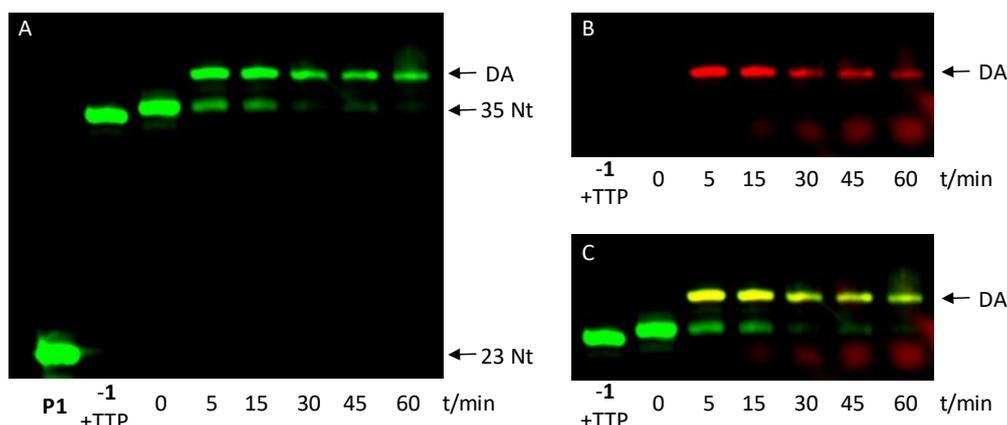
#### 4.1.3 Bioorthogonale Markierungsexperimente

Als Reaktionspartner für die bioorthogonale Markierung der triazinmodifizierten Oligonukleotide wurde das BCN-modifizierte Rhodamin B (kurz: BCN-Rhodamin, **15**) verwendet, welches eine iEDDA mit dem Triazinpartner eingeht. Diese postsynthetische Markierung ist in Schema 22 veranschaulicht. Für die folgenden Markierungsexperimente wurde das Produkt aus dem Running-Start-Experiment (**P1/T2**) genutzt.



**Schema 22:** Bioorthogonale Markierung triazinmodifizierter Oligonukleotide mit dem BCN-modifizierten Rhodamin B **15** durch eine iEDDA.

Hierfür wurde das Primerverlängerungsprodukt zunächst entsalzt und schließlich für verschiedene Zeitintervalle mit 1000 Äquivalenten des Farbstoffes, bezogen auf den eingesetzten Primer, bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Analyse mittels denaturierender PAGE ist in Abbildung 8 gezeigt.



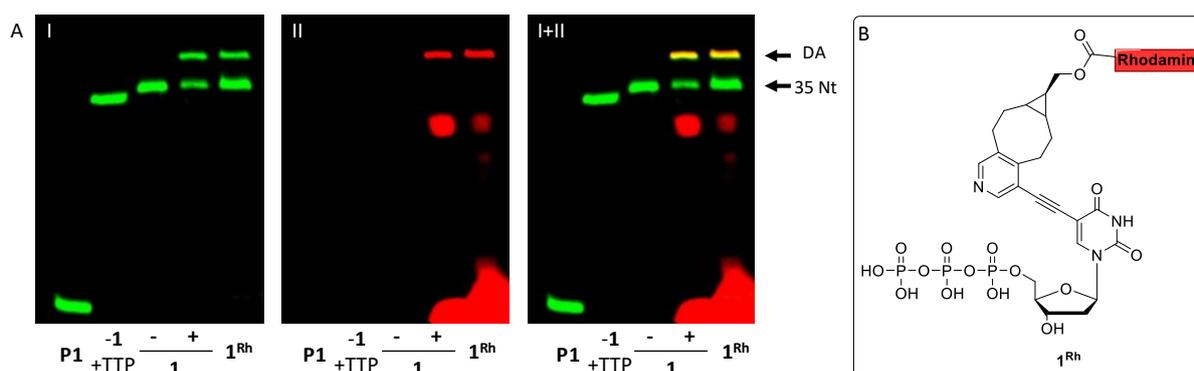
**Abbildung 8:** PAGE-Analyse der iEDDA der triazinmodifizierten DNA (**P1/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min mit **1**, dATP, dGTP und dCTP) mit **15** bei Raumtemperatur für verschiedene Zeitintervalle. „-1/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (A) Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm. (B) Rhodamin-Kanal:  $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm. (C) Überlagerung beider Kanäle, dabei entsteht bei der Anwesenheit beider Signale eine gemischte Farbe (gelb).

Im Fluorescein-Kanal (Abbildung 8A) ist bereits nach einer Inkubationszeit von 5 min eine zweite Bande sichtbar, welche eine geringere gelelektrophoretische Mobilität als die des unmarkierten PEX-Produktes (0 min) aufweist. Diese Bande zeigt zudem eine Emission im Rhodamin-Kanal (B), wodurch deutlich wird, dass es sich um das gewünschte Diels-Alder Produkt handelt. Die Überlagerung beider Kanäle (C) zeigt, dass es sich um dieselbe Bande handelt. Da dieses Produkt sowohl die Emission des Fluoresceins, hier in grün dargestellt, als

auch die des Rhodamins, hier in rot dargestellt, zeigt, erscheint die Bande in der Überlagerung in gelber Farbe. Durch einen prozentualen Vergleich der Fluoresceinintensitäten der Edukt- und Produktbanden lassen sich die Ausbeuten der Markierung bestimmen. Eine detaillierte Darstellung dieses Verfahrens ist in Kapitel 7.4.1 gegeben. Nach 5 min wurde bereits eine Markierungsausbeute von ca. 70 % erreicht, welche innerhalb von 45 min auf ein Maximum von ca. 80 % gesteigert werden konnte.

Wurde das PEX-Produkt vor der Markierung nicht entsalzt, so wurden deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt. Hierbei waren ein größerer Überschuss (2000 Äquivalente), sowie längere Inkubationszeiten (120 min) erforderlich, um eine vergleichbare Markierung zu erhalten. Eine repräsentative PAGE-Analyse ist in Kapitel 7.6.3 in Abbildung A12 dargestellt. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Anwesenheit von Salzen aus dem Reaktionspuffer sein, welche für die enzymatische DNA-Synthese essenziell sind.

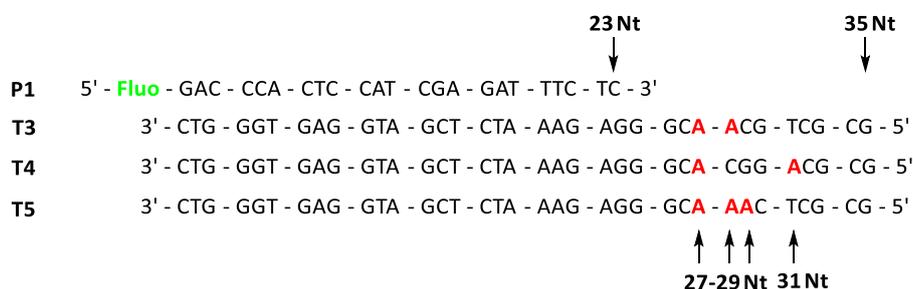
Um einen zusätzlichen Nachweis zu erhalten, dass es sich bei der entstandenen Bande um das gewünschte Markierungsprodukt handelt, wurden Markierungsversuche mit dem Triphosphat durchgeführt. Hierfür wurde **1** mit einem Äquivalent **15** inkubiert und das Konjugat anschließend mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen (siehe Abbildung A3, Kapitel 7.6.2). Die Struktur dieses mit Rhodamin konjugierten Triphosphats **1<sup>Rh</sup>** ist in Abbildung 9B gezeigt. Weiterhin wurde dieses Konjugat für PEX-Experimente genutzt.



**Abbildung 9:** Vergleich des enzymatischen Einbaus von **1** und **1<sup>Rh</sup>**. (A) PAGE-Analyse der PEX von **P1/T2**. „-1/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). „1“: Entsalztes PEX-Produkt (Vent (exo-), 37 °C, 30 min mit **1**, dATP, dGTP und dCTP), entweder ohne (-) oder mit (+) Inkubation mit **15** (30 min). „1<sup>Rh</sup>“: PEX-Produkt unter Verwendung von **1<sup>Rh</sup>**, dATP, dGTP und dCTP (KOD XL, 72 °C, 30 min). (I) Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ; (II) Rhodamin-Kanal:  $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ . (B) Struktur von **1<sup>Rh</sup>**.

Hierfür wurde **1<sup>Rh</sup>** frisch vorbereitet, mit den restlichen natürlichen dNTPs gemischt und für die enzymatische Primerverlängerung eingesetzt. Zunächst wurden Experimente mit der Vent (exo-)-DNA-Polymerase durchgeführt, jedoch konnte weder bei 37 °C noch bei dem Temperaturoptimum von 72 °C ein Einbau des markierten Triphosphats nachgewiesen werden. Somit scheint die gewählte Polymerase dieses sterisch anspruchsvolle Triphosphat nicht umsetzen zu können. Die KOD XL-DNA-Polymerase bewies bereits in anderen Experimenten eine große Toleranz gegenüber Modifikationen, wie in Kapitel 4.4. weiter ausgeführt wird. Aus diesem Grund schien sie für den enzymatischen Einbau des konjugierten Triphosphats **1<sup>Rh</sup>** geeignet. Durch einen Mobilitätsvergleich der Gelbanden der Primerverlängerung von **1** mit anschließender Markierung und des enzymatischen Einbaus des bereits markierten **1<sup>Rh</sup>** mit Hilfe der KOD XL-DNA-Polymerase konnte gezeigt werden, dass es sich um das gleiche Produkt handelt (Abbildung 9A).

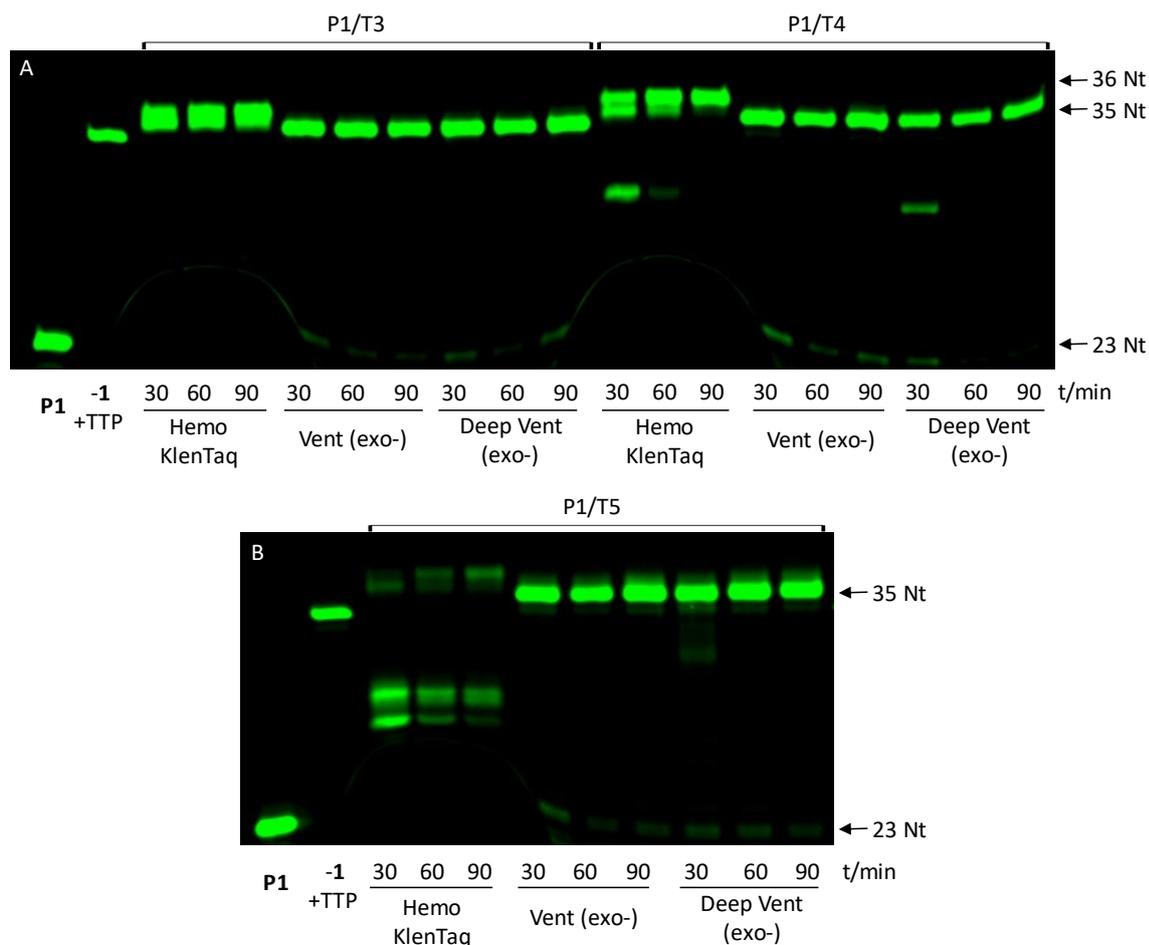
Um darüber hinaus die Effizienz des Einbaus und der bioorthogonalen Markierung des triazinmodifizierten dUTPs weiter zu untersuchen, wurden Mehrfachmarkierungen anhand der in Abbildung 10 gezeigten Template durchgeführt.



**Abbildung 10:** Sequenzen des verwendeten fluoresceinmarkierten Primers **P1**, sowie der für den Mehrfacheinbau verwendeten Template **T3**, **T4** und **T5**.

Die Template **T3** und **T4** wurden für einen doppelten Einbau verwendet, wobei die jeweiligen Modifikationen entweder direkt benachbart (**T3**) oder durch drei Basen voneinander getrennt sind (**T4**). Zusätzlich wurde ein konsekutiver dreifacher Einbau mittels **T5** getestet.

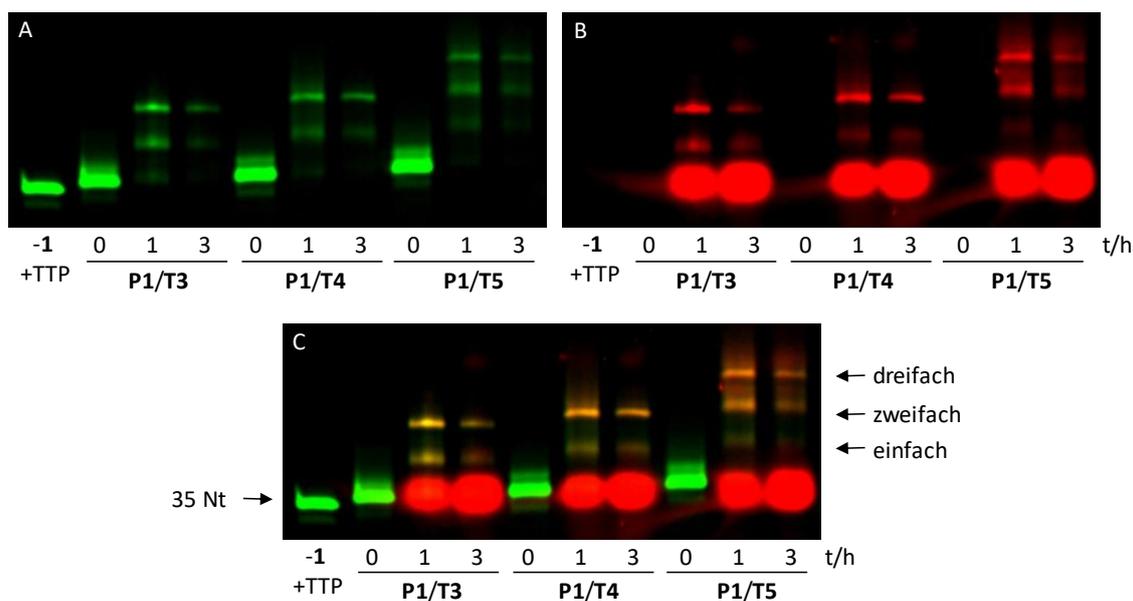
Bevor die Markierungseffizienz an mehrfachmodifizierter DNA untersucht werden konnte, musste zunächst getestet werden, welche Polymerasen in der Lage sind, die Modifikation mehrfach einzubauen. Hierfür wurden erneut die DNA-Polymerasen Vent (exo-), Deep Vent (exo-) und Hemo KlenTaq bei einer Temperatur von 37 °C getestet. Die gelelektrophoretische Auswertung dieses Screenings ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** PAGE-Analyse des Mehrfacheinbaus von **1** bei 37 °C mittels verschiedener DNA-Polymerasen bei unterschiedlichen Elongationszeiten. „-1/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm. (A) Doppelter Einbau mit **P1**, **T3** bzw. **T4** und **1**, dATP, dGTP und dCTP. (B) analoger Dreifacheinbau mit **T5**.

Die Vent (exo-)-DNA-Polymerase konnte in allen drei Fällen den Primer bereits innerhalb von 30 min vollständig verlängern. Der Einfluss der zusätzlichen Modifikation auf die Polymerase scheint so gering zu sein, dass selbst der konsekutive dreifache Einbau in vergleichbarer Zeit erfolgte wie der einfache (Vergleich Abbildung 7). Auffällig ist, dass für den zweifachen separierten Einbau mit **T4** unter Verwendung der Hemo KlenTaq- und Deep Vent (exo-)-DNA-Polymerase eine längere Elongationszeit notwendig war als für den konsekutiven Einbau mit **T3**. Im Fall der Deep Vent (exo-)-DNA-Polymerase lief sogar der konsekutive Dreifacheinbau (**T5**) schneller ab als der separierte Doppeleinbau (**T4**), wodurch dieser Trend weiter bestätigt wurde. Lediglich unter Verwendung der Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase wurden für die Verlängerung des Primers komplementär zu **T5** hauptsächlich Abbruchstränge

erhalten. Die Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase gehört zur A-Familie, wohingegen die beiden anderen Polymerasen der B-Familie angehören. Dies scheint ein Hinweis zu sein, dass auch die Triazinmodifikation von DNA-Polymerasen der B-Familie besser akzeptiert wird als von jenen der A-Familie, wie bereits in Kapitel 3.3 erläutert wurde. Entsprechend den vorhergehenden Experimenten ist ein leichter Unterschied in der Gelretention des vollverlängerten, modifizierten DNA-Stranges im Vergleich zum Unmodifizierten ersichtlich. Dieser Unterschied ist bei dem Dreifacheinbau (**P1/T5**) besonders deutlich zu erkennen und kann auf die zusätzliche Größe der drei eingebauten Modifikationen zurückgeführt werden. Um für die folgenden Markierungsexperimente einen vollständigen Einbau zu garantieren, wurde eine Elongationszeit von 60 min bei 37 °C unter Verwendung der Vent (exo-)DNA-Polymerase gewählt. Die erhaltene DNA wurde jeweils vor der Markierung entsalzt und schließlich mit 1000 Äquivalenten (bezogen auf die Konzentration des Primers) des Farbstoffes **15** bei Raumtemperatur inkubiert. Die gelelektrophoretische Analyse der Markierungsexperimente ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12:** PAGE-Analyse der iEDDA der mehrfachmodifizierten DNA (Vent (exo-), 37 °C, 60 min mit **1**, dATP, dGTP und dCTP) mit **15** bei Raumtemperatur für 1 und 3 h. „-1/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (A) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ), (B): Rhodamin-Kanal ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ ), (C) Überlagerung beider Kanäle.

Für die Markierung der doppelten Einbauten (**T3** und **T4**) sind im Fluorescein-Kanal zwei neue Banden sichtbar, die neben einer geringeren gelelektrophoretischen Mobilität auch die

charakteristische Emission des Rhodamins zeigen. Dabei handelt es sich um den einfach und doppelt markierten, vollverlängerten Primer. Nach einer Inkubationszeit von 3 h konnten die Ausbeuten soweit erhöht werden, dass keine unmarkierte DNA mehr detektiert wurde (siehe Tabelle 1). Zudem ist erkennbar, dass die Effizienz der Doppelmarkierung für den separierten Einbau mit 61 % Ausbeute nur unwesentlich höher liegt als die des konsekutiven Einbaus (56 %). Bei den auf Höhe der unmarkierten DNA liegenden roten Signalen, welche im Rhodamin-Kanal bzw. in der Überlagerung sichtbar sind, handelt es sich vermutlich um überschüssigen Farbstoff. Dieser konnte durch die denaturierende Gelelektrophorese nicht vollständig abgetrennt werden, unterscheidet sich aber deutlich von den klar definierten Banden der Markierungsprodukte. Da in allen Fällen im Fluorescein-Kanal nur sehr geringe bis keine Anteile an unmarkierter DNA detektiert wurden, wird zudem deutlich, dass es sich um ungebundenen Farbstoff handeln muss.

Für die Dreifachmarkierung des Volllängenproduktes aus **P1/T5** konnte ebenfalls nach einer Inkubationszeit von 3 h keine unmarkierte DNA mehr detektiert werden. Zudem wurden lediglich 13 % der einfach markierten DNA erhalten. Im Vergleich zu den doppelt modifizierten Strängen stellt dies eine erhöhte Markierungseffizienz dar. Bei dem Hauptprodukt handelt es sich mit 46 % um den zweifach markierten Strang, während ein nur unwesentlich geringerer Anteil an dreifach markierter DNA (41 %) erhalten werden konnte.

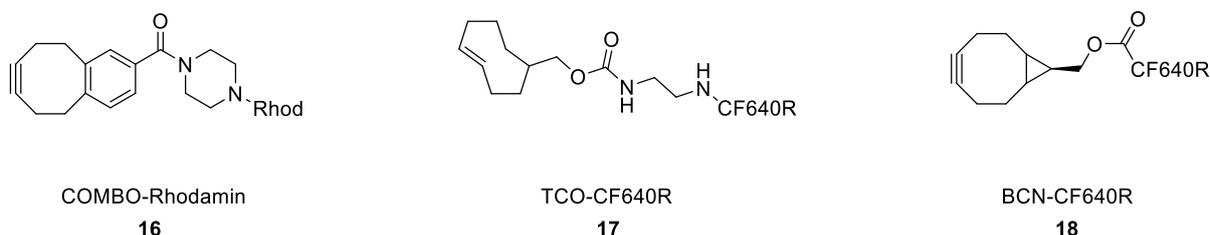
**Tabelle 1:** Ausbeuten der Markierung der mehrfachmodifizierten DNA (**P1** mit **T3/T4/T5**) mit **15** für 1 h bzw. 3 h bei Raumtemperatur, entsprechend dem in Abbildung 12 dargestellten Polyacrylamidgel.

Markierung	P1/T3		P1/T4		P1/T5	
	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h
dreifach	-	-	-	-	37 %	41 %
zweifach	45 %	56 %	54 %	61 %	43 %	46 %
einfach	41 %	44 %	38 %	39 %	18 %	13 %
unmarkiert	14 %	0 %	8 %	0 %	2 %	0 %

Der Vergleich aller Ausbeuten verdeutlicht, dass der konsekutive Dreifacheinbau mit **T5** die höchste Markierungseffizienz aufweist, da hierbei die geringsten Anteile an unmarkierter und einfachmarkierter DNA erhalten wurden. Möglicherweise wird durch die Triazineinheit selbst

oder das Konjugationsprodukt eine strukturelle Änderung der Doppelhelix hervorgerufen, wodurch eine zusätzliche räumliche Flexibilität für eine weitere iEDDA mit einem benachbarten Triazin entsteht. Jedoch bestätigt sich dieser Trend im Vergleich des konsekutiven und separierten Zweifacheinbaus nicht.

Nachdem die effiziente postsynthetische Markierung der triazinmodifizierten DNA erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sollten weitere Farbstoffe und reaktive Gruppen getestet werden, um das Spektrum an geeigneten Fluoreszenzsonden zu erweitern. Zu diesem Zweck wurden die in Schema 23 dargestellten Farbstoffe ausgewählt.

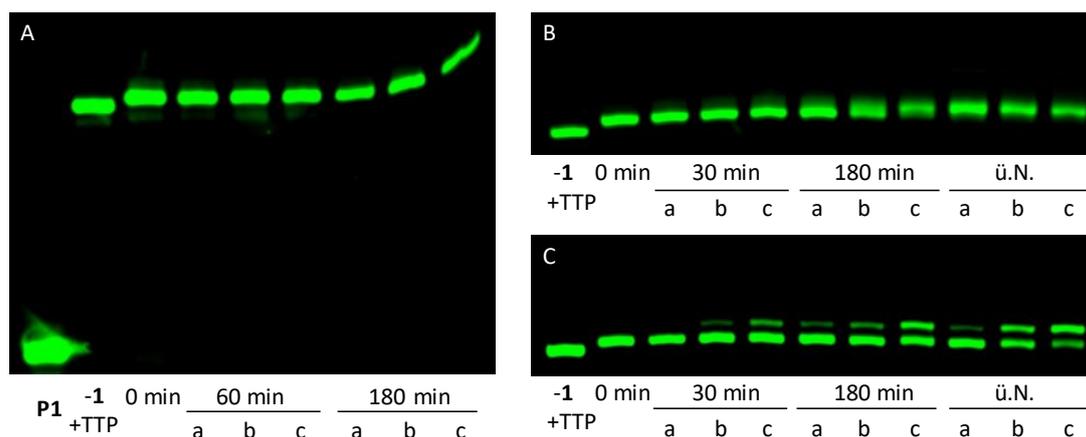


**Schema 23:** Übersicht über weitere Fluoreszenzfarbstoffe mit geeigneten Dienophilen.

Bei dem COMBO-Rhodamin **16** handelt es sich um den gleichen Farbstoff wie bei **15**, jedoch ist dieser anstelle des BCN mit COMBO modifiziert. Die anderen beiden Farbstoffe **17** und **18** unterscheiden sich lediglich in ihrem verknüpften Dienophil. Das hierfür verwendete CF640R ist ein auf Rhodamin basierender Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptionsmaximum im Vergleich zu Rhodamin rotverschoben ist, wodurch eine potentielle Anwendung an lebenden Zellen begünstigt wäre. Um die Reaktivität dieser Farbstoffe in der iEDDA mit der triazinmodifizierten DNA zu untersuchen, wurden verschiedene Inkubationszeiten und Äquivalente getestet (Abbildung 13).

Bei Betrachtung des Fluorescein-Kanals der Markierungsversuche mit COMBO-Rhodamin **16** (Abbildung 13A) wird deutlich, dass unter keiner der getesteten Bedingungen eine Markierung stattgefunden hat. Selbst durch eine Erhöhung der Farbstoffäquivalente und Verlängerung der Inkubationszeit konnte keine Produktbande detektiert werden. Da es sich um den gleichen Farbstoff wie **15** handelt, kann ein negativer Einfluss des Farbstoffes selbst auf die Markierung ausgeschlossen werden. Es ist daraus zu schließen, dass das COMBO und das Triazin keine geeigneten Reaktionspartner darstellen. Möglicherweise könnte eine Reaktion zwar durch erhöhte Temperatur begünstigt werden, dies ist aber unter dem Gesichtspunkt der

potentiellen Anwendung zur Markierung biologischer Systeme nicht zielführend und wurde daher nicht getestet. COMBO-Bausteine werden hauptsächlich für die SPAAC mit Aziden eingesetzt, wobei sie in diesem Fall typischerweise eine höhere Reaktivität zeigen als entsprechende BCN-Bausteine. Für den Einsatz als Dienophil für die iEDDA scheint sich diese Tendenz jedoch nicht zu bestätigen. Eine geringere Reaktivität des COMBOs in der iEDDA konnte bereits in der postsynthetischen Markierung von tetrazinmodifizierten Oligonukleotiden gezeigt werden<sup>[54]</sup> und bestätigt somit die hier gezeigten Resultate.



**Abbildung 13:** PAGE-Analyse der Markierungsexperimente der entsalzten triazinmodifizierten DNA (**P1/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min mit **1**, dATP, dGTP und dCTP) mit den Farbstoffen **16** (A), **17** (B) und **18** (C). Die Markierungsexperimente wurden jeweils bei Raumtemperatur für unterschiedliche Inkubationszeiten mit (a) 500, (b) 1000 und (c) 2000 Äquivalenten des Farbstoffes durchgeführt. „-1/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). Gezeigt ist jeweils die Fluorescein-Emission ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ); die Auswertung der CF640R-Emission zu (C) ist Abbildung A13 (Kapitel 7.6.3) zu entnehmen.

Auch der Markierungsversuch mit dem TCO-CF640R **17** zeigte im Fluorescein-Kanal (Abbildung 13B) keine neue Produktbande. Selbst nach Inkubation über Nacht konnte kein Unterschied detektiert werden, obwohl es sich bei TCO um ein reaktiveres Dienophil als BCN handelt (Kapitel 3.2.1). Im Vergleich hierzu wurden Markierungsversuche mit dem BCN-modifizierten CF640R **18** durchgeführt. Im Fluorescein-Kanal (Abbildung 13C) kann die Bildung einer zusätzlichen Gelbande mit einer etwas geringeren gelelektrophoretischen Mobilität beobachtet werden. Diese wurde sowohl mit zunehmender Inkubationszeit als auch mit zunehmender Farbstoffmenge verstärkt gebildet. Allerdings ist diese nicht auf ein Markierungsprodukt zurückzuführen, da sie keine Emission des CF640R-Farbstoffs zeigt (Abbildung A13, Kapitel 7.6.3). Um auszuschließen, dass es sich dabei nicht um freies BCN

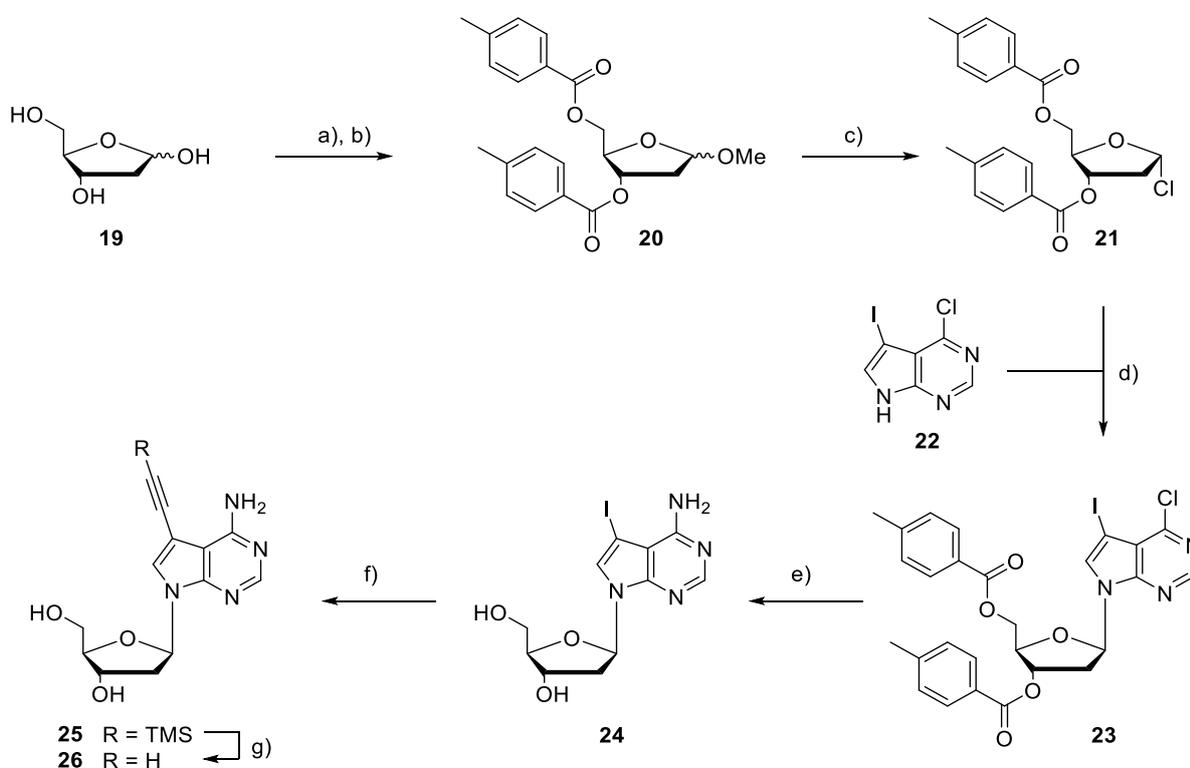
ohne Farbstoff handelt, welches eine Reaktion mit dem Triazin eingegangen ist, wurden Testreaktionen mit 3,6-Diphenyl-1,2,4,5-tetrazin durchgeführt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Hierbei konnten von TCO- und BCN-CF640R sowohl die vom Hersteller angegebenen Eduktmassen, als auch die Massen des (oxidierten) Konjugationsproduktes mit 3,6-Diphenyl-1,2,4,5-tetrazin nachgewiesen werden (siehe Abbildung A4 und A5, Kapitel 7.6.2). Es zeigt sich somit zum einen, dass eine Markierung zwar mit BCN-Rhodamin, aber nicht mit BCN-CF640R möglich ist. Zum anderen erfolgte auch unter Verwendung des noch reaktiveren Dienophils TCO keine Markierung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der CF640R-Farbstoff selbst die Reaktion hemmt. Mögliche Gründe könnten eine unspezifische Bindung des Farbstoffes an die DNA oder eine Abstoßung zwischen DNA und Farbstoff aufgrund der vorliegenden elektronischen Situation sein. Da von Seiten des Herstellers keinerlei Angaben über Struktur, Ladung und Polarität vorliegen, kann hierüber keine genaue Aussage getroffen werden. Die einzige Information bezieht sich auf die scheinbar gute Wasserlöslichkeit, weshalb eine Aggregation der Farbstoffe als Grund für die fehlende Reaktivität ausgeschlossen werden kann. Um dennoch einen negativen Lösungsmiteleinfluss auszuschließen, wurden Markierungsexperimente in H<sub>2</sub>O/DMSO- und H<sub>2</sub>O/Ethanol-Gemischen durchgeführt. Darüber hinaus wurden Experimente in NaCl-haltigem Na-P<sub>i</sub>-Puffer durchgeführt. Die Verwendung dieses Puffers zur bioorthogonalen Markierung hat in Vorarbeiten bereits positive Effekte gezeigt.<sup>[159]</sup> Es konnte jedoch in keinem der genannten Lösungsmittelsysteme eine Markierung mit BCN- oder TCO-modifizierten CF640R-Farbstoffen nachgewiesen werden (siehe Abbildung A14, Kapitel 7.6.3). Für die Markierung von **1** mit **15** konnte das Konjugat **1<sup>Rh</sup>** erfolgreich massenspektrometrisch nachgewiesen werden. In Anlehnung daran wurden vergleichbare Untersuchungen mit den Farbstoffen **17** und **18** durchgeführt, welche zeigten, dass das gewünschte Konjugat auf Ebene des Triphosphats in sehr geringen Mengen gebildet wird (siehe Abbildung A6 und A7, Kapitel 7.6.2). Diese könnte möglicherweise zu gering sein, um in der Fluoreszenzanalyse der PAGE-Experimente nachgewiesen zu werden. Darüber hinaus könnte die Markierungseffizienz im Oligonukleotid noch geringer sein, wodurch ein Nachweis nicht mehr möglich wäre.

Auch wenn die Testreihe der ergänzenden Fluoreszenzfarbstoffe **16** – **18** keine Markierung lieferte, konnte dennoch die Markierung mit **15** in hohen Ausbeuten erfolgreich realisiert werden.

## 4.2 Triazinmodifizierter 7-Deaza-dATP-Baustein 2

### 4.2.1 Synthese des triazinmodifizierten 7-Deaza-dATPs 2

Um einen weiteren Baustein zu erhalten, welcher sequenzspezifisch orthogonal zu dem gezeigten Triazin-dUTP **1** in Oligonukleotide eingebaut werden kann, wurde das bereits in der Theorieeinführung (Kapitel 3.3) erwähnte 7-Deaza-2'-desoxyadenosin als Grundbaustein ausgewählt. Für die Synthese des triazinmodifizierten Analogons wurde zunächst in Anlehnung an **1** das alkinmodifizierte 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **26** synthetisiert (Schema 24).



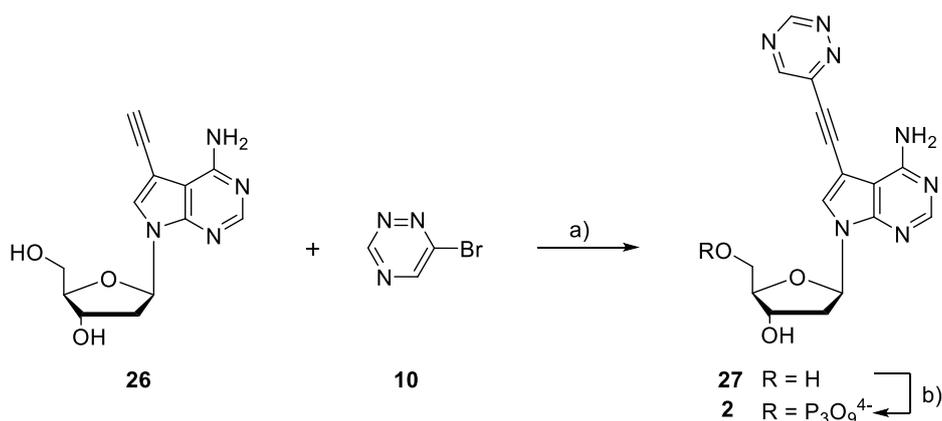
**Schema 24:** Synthese des alkinmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosins **26**: a) Acetylchlorid, MeOH, 20 min, RT; b) Toluoylchlorid, NEt<sub>3</sub>, Aceton, ü.N., RT, 73 % über 2 Stufen; c) HCl/Dioxan, Eisessig, 2 h, 0 °C, 44 %; d) TDA-1, KOH, MeCN, 1 h, RT; e) NH<sub>3</sub>/MeOH, 24 h, 120 °C, 74 % (über 2 Stufen); f) CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TMS-Acetylen, NEt<sub>3</sub>, DMF, 3 h, RT, 63 %; g) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 45 min, RT, 86 %.

Die Synthese dieses alkinmodifizierten Nukleosids erfolgte ausgehend von 2-Desoxyribose **19** und 6-Chlor-7-ioddeazapurin **22**. Das artifizielle 7-Deaza-Derivat kann durch eine Glykosylierung mit einer geeigneten Aminkomponente erhalten werden. Der dabei benötigte

$\alpha$ -Chlorzucker **21** wurde nach einer literaturbekannten Synthese in drei Schritten hergestellt.  
[160-162]

Die Kupplung des Chlorzuckers **21** mit der Nukleobase **22** erfolgte nach einer von *Seela et al.* etablierten Glykosylierungsmethode.<sup>[163-164]</sup> Die Reaktion wurde basenkatalysiert unter Einsatz von TDA-1 als Katalysator durchgeführt, wobei sich als Produkt stereoselektiv das  $\beta$ -Nukleosid **23** bildet. Dieses wurde ohne Aufarbeitung direkt für die nachfolgende Entschützung der *p*-Toluoylgruppen und die Substitution des Chloratoms in der 6-Position mittels Ammoniak in Methanol verwendet.<sup>[165]</sup> Durch diese Reaktionsführung konnte **24** ausgehend von **21** in einer Ausbeute von 74 % erhalten werden. Das iodidierte Nukleosid **24** wurde anschließend, angelehnt an eine von *Seela et al.* publizierte Vorschrift, einer Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen unterzogen.<sup>[164]</sup> Anstelle des  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  wurde  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  als Katalysator eingesetzt<sup>[166]</sup> und nach einer Reaktionszeit von 3 h bei Raumtemperatur konnte **25** in einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Die abschließende Entschützung der TMS-Gruppe erfolgte ebenfalls nach einer Vorschrift von *Seela*<sup>[164]</sup> mit wasserfreiem Kaliumcarbonat in Methanol, wobei das freie alkinmodifizierte Nukleosid **26** in einer Ausbeute von 86 % erhalten wurde.

Mit diesem Baustein konnte nun die Sonogashira-Kupplung mit **10** durchgeführt werden (Schema 25), wobei die optimierten Bedingungen aus der Kupplung mit dem alkinmodifizierten 2'-Desoxyuridin **13** übertragen wurden (Vergleich Kapitel 4.1.1).



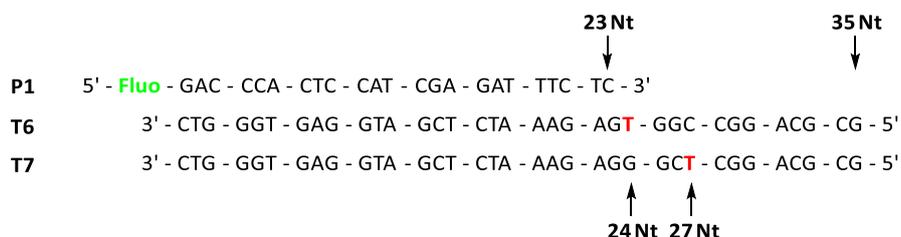
**Schema 25:** Synthese des triazinmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphats **2**. a)  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{NEt}_3$ , DMF, ü.N., RT, 44 %; b) I.  $\text{POCl}_3$ , PS, TMP, 5 h,  $-20^\circ\text{C}$ ; II.  $(n\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $n\text{Bu}_3\text{N}$ , DMF, 15 min, RT; III. TEAB-Puffer, 4 h, RT, 12 %.

Das gewünschte Nukleosid **27** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung als gelber Feststoff in 44 % Ausbeute erhalten.

Um diesen triazinmodifizierten Baustein für den enzymatischen Einbau in Oligonukleotide nutzen zu können, wurde **27** in das entsprechende Triphosphat **2** überführt. Es wurde erneut die bereits für das Triazin-dUTP **1** verwendete *Ludwig*-Methode genutzt (siehe Kapitel 4.1.2) und **2** in einer guten Ausbeute von 12 % erhalten.

#### 4.2.2 Enzymatischer Einbau in Oligonukleotide

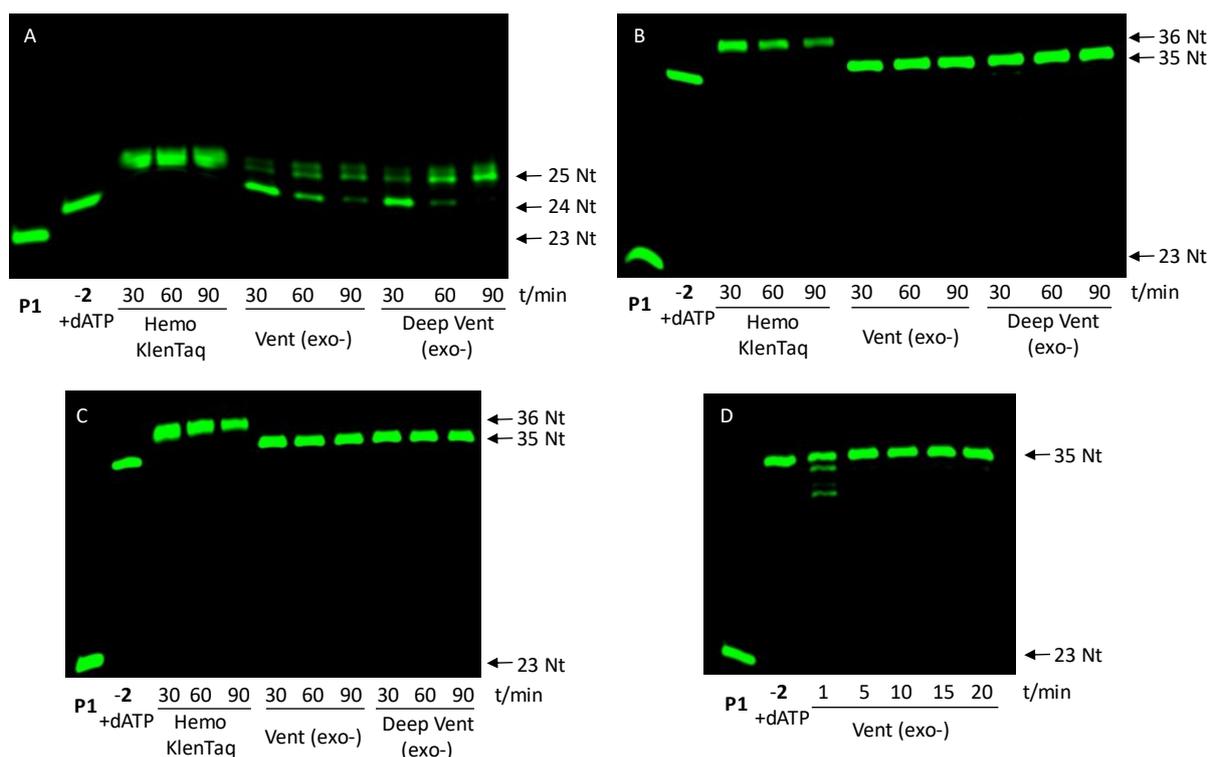
Um nachzuweisen, dass der Baustein **2** analog zu **1** von DNA-Polymerasen toleriert wird, wurden Standing-Start- und Running-Start-Experimente mit den in Abbildung 14 gezeigten Templaten durchgeführt.



**Abbildung 14:** Sequenzen des fluoresceinmarkierten Primers **P1**, sowie der Template **T6** für Standing-Start- und **T7** für Running-Start-Experimente.

Entsprechend den in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Einbauexperimenten mit dem dUTP-Baustein **1** wurde auch hier der mit einem Fluorescein markierte Primer **P1** verwendet. Die Sequenzen der Template **T6** und **T7** sind in Anlehnung an die Template **T1** und **T2** so konzipiert, dass der Baustein **2** ebenfalls in den Positionen 24 (**T6**) bzw. 27 (**T7**) eingebaut wird. Hierdurch wird eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Bausteine erreicht.

Aufgrund der Erkenntnisse mit **1** wurde für das Triphosphat **2** auf eine Untersuchung der Einbaueffizienz im Temperaturoptimum der Polymerasen verzichtet. Stattdessen wurde, wie in Abbildung 15 dargestellt, direkt die Toleranz der Polymerasen unter physiologischer Temperatur bei 37 °C getestet. Hierfür wurden erneut die DNA-Polymerasen Hemo KlenTaq, Vent (exo-) und Deep Vent (exo-) verwendet.



**Abbildung 15:** PAGE-Analyse des Einbaus von **2** bei 37 °C mittels verschiedener DNA-Polymerasen mit unterschiedlichen Elongationszeiten. Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm. (A) Standing-Start-Experiment mit **P1/T6** und **2**. „-2/+dATP“: um 1 dATP verlängerter **P1** (24 Nt). (B) Standing-Start-Experiment mit **P1/T6**, **2**, TTP, dGTP und dCTP. „-2/+dATP“: mit natürlichen dNTPs vollverlängerter **P1** (35 Nt). (C) Running-Start-Experiment mit **P1/T7**, **2**, TTP, dGTP und dCTP. „-2/+dATP“: mit natürlichen dNTPs vollverlängerter **P1** (35 Nt). (D) Analog zu C unter Verwendung der Vent (exo-)-DNA-Polymerase bei kürzeren Elongationszeiten.

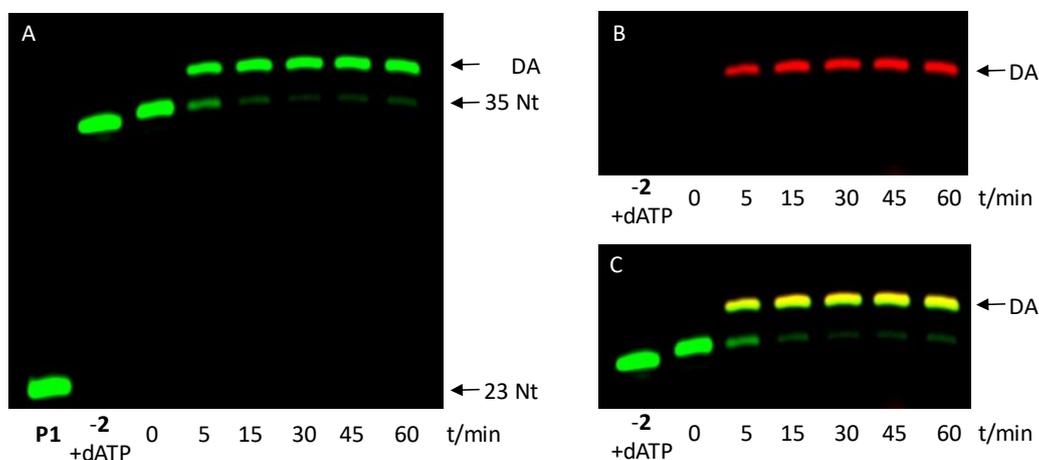
In den Standing-Start-Experimenten, in denen lediglich **2** und keine der natürlichen Triphosphate zugegeben wurden (Abbildung 15A), konnte mit allen Polymerasen eine Verlängerung des Primers um mindestens ein Nukleotid erzielt werden. Wurde **2** mit den übrigen natürlichen Triphosphaten TTP, dGTP und dCTP gemischt, fand sowohl im Standing- als auch im Running-Start-Experiment eine vollständige Verlängerung des Primers durch alle Polymerasen mit allen getesteten Elongationszeiten statt (Abbildung 15B und C). Dabei baute die Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase in allen Fällen, wie zuvor beschrieben, einen 3'-Überhang ein. Aufgrund der Ergebnisse kamen alle drei Polymerasen für weitere Experimente in Frage, für eine gute Vergleichbarkeit zu Baustein **1** wurde jedoch die Vent (exo-)-DNA-Polymerase ausgewählt. Da bereits nach 30 min in allen Experimenten die Verlängerung des Primers vollständig abgeschlossen war, wurden zusätzlich für diese Polymerase kürzere Elongationszeiten zwischen 1 und 20 min getestet (Abbildung 15D). Während für die Probe

mit einer Verlängerungszeit von 1 min bei 37 °C noch ein geringer Teil an unvollständigen Primerverlängerungen erkennbar ist, wurde bereits nach 5 min eine homogene Bande aus vollständig verlängertem Primer erhalten. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für die folgenden Experimente eine kürzere Elongationszeit von nur 15 min im Vergleich zu den 30 min für Baustein **1** gewählt. Das Triphosphat **2** scheint für den enzymatischen Einbau durch DNA-Polymerasen eine höhere Kinetik aufzuweisen als **1**.

#### 4.2.3 Bioorthogonale Markierungsexperimente

Als Reaktionspartner für die bioorthogonale Markierung wurde das bereits in Kapitel 4.2.2 vorgestellte BCN-Rhodamin **15** verwendet.

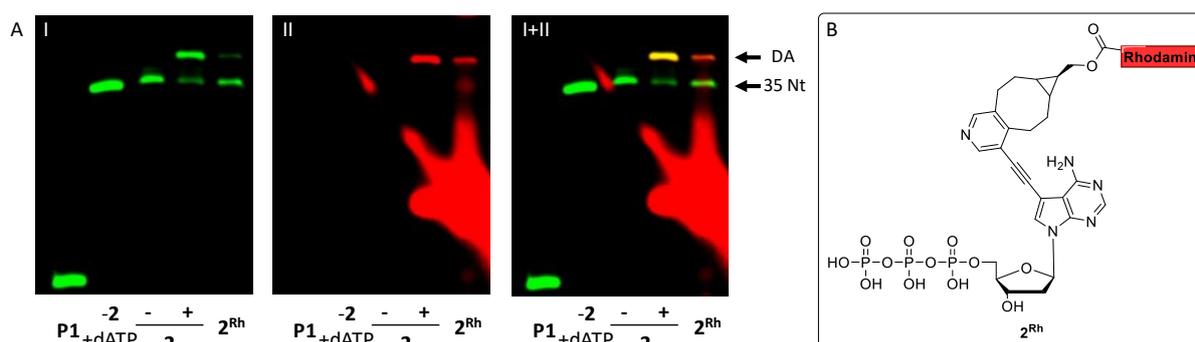
Hierfür wurde aufgrund der Erkenntnisse mit **1** das Primerverlängerungsprodukt von **P1/T7** zunächst entsalzt, um störende Komponenten aus dem Reaktionspuffer der Polymerase zu entfernen. Das lyophilisierte Oligonukleotid wurde anschließend wieder in hochreinem Wasser aufgenommen und mit je 1000 Äquivalenten **15** bei Raumtemperatur für verschiedene Zeitintervalle inkubiert. Die gelelektrophoretische Auswertung dieser Markierung ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16:** PAGE-Analyse der iEDDA der triazinmodifizierten DNA (**P1/T7**, Vent (exo-), 37 °C, 15 min, mit **2**, TTP, dGTP, dCTP) mit BCN-Rhodamin **15** bei Raumtemperatur für verschiedene Zeitintervalle. „-2/+dATP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (A) Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm. (B) Rhodamin-Kanal:  $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm. (C) Überlagerung beider Kanäle, wobei bei Anwesenheit beider Signale (Fluorescein: grün, Rhodamin: rot) gelb als Mischfarbe entsteht.

Ähnlich zur bioorthogonalen Markierung mit **1**, war auch für den Baustein **2** bereits nach 5 min eine neue Bande im Fluorescein-Kanal (Abbildung 16A) sichtbar. Diese zeigte eine geringere gelelektrophoretische Mobilität als das unmarkierte Volllängenprodukt und zudem die rhodaminspezifische Emission (B). Darüber hinaus belegt die Überlagerung beider Kanäle (C), dass es sich bei der erhaltenen Rhodamin-Emission um die neu entstandene Bande handelt, weshalb diese dem Diels-Alder-Produkt zugeordnet werden konnte. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Banden des Volllängenproduktes (35 Nt) und des entsprechenden DA-Produktes im Fluorescein-Kanal konnte für die iEDDA nach 5 min eine Ausbeute von 65 % bestimmt werden. Diese Ausbeute erreichte ein Maximum von ca. 85 % innerhalb von 30 min. Mit Baustein **1** hingegen konnte eine maximale Markierungsausbeute von 80 % innerhalb von 45 min erreicht werden. Dies deutet auf eine höhere Reaktivität des Triazinderivats **2** als des entsprechenden Triazins **1** für die iEDDA mit dem BCN **15** hin. Eine höhere Geschwindigkeitskonstante für die iEDDA mit einem modifiziertes 7-Deaza-dA-Analogen gegenüber dem entsprechenden dU-Analogen wurde bereits früher in der Literatur beobachtet.<sup>[167]</sup>

Analog zum Nachweis des Konjugationsproduktes von **1** wurde für **2** ebenfalls die Konjugation des Triphosphats mit dem Farbstoff **15** durchgeführt. Das daraus resultierende Triphosphat-Konjugat **2<sup>Rh</sup>** konnte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe Abbildung A8, Kapitel 7.6.2) nachgewiesen werden und weiterhin für Primerverlängerungsexperimente verwendet werden (Abbildung 17).

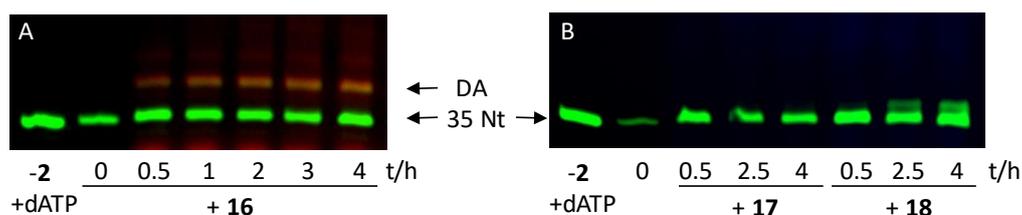


**Abbildung 17:** Vergleich des enzymatischen Einbaus von **2** und **2<sup>Rh</sup>**. (A) PAGE-Analyse der PEX von **P1/T7**. „-2/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). „2“: Entsalztes PEX-Produkt (Vent (exo-), 37 °C, 30 min, **2**, TTP, dGTP und dCTP) entweder ohne (-) oder mit (+) Inkubation mit **15** (30 min). „2<sup>Rh</sup>“: PEX-Produkt unter Verwendung von **2<sup>Rh</sup>**, TTP, dGTP und dCTP (KOD XL, 72 °C, 30 min). (I) Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm, (II) Rhodamin-Kanal:  $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm. (B) Struktur des Triphosphat-Konjugats **2<sup>Rh</sup>**.

Auch in diesem Fall war ein Einbau des Triphosphatkonjugats **2<sup>Rh</sup>** mit Hilfe der KOD XL-DNA-Polymerase erfolgreich, wenn auch als Hauptprodukt die Verlängerung mit dem unmarkierten Triphosphat **2** erhalten wurde. Ein Vergleich zwischen den resultierenden Banden für den enzymatischen Einbau von **2** mit anschließender Rhodaminmarkierung und den enzymatischen Einbau des bereits markierten Bausteins **2<sup>Rh</sup>** verdeutlicht, dass es sich um das gleiche Produkt handeln muss.

Da **2** im Vergleich zu **1** eine erhöhte Reaktivität zeigte, sollten hierfür erneut die reaktiven Farbstoffe **16** - **18** getestet werden (Strukturen siehe Schema 23), welche für **1** keine Markierungen lieferten.

Aus der gelelektrophoretischen Analyse (Abbildung 18) wird deutlich, dass entsprechend den Ergebnissen mit **1** auch in diesem Fall keine Markierung durch die CF640R-Farbstoffe **17** und **18** erreicht werden konnte.

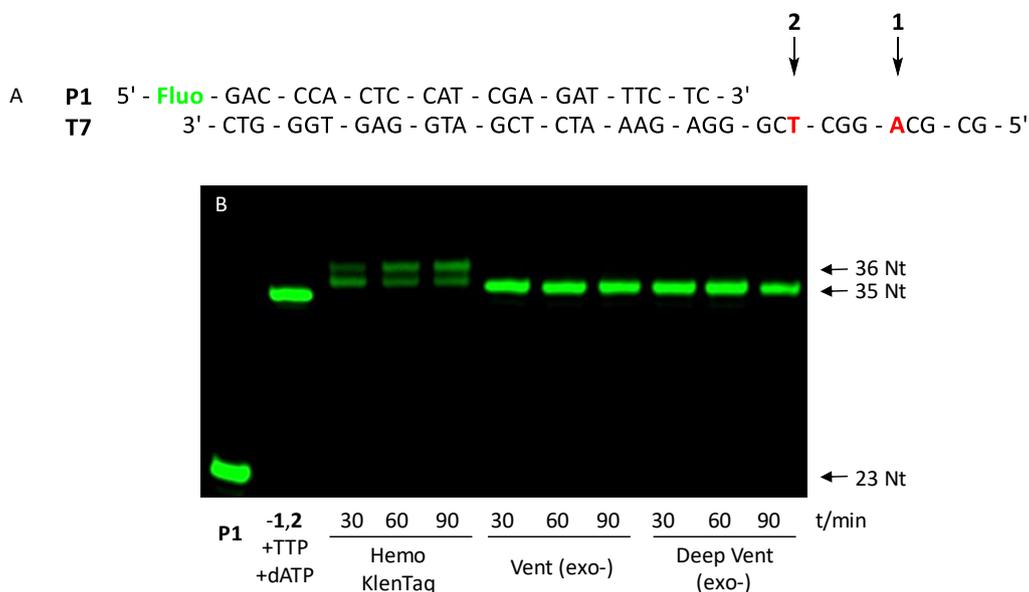


**Abbildung 18:** PAGE-Analyse der Markierungsexperimente der entsalzten triazinmodifizierten DNA (**P1/T7**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, **2**, TTP, dGTP und dCTP) mit den Farbstoffen **16**, **17** und **18** bei Raumtemperatur für verschiedene Inkubationszeiten. „-2/+TTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). Gezeigt ist die Überlagerung der Fluorescein-Emission ( $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm, grün) mit (A) der Rhodamin-Emission ( $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm, rot) bzw. (B) der CF640R-Emission ( $\lambda_{exc} = 630$  nm,  $\lambda_{em} = 700$  nm, blau). Die Einzelbilder sind in Abbildung A15 in Kapitel 7.6.3 dargestellt.

Bei Verwendung des COMBO-modifizierten Rhodamins **16** ist im Gegensatz zu Baustein **1** hier die Bildung einer neuen Gelbande erkennbar, welche aufgrund der geringeren Gelmobilität und der zusätzlichen Rhodamin-Emission dem Diels-Alder-Produkt zugeordnet werden konnte. Dabei wurde nach einer Stunde eine Ausbeute von 20 % erhalten, welche jedoch auch durch längere Inkubationszeiten nicht weiter erhöht werden konnte. Das triazinmodifizierte dATP-Analogon **2** zeigt somit eine deutlich geringere Reaktivität mit dem COMBO verglichen mit dem BCN. Trotz der geringen Ausbeute für die bioorthogonale Markierung von **2** mit **16** zeigt sich hier ein Vorteil gegenüber Baustein **1**, welcher keinerlei Reaktivität gegenüber

diesem Dienophil zeigte. Dies bestätigt, dass es sich bei **2** um ein reaktiveres Triazinderivat handelt als bei dem modifizierten dU-Analogon **1**. Dieser Reaktivitätsunterschied kann vermutlich von dem unterschiedlich stark ausgeprägten aromatischen Charakter der beiden Nukleobasen abgeleitet werden. Das 7-Deaza-dA besitzt ein größeres aromatisches System, wodurch das LUMO energetisch besser abgesenkt und somit die Reaktivität in einer iEDDA gesteigert wird. Ein weiterer Grund könnte in einer leicht abweichenden Positionierung innerhalb der großen Furche liegen, wodurch eine bessere Zugänglichkeit für den Farbstoff erreicht werden könnte.

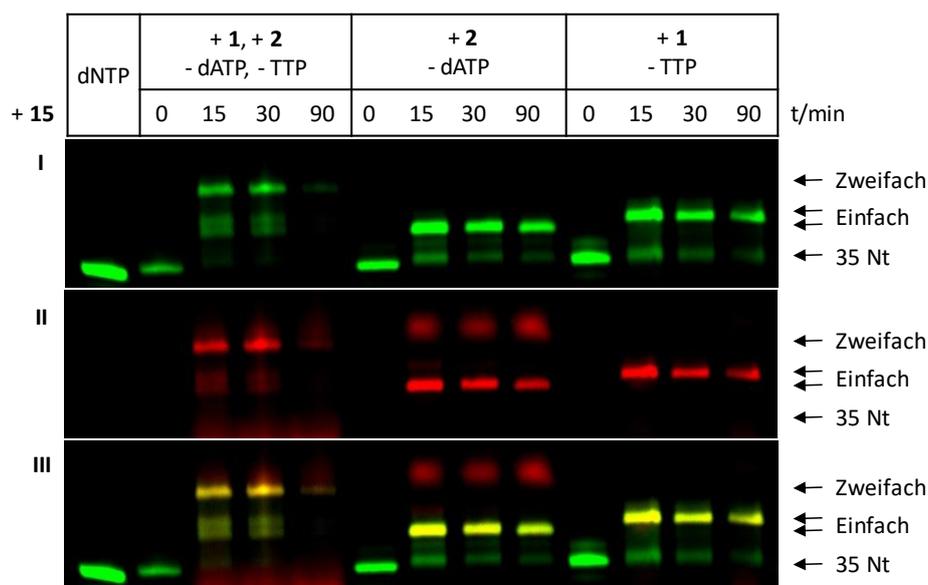
Mit Baustein **1** konnte bereits gezeigt werden, dass der multiple Einbau von Modifikationen keine Schwierigkeit für die DNA-Polymerasen darstellt (siehe Kapitel 4.1.3 Abbildung 11). Als nächster Schritt sollten nun die beiden Triphosphate **1** und **2** sequenzspezifisch in ein Oligonukleotid eingebaut werden um eine Doppelmarkierung zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls das Templat **T7** verwendet, welches sowohl für das dUTP- als auch für das dATP-Analogon je eine Einbaustelle enthält (Abbildung 19A). Um sicherzustellen, dass der Einbau der verschiedenen artifiziellen Triphosphate gleichzeitig in ein Oligonukleotid von den DNA-Polymerasen toleriert wird, wurden zunächst Einbauscreenings durchgeführt (B).



**Abbildung 19:** Doppeleinbau von Triazin-dUTP **1** und Triazin-dATP **2**. (A) Sequenz des verwendeten Primer-Templat-Paares **P1/T7**. (B) PAGE-Analyse des Doppeleinbaus von **1**, **2**, dGTP und dCTP mittels verschiedener DNA-Polymerasen mit unterschiedlichen Elongationszeiten. „-1,2/+TTP,dATP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ .

Mit allen getesteten DNA-Polymerasen wurde der Primer bereits nach 30 min vollständig verlängert, wobei auch in diesem Experiment ein 3'-Überhang im Falle der Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase auftrat. Für die folgenden Markierungsexperimente wurde die Vent (exo)-DNA-Polymerase ausgewählt, da sie bereits bei den Einzelexperimenten mit **1** bzw. **2** gute Ergebnisse lieferte.

Da beide Bausteine eine Triazinmodifikation tragen, konnten diese mit dem gleichen BCN-Rhodamin markiert werden, wodurch jedoch aus der Fluoreszenzanalyse keine Aussage darüber getroffen werden kann, welcher Baustein tatsächlich reagierte. Daher wurde ein Vergleich mit einfach modifizierten Oligonukleotiden (nur **1** oder nur **2**) erstellt. Die drei verschiedenen DNA-Stränge wurden durch Primerverlängerungsexperimente (Vent (exo-), 37 °C, 30 min) enzymatisch synthetisiert, entsalzt und schließlich für verschiedene Zeitintervalle bei Raumtemperatur mit **15** inkubiert (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** PAGE-Analyse der Doppelmarkierung der entsalzten DNA (**P1/T7**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, unter Verwendung verschiedener Triphosphatmischungen mit **1** und/oder **2** in Kombination mit den restlichen natürlichen dNTPs) mit **15** bei Raumtemperatur für verschiedene Zeitintervalle. „dNTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (I) Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm; (II) Rhodamin-Kanal:  $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm; (III) Überlagerung von I und II.

Wurde nur einer der beiden Bausteine eingebaut (Mitte: **2**, rechts: **1**), so ist sowohl im Fluorescein- (I) als auch im Rhodamin-Kanal (II) die Bildung des Diels-Alder-Produktes sichtbar. Dies ist erkennbar an der geringeren Gelretention sowie der kolokalisierten Emission beider

Farbstoffe. Interessanterweise weisen die beiden verschiedenen einfachmarkierten Oligonukleotide einen leichten Unterschied in der jeweiligen Laufhöhe auf. So zeigt das Markierungsprodukt der mit **1** modifizierten DNA eine geringere Gelmobilität als jenes der mit **2** markierten DNA. Prinzipiell haben die Ethynyltriazinmodifikationen von **1** und **2** dieselbe Größe. Obwohl aufgrund der Methylgruppe in der 5-Position des TTP im Fall von **1** durch die Modifikation eine geringere zusätzliche Größe eingebracht wird als im Fall von **2**, zeigt dieser Baustein, sobald er mit dem Farbstoff konjugiert wurde, dennoch den größeren Einfluss auf die Gelmobilität. Dies ist als Erklärung für das erhaltene Resultat folglich nicht zutreffend. Ein Grund für die beobachteten Unterschiede könnte stattdessen in einer unterschiedlichen geometrischen Orientierung des Konjugats relativ zum DNA-Strang liegen, welcher in der PAGE-Analyse denaturiert vorliegt.

Für das Oligonukleotid, welches beide Bausteine beinhaltet (links), ist nach der Markierung eine weitere Bande mit noch geringerer Gelmobilität erkennbar, welche auf das doppelt markierte Vollängenprodukt zurückzuführen ist. Des Weiteren sind Einfachmarkierungen sichtbar, die aufgrund der Unterschiede in den Gelretentionen der einzelnen Produkte als dicht beieinanderliegende Doppelbanden erscheinen. Darüber hinaus ist kaum unmarkierte DNA sichtbar, wodurch abermals die Effizienz dieser bioorthogonalen Markierung unterstrichen wird.

Das triazinmodifizierte dATP-Analogon **2** konnte folglich enzymatisch in Oligonukleotide eingebaut und effizient in einer iEDDA mit BCN-Rhodamin **15** markiert werden. Auch der doppelte, sequenzspezifische Einbau mit Baustein **1** zeigte eine erfolgreiche Doppelmarkierung. Den nächsten Schritt für die multiple Markierung eines Oligonukleotids stellt die Markierung mit unterschiedlichen Reaktionspartnern dar, wofür wiederum verschiedene Modifikationen notwendig sind. Auf eine solche orthogonale Mehrfachmarkierung soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

### 4.3 Duale bioorthogonale Markierung mit unterschiedlichen Modifikationen

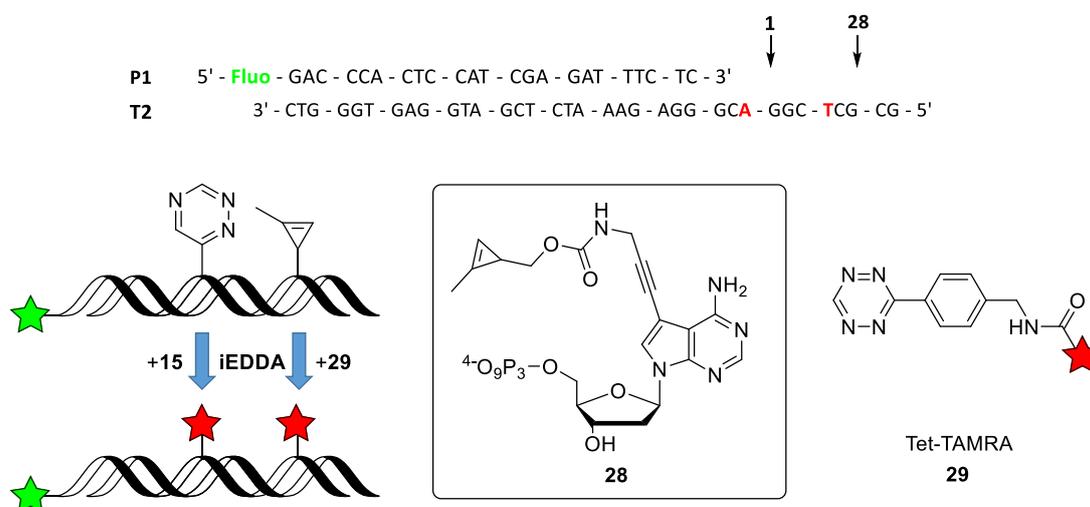
Die Kombination verschiedener bioorthogonaler Reaktionen ist von großem Interesse, stellt aber gleichzeitig eine besondere Herausforderung dar. Um beispielsweise für die optimierte molekulare Bildgebung Energietransfer-Systeme zu nutzen, ist das spezifische Einbringen von mindestens zwei verschiedenen Fluorophoren erforderlich. Werden hierbei geeignete Donor- und Akzeptorfluorophore gewählt und an einem Biomolekül angebracht, so werden dadurch Analysen mittels Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie möglich.<sup>[168-169]</sup>

Eine Möglichkeit stellt die Kombination aus iEDDA und SPAAC dar. So konnten *Prescher et al.* durch das Einbringen eines Cyclopropens und eines Azids diese beiden Reaktionen nutzen, um Kohlenhydrate auf Zelloberflächen orthogonal zu markieren.<sup>[49]</sup> Eine Schwierigkeit bei solchen Kombinationen stellt die Kreuzreaktivität von Cyclooctinen dar, da diese nicht nur Cycloadditionen mit Aziden (SPAAC), sondern auch mit geeigneten Dienen (iEDDA) eingehen können.<sup>[170]</sup> Für die Zweifachmarkierung von Proteinen mittels Hochauflösungs- Mikroskopie haben *Lemke et al.* zwei iEDDA-Reaktionen kombiniert, indem die unterschiedliche Reaktivität von methylsubstituierten und unsubstituierten Tetrazinen ausgenutzt wurde.<sup>[63]</sup> Dies stellt jedoch keine vollständige Orthogonalität dar, weswegen die Zweifachmarkierung sequenziell durchgeführt werden muss. Die duale Markierung von Nukleinsäuren hingegen konnte bisher nur unter Beteiligung der kupferkatalysierten Cycloaddition verwirklicht werden. So konnte die *Carell*-Gruppe DNA mit einem terminalen Alken und Alkin modifizieren und beide Bausteine gleichzeitig für bioorthogonale Reaktionen nutzen.<sup>[171]</sup> Diese Kombination fand bisher jedoch keine Anwendung für die Bildgebung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Eine Dreifachmarkierung mit Fluorophoren erreichten sie schließlich durch terminale Alkine. Diese trugen unterschiedliche Schutzgruppen, welche selektiv gespalten werden können und damit eine sequenzielle Markierung erlaubten.<sup>[172]</sup> Aufgrund der vielen konsekutiven Schritte und der benötigten Chemikalien scheint diese Kombination jedoch nicht geeignet für biologische Anwendungen. Ebenfalls eine Dreifachmarkierung wurde von *Jäschke et al.* durch die Kombination aus CuAAC, SPAAC und iEDDA erreicht.<sup>[173]</sup>

Um eine kupferfreie Methode zur dualen Markierung von Oligonukleotiden zu entwickeln, wurde das zuvor erwähnte Cyclopropen ausgewählt. Hierbei handelt es sich um eine kleine Modifikation, welche eine gute Akzeptanz durch Polymerasen zeigt und zudem mit

akzeptabler Geschwindigkeit eine hohe Markierungsausbeute erreicht (Vergleich Kapitel 3.2.1). Die wohl wichtigste Eigenschaft liegt jedoch in der Orthogonalität zu den Triazinen.<sup>[81]</sup> So stellen Cyclopropene zwar reaktive Reaktionspartner für Tetrazine, nicht aber für die weniger reaktiven Triazine dar. Folglich sollten diese beiden Bausteine in zwei orthogonalen iEDDA einsetzbar sein. Das in dieser Arbeit verwendete dATP-Analogon **28** trägt eine 1-Methylcyclopropenfunktion in der 7-Position. Dieses artifizielle Nukleotid wurde von *Damian Ploschik* synthetisiert, in Bezug auf seine Funktion als bioorthogonaler Reporter untersucht<sup>[53, 174]</sup> und für die folgenden Experimente zur Verfügung gestellt. Dabei konnte er zeigen, dass dieser Baustein unter physiologischen Bedingungen effizient von DNA-Polymerasen umgesetzt wird und hohe Markierungsausbeuten von bis zu 90 % durch den Einsatz eines tetrazinmodifizierten Tetramethylrhodamins (TAMRA) erreicht.

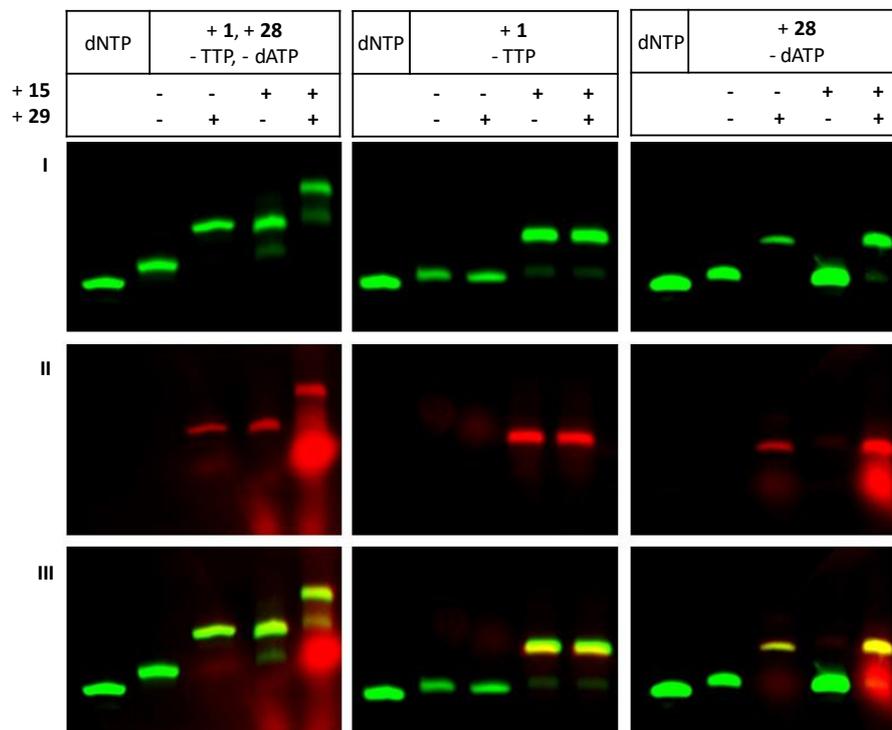
Für den orthogonalen Einbau des triazinmodifizierten dUTP-Analogons **1** sowie des cyclopropenmodifizierten dATP-Analogons **28** wurde erneut das Templat **T2** gewählt, welches für beide Bausteine jeweils eine Einbauposition aufweist (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Übersicht für den dualen Einbau von **1** und **28** in den fluoreszenmarkierten Primer **P1** komplementär zum Templat **T2**. Die bioorthogonale Markierung des Triazins wurde mit BCN-Rhodamin **15**, die des Cyclopropens mit dem dargestellten tetrazinmodifizierten TAMRA **29** durchgeführt.

Da die Vent (exo-)DNA-Polymerase nicht nur **1** sondern auch **28** effizient als Substrat eingebaut hat,<sup>[53]</sup> wurde sie für die folgenden Experimente ebenfalls verwendet. Dabei wurde eine Verlängerungszeit von 30 min bei 37 °C gewählt. Die PAGE-Analyse der anschließenden bioorthogonalen Markierung der doppelt modifizierten DNA ist in Abbildung 22 dargestellt.

Als Vergleich für die Analyse der Markierungsversuche wurden analoge Experimente mit den jeweils einfachmodifizierten Oligonukleotiden (nur **1** oder nur **28**) durchgeführt.



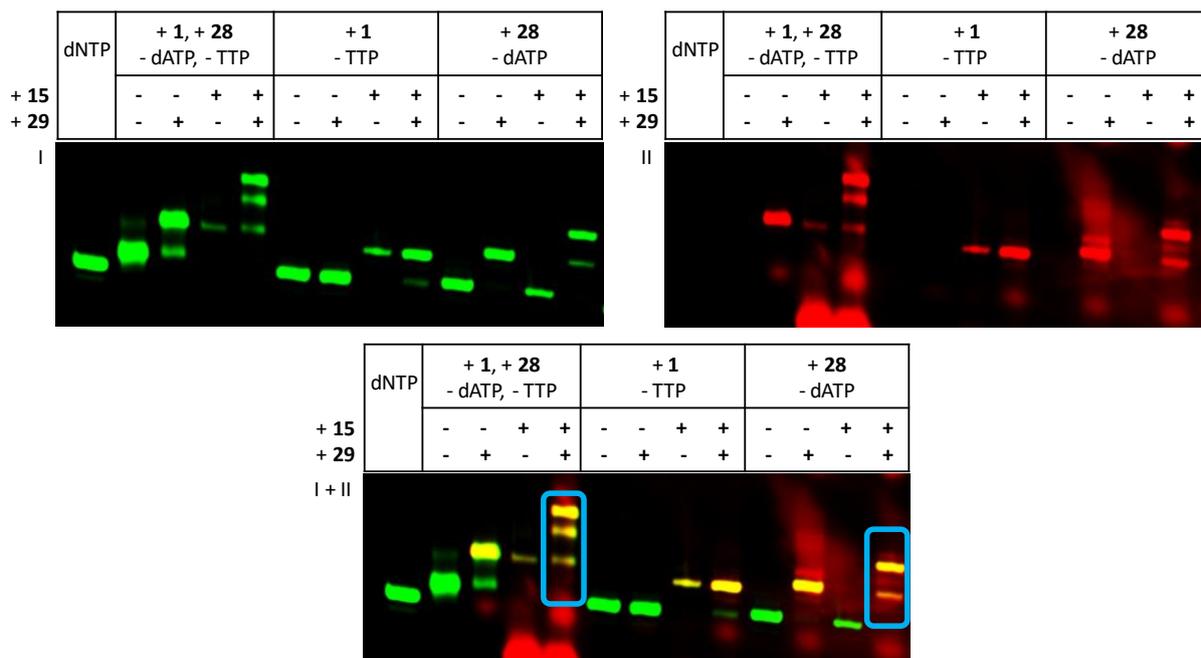
**Abbildung 22:** PAGE-Analyse der bioorthogonalen Markierung verschiedener Oligonukleotide (**P1/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, unter Verwendung verschiedener Triphosphatmischungen mit **1** und/oder **28** in Kombination mit den restlichen natürlichen dNTPs) mit BCN-Rhodamin **15** (30 min) und anschließend/oder Tetrazin-TAMRA **29** (15 min). „dNTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (I) Fluorescein-Emission (grün):  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ; (II) Rhodamin-/TAMRA-Emission (rot):  $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ ; (III) Überlagerung von I und II. Bei Anwesenheit beider Signale (grün und rot) entsteht gelb als Mischfarbe.

Bei alleinigem Einbau von **1** (Abbildung 22, Mitte) ist das Markierungsprodukt mit **15** als zusätzliche Bande mit Emission im grünen als auch im roten Kanal sichtbar. Bei Inkubation mit **29** ist hingegen keine neue Bande sichtbar, da es sich bei Tetrazinen und Triazinen um keine reaktive Kombination handelt. Die Zugabe von **29**, zusätzlich zu **15**, verursachte keinen Unterschied, wodurch deutlich wird, dass hier keine Kreuzreaktivität vorhanden ist. Wurde nur **28** eingebaut (Abbildung 22, rechts), so zeigt sich ein vergleichbares Resultat. Durch Zugabe von **29** konnte eine neue Gelbande beobachtet werden, weshalb die erfolgreiche Markierung des Cyclopropens mit dem Tetrazin angenommen werden kann. Das daraus resultierende Konjugat wurde analog zu dem Vorgehen für die Rhodamin-Konjugate **1<sup>Rh</sup>** und

**2<sup>Rh</sup>** nachgewiesen (Abbildungen A9 und A16, Kapitel 7.6). Die Inkubation der mit **28** modifizierten DNA mit **15**, zusätzlich zu **29**, führte zu keiner Veränderung in der PAGE-Analyse.

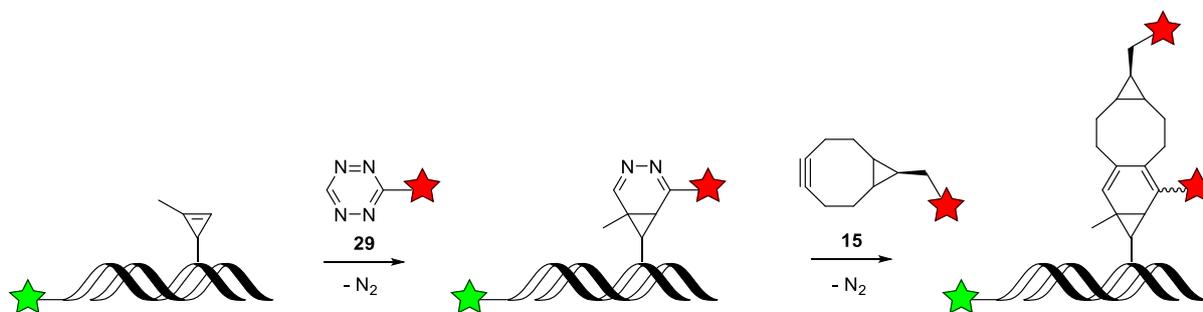
Das doppelt modifizierte Oligonukleotid zeigt analog zu den jeweils einzeln modifizierten einen leichten Unterschied in der gelelektrophoretischen Mobilität relativ zum unmodifizierten Strang. Dieser Sachverhalt lässt bereits auf einen erfolgreichen Einbau beider Modifikationen schließen. In der PAGE-Analyse ist für die zweifach funktionalisierte DNA (Abbildung 22, links) nur eine neue Bande mit geringerer Mobilität erkennbar, wenn diese nur mit **15** oder nur mit **29** inkubiert wurde. Diese Banden weisen zusätzlich zur Fluorescein-Emission auch eine kolokalisierte Rhodamin- bzw. TAMRA-Emission auf und werden deshalb als die jeweiligen einfach markierten Produkte angesehen. Ein Vergleich mit den Experimenten der einzeln modifizierten DNA-Stränge zeigt, dass die Effizienz der jeweiligen Markierungsreaktion durch die Anwesenheit der zweiten Modifikation nicht beeinträchtigt wurde. Nach der Inkubation der zweifach markierten DNA mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen konnte eine weitere Bande mit noch geringerer Gelmobilität erhalten werden, welche dem doppelt markierten Oligonukleotid zugeordnet werden kann. Die Effizienz beider bioorthogonaler Reaktionen, selbst in Kombination miteinander, wird dadurch unterstrichen, dass diese Fluorescein-Bande aufgrund ihrer Intensität als das Hauptprodukt angesehen werden kann.

Dennoch ist es notwendig zu erwähnen, dass für diese effiziente Doppelmarkierung, wie sie in Abbildung 22 dargestellt ist, die Zugabereihenfolge der Kupplungspartner eine zentrale Rolle spielt. Wurde die Konjugation entgegen dem zuvor beschriebenen Vorgehen zuerst mit dem Tetrazin **29** und anschließend mit dem BCN **15** durchgeführt, so wurden zusätzliche Gelbanden erhalten. Die entsprechende PAGE-Analyse ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23:** PAGE-Analyse der bioorthogonalen Markierung verschiedener Oligonukleotide (**P1/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, unter Verwendung verschiedener Triphosphatmischungen mit **1** und/oder **28** in Kombination mit den restlichen natürlichen dNTPs), mit Tetrazin-TAMRA **29** (15 min) und anschließend/oder BCN-Rhodamin **15** (30 min). „dNTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (I) Fluorescein-Emission:  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ; (II) Rhodamin-/TAMRA-Emission:  $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ .

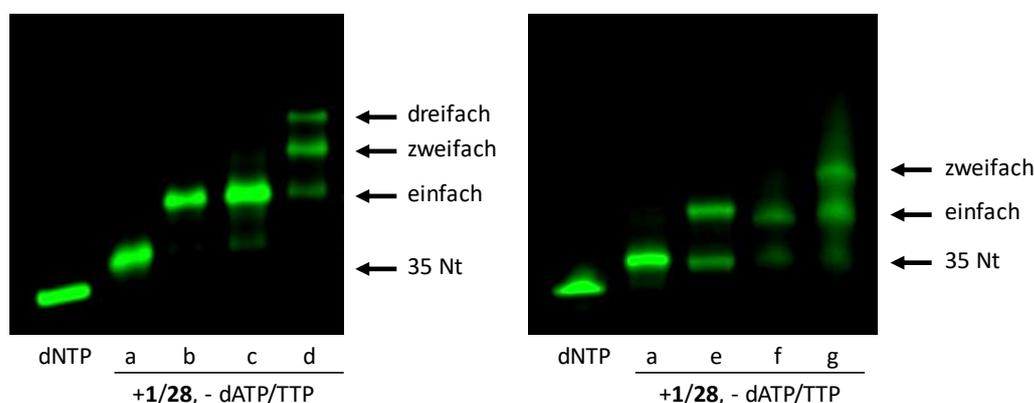
Für die Inkubation der doppelt modifizierten DNA mit beiden Farbstoffen ist sowohl im grünen als auch im roten Emissionskanal eine dritte neue Gelbande erkennbar, obwohl nur zwei Markierungsprodukte zu erwarten wären. Ebenso ist eine zusätzliche zweite Gelbande durch die Inkubation der mit **28** modifizierten DNA sichtbar. Auffällig ist, dass die Zugabereihenfolge der Reaktionspartner keinerlei Einfluss auf die Markierung der lediglich mit **1** modifizierten DNA zeigt. Aufgrund dessen wurde eine Hypothese für den zugrundeliegenden Mechanismus der Bildung eines weiteren Konjugationsproduktes aufgestellt (Schema 26).



**Schema 26:** Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung eines zusätzlichen Konjugationsproduktes durch Reaktion der Cyclopropeneinheit mit den Tetrazin- und BCN-modifizierten Farbstoffen **15** und **29**.

Hierbei wird zunächst durch Reaktion zwischen der Cyclopropen- und der Tetrazineinheit ein Dihydropyridazinderivat gebildet. Da dieses wiederum ein Dien darstellt, wäre eine nachfolgende zweite Diels-Alder-Cycloaddition mit der BCN-Funktionalität unter erneuter Stickstoffabspaltung denkbar. Um diesen postulierten Mechanismus zu bestätigen, wurde das Triphosphat **28** mit den beiden Farbstoffen **15** und **29** zur Reaktion gebracht. Die massenspektrometrische Untersuchung konnte die Bildung des doppelten Konjugats nachweisen (siehe Abbildung A10, Kapitel 7.6.2). Zur weiteren Untersuchung wurden analog zu **1<sup>Rh</sup>** PEX-Experimente mit diesem Konjugat durchgeführt. Ein Einbau des doppelten Konjugats war allerdings, selbst durch den Einsatz der KOD XL-DNA-Polymerase, nicht erfolgreich, was auf den enormen sterischen Anspruch der Modifikation zurückzuführen ist (Abbildung A16, Kapitel 7.6.3).

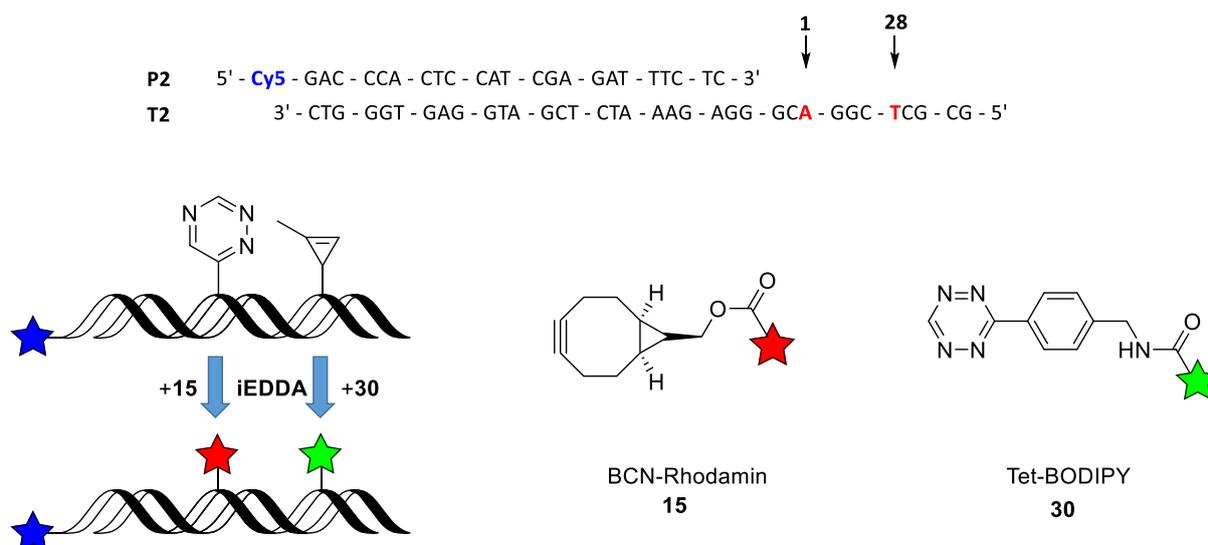
Um den gezeigten Mechanismus genauer zu untersuchen, wurden weitere Markierungsexperimente mit der doppelt modifizierten DNA durchgeführt. Hierfür wurden unterschiedliche Zugabereihenfolgen für die duale Markierung getestet und der überschüssige Farbstoff aus der ersten Reaktion jeweils vor der zweiten Markierung durch einen Entsalzungsschritt entfernt. Die gelelektrophoretische Auswertung der Fluorescein-Emission ist in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24:** PAGE-Analyse zur Untersuchung der Nebenreaktion der doppelten Markierung durch unterschiedliche Zugabereihenfolgen und zwischengeschaltete Entsalzungsschritte. Gezeigt ist der Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ). „dNTP“: mit natürlichen dNTPs verlängerter **P1**. „+1/28,-dATP/TTP“: entsalztes PEX-Produkt (**P1/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min mit **1**, **28**, dGTP und dCTP). Gezeigt ist das unbehandelte PEX-Produkt (a) sowie die Markierung zuerst mit **29** für 15 min (b), mit anschließendem Entsalzen (c) und der nachfolgenden Inkubation mit **15** für 30 min (d); bzw. in umgekehrter Reihenfolge (e, f und g).

Wurde die DNA lediglich mit Tetrazin **29** (b) oder BCN **15** (e) inkubiert, so wurde nur eine neue Gelbande erhalten, welche der einfach markierten DNA entspricht. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, ob anschließend ein Entsalzungsschritt folgte oder nicht (Vergleich b mit c bzw. e mit f). Wenn die DNA zuerst mit **29** markiert, entsalzt und schließlich mit **15** inkubiert wurde, zeigt die PAGE-Analyse zwei zusätzliche Gelbanden, welche auf das zweifach und „dreifach“ markierte Oligonukleotid zurückzuführen sind (d). In der umgekehrten Reihenfolge, in der zuerst die Markierung mit **15** und nach anschließendem Entsalzen die zweite Reaktion mit **29** durchgeführt wurde, ist dieses zusätzliche Produkt nicht erkennbar (g). In diesem Fall wurde der überschüssige BCN-Farbstoff **15** bereits entfernt bevor das Konjugat aus Cyclopropan und Tetrazin im zweiten Markierungsschritt gebildet werden konnte. Dieses Resultat bestätigt den in Schema 26 vorgestellten Mechanismus, indem das zusätzliche Produkt ausschließlich durch Reaktion des BCNs mit dem zuvor gebildeten Tetrazin-Cyclopropan-Konjugat entstehen kann.

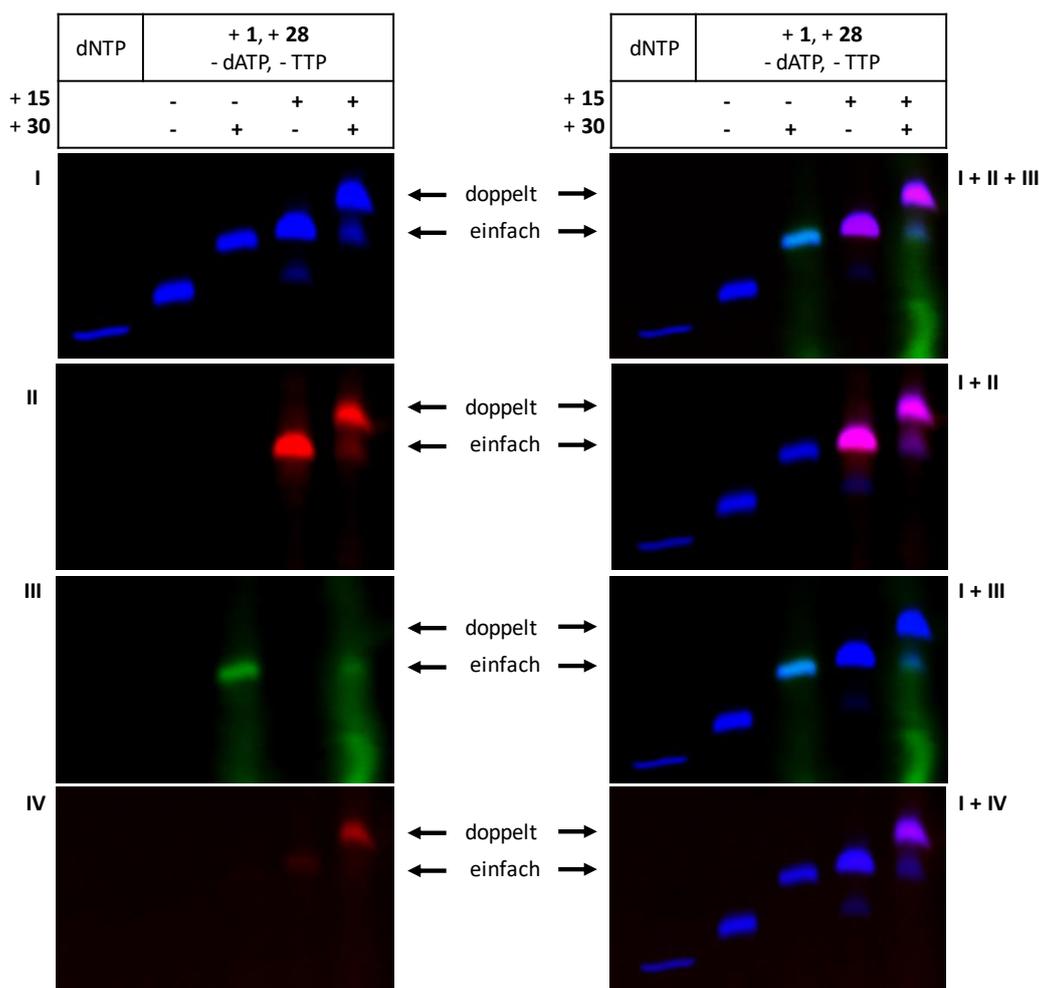
Durch diese Untersuchungen konnte die duale Markierung von DNA mittels zweier verschiedener Modifikationen erreicht werden. Dennoch erlaubt die Kombination aus einem Rhodamin (**15**) und TAMRA (**29**) aufgrund ihrer ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften keine Unterscheidung in der PAGE-Analyse. Um dieses Problem zu lösen, wurde als Reaktionspartner für das Cyclopropan der tetrazinmodifizierte BODIPY-Farbstoff **30** verwendet. Da dieser wiederum ein ähnliches Emissionsmaximum wie das verwendete Fluorescein des Primers **P1** aufweist, wurde für die folgenden Experimente der Primer **P2** mit einem Cy5 als 5'-Modifikation verwendet (Abbildung 25). Dieser Farbstoff emittiert im dunkelroten Bereich, wird im Folgenden jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit in blau dargestellt.



**Abbildung 25:** Übersicht des Systems für den dualen Einbau von **1** und **28** mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen: Cy5 (blau) als 5'-Modifikation des Primers **P2**, BCN-Rhodamin **15** (rot) als Reaktionspartner für das Triazin und Tetrazin-BODIPY **30** (grün) als Reaktionspartner für das Cyclopropen.

Die enzymatische Synthese mit dem Primer **P2** wurde analog zu den vorherigen Experimenten mit **P1** durchgeführt und das erhaltene PEX-Produkt entsalzt. Die anschließenden Markierungsexperimente wurden entsprechend den vorherigen Ergebnissen zuerst mit dem BCN-Rhodamin **15** und, nach Entfernen des überschüssigen Farbstoffs, mit dem Tetrazin-BODIPY **30** durchgeführt. Die entsprechende PAGE-Analyse dieser bioorthogonalen Markierung der doppelt modifizierten DNA ist in Abbildung 24 dargestellt. Die entsprechenden Kontrollexperimente mit den nur einfach modifizierten Oligonukleotiden können Abbildung A17 (Kapitel 7.6.3) entnommen werden.

Auch für den Primer **P2** ist eine geringere gelelektrophoretische Mobilität erkennbar, wenn anstelle der natürlichen Triphosphate TTP und dATP die Bausteine **1** und **28** für die Verlängerung verwendet wurden. Dies entspricht den Erwartungen aufgrund der bisherigen Ergebnisse mit dem fluoresceinmarkierten Primer **P1**.



**Abbildung 26:** PAGE-Analyse der bioorthogonalen Markierung der doppelt modifizierten DNA (**P2/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min mit **1**, **28**, dGTP und dCTP) mit **15** (30 min) und anschließend/oder **30** (15 min). „dNTP“: Volllängenprodukt mit natürlichen dNTPs (35 Nt). (I) Cy5:  $\lambda_{\text{exc}} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm}$ ; (II) Rhodamin:  $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ ; (III) BODIPY:  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ; (IV) BODIPY:  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$ . Bei Überlagerung der jeweiligen Kanäle entstehen gemischte Farben für übereinanderliegende Signale: magenta für Cy5 (blau) + Rhodamin (rot); cyan für Cy5 + BODIPY (grün). Die entsprechenden Kontrollexperimente mit den einfach modifizierten Oligonukleotiden können Abbildung A17 (Kapitel 7.6.3) entnommen werden.

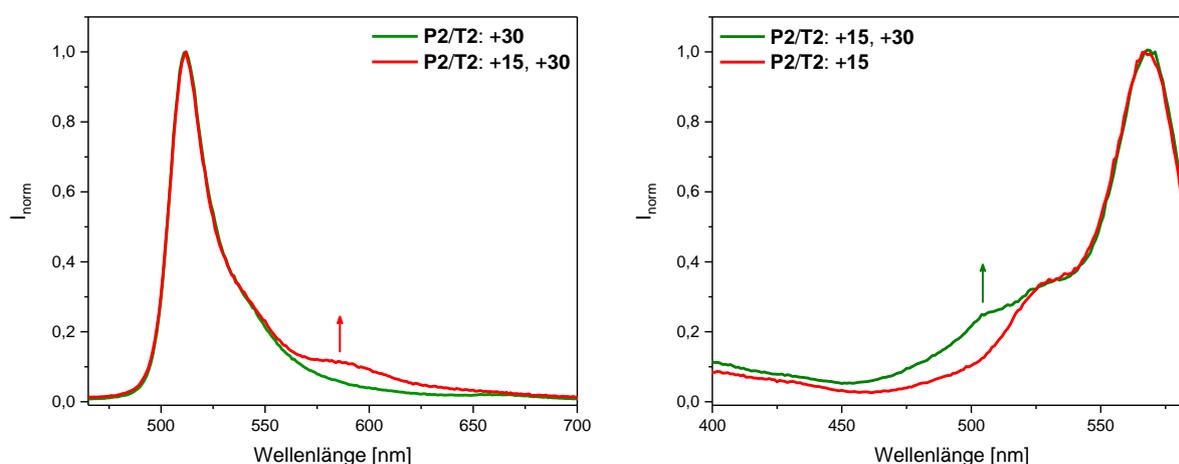
Wurde die bioorthogonale Markierung nur mit einem der beiden Farbstoffe durchgeführt (**15** oder **30**), so ist jeweils eine neue Bande mit geringerer Gelretention erkennbar. Da diese zusätzlich zur Cy5-Emission auch die des jeweiligen Farbstoffes zeigen, kann angenommen werden, dass es sich um das jeweilige einfach markierte Produkt handelt. In beiden Fällen kann analog zu den Experimenten mit **P1/T2** eine sehr hohe Ausbeute für die Markierung beobachtet werden. Die Konjugation von **28** mit dem neuen Tetrazin-BODIPY **30** wurde analog zu der mit dem Tetrazin-TAMRA **29** massenspektrometrisch nachgewiesen (Abbildung A11, Kapitel 7.6.2) und das erhaltene Konjugat erfolgreich in PEX-Experimenten eingesetzt

(Abbildung A16, Kapitel 7.6.3). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es sich bei der durch die Markierung erhaltenen Gelbande tatsächlich um das gewünschte Farbstoff-DNA-Konjugat handelt.

Die orthogonale duale Markierung mit beiden Farbstoffen (**15** und **30**) resultierte in zwei neuen Gelbanden mit geringerer Laufhöhe im Cy5-Kanal. Die niedrigere Bande zeigt eine Emission sowohl im Cy5-Kanal als auch im Rhodamin- und BODIPY-Kanal. Daher kann angenommen werden, dass es sich um ein Gemisch aus einfach markierten Oligonukleotiden mit entweder **15** oder **30** handelt. Die obere Bande zeigt nicht nur im Cy5-, sondern auch im Rhodamin-Kanal, eine deutliche Fluoreszenz. Obwohl aufgrund der gelelektrophoretischen Charakteristik nahe liegt, dass es sich um das zweifach markierte Produkt handelt, kann eine entsprechende Fluoreszenz im BODIPY-Kanal nicht beobachtet werden. Da die Emission des BODIPY und die Absorption des Rhodamins eine hohe Überlappung besitzen, wäre hier prinzipiell ein Energietransfer als Grund für die fehlende BODIPY-Fluoreszenz denkbar. Ein wichtiger Aspekt in Bezug auf einen erfolgreichen Energietransfer spielt die räumliche Nähe des Donors und Akzeptors. Für vergleichbare BODIPY-Rhodamin-Paare ist in der Literatur ein Förster-Radius von 55 Å zu finden.<sup>[175-177]</sup> Da die beiden Modifikationen im eingesetzten Primer-Templat-Paar durch drei Basen voneinander getrennt sind und der helikale Abstand zwischen benachbarten Basen in der DNA 3.4 Å beträgt, ergibt sich hieraus ein Gesamtabstand von ca. 13.6 Å. Folglich sollte, selbst im denaturierten linearen Zustand des doppelt markierten Oligonukleotids, ein FRET zwischen dem BODIPY und Rhodamin möglich sein. Um dies schließlich zu testen, wurde das Gel im Anregungsbereich des BODIPYs (470 nm) angeregt. Die nachfolgende Aufnahme der Emission erfolgte bei 605 nm, folglich außerhalb der BODIPY- aber innerhalb der Rhodamin-Emission (Zeile IV). In diesem Fall kann eine deutliche Fluoreszenz des Rhodamin-Fluorophors beobachtet werden, welche der oberen Bande entspricht, wie aus der Überlagerung mit dem Cy5-Kanal ersichtlich ist. Diese Befunde unterstützen die Hypothese eines Energietransfers von dem BODIPY-Farbstoff als Donor auf das Rhodamin als Akzeptor und erklären die fehlende BODIPY-Fluoreszenz im doppelt markierten Oligonukleotid. Darüber hinaus unterstreicht diese Beobachtung die Annahme, dass es sich bei der oberen Bande um das doppelte Markierungsprodukt handelt, da nur in diesem Fall beide Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander vorliegen und ein Energietransfer möglich sein sollte. Ein intermolekularer Energietransfer scheint hingegen unwahrscheinlich,

da im Gemisch der beiden einfachmarkierten Oligonukleotide, wie im Fall der unteren Bande, keine entsprechende Beobachtung gemacht werden konnte.

Um nun den Energietransfer zwischen Rhodamin und BODIPY weiter zu charakterisieren, wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen, welche in Abbildung 27 gezeigt sind. Für die spektroskopische Untersuchung wurden zusätzlich nach den erfolgten Markierungen Entsalzungsschritte durchgeführt, um möglichst viel des überschüssigen Farbstoffes zu entfernen. Allerdings konnte durch dieses Vorgehen keine vollständige Reinigung erreicht werden, so dass die Proben noch Reste des freien Farbstoffes beinhalten.

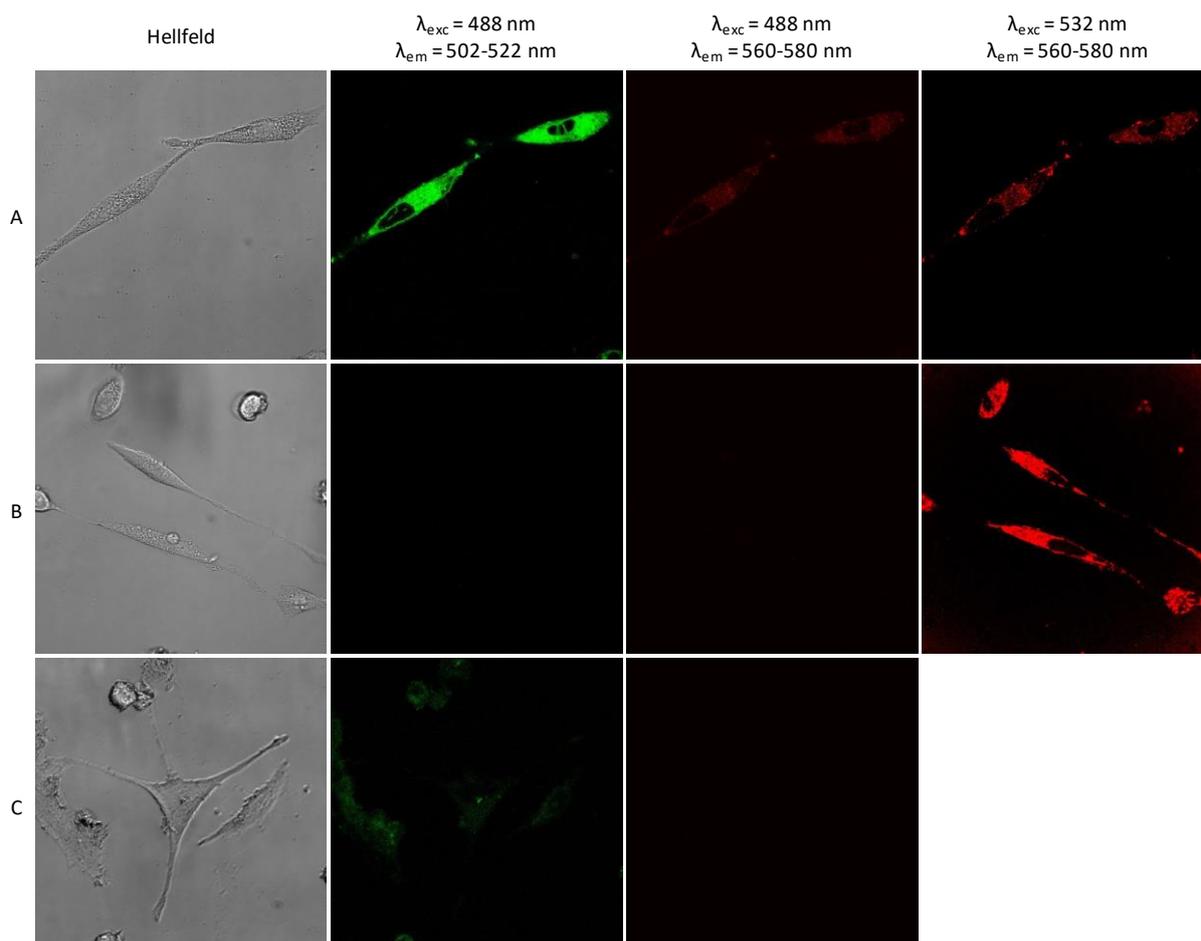


**Abbildung 27:** Fluoreszenz der doppelt modifizierten DNA (P2/T2) nach der einfachen Markierung mit **15** oder **30**, bzw. der doppelten Markierung mit **15** und **30**, aufgenommen in Wasser. Links: normierte Emission,  $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ . Rechts: normierte Anregungsspektren,  $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ .

Eine Anregung des BODIPY-Farbstoffes bei 450 nm zeigt die erwartete Emission mit einem Maximum bei 512 nm für die einfach markierte DNA (nur BODIPY **30**). Im Fall der doppelt markierten DNA (BODIPY **30** und Rhodamin **15**) ist diese Emission ebenfalls sichtbar, jedoch erscheint zusätzlich eine Schulter im Bereich um 585 nm, was dem Emissionsmaximum des Rhodamins entspricht. Eine weitere Bestätigung für diesen Energietransfer findet sich im Vergleich der Anregungsspektren. Hierbei zeigte sich, dass im Fall der doppelt markierten DNA die für Rhodamin typische Fluoreszenz bei 600 nm im Vergleich zur einfach markierten DNA (nur Rhodamin **15**) bereits mit kurzwelligerem Licht außerhalb des eigentlichen Absorptionsbereichs des Rhodamins hervorgerufen wird. Da die entsprechenden PAGE-Analysen (Abbildung 26) hohe Ausbeuten der einzelnen sowie der doppelten Markierungen

gezeigt haben, ist die geringe Effizienz des in den Fluoreszenzmessungen beobachteten Energietransfers vermutlich auf die Anwesenheit freien Farbstoffs zurückzuführen, welcher aufgrund mangelnder räumlicher Nähe in der Verdünnung der Messprobe keinen Energietransfer eingeht.

Ein solcher Energietransfer zwischen den beiden für die Markierung verwendeten Farbstoffen ist ein interessanter Aspekt in Bezug auf die molekulare Bildgebung, insbesondere für *in vivo* Anwendungen. Die Detektion eines Farbstoffpaares mittels Energietransfer, welcher nur im Fall einer erfolgten doppelten bioorthogonalen Markierung zustande kommt, eröffnet prinzipiell die Möglichkeit einer Reduktion von störenden Hintergrundsignalen. Um diesen möglichen Einsatz in der Zellbiologie weiter zu untersuchen, wurden die doppelt sowie die jeweils einzeln markierten Oligonukleotide in *HeLa*-Zellen transfiziert. Die erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 28 dargestellt.



**Abbildung 28:** Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von *HeLa*-Zellen, transfiziert mit der doppelt modifizierten DNA (P2/T2), welche vorab entweder sowohl mit BCN-Rhodamin **15** als auch mit Tetrazin-BODIPY **30** (A), nur mit **15** (B) oder nur mit **30** (C), entsprechend dem zuvor beschriebenen Vorgehen, markiert wurde.

Die Zellbilder der mit der doppelt markierten DNA transfizierten Zellen (A) zeigen die BODIPY-Fluoreszenz (502-522 nm) durch eine Anregung bei 488 nm sowie die Rhodamin-Fluoreszenz (560 – 580 nm) bei Anregung mit einer Wellenlänge von 532 nm. Darüber hinaus kann die Rhodamin-Fluoreszenz auch durch Anregung bei 488 nm beobachtet werden, was auf den zuvor beschriebenen Energietransfer zurückzuführen ist. In den Kontrollexperimenten, in denen die DNA jeweils nur mit einem der beiden Farbstoffen markiert wurde (B: Rhodamin **15**, C: BODIPY **30**), kann nur die jeweilige Fluoreszenz des eingesetzten Farbstoffes beobachtet werden. So ist die Rhodamin-Fluoreszenz (B) lediglich im entsprechenden Emissionsbereich (560 – 580 nm) durch Anregung bei 532 nm, nicht aber bei 488 nm sichtbar. Ebenso kann die BODIPY-Fluoreszenz (C) nur durch Anregung bei 488 nm hervorgerufen werden, wobei keine Emission im Bereich 560 – 580 nm zu beobachten ist. Dies zeigt deutlich, dass der durch die PAGE-Analysen und die Fluoreszenzspektroskopie angedeutete Energietransfer vom BODIPY auf das Rhodamin auch in lebenden Zellen beobachtet werden kann.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines Triazins mit einem Cyclopropen geeignet ist für die duale orthogonale bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren. Durch die Wahl der verwendeten Markierungspartner konnte zudem durch die selektive Doppelmarkierung ein Energietransferpaar kovalent mit der DNA verknüpft werden, welches ein hohes Potential für die molekulare Bildgebung in lebenden Zellen besitzt.

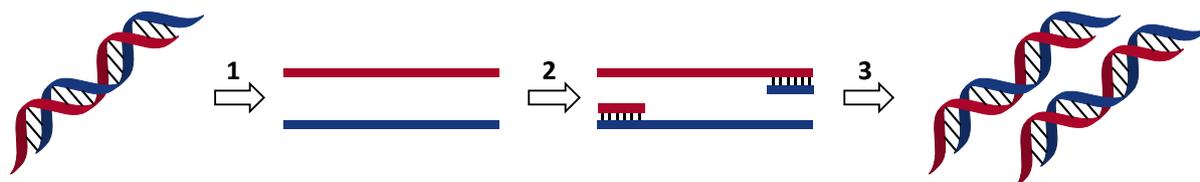
### 4.4 PCR-Experimente

Die enorme Bedeutung der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die Biochemie ist nicht zuletzt an der Verleihung des Nobelpreises für Chemie an ihren Erfinder Kary Mullis im Jahre 1993 zu erkennen.<sup>[178]</sup> Sie ermöglicht es Millionen von Kopien eines einzigen DNA-Stranges in kürzester Zeit zu generieren, wodurch in der Biologie und Medizin beispielsweise die Erkennung von genetischen Krankheiten vorangetrieben wurde.

Um eine effiziente Anwendung eines bioorthogonalen Reporters für die Markierung *in vivo* zu erreichen, ist es wichtig, dass dieser vom gesamten biologischen System toleriert wird (siehe Kapitel 3). Für modifizierte Nukleoside zählt dazu nicht nur die Akzeptanz der Polymerasen für den Einbau in die DNA, sondern auch für die folgenden biosynthetischen Schritte, in diesem Fall die Replikation und Transkription. Die PCR stellt dabei ein geeignetes Experiment dar, um

die Funktionsfähigkeit des modifizierten Bausteins als Templat für die DNA-Polymerase zu untersuchen. Sobald das artifizielle Triphosphat einmal in einen DNA-Strang eingebaut wurde, muss die DNA-Polymerase für eine erfolgreiche Amplifikation dieses als Matrize für die weiteren Verlängerungen erkennen.

Für PCR-Experimente wird ein zyklischer Ablauf verwendet, wie er schematisch in Abbildung 29 dargestellt ist.



**Abbildung 29:** schematische Darstellung eines einzelnen PCR-Zyklus bestehend aus den folgenden Schritten: 1. Denaturieren des Doppelstranges, 2. Anlagerung des Primers, 3. Verlängerung des Primers in 5'-3'-Richtung.

Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen dehybridisiert. Im zweiten Schritt werden komplementäre Primer an die einzelsträngige DNA angelagert und schließlich enzymatisch durch DNA-Polymerasen in 5'-3'-Richtung verlängert. Diese Schritte entsprechen prinzipiell denen der Primerverlängerungsexperimente und werden im Gegensatz dazu solange wiederholt, bis die gewünschte Vervielfältigung der DNA erfolgt ist. Durch die Verdopplung der DNA-Stränge mit jedem Zyklus kann eine exponentielle Amplifikation erreicht werden.

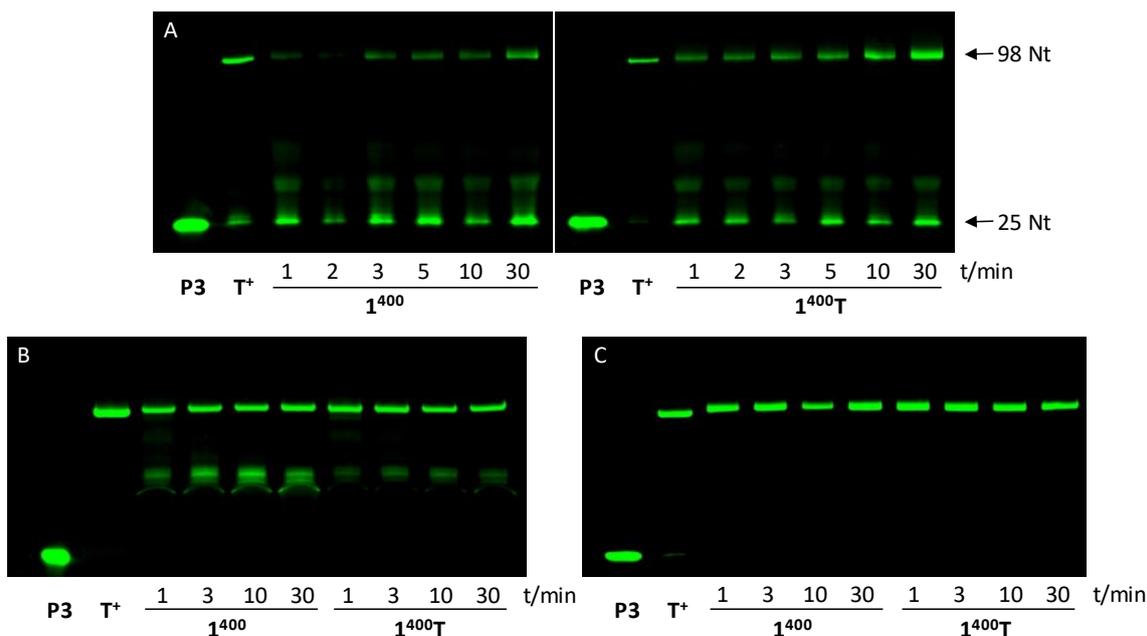
### 4.4.1 Triazinmodifizierte Triphosphate für die DNA-Amplifikation

Da PCR-Experimente ein zyklisches Verfahren darstellen, müssen alle Bestandteile bereits zu Beginn gemischt werden und unter den verwendeten Bedingungen stabil sein. Zunächst wurde ein Testexperiment durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Triazinmodifikation mit den verwendeten Temperaturbereichen von bis zu 95 °C für die Dehybridisierung kompatibel ist. Hierfür wurden PEX-Experimente mit dem zuvor verwendeten Primer-Templat-Paar **P1/T2** unter PCR-typischen Temperaturbedingungen durchgeführt: 3 min bei 95 °C zur Dehybridisierung, 1 min bei 53 °C zur Anlagerung des Primers und schließlich 1 min bei 72 °C für die Verlängerung des Primers. Das resultierende PEX-Produkt wurde entsalzt, mit BCN-Rhodamin **15** markiert und mittels PAGE analysiert (Abbildung 30). Dabei konnte eine Gelbande mit der typischen Fluoreszenz des Fluoresceins und Rhodamins, analog zu den



Für erste Experimente wurde das Templat **T8** in Kombination mit den fluoresceinmarkierten Primern **P3** (Rückwärtsprimer) und **P4** (Vorwärtsprimer) verwendet. Das Templat besitzt eine Länge von 98 Nukleotiden und wurde ausgewählt, da es bereits in der Literatur erfolgreich für PCR-Experimente mit artifiziellen Nukleotiden eingesetzt wurde.<sup>[139]</sup> Die Primersequenzen wurden ebenfalls hieran angelehnt, jedoch für eine bessere Visualisierung der Resultate entsprechend den PEX-Experimenten mit einem Fluorescein funktionalisiert.

Zuerst wurde untersucht, welche DNA-Polymerasen geeignet sind, um **1** in kurzer Zeit effizient in diese Sequenz einzubauen. Hierfür wurden Primerverlängerungen mit dem Templat **T8** und dem Rückwärtsprimer **P3** durchgeführt. Zum einen wurden die DNA-Polymerasen Hemo KlenTaq und KOD XL verwendet, da sie in der Literatur häufig für entsprechende Experimente eingesetzt werden. Zum anderen wurde die Vent (exo-)-DNA-Polymerase getestet, da mit ihr gute Resultate für die vorherigen PEX-Experimenten erzielt werden konnten. Für die vollständige Verlängerung von **P3** ist ein 21-facher Einbau des Bausteins **1** erforderlich. Dabei wurden zwei verschiedene Triphosphatmischungen getestet. Der Mix **1<sup>400</sup>** beinhaltet die natürlichen Triphosphate, wobei das natürliche TTP durch **1** substituiert wurde. Die Konzentration von **1** wurde im Vergleich zu den natürlichen Triphosphaten (je 200µM) verdoppelt (400 µM), um einen erfolgreichen Einbau zu fördern. Im Mix **1<sup>400T</sup>** ist zusätzlich natürliches TTP (50 µM) vorhanden, damit eine vollständige Verlängerung weiter begünstigt wird. Die PAGE-Analyse dieser Voruntersuchungen ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Primerverlängerungen mit der Vent (exo-)-DNA-Polymerase (Abbildung 32A) zeigen unter Verwendung des **1<sup>400</sup>**-Mixes nur eine geringe Menge des Vollängenproduktes und hauptsächlich unverlängerten Primer sowie Abbruchstränge. Durch Zugabe von natürlichem TTP (**1<sup>400T</sup>**) konnte die Effizienz der Verlängerung gesteigert werden, sodass nach einer Elongationszeit von 30 min zwar eine signifikante Menge an Vollängenprodukt, aber immer noch unverlängerter Primer erkennbar war. Die Ergebnisse mit der Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase (B) bestätigen diesen Trend, wobei auch hier selbst nach einer Verlängerungszeit von 30 min noch Abbruchstränge zu erkennen waren.

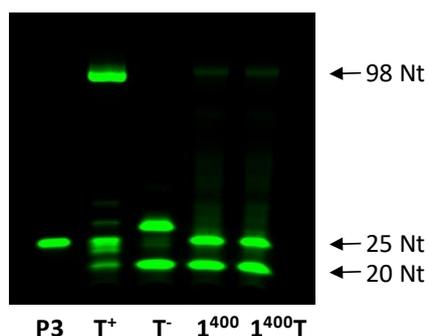


**Abbildung 32:** PAGE-Analyse der Primerverlängerung von **P3/T8** (1 min 95 °C, 1 min 53 °C, verschiedene Elongationszeiten bei 72 °C) mit den DNA-Polymerasen Vent (exo-) (A), Hemo KlenTaq (B) und KOD XL (C). „**T<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200 µM). „**1<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **1** (400 µM) und dATP, dGTP, dCTP (je 200 µM). „**1<sup>400</sup>T**“: analog zu **1<sup>400</sup>** + TTP (50 µM). Gezeigt ist der Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ .

Einzig die KOD XL-DNA-Polymerase (C) ermöglichte, selbst mit dem **1<sup>400</sup>**-Mix, bereits nach kurzer Elongationszeit von 1 min die vollständige Verlängerung des Primers. Dies zeigt einen effizienten Einbau von **1**, weshalb das Hinzufügen des natürlichen TTPs (**1<sup>400</sup>T**) zu keiner Veränderung führte und in diesem Fall nicht notwendig zu sein scheint.

Aufgrund dessen wurde die KOD XL-DNA-Polymerase für die folgenden PCR-Experimente ausgewählt. Um sicherzustellen, dass das verwendete PCR-Experiment grundlegend funktionstüchtig ist, wurden unter den jeweiligen Bedingungen Positiv- und Negativkontrollen erstellt. Während die Positivkontrolle (**T<sup>+</sup>**) alle natürlichen Triphosphate beinhaltet, fehlt in der Negativkontrolle (**T**) das natürliche TTP.

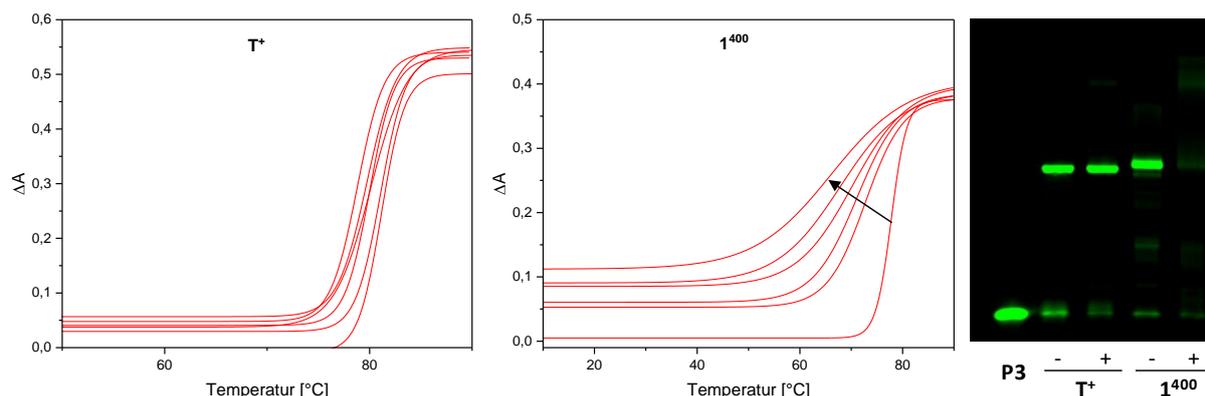
Zunächst wurde ein PCR-Experiment mit 30 Zyklen unter den zuvor getesteten Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde eine Elongationszeit von 3 min innerhalb der Zyklen gewählt, um möglichst eine vollständige Verlängerung sicherzustellen. Die Auswertung erfolgte mittels PAGE, welche in Abbildung 33 dargestellt ist.



**Abbildung 33:** PAGE-Analyse des PCR-Experiments mit **P3/P4/T8** (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C). „**T<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200 µM). „**T<sup>-</sup>**“: analog zu **T<sup>+</sup>** ohne TTP. „**1<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **1** (400 µM) und dATP, dGTP, dCTP (je 200 µM). „**1<sup>400</sup>T**“: analog zu **1<sup>400</sup>** + TTP (50 µM). Gezeigt ist der Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ .

Die Positivkontrolle zeigt eine Verlängerung beider eingesetzter Primer (**P3**: 25 Nt, **P4**: 20 Nt) und bestätigt damit die Funktionsfähigkeit des verwendeten PCR-Aufbaus. Die Negativkontrolle zeigt zwei Banden im Fluorescein-Kanal, wobei es sich bei der oberen um einen Abbruchstrang des verlängerten Primers **P3** handelt. Da hier weder TTP noch **1** zur Verfügung standen, wurde die Verlängerung in der Position komplementär zum ersten A abgebrochen. Dabei wurde keine Verteilung verschiedener Abbruchstränge, sondern eine homogene Bande erhalten, wodurch deutlich wird, dass kein Fehleinbau stattfindet. Die untere Bande entspricht dem eingesetzten Vorwärtsprimer **P4**, welcher nicht verlängert werden konnte, da kein Gegenstrang ausgehend von **P3** gebildet wurde. Für die Proben mit Baustein **1** konnte nur ein sehr geringes Fluoresceinsignal auf Höhe des Vollängenproduktes und ansonsten die Signale auf Höhe der beiden eingesetzten Primer detektiert werden. Dies zeigt eine Primerverlängerung in geringem Maße, ohne dass eine Amplifikation stattgefunden hat. Prinzipiell könnten dafür verschiedene Gründe in Betracht gezogen werden. Möglicherweise kann das triazinmodifizierte dU von der DNA-Polymerase nicht als Templat erkannt werden. In diesem Fall wären allerdings Abbruchstränge analog zu dem der Negativkontrolle zu erwarten. Des Weiteren könnte die Anlagerung des Primers an den mit Triazineinheiten verlängerten Gegenstrang problematisch sein, jedoch wären auch in diesem Fall Abbruchstränge zu erwarten. Da die erhaltenen Banden dieses PCR-Experiments die beiden unverlängerten Primer darstellen, scheinen diese Gründe nicht zutreffend. Des Weiteren wäre eine Veränderung der Schmelztemperatur denkbar, wodurch die verwendete Temperatur von 95 °C eventuell nicht ausreichend wäre, um das Templat und den neu

gebildeten Gegenstrang zu dehybridisieren. In einem solchen Fall wäre eine Amplifikation nicht erfolgreich und es würden trotzdem keine Abbruchstränge gebildet. Deshalb wurden Primerverlängerungen (**P3/T8**) mit **T<sup>+</sup>** und **1<sup>400</sup>** durchgeführt, entsalzt, um überschüssige dNTPs zu entfernen, und anschließend einer Schmelztemperaturanalyse unterzogen. Für den mit natürlichen dNTPs erhaltenen Duplex (**T<sup>+</sup>**) wurde eine Schmelztemperatur von 80 °C und für den mit **1** modifizierten Duplex eine von 78 °C ermittelt.

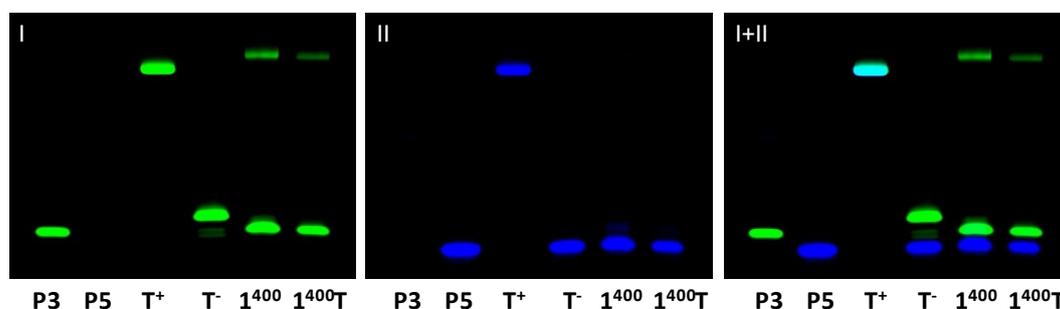


**Abbildung 34:** Schmelztemperaturanalyse der entsalzten PEX-Produkte (**P3/T8**, KOD XL, 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C) mit **T<sup>+</sup>** (nur natürliche dNTPs, je 200 μM) und **1<sup>400</sup>** (400 μM **1** und je 200 μM dATP, dGTP und dCTP) sowie die PAGE-Analyse dieser entsalzten PEX-Produkte vor (-) und nach (+) der Schmelztemperaturanalyse (Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ).

Bei Betrachtung der Schmelzkurven des triazinmodifizierten Doppelstranges (Abbildung 34) wird eine signifikante Veränderung der Absorption im Verlauf der Messungen deutlich. Die PAGE-Analyse beider Proben vor und nach der Schmelztemperaturanalyse zeigte zwar keine Veränderung der unmodifizierten (**T<sup>+</sup>**), aber der triazinmodifizierten DNA. Folglich scheint während der Mehrfachmessung des Schmelzverhaltens eine Veränderung in der triazinmodifizierten DNA stattzufinden. Für die Bestimmung der Schmelztemperatur dieser DNA wurde daher nur die erste Messung verwendet. Durch die erhaltenen Resultate konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der Triazineinheiten die Schmelztemperatur des Doppelstranges nicht erhöht. Folgerichtig kann eine unzureichende Dehybridisierung als Grund für die fehlende Amplifikation ausgeschlossen werden. Die Zersetzung der DNA und des verknüpften Fluoresceins während der Schmelztemperaturanalyse wurde aufgrund dessen nicht weiter untersucht.

Bei der Amplifikation schwieriger DNA-Sequenzen kann eine erhöhte  $\text{MgSO}_4$ -Konzentration von Vorteil sein. Daher wurden PCR-Experimente mit variierender  $\text{MgSO}_4$ -Konzentration durchgeführt und mittels PAGE analysiert (Abbildung A18, Kapitel 7.6.3). Durch dieses Vorgehen konnte jedoch keine Optimierung erreicht werden.

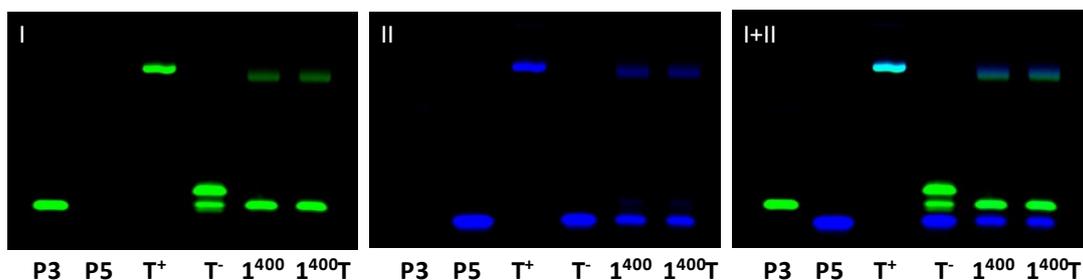
Ein weiterer der genannten möglichen Gründe für die ausbleibende Amplifikation betrifft die Funktionalität der triazinmodifizierten Nucleobase als Templat. Kann die DNA-Polymerase kein natürliches dATP gegenüber dieser artifiziellen Nucleobase einbauen, so wäre die Amplifikation nicht erfolgreich. Daher wurde der Cy5-modifizierte Vorwärtsprimer **P5** (im Folgenden in blau dargestellt) in Kombination mit dem fluoresceinmarkierten Rückwärtsprimer **P3** verwendet (Abbildung 35). Die Kombination dieser Fluorophore erlaubt es zu bestimmen, welcher der beiden Primer tatsächlich verlängert wurde.



**Abbildung 35:** PAGE-Analyse des PCR-Experiments mit **P3/P5/T8** (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C). „**T<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200  $\mu\text{M}$ ). „**T<sup>-</sup>**“: analog zu **T<sup>+</sup>** ohne TTP. „**1<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **1** (400  $\mu\text{M}$ ) und dATP, dGTP, dCTP (je 200  $\mu\text{M}$ ). „**1<sup>400</sup>T**“: analog zu **1<sup>400</sup>** + TTP (50  $\mu\text{M}$ ). (I) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ), (II) Cy5-Kanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm}$ ), (I+II) Überlagerung beider Kanäle, wobei bei der Anwesenheit beider Signale cyan als Mischfarbe entsteht.

Wenn nur natürliche Triphosphate eingesetzt wurden (**T<sup>+</sup>**), zeigte die PAGE-Analyse die vollständige Verlängerung beider Primer. Bei Abwesenheit des TTPs (**T<sup>-</sup>**) ist eine unvollständige Verlängerung des fluoresceinmarkierten **P3** und keine Verlängerung des Cy5-markierten **P5** zu erkennen. Dies entspricht den zuvor erhaltenen Ergebnissen mit **P3** und **P4**. Wurde anstelle des TTP das Triazin-dUTP **1** verwendet (**1<sup>400</sup>** und **1<sup>400</sup>T**), so ist zwar im Fluorescein-Kanal eine Verlängerung des **P3**, im Cy5-Kanal jedoch keinerlei Verlängerung des **P5** zu erkennen. Die selektive Visualisierung beider Primer bestätigt, dass die Verlängerung von **P3** komplementär zum Templat zu einem geringen Grad abläuft, die von **P5** komplementär zum gebildeten triazinmodifizierten Gegenstrang jedoch ausbleibt.

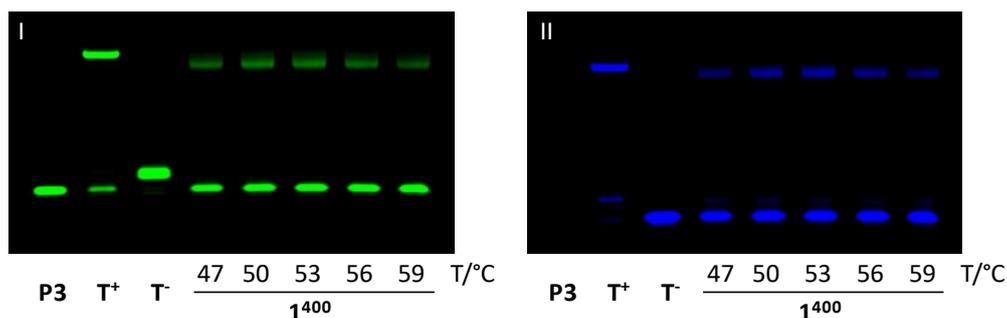
Um dennoch zu testen, ob **1** als Matrize für die enzymatische DNA-Synthese dienen kann, wurde das verkürzte Templat **T9** verwendet. Dabei wurde auf einen Teil des AT-reichen mittleren Bereichs von **T8** (98 Nt) verzichtet, wodurch eine Länge von 68 Nukleotiden erhalten wurde. Mit diesem Templat wurden die PCR-Experimente mit **P3** und **P5** wiederholt und mittels PAGE (Abbildung 36) analysiert.



**Abbildung 36:** PAGE-Analyse des PCR-Experiments mit **P3/P5/T9** (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C). „**T<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200 µM). „**T<sup>-</sup>**“: analog zu **T<sup>+</sup>** ohne TTP. „**1<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **1** (400 µM) und dATP, dGTP, dCTP (je 200 µM). „**1<sup>400</sup>T**“: analog zu **1<sup>400</sup>** + TTP (50 µM). (I) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ), (II) Cy5-Kanal ( $\lambda_{exc} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$ ).

Die Analysen der Positiv- und Negativkontrollen (**T<sup>+</sup>** und **T<sup>-</sup>**) zeigen die gleichen Resultate wie mit dem längeren Templat **T8**. Wurden Triphosphatmischungen mit dem artifiziellen Baustein **1** verwendet, so ist sowohl im Fluorescein- als auch im Cy5-Kanal eine schwache Bande auf Höhe des Volllängenproduktes sichtbar. Die vollständige Verlängerung des Vorwärtsprimers **P5** zeigt, dass die DNA-Polymerase die triazinmodifizierte Nukleobase erkennt und in der Lage ist, mit dieser den komplementären Strang zu bilden. Generell scheint die Effizienz der Amplifikation jedoch äußerst gering zu sein, da hauptsächlich die unverlängerten Primer sichtbar sind. PCR-Experimente mit einer doppelten Anzahl an Zyklen kamen zum gleichen Ergebnis.

Eine geringe Effizienz könnte auch durch eine gehemmte Anlagerung des Primers an die triazinmodifizierten Oligonukleotide hervorgerufen werden. Aus diesem Grund wurden PCR-Experimente mit unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen durchgeführt und gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 37).

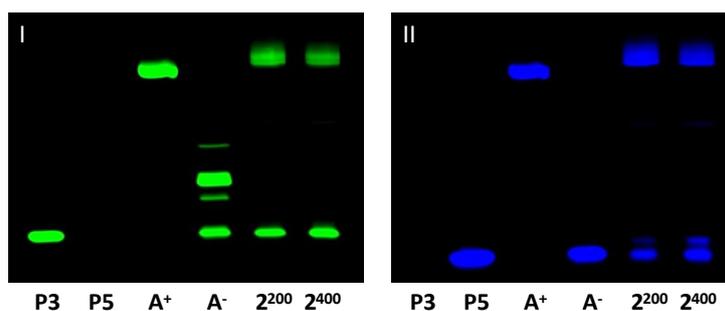


**Abbildung 37:** PAGE-Analyse der PCR-Experimente mit **P3/P5/T9** unter Verwendung unterschiedlicher Temperaturen für die Primeranlagerung (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min der jeweils angegebenen Temperatur, 3 min 72 °C). „**T<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200 µM). „**T<sup>-</sup>**“: analog zu **T<sup>+</sup>** ohne TTP. „**1<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **1** (400 µM) und dATP, dGTP, dCTP (je 200 µM). (I) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ), (II) Cy5-Kanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm}$ ).

Sowohl im Fluorescein- als auch im Cy5-Kanal kann bei einer Abweichung der ursprünglich verwendeten Anlagerungstemperatur (53 °C) hin zu höheren (59 °C) und niedrigeren (47 °C) Temperaturen eine geringe Abnahme der erhaltenen Vollverlängerungen beobachtet werden.

Die PCR-Experimente mit **1** konnten folglich durch Verwendung des kürzeren Templats **T9** ermöglicht werden. Die geringe Effizienz konnte jedoch durch keine der Untersuchungen gesteigert werden.

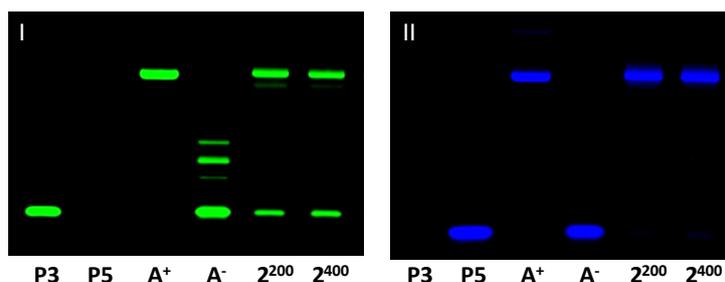
Da **2** bereits in den PEX-Experimenten besser toleriert wurde, sollte dieser Baustein ebenfalls in PCR-Experimenten eingesetzt und mit dem dU-Analogon **1** verglichen werden. Für die folgenden Experimente wurden analoge Kontrollen mit allen natürlichen Triphosphaten (**A<sup>+</sup>**) bzw. mit allen natürlichen Triphosphaten außer dATP (**A<sup>-</sup>**) durchgeführt. Das dATP-Analogon **2** wurde entweder in gleicher Konzentration wie die übrigen dNTPs (200 µM, **2<sup>200</sup>**) oder in doppelter Konzentration (400 µM, **2<sup>400</sup>**) eingesetzt. Auf einen Zusatz des natürlichen dATPs wurde verzichtet. Die PAGE-Analyse des PCR-Experiments mit Templat **T8** (98 Nt) und den Primern **P3** und **P5** ist in Abbildung 38 gezeigt.



**Abbildung 38:** PAGE-Analyse des PCR-Experiments mit **P3/P5/T8** (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C). „**A<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200 μM). „**A<sup>-</sup>**“: analog zu **A<sup>+</sup>** ohne dATP. „**2<sup>200</sup>/2<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **2** (200 oder 400 μM) und TTP, dGTP, dCTP (je 200 μM). (I) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm), (II) Cy5-Kanal ( $\lambda_{exc} = 630$  nm,  $\lambda_{em} = 700$  nm).

Durch Verwendung aller natürlicher Triphosphate (**A<sup>+</sup>**) ist eine vollständige Verlängerung beider eingesetzter Primer sichtbar, analog zu **T<sup>+</sup>**. Fehlte das natürliche dATP (**A<sup>-</sup>**), so wurde eine unvollständige Verlängerung des Rückwärtsprimers **P3** und keine Verlängerung des Vorwärtsprimers **P5** erhalten. Der Abbruchstrang für **A<sup>-</sup>** zeigt dabei eine geringere Gelmobilität verglichen mit **T<sup>-</sup>**. Dies ist auf einen längeren Abbruchstrang zurückzuführen, da bei der Verlängerung des **P3** das erste TTP an vierter, das erste dATP jedoch erst an neunter Position eingebaut werden muss. Wurde das artifizielle dATP-Analogon **2** verwendet, so kann sowohl im Fluorescein- als auch im Cy5-Kanal die Bildung des Volllängenproduktes beider Primer beobachtet werden, unabhängig der eingesetzten Konzentration (Vergleich **2<sup>200</sup>** und **2<sup>400</sup>**). In beiden Fällen konnten ca. 60 % des **P3** und 70 % des **P5** verlängert werden. Im Gegensatz zum dU-Analogon **1** zeigte sich eine erfolgreiche Amplifikation unter Verwendung von **2** mit dem 98mer **T8**. Dies bestätigt bereits die bessere Effizienz von **2** gegenüber **1** in Bezug auf die enzymatische DNA-Synthese, wie sie zuvor in den PEX-Experimenten beobachtet werden konnte.

Um einen besseren Vergleich zu **1** ziehen zu können, wurden analoge Experimente mit **2** mit dem kürzeren Templat **T9** durchgeführt. Die entsprechende PAGE-Analyse ist in Abbildung 39 dargestellt.



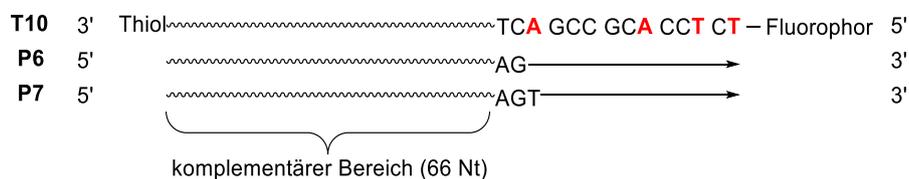
**Abbildung 39:** PAGE-Analyse des PCR-Experiments mit **P3/P5/T9** (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C). „**A<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs (200 μM). „**A<sup>-</sup>**“: analog zu **A<sup>+</sup>** ohne dATP. „**2<sup>200</sup>/2<sup>400</sup>**“: dNTP-Mix mit **2** (200 oder 400 μM) und TTP, dGTP, dCTP (je 200 μM). (I) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm), (II) Cy5-Kanal ( $\lambda_{exc} = 630$  nm,  $\lambda_{em} = 700$  nm).

Die Verwendung des kürzeren Templats **T9** zeigte eine noch höhere Effizienz der DNA-Amplifikation verglichen mit **T8**. Im Cy5-Kanal ist für **2<sup>200</sup>** und **2<sup>400</sup>** hauptsächlich das Volllängenprodukt entsprechend der Positivkontrolle (**A<sup>+</sup>**) und kein unverlängerter Primer mehr sichtbar. Auch im Fluorescein-Kanal ist eine signifikante Menge an Volllängenprodukt sichtbar und lediglich ca. 30 % des unverlängerten **P3**. Hiermit bestätigt sich die zuvor beobachtete deutlich höhere Effizienz verglichen mit **1**.

Die Ethinyl-1,2,4-triazinmodifikation scheint folglich besser in der 7-Position des 7-Deaza-2'-desoxyadenosins als in der 5-Position des 2'-Desoxyuridins akzeptiert zu werden. Um dieses Verhalten weiter charakterisieren zu können, sind kinetische Daten für den Einbau der artifiziellen Triphosphate nötig. Zu diesem Zweck wurden von der Firma Dynamic Biosensors GmbH Geschwindigkeitskonstanten für die enzymatische Verlängerung in Echtzeit mit einem switchSENSE® DRX2 Biosensor ermittelt.<sup>[53]</sup>

Hierfür wurde die einzelsträngige DNA **T10** (80 Nt) genutzt, welche am 3'-Terminus mit einem Thiollinker und am 5'-Terminus mit einem Fluorophor verknüpft wurde. Dazu wurden die komplementären Primer **P6** (68 Nt) und **P7** (69 Nt) verwendet, sodass eine Primerverlängerung um 12 bzw. 11 Nukleotide erfolgen kann. Die vollständigen Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide können Tabelle 12 (Kapitel 7.3.3) entnommen werden. Eine Übersicht des zu verlängernden Bereichs ist in Abbildung 40 dargestellt. Die Thiolmodifikation erlaubt eine Immobilisierung des Templats über den 3'-Terminus auf einer Gold-Mikroelektrode. Durch die Metalloberfläche kommt es zur Fluoreszenzlöschung des Fluorophors am 5'-Terminus, solange dieser sich in räumlicher Nähe befindet. Eine

ausreichende Nähe ist durch die im einzelsträngigen Templatstrang gegebene Flexibilität vorhanden. Durch die Anlagerung des Primers und die fortschreitende Verlängerung wird zunehmend die weniger flexible Doppelhelix ausgebildet, wodurch sich der Fluorophor von der Goldoberfläche entfernt. Dies resultiert in einem Anstieg der Fluoreszenz.<sup>[179]</sup>



**Abbildung 40:** Übersicht über den zu verlängernden Bereich der Primer **P6** und **P7** komplementär zu **T10**.

Für den Primer **P6** werden sowohl das dUTP-Analogon **1** als auch das 7-Deaza-dATP-Analogon **2** zweimal in die Sequenz eingebaut. Für den um ein Nukleotid verlängerten Primer **P7** wird **1** nur einmal in die Sequenz eingebaut. Diese Sequenz wurde gewählt, um die bereits aus den vorherigen Experimenten angedeutete geringere Aktivität des dUTP-Analogons für die kinetischen Experimente zu relativieren. Für die Messungen der Geschwindigkeitskonstanten wurde die Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase und verschiedene Triphosphatmischungen bei einer Temperatur von 37 °C verwendet. Die erhaltenen Echtzeit-Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Als natürliches Gegenstück für **1** wurde für eine genauere Vergleichbarkeit anstelle des TTP ebenfalls ein dUTP gewählt.

**Tabelle 2:** Gemessene Echtzeit-Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  für die Verlängerung von **P6** und **P7** durch die Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase in Anwesenheit verschiedener Triphosphatmischungen bei 37 °C.

dNTPs	P6: $k_{\text{obs}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	P7: $k_{\text{obs}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
dUTP, dATP, dCTP, dGTP	$7.3 \pm 0.4$	$8.3 \pm 0.4$
<b>1</b> , dATP, dCTP, dGTP	$1.8 \pm 0.1$	$3.2 \pm 0.1$
dUTP, <b>2</b> , dCTP, dGTP	$3.7 \pm 0.1$	$5.0 \pm 0.1$

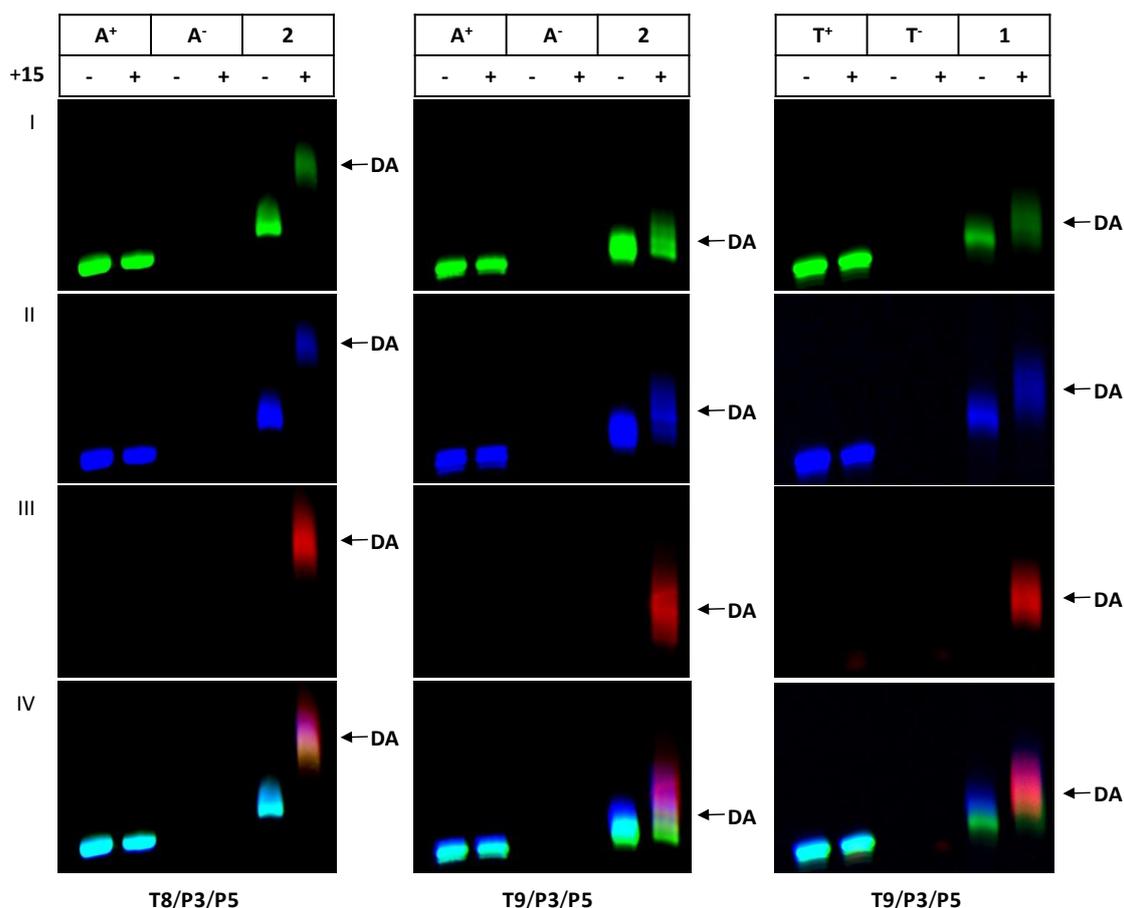
Wurde **1** gemeinsam mit den restlichen natürlichen Triphosphaten (dATP, dGTP und dCTP) injiziert, so wurde die Elongationsgeschwindigkeit relativ zur unmodifizierten Kontrolle für **P6** auf 25 % und für **P7** auf 40 % reduziert. Insbesondere der nur einmalige Einbau von **1** in **P7** bestätigt, dass dieses Analogon schlecht von den DNA-Polymerasen akzeptiert wird. Durch die Verwendung von **2**, in Kombination mit dUTP, dGTP und dCTP, wurde die Elongationszeit

beider Primer im Vergleich zur unmodifizierten Kontrolle lediglich auf 50 – 60 % abgesenkt. Obwohl **2** in beiden Fällen zweimal eingebaut wurde, konnte eine deutlich geringere Abnahme der Geschwindigkeitskonstante beobachtet werden als für **1**.

Diese Resultate sind übereinstimmend mit den Beobachtungen aus den PEX- und PCR-Experimenten und bestätigen die bessere Akzeptanz der 6-Ethynyl-1,2,4-triazinmodifikation durch DNA-Polymerasen in der 7-Position des 7-Deaza-dATPs als in der 5-Position des dUTPs.

#### 4.4.2 Bioorthogonale Mehrfachmarkierung

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden schließlich in Markierungsexperimenten mit **15** eingesetzt. Für **2** wurden die PCR-Produkte beider Template (**T8** und **T9**) verwendet, während aufgrund der geringen Effizienz von **1** hierfür nur das kürzere Templat **T9** genutzt wurde. Analog zu den Markierungsexperimenten der PEX-Produkte wurden die erhaltenen PCR-Produkte zunächst entsalzt, getrocknet und wieder entsprechend der Originalkonzentration in *millipore* H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Markierung wurde jeweils mit 10 Äquivalenten des Farbstoffes bei Raumtemperatur für 60 min durchgeführt. Als Vergleich wurden die Kontrollproben (**A<sup>+</sup>**, **A<sup>-</sup>**, **T<sup>+</sup>**, **T<sup>-</sup>**) unter identischen Bedingungen mit dem Farbstoff inkubiert. Die PAGE-Analyse aller Markierungsexperimente ist in Abbildung 41 dargestellt. Alle modifizierten Oligonukleotide konnten erfolgreich postsynthetisch markiert werden. Dies kann aus der sichtbaren Rhodamin-Emission (III), zusätzlich zu den Fluorescein- und Cy5-Emissionen der eingesetzten Primer (I und II), geschlossen werden. Die Verbreiterung der Bande im Rhodamin-Kanal wurde vermutlich durch leicht unterschiedliche Markierungsgrade erzeugt. Zudem werden die artifiziellen Bausteine aufgrund der verschiedenen zu verlängernden Bereiche und eingesetzten Primerlängen unterschiedlich häufig in den Templat- und den Gegenstrang eingebaut. Dadurch kommt es zu einem leichten Unterschied in der gelelektrophoretischen Mobilität, welcher im Fall des kürzeren Templats **T9** bereits im unmarkierten Oligonukleotid erkennbar ist („-“), und sich dementsprechend auf das Markierungsprodukt auswirkt. Dennoch zeigt die Überlagerung aller Kanäle (IV), dass es sich um eine Überlappung der Emissionen aus den verschiedenen Kanälen handelt. Für die Vergleichsoligonukleotide ohne Modifikation ist eine solche rote Emission hingegen nicht sichtbar, obwohl auch diese mit **15** inkubiert wurden. Eine durch unspezifische Anlagerungen hervorgerufene Emission kann somit ausgeschlossen werden.



**Abbildung 41:** PAGE-Analyse der bioorthogonalen Markierung der entsalzten PCR-Produkte (KOD XL, 30 Zyklen: 1 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C, mit **P3** und **P5**, **T8** bzw. **T9** und verschiedenen dNTP-Mischungen) mit BCN-Rhodamin **15** (60 min, RT). „**A<sup>+</sup>/T<sup>+</sup>**“: dNTP-Mix mit natürlichen dNTPs. „**A<sup>-</sup>/T<sup>-</sup>**“: analog zu **A<sup>+</sup>/T<sup>+</sup>** ohne dATP/TTTP. „**2**“: dNTP-Mix mit **2**, TTP, dGTP, dCTP (je 200 μM). „**1**“: dNTP-Mix mit **1** (400 μM) und dATP, dGTP, dCTP (je 200 μM). (I) Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ ), (II) Cy5-Kanal ( $\lambda_{exc} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$ ). (III) Rhodamin-Kanal ( $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ ), (IV) Überlagerung aus I, II und III.

Der resultierende Unterschied in der gelelektrophoretischen Mobilität zwischen den PCR-Produkten, vor (-) und nach (+) der Markierung, ist für das kurze Templat **T9** sowohl mit **1** als auch mit **2** eher gering. Für das längere Templat **T8** hingegen ist ein großer Unterschied erkennbar, der auf die signifikant höhere Anzahl an eingebauten Triazinmodifikationen zurückgeführt werden kann. Dieser ausgeprägte Unterschied zeigt nicht nur, dass tatsächlich mehr Triazine eingebaut sein müssen als in **T9**, sondern betont auch die Effizienz der Markierung mit dem BCN-Rhodamin, wie sie bereits in den PEX-Experimenten sichtbar wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl **1** als auch **2** für die DNA-Amplifikation mittels PCR erfolgreich genutzt werden konnten. Die hieraus entstandenen Oligonukleotide konnten

zudem für eine postsynthetische Mehrfachmarkierung verwendet werden. Das längere Templat **T8** zeigte dabei Vorteile gegenüber dem kürzeren **T9** bezüglich der erhaltenen Fluoreszenzintensität und der Analytik mittels PAGE. Somit wird deutlich, dass eine hohe Akzeptanz artifizieller Triphosphate durch Polymerasen eine wichtige Rolle für die Anwendung von postsynthetischen Markierungsmethoden spielt, insbesondere im Fall von Mehrfachmarkierungen.

Die Tatsache, dass mit der Triazinmodifikation am 7-Deaza-dATP **2** bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als am dUTP **1**, bestätigt einen in der Literatur bereits erkennbaren Trend. So konnten *Wagenknecht et al.* mit einer 1-Methylcyclopropenmodifikation ebenfalls signifikant bessere Ergebnisse für den enzymatischen Einbau in die DNA beobachten, wenn diese funktionelle Einheit anstatt in der 5-Position eines dUTPs in der 7-Position eines 7-Deaza-dATPs (siehe **28**) verknüpft wurde.<sup>[53]</sup> *Hocek et al.* verglichen sogar Funktionalisierungen in der 5-Position der Pyrimidine dUTP und dCTP und in der 7-Position der Purine 7-Deaza-dATP und 7-Deaza-dGTP.<sup>[180]</sup> Auch hier konnten für mehrere getestete Modifikationen jeweils die besten Ergebnisse mit dem 7-Deaza-dATP-Derivat erreicht werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Modifikation am 7-Deaza-dATP generell besser von DNA-Polymerasen toleriert werden als am dUTP. Die Gründe für eine allgemein hohe Akzeptanz von starren ethinylmodifizierten 7-Deaza-dATP-Analoga, vor allem durch DNA-Polymerasen der B-Familie, konnten durch Röntgenstrukturanalysen von *Marx* und *Diederichs et al.* aufgezeigt werden.<sup>[148]</sup> Dennoch gibt es auch artifizielle dUTP-Analoga, in denen Modifikationen über lange flexible Linker angeknüpft sind, welche gut von DNA-Polymerasen akzeptiert wurden.<sup>[181]</sup> Es scheint folglich von Vorteil zu sein die gewünschte Modifikation, insbesondere wenn diese über einen kurzen starren Linker verknüpft wird, in der 7-Position von 7-Deaza-dATP anzubringen.

### 4.5 Zusammenfassung

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit der ethinylverbrückten Triazinmodifikation am 7-Deaza-dATP **2** durchweg bessere Ergebnisse erzielt wurden als am dUTP **1**. Dies gilt zum einen für die bioorthogonale Markierung. So konnte durch eine iEDDA mit dem BCN-Rhodamin **15** mit **1** eine Markierungsausbeute von 80 % innerhalb von 45 min erreicht werden, während die Markierung mit **2** zu einer maximalen Ausbeute von 85 % nach 30 min führte. Die Verwendung

des COMBO-Rhodamins **16** führte mit **1** zu keiner Markierung, wohingegen jene mit **2** zumindest mit einer Ausbeute von 20 % nach einer Stunde realisiert werden konnte. Des Weiteren zeigte **2** verglichen mit **1** Vorteile in der enzymatischen DNA-Synthese, wie in den PEX- und PCR-Experimenten gezeigt. Das dATP-Analogon **2** konnte in kürzerer Zeit von DNA-Polymerasen durch Primerverlängerungen inkorporiert werden und zeigte zudem eine höhere Effizienz in der Amplifikation längerer Template. Dieser Trend konnte durch die Bestimmung der Einbaugeschwindigkeiten weiter bekräftigt werden. So führte ein einziger Einbau des artifiziellen Triphosphats **1** zu einer Reduktion der Elongationsgeschwindigkeit auf 40 %, während selbst der zweifache Einbau von **2** diese lediglich auf 60 % reduzierte. Trotz der niedrigeren Effizienz von **1** gegenüber **2** zeigte dieses eine bessere Toleranz durch DNA-Polymerasen verglichen mit einem literaturbekannten Triazin-dUTP (siehe Schema 8, Kapitel 3.2.1). Ein Grund dafür könnte sowohl in der wesentlich geringeren Größe der hier eingesetzten Triazinmodifikation, als auch in der Verwendung des kurzen starren Alkinlinkers, der bekannterweise gut von DNA-Polymerasen akzeptiert wird, liegen.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Literatur und bekräftigen weiter den Trend, dass für Modifikationen über kurze starre Linker das 7-Deaza-dATP besser geeignet ist als das dUTP. Ein möglicher Grund, weshalb in der Literatur dennoch häufig auf dUTP-Derivate zurückgegriffen wurde,<sup>[45, 54, 65-67, 107, 167, 171, 182-186]</sup> liegt vermutlich im einfacheren synthetischen Zugang. So sind in der 5-Position halogenierte 2'-Desoxyuridine kommerziell erhältlich, wohingegen die entsprechenden halogenierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine ausgehend von 2-Desoxyribose selbst synthetisiert werden müssen. So konnte durch den Einsatz des Triazins **10** das triazinmodifizierte 7-Deaza-2'-desoxyuridin **14** ausgehend von 5-Iod-2'-desoxyuridin (**11**) über eine Syntheseroute von 3 Stufen in einer Gesamtausbeute von 50 % erhalten werden. Das analoge 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **27** musste ausgehend von 2-Desoxyribose (**19**) über 8 Schritte synthetisiert werden, wobei eine Gesamtausbeute von lediglich 6 % erreicht wurde. Für enzymatische Anwendungen artifizierender Triphosphate scheint dieser größere synthetische Aufwand für die 7-Deaza-dA-Derivate dennoch lohnenswert.

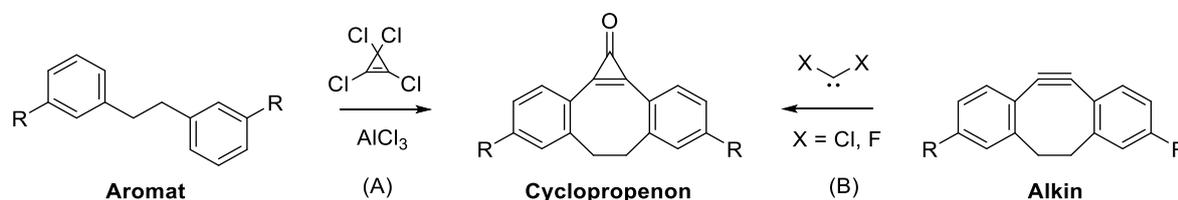
Darüber hinaus konnten **1** und **2** sequenzspezifisch in ein Oligonukleotid eingebaut und somit eine Mehrfachmarkierung erreicht werden. Jedoch erst die Kombination aus **1** mit dem cyclopropenmodifizierten dATP-Analogon **28** erlaubte eine tatsächlich orthogonale duale

Markierung. Durch den Einsatz zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe für die beiden untereinander orthogonalen iEDDAs konnten die modifizierten Oligonukleotide durch die duale Markierung mit einem Energietransferpaar versehen werden. Dieser Energietransfer vom eingesetzten BODIPY, als Reaktionspartner für das Cyclopropen, auf das verwendete Rhodamin, als Dienophil für das Triazin, zeigte sich sowohl in der gelelektrophoretischen Analyse als auch in spektroskopischen Untersuchungen. Zudem konnte dieser Energietransfer durch Transfektion von markierter DNA in *HeLa*-Zellen intrazellulär beobachtet werden. Hierdurch wird eine weitergehende Anwendung dieser bioorthogonalen Reporter, beispielsweise für die molekulare Bildgebung, eröffnet.

## 5. Cyclopropenone als photoaktivierbare Vorstufen für die SPAAC

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines cyclopropenonmodifizierten Nucleosids. Im Gegensatz zu den bereits etablierten Tetrazolen soll damit der Weg zu einer selektiveren photoaktivierbaren Methode für die Markierung von Nucleinsäuren eröffnet werden.

Cyclopropenonmodifizierte Nucleinsäurebausteine sind in der Literatur bisher nicht bekannt. Die synthetische Darstellung einfacher Cyclopropenone hingegen geht bereits auf das Jahr 1959 zurück. *Breslow* und *Vol'pin* gelang es unabhängig voneinander ein Diphenylcyclopropenon zu synthetisieren.<sup>[187-188]</sup> In Schema 27 sind die beiden wichtigsten Methoden für die Darstellung cyclischer Cyclopropenone vorgestellt.

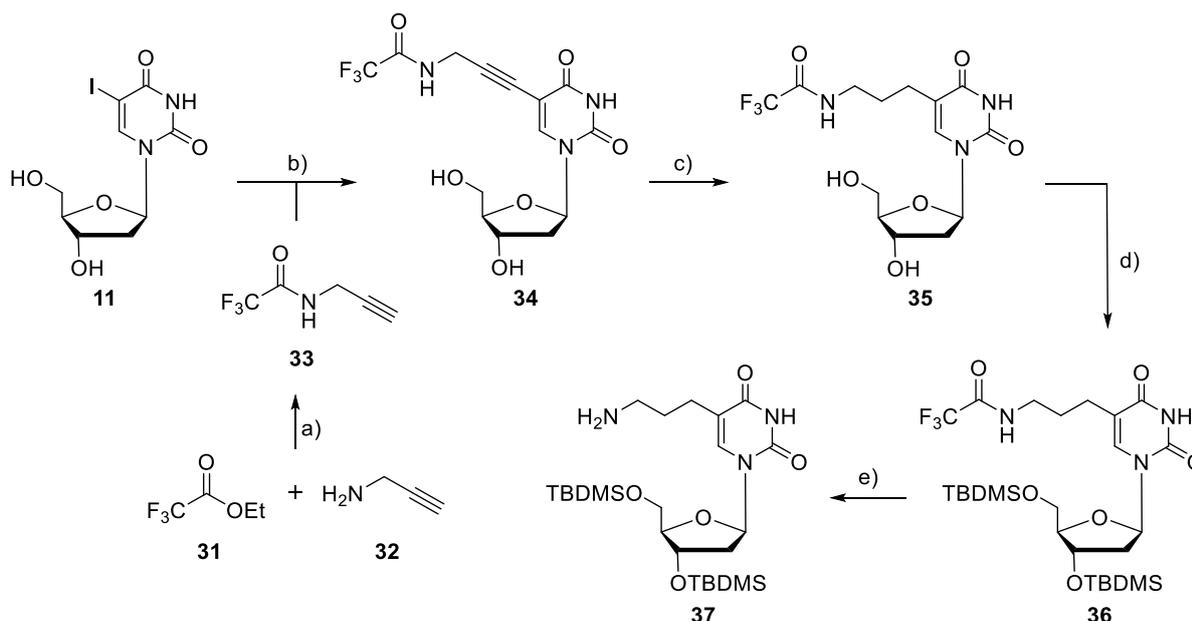


**Schema 27:** Mögliche Methoden für die Synthese von Cyclopropenonen: (A) über eine Friedel-Crafts-Alkylierung oder (B) über eine Carben-Addition.

Die Möglichkeit A stellt eine Friedel-Crafts-Alkylierung mit Tetrachlorcyclopropan und Aluminiumchlorid mit anschließender Hydrolyse dar.<sup>[118]</sup> Für diese Reaktion sind prinzipiell einfache aktivierte Aromaten ausreichend. Um das dargestellt cyclische Cyclopropenon zu erhalten, müssen Strukturen gewählt werden, welche aus zwei ethylenverbrückten aromatischen Systemen bestehen. Somit kann durch eine intramolekulare Reaktion die Cyclisierung und Bildung des Cyclopropenons erreicht werden. Zu diesem Zweck werden elektronenschiebende Substituenten, wie Methoxy-<sup>[94]</sup> oder Butoxygruppen,<sup>[120]</sup> in der jeweiligen para-Position benötigt. Bei Methode B handelt es sich um eine [2+1]-Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem Dihalocarbon, ebenfalls mit anschließender Hydrolyse. Die am häufigsten eingesetzten Dichlorcarbene können ausgehend von Chloroform und n-Butyllithium *in situ* dargestellt werden.<sup>[189-190]</sup> Beispielsweise können auch Difluorcarbene, ausgehend von TMS-CF<sub>3</sub> und Natriumiodid, genutzt werden.<sup>[123, 191]</sup>

## 5.1 Synthese des cyclopropenonmodifizierten Nucleosids **3**

Um das gewünschte cyclopropenonmodifizierte Nucleosid **3** zu erhalten, sollte die Anbindung des Cyclopropenons an das Nucleosid per Carbamatbindung realisiert werden. Dafür wurde ein 2'-Desoxyuridin mit einem Aminopropyl linker in der 5-Position ausgewählt (**37**). Zunächst soll die Synthese dieses Nucleosids, dargestellt in Schema 28, erläutert werden, bevor auf die Synthese des eigentlichen Cyclopropenons eingegangen wird.

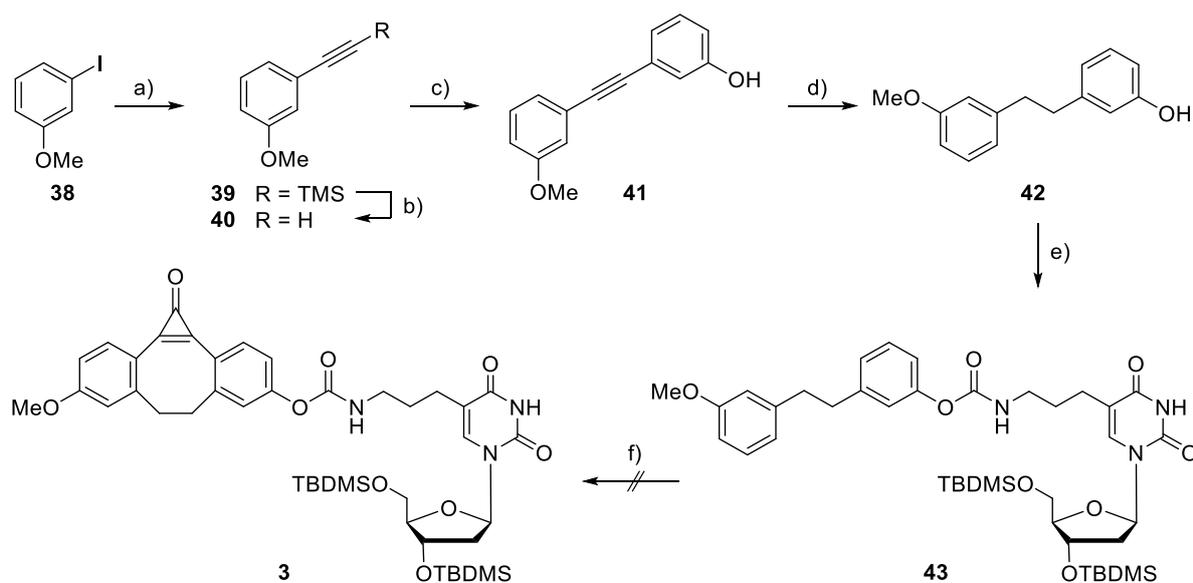


**Schema 28:** Synthese von **37**. a) MeOH, ü.N., RT, 60 %; b) CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, NEt<sub>3</sub>, DMF, ü.N., RT, 75 %; c) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, Et<sub>3</sub>SiH, MeOH, ü.N., RT, 81 %; d) TBDMSCl, Imidazol, DMF, ü.N., RT, 76 %; e) wässr. NH<sub>3</sub>, MeOH, ü.N., RT, 56 %.

Das terminale Alkin **33** wurde nach einer literaturbekannten Synthese hergestellt<sup>[192]</sup> und anschließend mit 5-Iod-2'-desoxyuridin **11** in einer Sonogashira-Kupplung verknüpft.<sup>[193]</sup> Die anschließende Hydrierung des Propargyllinkers von **34** wurde mit Triethylsilan und Palladiumhydroxid auf Kohlenstoff durchgeführt.<sup>[54]</sup> Um bei der Carbamatbildung Nebenreaktionen mit den beiden Hydroxygruppen des Zuckers zu vermeiden, wurden TBDMS-Schutzgruppen eingeführt. Dieser Schritt erfolgte mit TBDMS-Chlorid unter Zusatz von Imidazol als Base über Nacht bei Raumtemperatur. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Nucleosid **36** als weißer Schaum in einer Ausbeute von 76 % erhalten werden. Die abschließende Entschützung der TFA-Gruppe sollte mit Hilfe von Ammoniak durchgeführt werden. Üblicherweise wird konzentrierter wässriger Ammoniak als Reagenz und Lösungsmittel zugleich eingesetzt. Aufgrund der eingeführten TBDMS-Gruppen zeigte **36**

jedoch keine Löslichkeit im Wässrigen. Folglich wurde auf Methanol als Lösungsmittel zurückgegriffen und weiterhin mit wässrigem Ammoniak für die Spaltung der TFA-Gruppe gearbeitet. Unter den so gewählten Bedingungen konnte kein vollständiger Umsatz erreicht werden und 32 % des Edukts (**36**) sowie 56 % des gewünschten Produkts **37** isoliert werden. Der Einsatz von 7 M Ammoniak in Methanol anstelle des konzentrierten wässrigen Ammoniaks führte nicht zu höheren Ausbeuten. Auch eine Reaktionsführung bei erhöhter Temperatur in einem Druckgefäß zeigte keine Verbesserung bezüglich der Ausbeute. Im Gegensatz dazu steht die Reaktion am ungeschützten Nukleosid, welche typischerweise quantitative Ausbeuten ergibt.<sup>[54]</sup>

Für die Synthese des Zielmoleküls wurde das Carbamat, wie in Schema 29 gezeigt, aus **37** und der Cyclopropenon-Vorstufe **42** gebildet. Dieses sollte in einem letzten Schritt durch eine Friedel-Crafts-Alkylierung cyclisiert und in das Cyclopropenon **3** überführt werden.

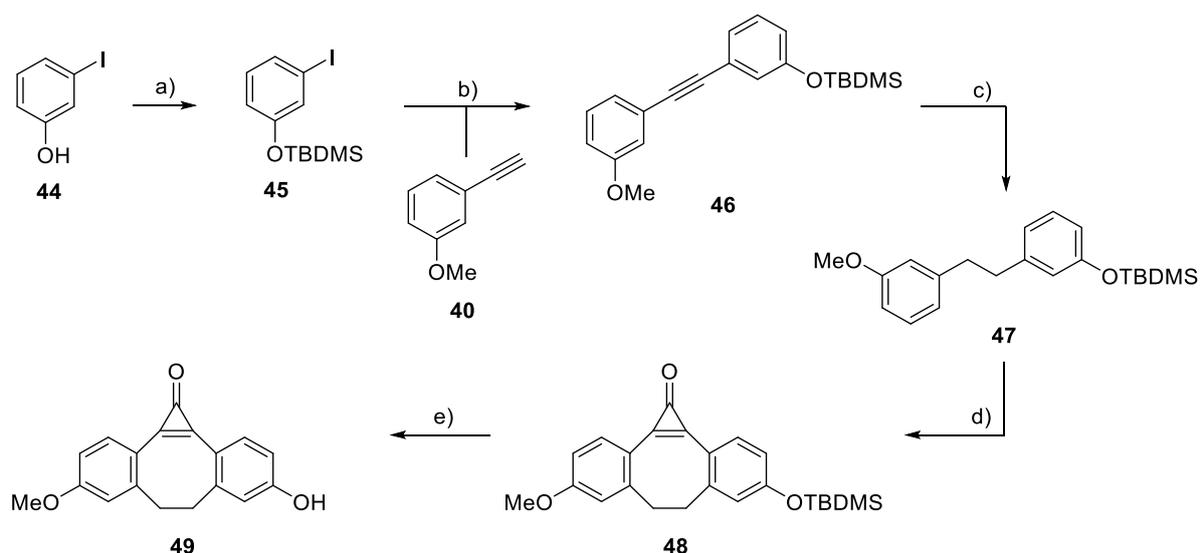


**Schema 29:** Syntheseroute zur Darstellung von **3**. a) TMS-Acetylen, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, DMF, 1 h, 50 °C, 94 %; b) TBAF (1M in THF), THF, 1 h, RT, quant.; c) 3-Iodphenol, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, MeCN, 17 h, RT, 81 %; d) Et<sub>3</sub>SiH, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, MeOH, 24 h, RT, 94 %; e) i) *para*-Nitrophenylchloroformat, DCM/Pyridin, ü.N., 0 °C – RT, ii) **37**, DCM/Pyridin, ü.N., RT, 40 %; f) AlCl<sub>3</sub>, Tetrachlorcyclopropen, DCM, 1 h, -78 °C.

Zuerst wurde das kommerziell erhältliche 3-Iodanisol (**38**) entsprechend einer von *Tokuyama et al.* beschriebenen Synthese in einer Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen eingesetzt.<sup>[194]</sup> Die TMS-Gruppe des dabei in 94 %-iger Ausbeute erhaltenen Alkins **39** konnte anschließend mit Hilfe von TBAF in THF entfernt werden. Das terminale Alkin **40** wurde auf diese Weise in

quantitativer Ausbeute erhalten. Die folgende Verknüpfung mit 3-Iodphenol erfolgte in einer weiteren Sonogashira-Kupplung mit Kupferiodid und  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  als Katalysatoren. Eine Reaktionsführung bei Raumtemperatur über Nacht ergab nach anschließender Säulenchromatographie **41** in einer Ausbeute von 81 %. Die Reduktion der Dreifachbindung, analog zu **43**, konnte mit Triethylsilan in einer hohen Ausbeute von 94 % erreicht werden. **42** konnte nun mit dem aminmodifizierte Baustein **37** über eine Carbamatbindung verknüpft werden. Für diesen Schritt kam *para*-Nitrophenylchloroformat als Aktivierungsreagenz für die Hydroxygruppe von **42** zum Einsatz. Eine kurze Aufreinigung des dabei erhaltenen Aktivesters und die anschließende Umsetzung mit der Aminkomponente **37** ergab nach säulenchromatographischer Aufreinigung **43** in einer Ausbeute von 40 %. Alternativ wurde Carbonyldiimidazol für die Aktivierung eingesetzt, wobei **43** in einer geringeren Ausbeute von 29 % erhalten wurde. Den letzten Schritt stellte der Ringschluss zum Cyclopropenon über eine doppelte Friedel-Crafts-Alkylierung dar. Dabei wurde Aluminiumtrichlorid als Katalysator eingesetzt und bei einer Temperatur von  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gearbeitet. Nachdem die Reaktionskontrolle eine vollständige Umsetzung des Ausgangsmaterials zeigte, erfolgte die saure Hydrolyse mit 1 M Salzsäure. Das gewünschte Cyclopropenon **3** konnte jedoch nicht isoliert werden.

Als Alternative wurde das Cyclopropenon vorab gebildet, wie in Schema 30 dargestellt, und danach über eine Carbamatkupplung mit dem Nukleosidbaustein **37** verknüpft.

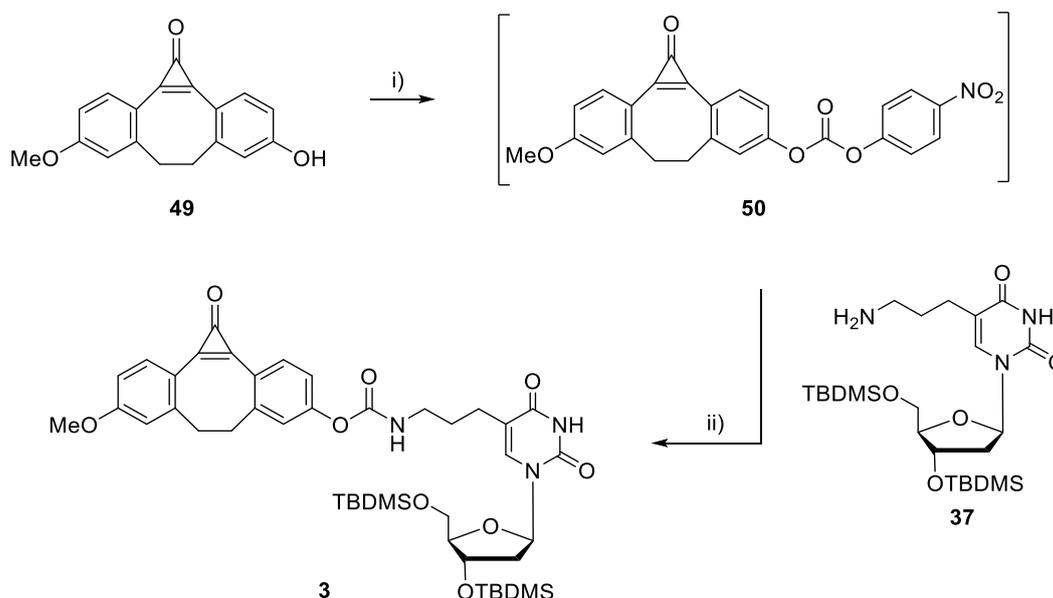


**Schema 30:** Synthese des Cyclopropenons **49**. a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, ü.N., RT, 95 %; b)  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{NEt}_3$ , MeCN, ü.N., RT, 97 %; c)  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ,  $\text{Et}_3\text{SiH}$ , MeOH, 24 h, RT, 92 %; d)  $\text{AlCl}_3$ , Tetrachlorcyclopropen, DCM, 2 h,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 65 %; e) TBAF (1M in THF), THF, 30 min, RT, 66 %.

Die Synthese der Cyclopropenon-Vorstufe **47** entspricht der in Schema 29 gezeigten Synthese von **42**, mit der Ausnahme, dass die Hydroxyfunktion des eingesetzten 3-Iodphenols (**44**) TBDMS-geschützt wurde (**45**). Auf diese Weise konnte die Ausbeute der Sonogashira-Kupplung mit **40** von 81 % auf 97 % gesteigert werden. Zudem wurde dadurch die säulenchromatographische Aufreinigung der einzelnen Stufen erleichtert.

Mit **47** konnte schließlich die Reaktion zum Cyclopropenon mit Hilfe des Tetrachlorcyclopropens durchgeführt werden. Dabei wurde die Reaktionsführung von **43** übertragen. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde das Gemisch auf Raumtemperatur gebracht und schließlich sauer hydrolysiert. **48** wurde nach erfolgter Aufreinigung mittels Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 65 % als weißer Feststoff erhalten. Um eine Verknüpfung mit einem Nucleosidbaustein durchführen zu können, musste in einem letzten Schritt die TBDMS-Gruppe entfernt werden. Es konnte durch den Einsatz von TBAF in THF bereits nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur der vollständige Umsatz des Ausgangsmaterials festgestellt und **49** durch säulenchromatographische Aufreinigung als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 66 % isoliert werden.

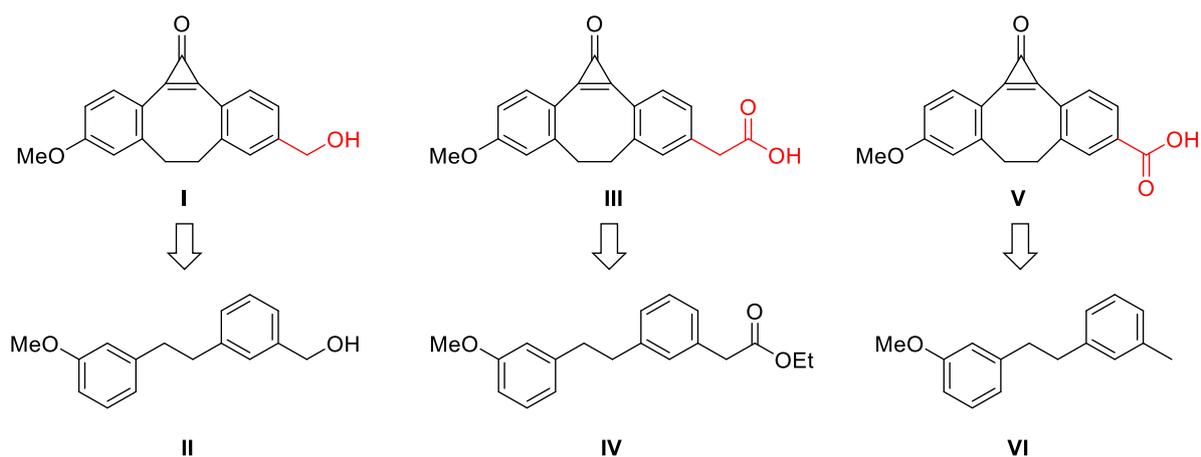
Um das gewünschte Nucleosid **3** zu erhalten, wurde eine Carbamatkupplung zwischen **49** und **37** durchgeführt (Schema 31).



**Schema 31:** Synthese des cyclopropenonmodifizierten Nucleosides **3** ausgehend von **49** und **37**. i) *para*-Nitrophenylchloroformat, DCM/Pyridin, 3 h, RT; ii) DCM, ü.N., RT, 16 %.

Als Aktivierungsreagenz wurde *para*-Nitrophenylchloroformat gewählt, da hiermit bereits für die Carbamatbildung mit **42** die besten Resultate erzielt wurden. Dazu wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus DCM und Pyridin gearbeitet und nach einer Reaktionszeit von 3 h das Nukleosid **37** hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht fortgeführt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Auf diese Weise konnte das gewünschte Produkt **3** als grünlicher Feststoff in einer Ausbeute von 16 % erhalten werden. Ein Problem dieser Reaktion liegt in der schlechten Löslichkeit des Cyclopropenons **49**. Dieses stellte sich als unlöslich in allen getesteten organischen Lösungsmitteln heraus. Diese Eigenschaft zeigte sich im Fall des Cyclopropenons **48** nicht, da dieses vermutlich durch die sterisch anspruchsvolle TBDMS-Gruppe eine bessere Löslichkeit erhält. Zudem äußerte sich eine mögliche Instabilität dieser Carbamatbindung im Umgang mit Nucleophilen. Wurde **3** beispielsweise TBAF ausgesetzt, welches für eine Entschützung der TBDMS-Gruppen zum Einsatz kommen könnte, so konnte bei Raumtemperatur bereits nach einer Stunde eine vollständige Spaltung in die Bausteine **37** und **49** beobachtet werden. Eine weitere Schwierigkeit liegt folglich in der Reaktivität der Hydroxygruppe, da es sich um eine aromatische OH-Gruppe handelt. Phenole stellen mögliche Abgangsgruppen dar, wodurch auch die geringe Ausbeute für die Bildung von **3** erklärt werden könnte.

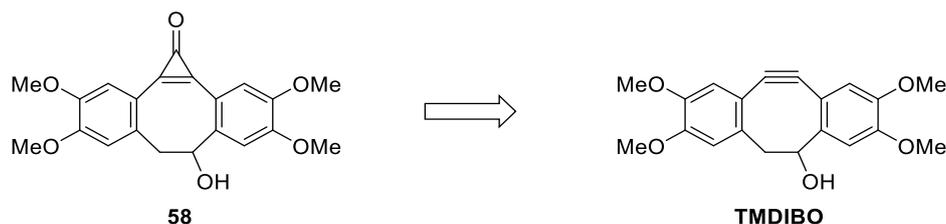
Um eine stabilere Anbindung des Cyclopropenons an das Nukleosid zu erhalten wären die in Schema 32 gezeigten Strukturen denkbar.



**Schema 32:** Übersicht weiterer Cyclopropenonstrukturen, mit ihren entsprechenden Vorstufen, für die eine stabilere Anbindung an ein Nukleosid denkbar wäre.

Eine Möglichkeit liegt in der Entkopplung der OH-Funktion vom aromatischen System über eine Methyleneinheit (**I**). Die Cyclopropenone **III** und **V** würden eine Änderung der Anbindung von der Carbamat- zur Peptidbindung erlauben. Wird bereits die Vorstufe mit der Estereinheit funktionalisiert, so müsste diese, um desaktivierende Effekte zu vermeiden, ebenfalls durch eine Methyleneinheit vom aromatischen System entkoppelt werden (**IV**). Eine andere Option besteht darin, die Säuregruppe erst im Nachhinein, beispielsweise durch Oxidation einer Methylgruppe, in das Molekül einzubringen (**VI**). Erste Untersuchungen zeigten jedoch, dass schwach aktivierende Substituenten, wie Alkylreste, nicht ausreichen, um die gewünschten Cyclisierung zu erhalten.

Deshalb wurde das alternative Cyclopropenon **58** ausgewählt. Dieses basiert auf TMDIBO (Tetramethoxydibenzocyclooctinol), welches bereits erfolgreich für die SPAAC mit Aziden eingesetzt wurde.<sup>[195]</sup> Für die Darstellung des Cyclopropenons muss in diesem Fall anstatt der Friedel-Crafts-Alkylierung eine Carben-Addition genutzt werden.

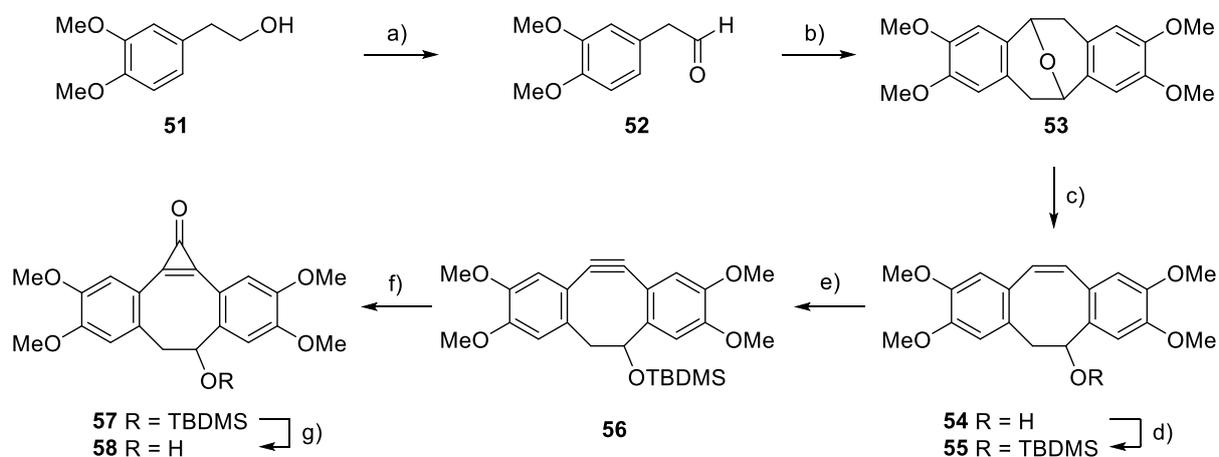


**Schema 33:** Retrosynthetische Übersicht zur Darstellung des Cyclopropenons **59** ausgehend von TMDIBO<sup>[195]</sup> über eine Carben-Addition.

Die aliphatische Hydroxygruppe könnte eine verbesserte Anbindung an Nukleosidbausteine ermöglichen. Die Synthese ausgehend von **51** ist in Schema 34 dargestellt.

Zunächst wurde kommerziell erhältliches (3,4-Dimethoxyphenyl)ethanol (**51**) nach einer literaturbekannten Synthese in den entsprechenden Aldehyd **52** überführt.<sup>[196]</sup> Die nachfolgende Darstellung von **53** erfolgte durch den Einsatz von TMS-Iodid.<sup>[197]</sup> Diese von *Jung et al.* entwickelte Methode beinhaltet die Bildung von  $\alpha$ -Iodethern ausgehend von Aldehyden und die anschließende elektrophile aromatische Substitution.<sup>[198]</sup> Obwohl in der Literatur mit äquimolaren Mengen an TMS-Iodid gearbeitet wird, konnte das gewünschte Produkt **53** durch den Einsatz von lediglich 0.25 Äquivalenten unter ansonsten gleichen Bedingungen in einer Ausbeute von 79 % erhalten werden. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde bisher nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise treibt während der Reaktion gebildeter Iodwasserstoff

die Reaktion in gleicher Weise wie das eingesetzte TMS-Iodid voran, wodurch die erfolgreiche Reduktion der eingesetzten Äquivalente erklärt werden könnte.



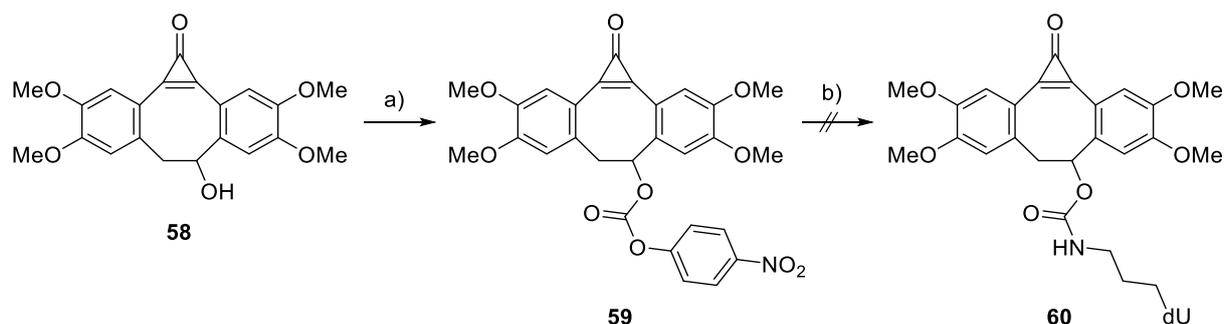
**Schema 34:** Synthese des Cyclopropenons **58**. a) DMP, DCM, 3 h, RT, 70 %; b) TMSI, DCM, 2 h, -78 °C, 79 %; c) *n*BuLi, THF, 2 h, RT, 80 %; d) TBDMSCl, DCM/Pyridin, ü.N., RT, 48 %; e) I) Br<sub>2</sub>, DCM, 5 min, -40 °C; II) KO<sup>t</sup>Bu, Piperazin, THF, ü.N., RT, 62 %; f) CHCl<sub>3</sub>, *n*BuLi, THF, 4 h, -78 °C, 72 %; g) TBAF (1 M in THF), THF; 20 min, RT, 96 %.

Die Eliminierung zur Bildung des Cyclooctatriens **54** wurde mit Hilfe von *n*-Butyllithium realisiert.<sup>[199]</sup> Hierbei konnte bereits nach einer Reaktionszeit von 2 h bei Raumtemperatur das gewünschte Produkt als weißer Schaum in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden. Die folgenden Schritte zum Cyclooctin **56** wurden angelehnt an eine von *Leeper et al.* beschriebene Synthese durchgeführt.<sup>[199]</sup> Die TBDMS-Schätzung wurde mit TBDMS-Chlorid in einem DCM-Pyridin-Lösungsmittelgemisch durchgeführt und **55** in einer Ausbeute von 48 % erhalten. Weder durch eine Erhöhung der TBDMSCl- oder Basenäquivalente noch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte eine Verbesserung bezüglich der Ausbeute erzielt werden. Durch die Addition von Brom und eine daran direkt angeschlossene Eliminierung mit Hilfe von Kaliumtertbutanolat und Piperazin wurde **56** als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 62 % erhalten.

Die anschließende Cyclopropenonbildung per Carben-Addition wurde in THF bei -78 °C durchgeführt. Zu einem Gemisch aus **56** und Chloroform wurde *n*-Butyllithium zugetropft und dadurch *in situ* das benötigte Dichlorcarben generiert. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei -78 °C wurde das Gemisch durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und nach anschließender Aufreinigung per Säulenchromatographie konnte **57** als weißer Feststoff in 51 %-iger Ausbeute erhalten werden. *Gundersen et al.* zeigten in einer Studie an

Dialkylcyclopropenonen, dass eine Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure die Bildung von Cyclopropenonen begünstigt.<sup>[190]</sup> Die Verwendung von Wasser in der Aufarbeitung hingegen scheint die Bildung von Ynonen zu favorisieren, wodurch die Ausbeute für die entsprechenden Cyclopropenone drastisch reduziert wird. Eine Umlagerung zum entsprechenden Alkinon scheint für **57** jedoch unwahrscheinlich, da in diesem Fall aus dem Cyclooctatrien das entsprechende neungliedrige Derivat gebildet würde. Daher wurde eine alternative Hydolysemethode mit 1 M Salzsäure getestet. Auf diese Weise konnte die Ausbeute für **57** von 51 % auf 72 % gesteigert werden. Die abschließende Entschützung der TBDMS-Gruppe mit Hilfe von TBAF verlief in fast quantitativer Ausbeute (**58**).

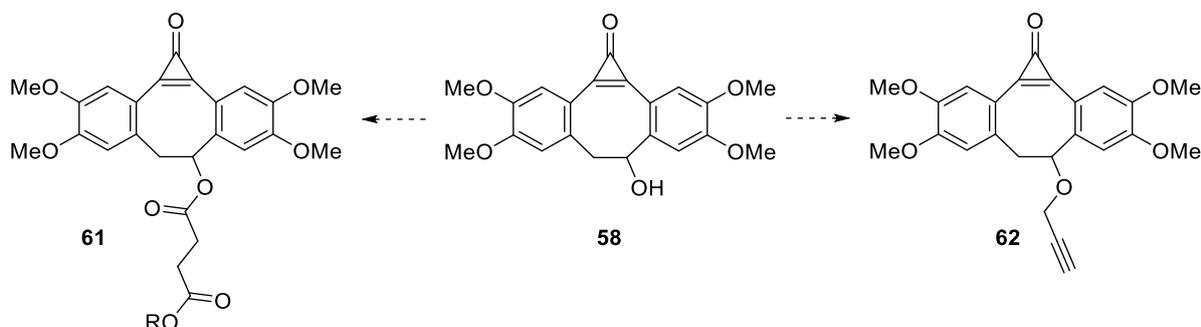
Mit diesem Baustein wurde eine Aktivierung mit *para*-Nitrophenylchloroformat durchgeführt. **59** sollte im Anschluss für die Carbamatkupplung mit **37** für die Bildung eines weiteren cyclopropenonmodifizierten Nucleosids (**60**) eingesetzt werden (Schema 35).



**Schema 35:** Getestete Syntheseroute zum cyclopropenonmodifizierten 2'-Desoxyuridin **60**. a) *para*-Nitrophenylchloroformat, DIPEA, DCM/Pyridin, 7 h, 0 °C – RT; b) **37**, DIPEA, DCM, ü.N., RT.

Die Aktivierung von **58** wurde unter Basenzusatz mit *para*-Nitrophenylchloroformat durchgeführt. Das dabei erhaltene Rohprodukt wurde extrahiert und schließlich mittels Säulenchromatographie weiter gereinigt. Das hierbei isolierte Hauptprodukt wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie analysiert, konnte jedoch nicht eindeutig dem gewünschten Aktivester **59** zugeordnet werden. Dennoch wurde die erhaltene Verbindung für eine Weiterreaktion mit **37** verwendet, wobei das gewünschte Nucleosid **60** nicht isoliert werden konnte. Eine alternative Aktivierung von **58** mit Carbonyldiimidazol ergab keinen Umsatz. Ähnlich zu **49** zeigte auch **58** eine äußerst geringe Löslichkeit, wodurch Reaktionen mit diesem Baustein erschwert wurden.

Generell wäre eine Anbindung der Cyclooptin-Einheit an das Nukleosid **37** denkbar, welches anschließend durch eine Carben-Addition in das cyclopropenonmodifizierte Nukleosid **60** überführt werden könnte. In Voruntersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass Dichlorcarbene in der Lage sind, auch mit der Doppelbindung der Uridinbase Reaktionen einzugehen, weshalb dies bedacht werden muss.



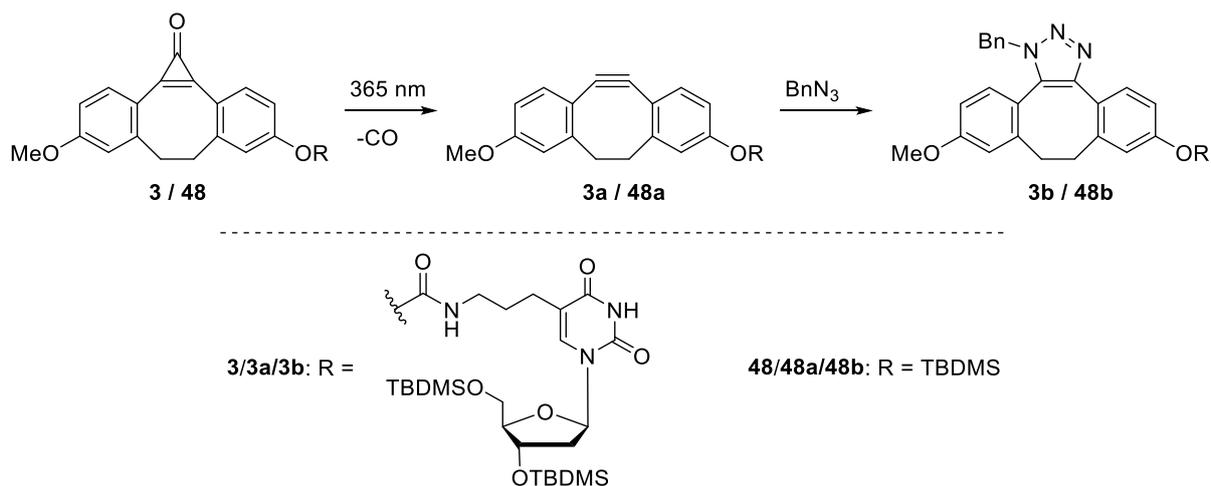
**Schema 36:** Mögliche Cyclopropenone für alternative Anbindungen an Nukleoside.

Darüber hinaus könnte die Hydroxygruppe von **58** weiter funktionalisiert werden. Mit **61** wäre eine Peptidkupplung mit **37** möglich, während durch die Bildung des terminalen Alkins **62** eine direkte Verknüpfung mit 5-Iod-2'-desoxyuridin (**11**) über eine Sonogashira-Kupplung durchgeführt werden könnte.

## 5.2 Untersuchungen einer photoinduzierten SPAAC

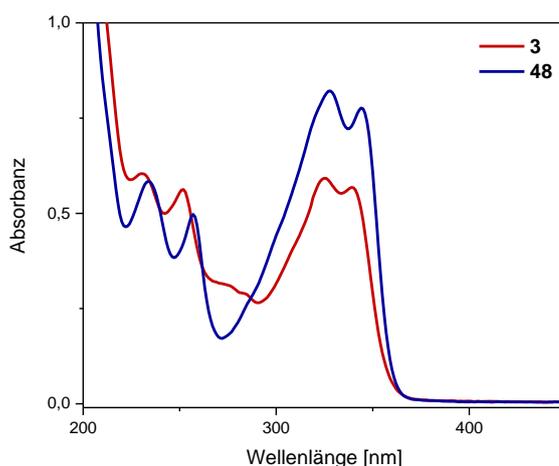
Da das cyclopropenonmodifizierte Nukleosid **3** erfolgreich synthetisiert wurde, sollte dieses schließlich spektroskopisch im Hinblick auf die Photodecarbonylierung und den potentiellen Einsatz für eine SPAAC untersucht werden.

Um beurteilen zu können, ob **3** potentiell für die bioorthogonale Markierung von DNA geeignet ist, wurde zunächst der Einfluss des verknüpften Nukleosids auf die Eigenschaften des Cyclopropenons untersucht. Zu diesem Zweck wurden Vergleiche zwischen **3** und dem einzelnen Cyclopropenon **48** in Bezug auf die Photolyse und die anschließende SPAAC angestellt. Eine Übersicht über den Verlauf dieser geplanten photoinduzierten SPAAC ist in Schema 37 gegeben.



**Schema 37:** Photodecarbonylierung der Cyclopropenone **3** bzw. **48**, wodurch die Alkine **3a** bzw. **48a** gebildet werden. Diese können nachfolgend eine SPAAC mit Aziden eingehen.

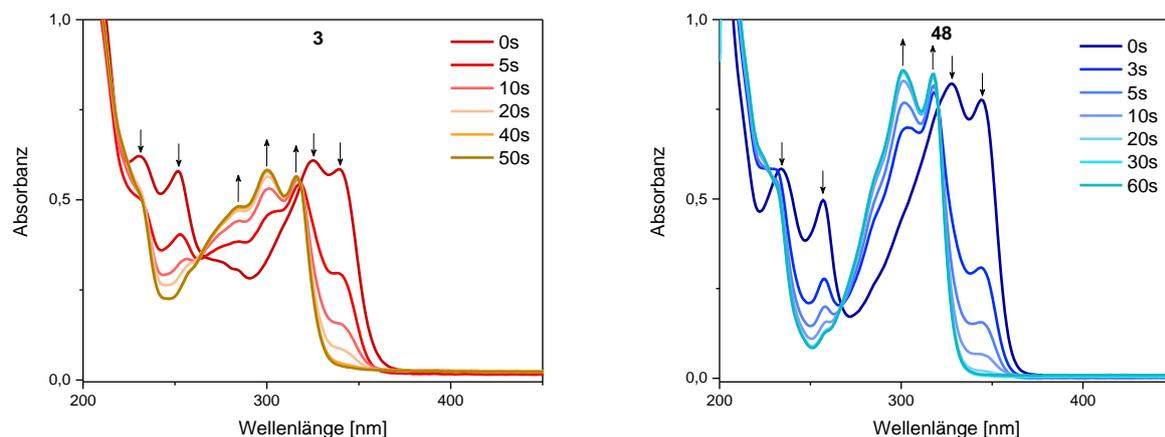
Zunächst wurden Absorptionsspektren beider Cyclopropenone in Methanol gemessen (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Absorption der Cyclopropenone **3** ( $2.58 \times 10^{-5}$  M) und **48** ( $2.42 \times 10^{-5}$  M) in Methanol.

Das Absorptionsspektrum von **48** zeigt die für Cyclopropenone charakteristische Absorptionsbande mit zwei Maxima bei 345 und 328 nm sowie weiteren zwei Absorptionsmaxima bei 257 und 234 nm. Die Absorptionsmaxima für **3** sind mit 339 und 325 nm sowie 252 und 230 nm minimal verschoben. Des Weiteren zeigt sich im Bereich zwischen 260 und 290 nm eine höhere Absorption verglichen mit **48**. Dies wird vermutlich durch die in diesem Bereich liegende Absorption der Nucleobase selbst verursacht. Die jeweiligen Absorptionsmaxima sowie die ermittelten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 3

zusammengefasst. Auffällig ist, dass **3** einen niedrigeren Extinktionskoeffizienten aufweist als **48**. Die anschließenden Untersuchungen zur photoinduzierten Decarbonylierung wurden durch Belichtung bei einer Wellenlänge von 365 nm vorgenommen. Die jeweiligen Absorptionsspektren, aufgenommen nach verschiedenen Belichtungsintervallen, sind in Abbildung 43 dargestellt.



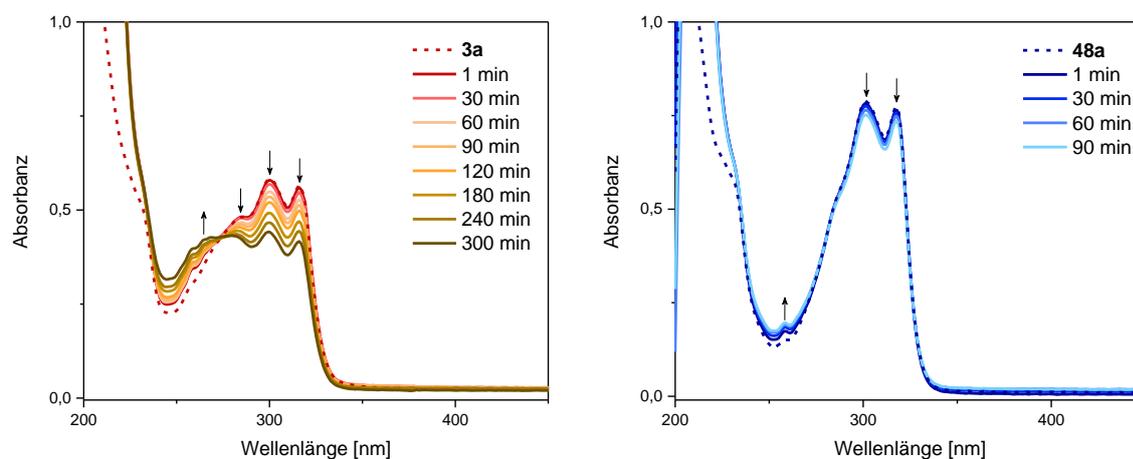
**Abbildung 43:** Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Photolyse von **3** (links) bzw. **48** (rechts) durch Belichtung mit einer 365 nm LED; aufgenommen in Methanol.

In beiden Fällen kann die Abnahme aller vier Absorptionsmaxima beobachtet werden. Durch die Belichtungen wird für **48** (Abbildung 43, rechts) eine blauverschobene Absorptionsbande, mit zwei Maxima bei 316 und 300 nm, hervorgerufen. Der gleiche Effekt kann für **3** beobachtet werden (Abbildung 43, links), wobei in diesem Fall zusätzlich eine Schulter bei ca. 285 nm auftritt. In beiden Fällen können jeweils zwei isobestische Punkte bei 265 und 318 nm (**3**) bzw. 267 und 320 nm (**48**) beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um eine stöchiometrische Umsetzung handelt. Durch Analysen mit Hilfe von hochauflösender ESI-Massenspektrometrie konnten die neu gebildeten Spezies den Alkinen **3a** und **48a** zugeordnet werden. Die Photolyse scheint bereits nach einer Belichtungsdauer von 40 s (**3**) bzw. 30 s (**48**) abgeschlossen zu sein, da durch eine weitergehende Belichtung keine zusätzliche Änderung in der Absorption mehr detektiert werden kann.

**Tabelle 3:** Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Cyclopropenone **3** und **48** sowie der jeweiligen durch Bestrahlung generierten Alkine **3a** und **48a** (in Methanol).

Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon$ ( $\lambda$ ) [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
<b>3</b>	339, 325, 252, 230	22.7 (339nm)
<b>3a</b>	316, 300	-
<b>48</b>	345, 328, 257, 234	32.0 (345 nm)
<b>48a</b>	318, 301	-

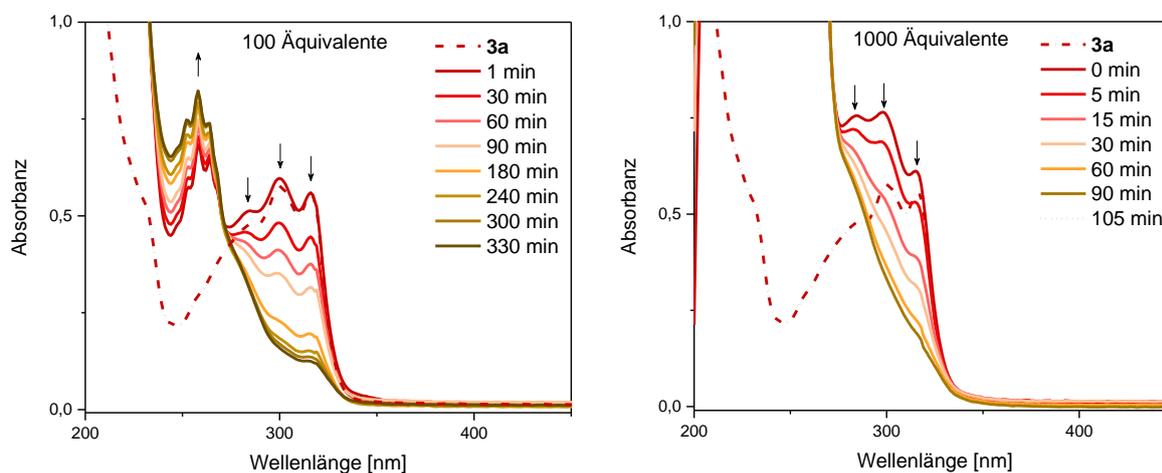
Um grundlegend zu überprüfen, ob die beiden Bausteine eine SPAAC mit einem Azid eingehen können, wurde das in der Literatur häufig verwendete Benzylazid als Reaktionspartner genutzt. Zunächst wurde das Absorptionsverhalten durch Zugabe von 10 Äquivalenten des Benzylazids untersucht.



**Abbildung 44:** Zeitlicher Verlauf der Absorption für die Untersuchung einer SPAAC der Alkine **3a** (links) und **48a** (rechts) mit Benzylazid (10 Äquivalente); aufgenommen in Methanol.

Ein Vergleich der benzylazidhaltigen Proben zu Reaktionsbeginn (1 min) mit den reinen Proben **3a** bzw. **48a** zeigt, dass durch die Zugabe des Benzylazids die Absorption bei Wellenlängen kürzer 270 nm leicht erhöht wurde, auch wenn die Reaktion noch nicht fortgeschritten ist. Dieser Effekt zeigt sich besonders stark im Bereich zwischen 230 und 200 nm und ist auf die Absorption des eingesetzten Benzylazids zurückzuführen. Für die Reaktion mit **3a** kann im Verlauf der Zeit eine Abnahme der charakteristischen Absorptionsbanden beobachtet

werden, während die Absorption im Bereich um 260 nm leicht ansteigt. Diese Änderungen könnten durch die zunehmende Bildung des Triazols **3b** verursacht worden sein. Mit Hilfe von hochaufgelöster ESI-Massenspektrometrie konnte dieses nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall kann ein isosbestischer Punkt bei 274 nm beobachtet werden, welcher auf die einheitliche Bildung des Triazols ausgehend vom Alkin hinweist. Nach einer Dauer von 300 min scheint diese Reaktion jedoch noch nicht abgeschlossen zu sein. Ein vergleichbarer Trend kann bei der Reaktion mit **48a** beobachtet werden, wobei die Änderung der Absorption hier noch geringer ausfällt, Messungen daher über längere Zeiten nicht fortgesetzt wurden. Um ein vollständiges Fortschreiten der Reaktion beobachten zu können, wurden weitere Experimente mit **3a** und 100 bzw. 1000 Äquivalenten des Benzylazids durchgeführt (Abbildung 45). Die entsprechenden Untersuchungen mit **48a** sind in Abbildung A19 (Kapitel 7.6.4) dargestellt.



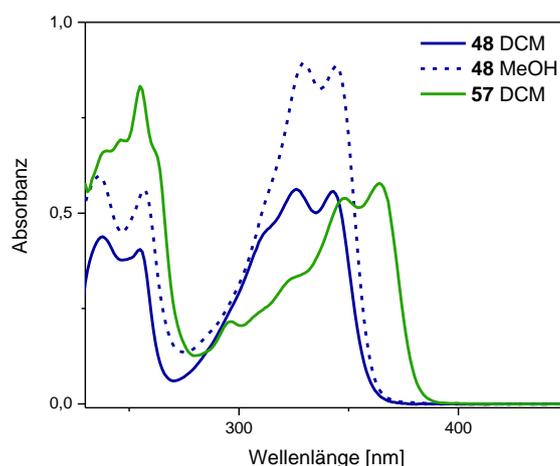
**Abbildung 45:** Zeitlicher Verlauf der Absorption für die SPAAC zwischen **3a** und Benzylazid (100 bzw. 1000 Äquivalente) zur Bildung des Triazols **3b**; aufgenommen in Methanol.

Durch die Verwendung höherer Benzylazid-Konzentrationen wurde auch eine verstärkte Absorption, insbesondere im Bereich von 200 bis 270 nm, hervorgerufen, welche auf das Benzylazid selbst zurückzuführen ist. Dennoch kann im zeitlichen Verlauf die Abnahme der Absorptionsmaxima von **3a** beobachtet werden. So scheint durch Verwendung von 100 Äquivalenten nach einer Zeit von 240 min nur noch eine geringe Absorptionsänderung aufzutreten. Bei 1000 Äquivalenten konnte nach 90 min keine weitere Änderung mehr beobachtet werden. Dies könnte durch die vollständige Reaktion von **3a** zum Triazol **3b** verursacht worden sein. Eine weiterführende Abnahme der Absorptionsbande wäre möglicherweise aufgrund der Überlagerung durch das überschüssige Benzylazid nicht

detektierbar. Die SPAAC mit **48a** erfolgte mit vergleichbarer Kinetik, wie aus den Absorptionsspektren in Abbildung A19 (Kapitel 7.6.4) ersichtlich ist. Um den Einfluss durch das Nukleosid auf die Geschwindigkeit der SPAAC mit Benzylazid exakt zu bestimmen, müssten jedoch die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden.

Generell zeigten die Cyclopropenone **3** und **48** ein vergleichbares Verhalten in der Photolyse sowie der nachfolgenden SPAAC mit Benzylazid.

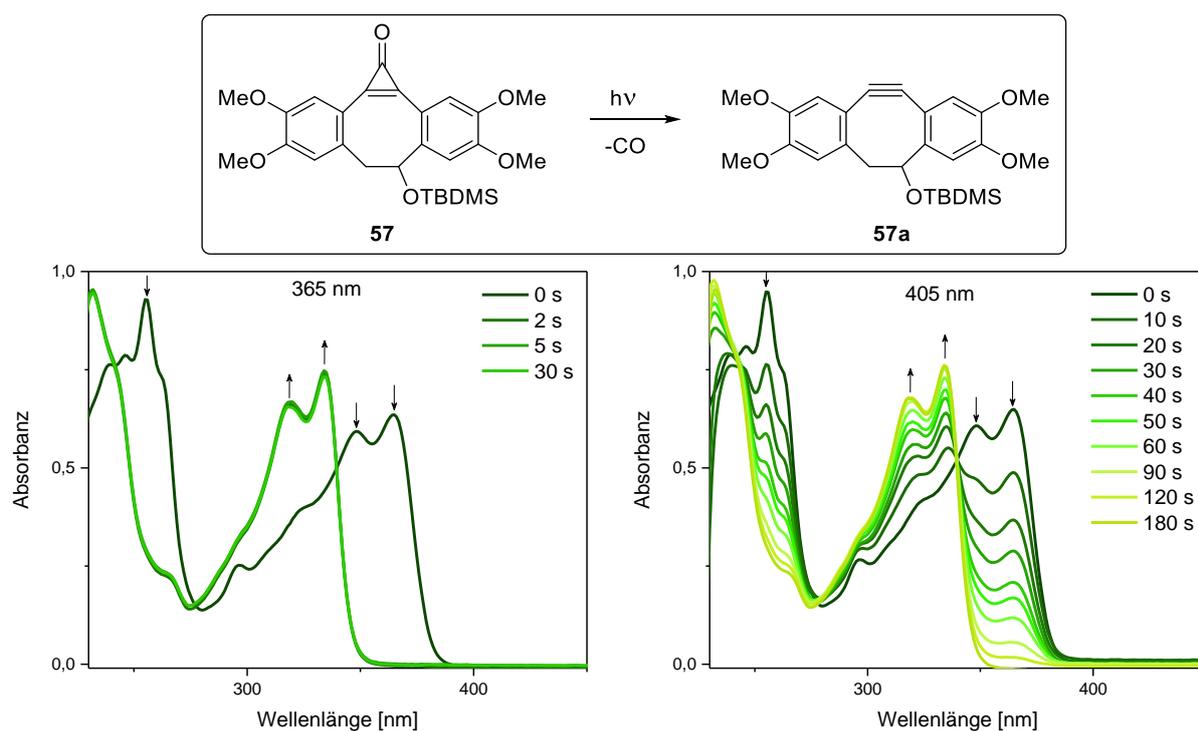
Darüber hinaus wurde die photoaktivierbare SPAAC mit **57** untersucht, um zu testen, ob dieses verbesserte Eigenschaften gegenüber **48** aufweist. Da **57** keine ausreichende Löslichkeit in Methanol zeigte, wurden die folgenden Spektren in Dichlormethan aufgenommen. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist daher nur eingeschränkt möglich. Um dennoch den Einfluss des Lösungsmittels einschätzen zu können, wurden Vergleichsspektren von **48** in Dichlormethan aufgenommen, welche zusammengefasst in Abbildung 46 dargestellt sind.



**Abbildung 46:** Absorption der Cyclopropenon-Bausteine **48** und **57**. Die Proben wurden in einer Konzentration von  $2.75 \times 10^{-5}$  M (**48**, Methanol),  $2.80 \times 10^{-5}$  M (**48**, Dichlormethan) bzw.  $3.00 \times 10^{-5}$  M (**57**) vermessen.

Der direkte Vergleich der Absorption von **48** in den getesteten Lösungsmitteln zeigt, dass die einzelnen Absorptionsmaxima kaum verschoben sind, die Absorption in Dichlormethan verglichen zu Methanol aber deutlich vermindert ist. Im Vergleich dazu zeigt **58** eine rotverschobene Absorptionsbande mit einem Maximum bei 364 nm. Zwei weitere Absorptionsmaxima liegen bei 348 und 255 nm. Der Extinktionskoeffizient fällt dabei mit  $\epsilon_{364} = 19.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  etwas geringer aus verglichen mit dem von **48** ( $\epsilon_{364} = 25.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Da sich die Absorption von **57** in einen längerwelligeren Bereich erstreckt als es für **3** und **48** der Fall ist, kann die Photolyse zum Alkin **57a** auch durch Bestrahlung mit längerwelligem Licht untersucht werden. Dies ist unter dem Gesichtspunkt der potentiellen bioorthogonalen Anwendung von besonderem Interesse. Für die Belichtungsexperimente wurden zusätzlich zu der bereits für **3** und **48** verwendeten 365 nm LED noch eine weitere LED mit einem Intensitätsmaximum bei 405 nm verwendet. Die durch verschiedene Belichtungszeiten erhaltenen Absorptionsspektren sind in Abbildung 47 dargestellt.

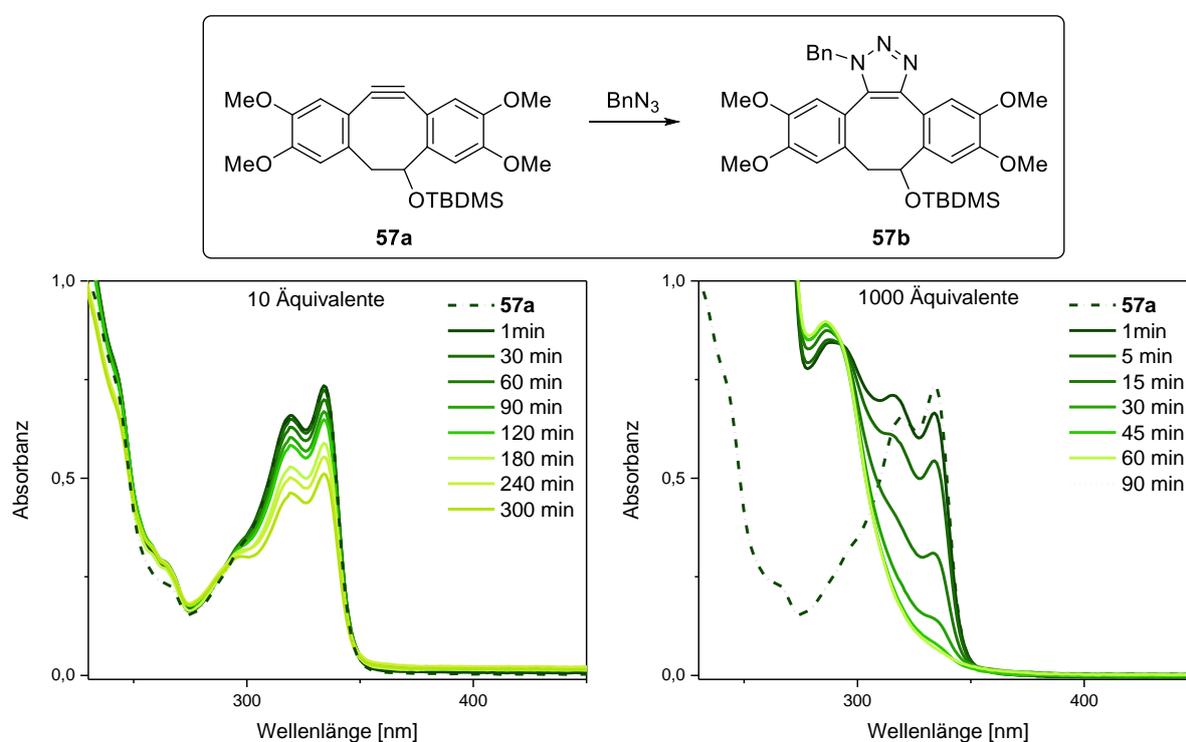


**Abbildung 47:** Photoinduzierte Decarbonylierung von **57** zu **57a**. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Absorption in Dichlormethan nach unterschiedlichen Belichtungsintervallen bei 365 nm (links) bzw. 405 nm (rechts).

Die Photolyse von **57** bei 365 nm, folglich im Absorptionsmaximum, ist bereits nach einer Belichtungszeit von 2 s vollständig abgeschlossen. Das neu entstandene Absorptionsspektrum weist zwei neue Absorptionsmaxima bei 334 und 318 nm auf, während die charakteristischen Absorptionsbanden des Cyclopropenons nicht mehr sichtbar sind. Das hierbei gebildete Alkin **57a** konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die gleichen Änderungen im Absorptionsverhalten wurden durch eine Belichtung bei 405 nm erreicht, jedoch war für die vollständige Decarbonylierung eine deutlich längere Belichtungsdauer von bis zu 180 s notwendig. Durch den langsameren Reaktionsverlauf kann vergleichbar zu **3** und **48** ein

isosbestischer Punkt bei 340 nm für die Bildung von **57a** ausgehend von **57** beobachtet werden. Hieraus zeigt sich ein Vorteil gegenüber **48**, da eine Verschiebung der für die Belichtung notwendigen Wellenlänge möglichst weit in den sichtbaren Bereich für spätere Anwendungen in biologischen Systemen wünschenswert sind.

Nach erfolgter Bildung des Cyclooktins **57a** wurde die SPAAC mit Benzylazid charakterisiert. In Anlehnung an die Experimente mit **3a** und **48a** wurden Messungen mit 10, 100 und 1000 Äquivalenten des Azids durchgeführt. In Abbildung 48 sind die Absorptionsspektren der SPAAC mit 10 und 1000 Äquivalenten dargestellt, jene mit 100 Äquivalenten können Abbildung A20 (Kapitel 7.6.4) entnommen werden.



**Abbildung 48:** SPAAC von **57a** mit Benzylazid zur Bildung des Triazols **57b**. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Absorption für die Reaktion in Dichlormethan unter Einsatz unterschiedlicher Äquivalente des Benzylazids (10 bzw. 1000).

Die SPAAC mit 10 Äquivalenten des Benzylazids zeigte eine Abnahme der Absorption im Bereich der Absorptionsbande von **57a**, welche der Bildung des Triazols **57b** zugeschrieben wird. Nach einer Reaktionsdauer von 300 min konnte allerdings noch keine Sättigung erreicht werden, weshalb weitere Experimente mit 1000 Äquivalenten durchgeführt wurden. In diesem Fall zeigte sich eine schnellere Abnahme der Absorption, welche nach 60 min ein

Minimum erreichte und vermutlich auf die vollständig erfolgte SPAAC zurückzuführen ist. Ein Vergleich der SPAAC von **3a**, **48a** und **57a** mit 1000 Äquivalenten des Azids zeigt, dass **57a** unter den gewählten Reaktionsbedingungen effektiver reagiert. Dies geht besonders aus den Absorptionsspektren der jeweiligen Verbindung nach einer Reaktionszeit von 60 min hervor, da bei **57a** ab diesem Zeitpunkt keine weitere Veränderung in der Absorption mehr auftrat. Um diesen Trend zu verifizieren, wäre allerdings die genaue Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante in einem einheitlichen Lösungsmittel erforderlich.

### 5.3 Zusammenfassung

Die Cyclopropenone **48** und **57** konnten in guten Ausbeuten von 65 % (**48**) über eine Friedel-Crafts-Alkylierung bzw. 72 % (**57**) über eine Carben-Addition aus den jeweiligen Vorstufen erhalten werden. Die Vorstufe **47** konnte dabei ausgehend der kommerziell erhältlichen Ausgangsverbindungen in 4 Schritten mit einer hohen Gesamtausbeute von 84 % synthetisiert werden. Die Synthese der Vorstufe **57** erfolgte hingegen mit einer Gesamtausbeute von nur 13 % über 5 Stufen. Die Problematik im synthetischen Zugang zu cyclopropenonmodifizierten Nucleosiden liegt allerdings in der Verknüpfung der Cyclopropenon-Bausteine mit einem geeigneten Nucleosid. So ergab die Carbamatkupplung von **37** mit **49** das gewünschte funktionalisierte Nucleosid **3** lediglich in einer Ausbeute von 16 %, während die entsprechende Kupplung mit **58** nicht erfolgreich war. Eine direkte Kupplung der jeweiligen Vorstufen löst diese Schwierigkeit nicht, da die genutzten Methoden für die letztendliche Bildung der Cyclopropenone an Nucleosiden nicht anwendbar scheinen.

Die spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass alle getesteten Cyclopropenone durch Belichtung eine Decarbonylierung unterlaufen, woraus die entsprechenden Alkine gebildet wurden. In diesem Aspekt zeigte sich ein Vorteil der Cyclopropenonstruktur von **57** gegenüber der von **3** bzw. **48**, da hier die Photolyse nicht nur durch Belichtung bei 365 nm, sondern auch bei 405 nm induziert werden konnte. Die anschließende SPAAC mit Benzylazid lief mit allen getesteten durch Belichtung gebildeten Alkinen mit einer vergleichbaren Kinetik ab.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das angestrebte cyclopropenonmodifizierte Nucleosid **3** erfolgreich synthetisiert und in einer photoinduzierten SPAAC mit Benzylazid eingesetzt werden konnte. Folglich scheint dies eine mögliche Alternative zu den in der

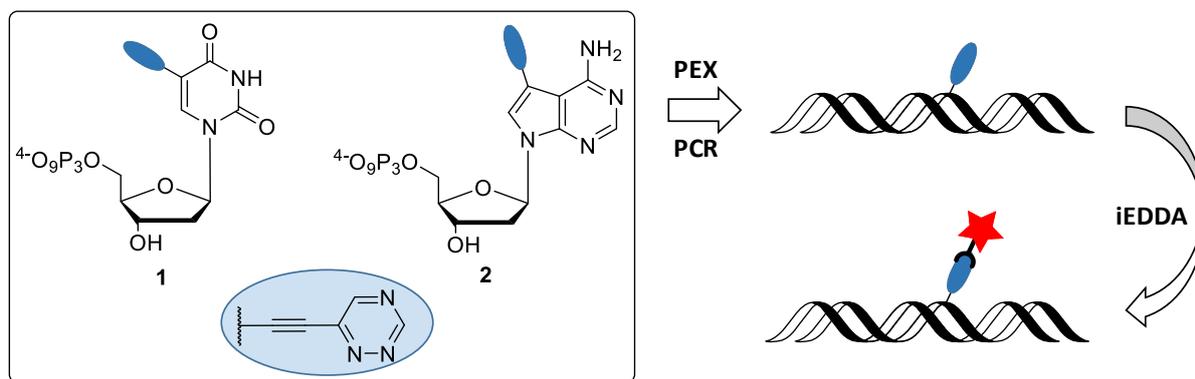
Nucleinsäurechemie bereits etablierten Tetrazolen zu sein, wobei die bioorthogonale Markierung zunächst in der DNA weiter untersucht werden müsste. Hierfür könnte das Nucleosid entweder chemisch als Phosphoramidit oder enzymatisch als Triphosphat in Oligonucleotide eingebaut werden. Darüber hinaus zeigten die spektroskopischen Untersuchungen, dass eine Optimierung eines solchen Nucleosids im Hinblick auf die notwendige Anregungswellenlänge durch den Einsatz des Cyclopropanons **57** anstelle **48** erreicht werden könnte.



## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit konnten durch die synthetische Funktionalisierung von Nucleosiden neue Methoden der kupferfreien bioorthogonalen DNA-Markierung entwickelt werden, die sich zum Teil auch für die Mehrfachmarkierung mittels PCR eignen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die beiden neuen triazinmodifizierten Nucleosid-Triphosphate **1** und **2** synthetisiert.

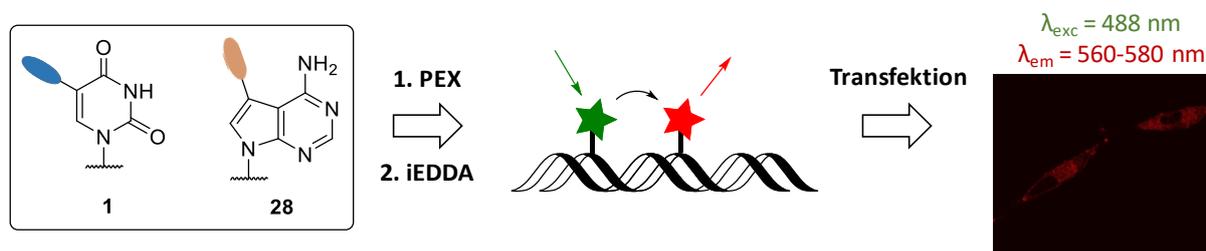


**Abbildung 49:** Schematische Darstellung des enzymatischen Einbaus der Triphosphate **1** und **2** mit anschließender bioorthogonaler Markierung.

Beide Bausteine konnten unter physiologischen Bedingungen sequenzspezifisch durch den Einsatz von Standard-DNA-Polymerasen in Oligonukleotide eingebaut werden. Die dadurch erhaltenen modifizierten DNA-Stränge konnten postsynthetisch in hohen Ausbeuten mit einem BCN-modifizierten Rhodamin in einer iEDDA markiert werden. Für das dUTP-Analogon **1** konnte eine 80 %-ige Ausbeute nach einer Inkubationszeit von 45 min erzielt werden. Die etwas höhere maximale Markierungsausbeute des 7-Deaza-dATP-Analogons **2** (85 %) konnte bereits nach einer Reaktionszeit von 30 min erreicht werden. Eine erhöhte Reaktivität von **2** gegenüber **1** äußerte sich zudem in der Konjugation mit einem COMBO-modifizierten Rhodamin. Während **1** keinerlei Reaktivität gegenüber diesem Dienophil zeigte, konnte für **2** immerhin eine Ausbeute von ca. 20 % erzielt werden. Im Anschluss wurde die Eignung beider Nucleotide für enzymatische Anwendungen weiter untersucht. Für einen direkten Vergleich wurden **1** und **2** in PCR-Experimenten eingesetzt und darüber hinaus die Kinetik für den enzymatischen Einbau bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Effizienz in der

DNA-Amplifikation, insbesondere von längeren Templaten, unter Verwendung des 7-Deaza-dATPs **2**. Dieser Effizienzunterschied spiegelte sich ebenfalls in der Kinetik für die enzymatische Primerverlängerung wieder. Für einen zweifachen Einbau reduzierte **1** die enzymatische Geschwindigkeit der DNA-Polymerase um 75 %, während **2** lediglich eine Reduktion von 40 % verursachte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für beide Bausteine eine gute Akzeptanz durch DNA-Polymerasen erreicht werden konnte. Für die vorliegende Ethinyltriazinmodifikation ist das 7-Deaza-dATP jedoch deutlich besser geeignet als das dUTP. Obwohl die Darstellung von **2** verglichen mit **1** einen höheren synthetischen Aufwand umfasst, wird dadurch eine bessere enzymatische Anwendung ermöglicht, wie es sich bereits in der Mehrfachmarkierung der PCR-Produkte zeigte. Aufgrund der guten Akzeptanz durch die verwendeten DNA-Polymerasen und der vergleichsweise geringen Größe der Modifikation, könnte **2** in zukünftigen Experimenten für die metabolische Markierung zellulärer DNA zum Einsatz kommen. Für eine solche Anwendung könnte die beschriebene Triazinmodifikation zudem auf RNA-Bausteine übertragen und im Hinblick auf die intrazelluläre Markierung von RNA untersucht werden.

Darüber hinaus konnte die Mehrfachmarkierung der DNA nicht nur durch die bereits beschriebenen PCR-Experimente realisiert werden. Auch der sequenzspezifische Einbau von **1** und **2** erlaubte eine doppelte Markierung von Oligonukleotiden durch zwei iEDDAs mit BCN-Rhodamin. Um eine tatsächlich orthogonale duale Markierung zu erhalten, wurde schließlich **1** in Kombination mit dem cyclopropenmodifizierten 7-Deaza-dATP **28** verwendet (siehe Abbildung 50).

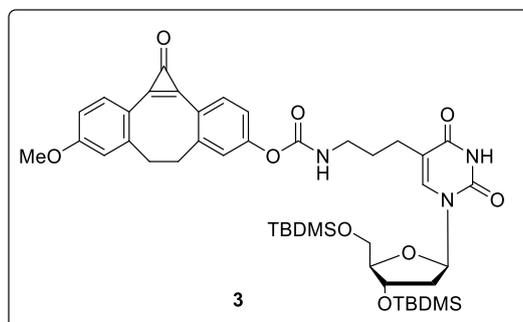


**Abbildung 50:** Übersicht über die duale Markierung mit **1** und dem cyclopropenmodifizierten Baustein **28**.

Diese beiden verschiedenen bioorthogonalen Reporter konnten ebenfalls sequenzspezifisch für die enzymatische DNA-Synthese genutzt werden. Die resultierenden funktionalisierten Oligonukleotide konnten in zwei untereinander orthogonalen iEDDAs mit zwei verschiedenen

Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert werden. Durch die gezielte Wahl des BCN-Rhodamins als Dienophil für das Triazin und eines tetrazinmodifizierten BODIPYs als Reaktionspartner für das Cyclopropen konnten die modifizierten Oligonukleotide kovalent mit einem Energietransferpaar versehen werden. Dieser Energietransfer konnte durch Transfektion der markierten DNA in *HeLa*-Zellen auch intrazellulär nachgewiesen werden, was eine zusätzliche Anwendbarkeit für die fluoreszente Bildgebung *in vivo* demonstriert. Generell stellt diese Vorgehensweise die erste kupferfreie bioorthogonale Methode für die orthogonale duale Markierung von DNA dar.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte mit der Synthese des Bausteins **3** erstmals ein Nukleosid mit einem Cyclopropenon funktionalisiert werden. Dieses konnte durch Belichtung bei einer Wellenlänge von 365 nm in das entsprechende Alkin überführt und im Anschluss mit einem Azid in einer SPAAC konjugiert werden. Durch den Einsatz von Cyclopropenonen könnte folglich eine selektive, durch die Photoaktivierung räumlich und zeitlich steuerbare DNA-Markierung erreicht werden. Für eine tatsächlich postsynthetische Markierung müsste der Baustein jedoch zunächst enzymatisch oder per Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut und weiter charakterisiert werden.



**Abbildung 51:** Struktur des cyclopropenonmodifizierten Nukleosids **3**, welches für die photoaktivierbare SPAAC geeignet ist.

Prinzipiell stellen Cyclopropenone und Triazine zueinander orthogonale Bausteine dar. Durch die räumliche und zeitliche Kontrolle der photoinduzierten SPAAC könnten sich weitere Vorteile in der Optimierung von dualen Markierungen ergeben.



## **7. Experimentalteil**

### **7.1 Materialien und Geräte**

#### **Lösungsmittel und Reagenzien**

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *ABCR*, *Acros Organics*, *Alpha Aesar*, *TCI*, *Carl Roth* und *VWR* bezogen und soweit nicht anders beschrieben ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel wurden mindestens in der Reinheitsstufe *p.a.* (*pro analysi*) erworben. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Sigma Aldrich* und *Acros Organics* bezogen und unter Argon aufbewahrt und gehandhabt. Zur Aufarbeitung und Aufreinigung wurden technische, abdestillierte Lösungsmittel verwendet. Für HPLC-Trennungen wurden hochreine Lösungsmittel (HPLC grade) sowie doppelt entionisiertes Wasser (*Milli-Q®* Direct 8/16 Anlage der Firma *Merck Millipore*) genutzt, Puffer wurden vor Gebrauch filtriert.

#### **Chemische Synthese**

Luft- und wasserempfindliche Reaktionen wurden mittels Schlenk-Technik unter Argon-Atmosphäre (Argon 4.6, *Air Liquide*, 99.999 % Reinheit) durchgeführt. Die benötigten Glasgeräte wurden zuvor mehrfach im Hochvakuum ausgeheizt und mit Argon geflutet.

Für Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden die folgenden Kältemischungen verwendet:

- 0 °C Eis in Wasser
- - 15 °C NaCl in Eis
- - 40 °C Trockeneis in Isopropanol
- - 78 °C Trockeneis in Isopropanol

Lichtempfindliche Reaktionen wurden, soweit möglich, unter Lichtausschluss durchgeführt. Dazu wurden Reaktionskolben und weitere verwendete Geräte mit Aluminiumfolie abgedeckt.

## Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend entweder an einer Lyophilisierungsanlage *Alpha 1-2 LD Plus* von *Christ* oder in einem Vakuumkonzentrator (*Alpha RVC*) von *Christ* getrocknet.

## Chromatographie

- **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Für die Reaktionskontrolle wurden mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete Aluminiumplatten (Schichtdicke 0.25 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die optische Detektion erfolgte mit Hilfe einer UV-Handlampe entweder bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) oder 366 nm (Fluoreszenzanregung). Für die chemische Auswertung wurden folgende Färbelösungen verwendet; eine Visualisierung erfolgte durch anschließendes Erhitzen:

- 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH
- Kaliumpermanganatlösung (1.0 g KMnO<sub>4</sub>, 2.5 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 g NaOH, 100 mL H<sub>2</sub>O)
- Ninhydrin-Lösung (3.0 g Ninhydrin in 200 mL EtOH)

- **Flash-Chromatographie (FC)**

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40 – 63 µm der Firma *Sigma Aldrich* verwendet. Die Säule wurde nass gepackt und die zu reinigende Substanz vorher entweder in der mobilen Phase gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem von *Still* beschriebenen Verfahren,<sup>[200]</sup> wobei zum Erzeugen des Überdrucks eine Handpumpe verwendet wurde.

- **Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)**

Für die Reinigung der Triphosphate wurden zwei HPLC-Systeme von *Shimadzu* mit den folgenden Komponenten verwendet: Entgaser *DGU-14A*, Pumpeneinheit *LC-10AT* bzw. *LC-10AD*, Autosampler *SIL-10AD*, Multidiodenarraydetektor *SPD-M10A* bzw. *SPD-M20A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Steuersoftware *Class-VP* bzw. *Lab Solutions*. Die präparative Trennung mittels Umkehrphase erfolgte über eine *Supercosil Discovery*<sup>®</sup> BIO Wide Pore C18 Säule (25 cm x 10 mm, 5 µm Porengröße, *Supelco*) mit einer Flussgeschwindigkeit von 2.5 mL/min. Zur Elution wurde ein Gradient aus MeCN

(Laufmittel B) in 50 mM TEAB-Puffer (pH = 7.2, Laufmittel A) verwendet. Für die präparative Trennung mittels Anionenaustausch wurde eine PL-SAX-Säule (15 cm x 7.5 mm, 8  $\mu$ m Porengröße, *Agilent*) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.5 mL/min verwendet. Als Komponente A wurde 15 % MeCN in Wasser, als Komponente B 15 % MeCN in 0.85 M TEAB-Puffer (pH = 8.5) verwendet.

### NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem *Bruker B-ACS 60* (300 MHz  $^1\text{H}$ -Spektren) oder *Bruker Ascend 500* (500 MHz  $^1\text{H}$ -, 126 MHz  $^{13}\text{C}$ - und 202 MHz  $^{31}\text{P}$ -Spektren) aufgenommen. Hierfür wurden etwa 5 mg der zu untersuchenden Substanz in einem Probenröhrchen mit 5 mm Außendurchmesser in 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel der Firma *eurisotop* gelöst. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wurde in *parts per million* (ppm) angegeben und bezieht sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Für die Kalibrierung wurde das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels verwendet:

- $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 7.26$  ppm  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 77.16$  ppm
- $\text{DMSO-d}_6$ :  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 2.50$  ppm  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 39.52$  ppm
- $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 3.31$  ppm  $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta = 49.00$  ppm
- $\text{D}_2\text{O}$ :  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta = 4.79$  ppm

Die Kopplungskonstante  $J$  wurde in Hz angegeben und die Multiplizität wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplett), dq (Dublett vom Quartett), ddd (Dublett vom Dublett vom Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett) und m (Multipllett).

### Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Messungen wurden durch die analytische Abteilung des Instituts für Organische Chemie und im Arbeitskreis Barner-Kowollik am KIT durchgeführt.

Hierfür wurde ein *Finnigan MAT 95* eingesetzt, wobei als Ionisierungsverfahren entweder FAB (*Fast Atom Bombardment*) oder EI (Elektronenstoßionisation) verwendet wurden. Des Weiteren wurden ESI-Messungen an einer *Q Exactive Orbitrap* der Firma *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt.

MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* aufgenommen. Hierfür wurden folgende Matrizen verwendet:

- 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP)      0.3 M in Ethanol
- 6-Aza-2-thiothymin (ATT)                      gesättigte Lösung in Acetonitril

Die Peaks werden im Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) angegeben.

### UV-Vis Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden entweder an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* oder an einem *Perkin Elmer Lamda 750* jeweils mit temperierbarem Küvettenhalter, aufgenommen. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Messungen bei 20 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke: 1 cm) der Firma *Starna* mit folgenden Parametern durchgeführt:

- *Cary 100 Bio*: SBW: 2.0 nm, Durchschnittszeit 0.1 s, Datenintervall: 1.0 nm, Lampenwechsel: 350 nm
- *Perkin Elmer Lamda 750*: Response: 0.08 s, Datenintervall 1.0 nm, Lampenwechsel 319.2 nm, Slits: 2.0 nm

### Schmelzpunkte

Schmelztemperaturmessungen wurden am *Cary 100 Bio* mit dem Programm „Thermal“ aufgenommen. Hierfür wurde die Absorptionsänderung bei  $\lambda = 260$  nm in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 90 °C verfolgt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min, an den Endpunkten wurde die Temperatur jeweils 10 min gehalten. Messpunkte wurden in 0.5 °C Intervallen aufgezeichnet. Es wurden Quarzglas Mikro-Küvetten der Firma *Hellma* mit einer Schichtdicke von 3 mm und einem Probenvolumen von 140  $\mu$ L verwendet.

### Fluoreszenzspektroskopie

Emissions- und Anregungsspektren wurden an einem *Fluoromax-4* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Horiba Scientific* mit einem AC 200 Thermostat von *Thermo Scientific* aufgenommen. Messungen wurden bei 20 °C mit einer Toleranz von 0.1 °C durchgeführt und gegen die Raman-Streuung des Lösungsmittels korrigiert. Soweit nicht anders beschrieben wurden

Quarzglas Mikro-Küvetten der Firma *Hellma* mit einer Schichtdicke von 3 mm und einem Probenvolumen von 140  $\mu\text{L}$  sowie folgende Messparameter verwendet: *Increment* 1.0 nm, *Increment time*: 0.2 s, *Integration time*: 0.1 s, *Slits*: 7 nm.

### Belichtungsexperimente

Belichtungsexperimente wurden mit Hochleistungs-UV-LEDs der Firma *Nichia* bei 365 nm und 405 nm durchgeführt. Dafür wurde ein Belichtungsreaktor verwendet, welcher von der zentralen feinmechanischen und elektronischen Abteilung der Universität Regensburg gefertigt wurde. Dieser verfügt über einen Rührmotor und zwei Peltier-Elemente zur Regelung der Temperatur.

### Konzentrationsbestimmung der Triphosphate und Oligonukleotide

Um die Konzentration von Oligonukleotiden und Triphosphaten in wässrigen Lösungen zu bestimmen wurde mithilfe eines ND-100 Spektrometers der Firma *NanoDrop* die Absorption bei 260 nm gemessen. Hierfür wurde ein Probenvolumen von 1  $\mu\text{L}$  verwendet und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt.

Der molare Extinktionskoeffizient von Oligonukleotiden wurde entsprechend der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleoside beziehungsweise der Modifikationen wie folgt berechnet:

$$\epsilon_{260} = (X * \epsilon_{260}(A) + X * \epsilon_{260}(T) + X * \epsilon_{260}(C) + X * \epsilon_{260}(G) + x * \epsilon_{260}(Mod)) * 0.9$$

Hierfür wurden die folgenden Parameter verwendet:

- X: jeweilige Anzahl
- $\epsilon_{260}(A) = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $\epsilon_{260}(T) = 8.80 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $\epsilon_{260}(C) = 7.30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- $\epsilon_{260}(G) = 11.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- molarer Extinktionskoeffizient der verschiedenen Modifikationen ( $\epsilon_{260}(\text{Mod})$ ):
  - $\epsilon_{260}(\text{Fluo}) = 20900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
  - $\epsilon_{260}(\text{Cy5}) = 10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
  - $\epsilon_{260}(\mathbf{14}) = 6083 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
  - $\epsilon_{260}(\mathbf{27}) = 9953 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Um die Hypochromizität von Oligonukleotiden zu berücksichtigen wurde ein Korrekturfaktor von 0.9 angewandt.

### **Bausteine der Primerverlängerungs- und PCR-Experimente**

Kommerzielle Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion* in HPLC-gereinigtem, lyophilisiertem Zustand bezogen und nach Erhalt in entionisiertem Wasser gelöst.

DNA-Polymerasen, sowie die entsprechenden Reaktionspuffer, wurden von der Firma *New England Biolabs* bezogen.

CF640R-Farbstoffe wurden von der Firma *Biotium*, BCN- und COMBO-modifiziertes Rhodamin B von der Arbeitsgruppe Prof. Péter Kele (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) erhalten.

### **Thermocycler**

Für Primerverlängerungs- und PCR-Experimente wurde der Thermocycler TGradient 96 mit beheizter Deckeinheit der Firma *Biometra/Aanalytik Jena* verwendet. Für die Durchführung wurden Mikroreaktionsgefäße der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet.

### **Gelelektrophorese**

Analysen der Primerverlängerungs- und PCR-Experimente wurden mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Für Primerverlängerungsexperimente wurde eine *Sequi-Gen GT Sequencing Cell* (21 cm x 40 cm), für PCR-Experimente eine *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (10 cm x 10 cm) verwendet. Beide Gelkammersysteme stammen von der Firma *BioRad* und wurden mit einer *PowerPac HV* Stromquelle, ebenfalls von *BioRad*, betrieben.

### **Fluoreszenzimager**

Die Auswertung der Polyacrylamidgele erfolgte mit einem *Stella 8300* Fluoreszenzimager der Firma *Raytest*. Die Anregungswellenlänge sowie der verwendete Emissionsfilter wurden entsprechend den unterschiedlichen Chromophore gewählt (siehe Tabelle 4). Zur Aufnahme der Emission (Fluoreszenz) wurde eine auf – 20 °C gekühlten CCD-Kamera verwendet. Die Belichtungszeit variierte dabei zwischen 30 s und 2 min.

**Tabelle 4:** Anregungswellenlänge und entsprechende Emissionsfilter für die Auswertung der Polyacrylamidgele.

<b>Chromophor</b>	<b>Anregungswellenlänge (<math>\lambda_{exc}</math>)</b>	<b>Emissionsfilter (<math>\lambda_{em}</math>)</b>
Fluorescein BODIPY-FL	470 ± 20 nm (Lampe 1)	535 ± 20 nm (cy2m)
Rhodamin B Tetramethylrhodamin	540 ± 10 nm (Lampe 2)	605 ± 10 nm (cy3m)
CF640R Cy5	630 ± 10 nm (Lampe 3)	700 ± 17.5 (cy5m)

Zur Auswertung der Bilder wurde die Software *Aida Image Analyzer v.450* der Firma *Raytest* verwendet.

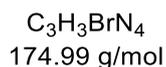
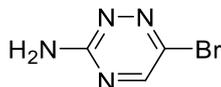
### **Zellexperimente**

Die Zellexperimente wurden mit humanen Cervix-Karzinomzellen vom Typ *HeLa wt* durchgeführt, welche im Institut für Toxikologie und Genetik kultiviert wurden. Für die Experimente wurden 8-Well-Platten ( *$\mu$ -slide 8 well*) der Firma *ibidi* benutzt.

Die Visualisierung der transfizierten DNA-Konstrukte erfolgte an einem *Leica TCS SPE (DMI400)* Konfokalmikroskop mit einem *ACS APO 40x/1.15 OIL* Objektiv mit Hilfe der Software *Leica Application Suite X (LAS X)* in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und einer Tiefe von 8 Bit.

## 7.2 Synthesevorschriften

### 6-Amino-3-bromo-1,2,4-triazin (5)<sup>[156]</sup>

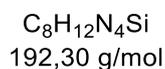
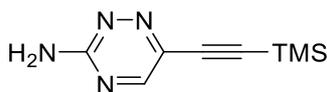


Eine Lösung aus 4.00 g 3-Aminotriazin (41.6 mmol, 1.00 Äq) in 30 mL Acetonitril und 45 mL Wasser wurde auf 0 °C gekühlt. Hierzu wurden 7.78 g NBS (43.7 mmol, 1.05 Äq) hinzugegeben und 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt, das Gemisch weitere 60 min rühren gelassen und schließlich mit 30 mL EE verdünnt und wieder auf 0 °C gekühlt. Das Gemisch wurde mit mehreren Spateln  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt und weitere 15 min rühren gelassen. Die Phasen wurden separiert und die wässrige Phase viermal mit 250 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ - und gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde noch einmal mit DCM und Hexan gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet. So konnten 5.39 g **5** (74 %) als hellbrauner Feststoff erhalten werden.

**DC** (DCM; 5 % EE):  $R_f = 0.15$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[81]</sup>

**3-Amino-6-((trimethylsilyl)ethynyl)-1,2,4-triazin (6)**



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 1.38 g **5** (7.89 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 20 mL trockenem Acetonitril gelöst und mit 5 mL trockenem Triethylamin versetzt. Hierzu wurden 97.3 mg CuI (0.51 mmol, 0.07 Äq), 358 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.51 mmol, 0.07 Äq), sowie 4.45 mL TMS-Acetylen (3.09 g, 7.89 mmol, 1.00 Äq) hinzugegeben und das Gemisch 10 min durch Einleiten von Argon entgast. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht rühren gelassen und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (H:EE; 1:1) konnten 700 mg des Produktes als gelber Feststoff isoliert werden (81 %).

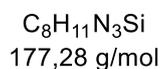
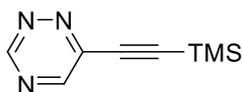
**DC** (H:EE; 1:1): R<sub>f</sub> = 0.31

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8.23 (s, 1H, 5-H), 5.75 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 0.28 (s, 9H, TMS).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 160.1 (3-C), 152.9 (5-C), 139.0 (6-C), 101.5 (C≡C), 98.2 (C≡C), -0.23 (TMS).

**HR-MS (EI)**: m/z: berechnet für [M]<sup>+</sup>: 192.0831; gefunden: 192.0830.

**6-(Trimethylsilyl)ethynyl-1,2,4-triazin (7)**



Unter Argon-Atmosphäre wurden in einem Vial 80 mg **6** (0.42 mmol, 1.00 Äq) in 3 mL trockenem THF gelöst, mit 362  $\mu$ L Isoamylnitrit (315 mg, 1.25 mmol, 3.00 Äq) versetzt und für 5 h auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch abkühlen gelassen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie mit reinem DCM aufgereinigt, wobei 18 mg **7** als hellgelbes Öl (25 %) erhalten wurden.

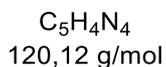
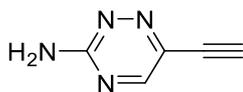
**DC** (DCM):  $R_f = 0.42$

**$^1H$ -NMR** (500MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9.58 (s, 1H, 3-H), 8.65 (s, 1H, 5-H), 0.32 (s, 9H, TMS).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 154.8 (3-C), 151.6 (5-C), 148.1 (6-C), 106.7 ( $C\equiv C$ ), 97.4 ( $C\equiv C$ ), -0.46 (TMS).

**HR-MS (ESI)**: m/z: berechnet für  $[M+H]^+$ : 178.08004; gefunden: 178.07925.

**3-Amino-6-ethinyl-1,2,4-triazin (8)**



Unter Argon-Atmosphäre wurden 100 mg **6** (0.52 mmol, 1.00 Äq) in 3 mL trockenem THF gelöst und bei Raumtemperatur mit 1.04 mL TBAF-Lösung (1 M in THF, 272 mg, 1.04 mmol, 2.00 Äq) versetzt. Nach 60 min wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM:EE; 10:1 – 3:1) aufgereinigt. So konnten 56 mg **8** (90 %) als gelber Feststoff erhalten werden.

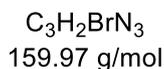
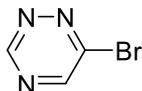
**DC** (DCM:EE; 4:1):  $R_f = 0.25$

**$^1H$ -NMR** (500MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) = 8.34 (s, 1H, 5-H), 7.68 (br s, 2H,  $NH_2$ ), 4.61 (s, 1H,  $C\equiv CH$ ).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) = 160.8 (3-C), 152.7 (5-C), 136.0 (6-C), 5.0 ( $C\equiv CH$ ), 78.8 ( $C\equiv CH$ ).

**HR-MS (EI)**: m/z: berechnet für  $[M]^+$ : 120.0436; gefunden: 120.0435.

**3-Bromo-1,2,4-triazin (10)**



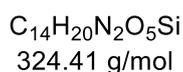
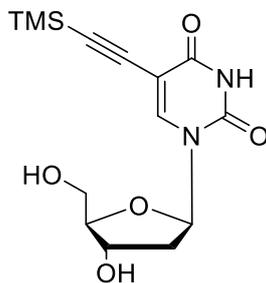
Die Verbindung **10** wurde entsprechend einer Vorschrift von *Prescher et al.*<sup>[81]</sup> hergestellt.

Hierzu wurde ein Druckreaktionsgefäß mit 120 mg **5** (0.69 mmol, 1.00 Äq) bestückt, im Hochvakuum getrocknet und mit Argon geflutet. Nun wurden 5 mL trockenes THF sowie 277 µL Isoamylnitrit (241 mg, 2.06 mmol, 3.00 Äq) zugegeben und das Gemisch 5 h auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel vorsichtig unter vermindertem Druck entfernt, wobei ein Unterdruck von 250 mbar nicht unterschritten wurde, und das Rohprodukt zügig mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 5 % EE) aufgereinigt. Das hierbei erhaltene Produkt wurde erneut bis zu einem Unterdruck von 200 mbar eingeengt und im Anschluss mit Argon geflutet. Auf diese Weise konnte **10** als gelbliches Öl erhalten werden, welches direkt weiter umgesetzt wurde.

Wurde eine größere Menge **10** benötigt, so wurde die beschriebene Ansatzgröße mehrfach angesetzt und die Einzelansätze erst zur Aufreinigung vereint.

**DC** (DCM; 5 % EE):  $R_f = 0.70$

**5-Trimethylsilylethynyl-2'-desoxyuridin (12)**

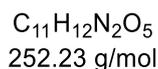
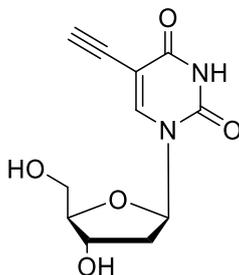


In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde 1.00 g 5-Iodo-2'-desoxyuridin (2.83 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 25 mL trockenem Acetonitril und 25 mL trockenem  $NEt_3$  gelöst. Es wurden 34.9 mg  $CuI$  (0.18 mmol, 0.07 Äq), 129 mg  $Pd(PPh_3)_2Cl_2$  (0.18 mmol, 0.07 Äq) und 1.60 mL TMS-Acetylen (1.11 g, 11.3 mmol, 4.00 Äq) hinzugegeben. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM; 10 % MeOH) 700 mg **12** (76 %) als hellbrauner Schaum erhalten.

**DC** (DCM; 10 % MeOH):  $R_f = 0.37$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[201]</sup>

**5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (13)**

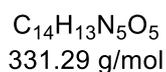
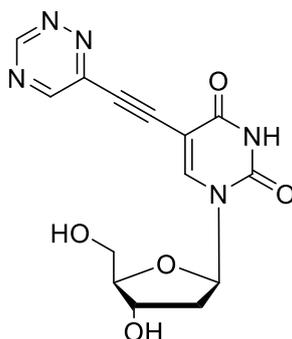


Zu einer Lösung aus 700 mg **12** (2.16 mmol, 1.00 Äq) in 4 mL trockenem THF wurde unter Argon-Atmosphäre 5.61 mL einer 1 M TBAF-Lösung in THF (1.47 g, 5.61 mmol, 2.00 Äq) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt dabei direkt auf Kieselgel adsorbiert. Nach einer Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (DCM; 10 % MeOH) konnten 544 mg **13** (quant.) als weißer Feststoff erhalten werden.

**DC** (DCM; 10 % MeOH):  $R_f = 0.28$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[201]</sup>

**5-(1,2,4-Triazin-6-yl)ethynyl-2'-desoxyuridin (14)**



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 310 mg **13** (1.23 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 20 mL trockenem DMF gelöst. Nun wurden 681  $\mu$ L  $NEt_3$  (497 mg, 4.92 mmol, 4.00 Äq), 46.7 mg  $CuI$  (0.25 mmol, 0.20 Äq) und 86.0 mg  $Pd(PPh_3)_2Cl_2$  (0.12 mmol, 0.10 Äq) zugegeben und das Gemisch durch Einleiten von Argon 5 min entgast. Ein Überschuss an **10** wurde zugegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, hierbei wurde das Rohprodukt direkt auf Kieselgel gezogen. Das Rohprodukt wurde zunächst mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereinigt. Das hierbei isolierte Produkt wurde mit 300 mg  $K_2CO_3$  versetzt, in 1 mL  $H_2O$  gelöst und 1 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Gemisch wurde anschließend mit Kieselgel versetzt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde über eine Filtersäule (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereinigt um die entstandenen Salze zu entfernen, wobei 269 mg **14** (66 %) als gelber Feststoff erhalten werden konnte.

$\epsilon_{260\text{ nm}} = 6083\text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

**DC** (DCM; 10 % MeOH):  $R_f = 0.28$

**$^1H$ -NMR** (500MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.87 (s, 1H, NH), 9.75 (s, 1H, Aryl-H), 8.96 (s, 1H, Aryl-H), 8.66 (s, 1H, Aryl-H), 6.11 (t,  $J = 6.3\text{ Hz}$ , 1H, 1'-H), 5.32 (d,  $J = 4.3\text{ Hz}$ , 1H, 3'-OH), 5.27 (t,

## Experimentalteil

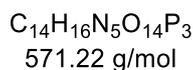
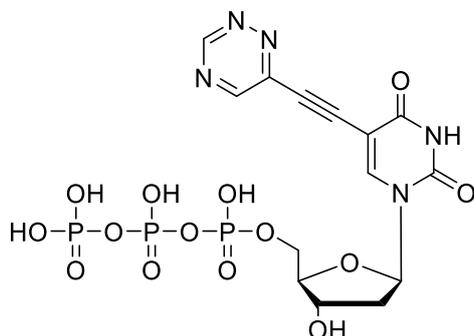
---

$J = 4.8$  Hz, 1H, 5'-OH), 4.27 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1H, 3'-H), 3.86 – 3.80 (m, 1H, 4'-H), 3.71 – 3.57 (m, 2H, 5'-H), 2.20 (q,  $J = 4.9, 3.8$  Hz, 2H, 2'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 161.2 (C<sub>q</sub>), 154.8 (Aryl-CH), 151.9 (Aryl-CH), 149.4 (C<sub>q</sub>), 147.7 (C<sub>q</sub>), 146.7 (Aryl-CH), 96.1 (C<sub>q</sub>), 91.8 (C<sub>q</sub>), 87.7 (4'-C), 86.1 (C<sub>q</sub>), 85.4 (1'-C), 69.7 (3'-C), 60.6 (5'-C), 40.4 (2'-C).

**HR-MS (ESI):**  $m/z$ : berechnet für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 354.0814; gefunden: 354.0815.

**5-(1,2,4-Triazin-6-yl)ethynyl-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (1)**



Ein ausgeheizter Kolben wurde mit 30.0 mg **14** (90.6  $\mu$ mol, 1.00 Äq) und 29.1 mg Protonenschwamm (0.14 mmol, 1.50 Äq) bestückt. Der Kolben wurde mit einem Septum verschlossen, mit einer Kanüle versehen und über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Der Kolben wurde mit Argon geflutet und mit 0.95 mL trockenem Trimethylphosphat versetzt. Das Gemisch wurde auf  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und 8.86  $\mu$ L  $\text{POCl}_3$  (14.6 mg, 0.10 mmol, 1.05 Äq) wurden schnell zugegeben. Nach 4 h Rühren bei  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden nochmals 3.37  $\mu$ L  $\text{POCl}_3$  (5.55 mg, 0.04 mmol, 0.40 Äq) zugegeben und eine weitere Stunde rühren gelassen. Separat wurden 298 mg  $(\text{nBu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (0.54 mmol, 6.00 Äq) in 1.09 mL trockenem DMF (0.5 M) gelöst und mit 94.9  $\mu$ L  $\text{nBu}_3\text{N}$  (73.9 mg, 0.40 mmol, 4.40 Äq) versetzt. Dieses Gemisch wurde auf einmal zur Reaktionslösung gegeben und das Kältebad entfernt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde das gesamte Gemisch über 40 min in 3.00 mL TEAB-Puffer (0.1 M; pH = 7.3) getropft. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde zunächst durch Umkehrphasen-HPLC (Laufmittel A: 50 mM TEAB-Puffer, pH = 7.3; Laufmittel B: MeCN; Gradient: 0 – 35 % B in 60 min) und anschließend durch SAX-HPLC (Laufmittel A: 15 % MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Laufmittel B: 15 % MeCN in 0.85 M TEAB-Puffer; Gradient: 0 – 100 % B in 60 min) aufgereinigt. So konnten 16.5  $\mu$ mol des gewünschten Triphosphats (18 %) als hellgelber Feststoff isoliert werden. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. Hierfür wurde näherungsweise der Extinktionskoeffizient des Nukleosids **14** verwendet.

## Experimentaltteil

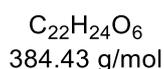
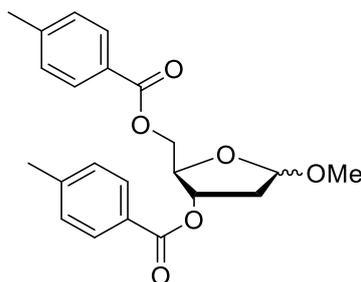
---

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 9.58 (s, 1H, Aryl-H), 9.10 (s, 1H, Aryl-H), 8.50 (s, 1H, Aryl-H), 6.29 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.66 (dt,  $J$  = 6.8, 3.3 Hz, 1H, 3'-H), 4.27 – 4.19 (m, 3H, 4'-H, 5'-H), 2.55 – 2.35 (m, 2H, 2'-H).

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = -10.54 (d,  $J$  = 20.1 Hz, 1P), -11.65 (d,  $J$  = 20.5 Hz, 1P), -23.33 (t,  $J$  = 20.3 Hz, 1P).

**MALDI-MS:**  $m/z$ : berechnet für [M-4H]<sup>-</sup>: 566.96; gefunden: 566.78.

**1-Methoxy-3,5-bis-*para*-toluoyl-2-desoxyribose (20)**



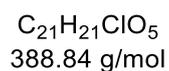
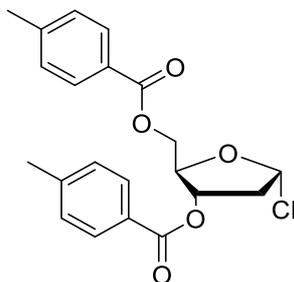
Es wurde 1.00 g 2-Desoxy-D-ribose (7.46 mmol, 1.00 Äq) in 12 mL trockenem Methanol gelöst und durch Einleiten von Argon entgast. Hierzu wurden 2 mL einer Lösung aus 0.17 mL Acetylchlorid in 10 mL trockenem Methanol tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde  $NaHCO_3$  zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Das Filtrat wurde einkonzentriert und im Hochvakuum getrocknet.

Der Rückstand wurde unter Argon-Atmosphäre in 20 mL trockenem Aceton aufgenommen und 2.47 mL p-Toluoylchlorid (2.88 g, 18.7 mmol, 2.50 Äq) zugetropft. Anschließend wurden 2.60 mL  $NEt_3$  (1.89 g, 18.7 mmol, 2.50 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Aceton nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (H:EE; 10:1) aufgereinigt. So konnten 2.05 g **20** (73 %) als Anomerengemisch ( $\alpha$  und  $\beta$ ) in Form eines weißen Feststoffes erhalten werden.

**DC** (H:EE; 10:1):  $R_f = 0.26, 0.21$  ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomer)

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein. <sup>[162]</sup>

**$\alpha$ -1-Chloro-3,5-bis-*para*-toluoyl-2-desoxyribose (21)**

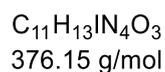
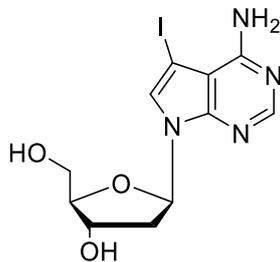


Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 2.05 g **20** (5.45 mmol, 1.00 Äq) in 15 mL Eisessig wurden 13.6 mL 4 M HCl in Dioxan (54.5 mmol, 10.0 Äq) über einen Tropftrichter zugetropft. Das Gemisch wurde 2 h bei 0 °C rühren gelassen, wobei ein weißer Feststoff auskristallisierte. Die Kristallisation wurde über Nacht im Gefrierfach fortgesetzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 940 mg **21** (44 %) in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

**DC** (H:EE; 10:1):  $R_f = 0.35$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[202]</sup>

**7-Deaza-7-iodo-2'-desoxyadenosin (24)**

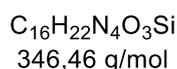
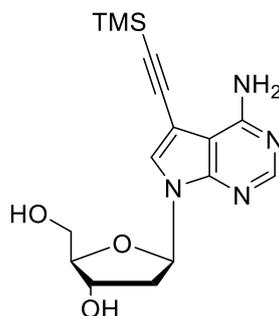


Unter Lichtausschluss wurden 653 mg 6-Chloro-7-iododeazapurin (2.34 mmol, 1.00 Äq) in 15 mL trockenem Acetonitril gelöst und 328 mg fein gemörsertes KOH (5.84 mmol, 2.50 Äq), sowie 37.4  $\mu$ L TDA-1 (37.8 mg, 0.12 mmol, 0.05 Äq) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur rühren gelassen bevor 1.00 g **21** (2.57 mmol, 1.10 Äq) zugegeben und eine weitere Stunde gerührt wurde. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit heißem Aceton gewaschen. Das Filtrat wurde unter Lichtausschluss eingengt und der resultierende Rückstand mittels 7 M Ammoniak in MeOH in ein *pressure tube* überführt und 18 h auf 120 °C erhitzt. Das Gemisch wurde abkühlen gelassen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM; 10 % MeOH) aufgereinigt, wobei 650 mg **24** (74 %) als beiger Feststoff isoliert wurden.

**DC** (DCM; 10 % MeOH):  $R_f = 0.32$

Sie spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[164]</sup>

**7-Deaza-7-Trimethylsilylethynyl-2'-desoxyuridin (25)**

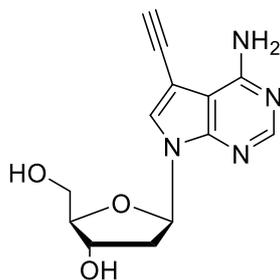


In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurde unter Argon 650 mg **24** (1.73 mmol, 1.00 Äq) in 20 mL trockenem DMF gelöst. Es wurden 6.56 mg CuI (34.6  $\mu$ mol, 0.02 Äq), 48.4 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (69.1  $\mu$ mol, 0.04 Äq), 2.40 mL NEt<sub>3</sub> (1.75 g, 17.3 mmol, 10.00 Äq) und 1.22 mL TMS-Acetylen (847 mg, 8.64 mmol, 5.00 Äq) zugegeben und das Gemisch durch Einleiten von Argon 5 min entgast. Die Reaktion erfolgte für 3 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereinigt. So konnten 380 mg **25** (63 %) als beiger Schaum erhalten werden.

**DC** (DCM; 10% MeOH): R<sub>f</sub> = 0.39

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[164]</sup>

**7-Deaza-7-ethinyl-2'-desoxyadenosin (26)**<sup>[164]</sup>



C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>  
274.28 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 380 mg **25** (1.10 mmol, 1.00 Äq) in 15 mL trockenem MeOH gelöst und mit 303 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.19 mmol, 2.00 Äq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 45 min bei Raumtemperatur rühren gelassen und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereingt, wodurch 260 mg **26** (86 %) als weißer Feststoff erhalten werden konnten.

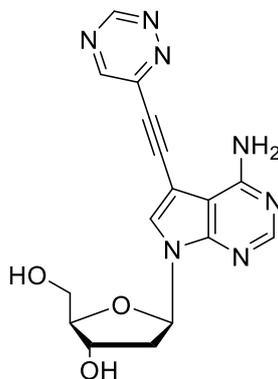
**DC** (DCM; 10 % MeOH): R<sub>f</sub> = 0.27

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8.12 (s, 1H, Aryl-H), 7.81 (s, 1H, Aryl-H), 6.47 (dd, J = 8.0, 5.9 Hz, 1H, 1'-H), 5.27 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 3'-OH), 5.08 (t, J = 5.5 Hz, 1H, 5'-OH), 4.36 - 4.31 (m, 1H, 3'-H), 4.28 (s, 1H, C≡CH), 3.82 (dt, J = 4.3, 2.4 Hz, 1H, 4'-H), 3.62 – 3.46 (m, 2H, 5'-H), 2.48 – 2.43 (m, 1H, 2'-H), 2.18 (ddd, J = 13.1, 6.0, 2.8 Hz, 1H, 2'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 157.5 (C<sub>q</sub>), 152.8 (Aryl-C), 149.1 (C<sub>q</sub>), 127.1 (Aryl-C), 102.3 (C<sub>q</sub>), 94.0 (C<sub>q</sub>), 87.6 (4'-C), 83.2 (1'-C), 83.1 (C<sub>q</sub>), 77.4 (C≡CH), 70.9 (3'-C), 61.8 (5'-C). Das 2'-C-Signal wird überlagert durch das DMSO-Signal.

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 275.1143; gefunden: 275.1144.

**7-Deaza-7-(1,2,4-triazin-6-yl)ethynyl-2'-desoxyadenosin (27)**



C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>  
353.34 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 195 mg **26** (0.71 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 15 mL absolutem DMF gelöst. Es wurden 27.0 mg CuI (0.14 mmol, 0.20 Äq), 49.8 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.07 mmol, 0.10 Äq) und 394 µL NEt<sub>3</sub> (288 mg, 2.84 mmol, 4.00 Äq) hinzugegeben und das Gemisch 5 min durch Einleiten von Argon entgast. Nun wurde ein Überschuss an **10** zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur laufen gelassen. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt dabei direkt auf Kieselgel adsorbiert. Das Rohprodukt wurde zunächst säulenchromatographisch (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereinigt. Das auf diese Weise isolierte Produkt wurde nun in 1.5 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 100 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Die entstandene bräunliche Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor Kieselgel zugegeben und das Gemisch schließlich lyophilisiert wurde. Der erhaltene Rückstand wurde erneut einer Säulenchromatographie (DCM; 0 – 10 % MeOH) unterzogen um die entstandenen Salze zu entfernen. So konnten 110 mg **27** (44 %) als gelber Feststoff erhalten werden.

$\epsilon_{260 \text{ nm}} = 9953 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$

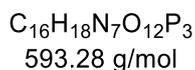
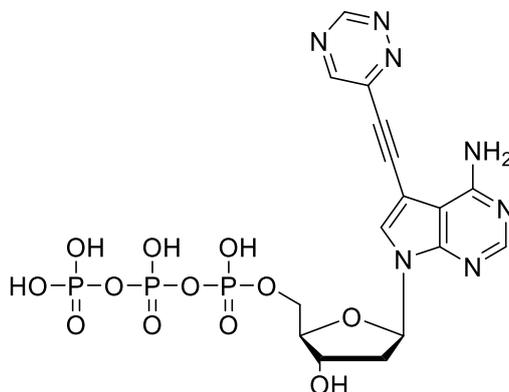
DC (DCM; 10 % MeOH): R<sub>f</sub> = 0.29

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 9.72 (s, 1H, Aryl-H), 9.12 (s, 1H, Aryl-H), 8.19 (s, 1H, Aryl-H), 8.17 (s, 1H, Aryl-H), 6.53 (dd, *J* = 7.8, 6.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.31 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, 3'-OH), 5.11 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5'-OH), 4.37 (dq, *J* = 6.1, 3.0 Hz, 1H, 3'-H), 3.88 – 3.83 (m, 1H, 4'-H), 3.65 – 3.49 (m, 2H, 5'-H), 2.25 (ddd, *J* = 13.1, 6.1, 2.9 Hz, 1H, 2'-H). Das 2'-H-Signal wird überlagert durch das DMSO-Signal.

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 157.5 (C<sub>q</sub>), 154.5 (C<sub>q</sub>), 153.2 (C<sub>q</sub>), 152.2 (Aryl-CH), 149.8 (Aryl-CH), 148.1 (Aryl-CH), 129.5 (C<sub>q</sub>), 101.8 (C<sub>q</sub>), 92.8 (C<sub>q</sub>), 92.0 (C<sub>q</sub>), 87.7 (4'-C), 85.9 (C<sub>q</sub>), 83.5 (1'-C), 70.9 (3'-C), 61.8 (5'-C). Das 2'-C-Signal wird überlagert durch das DMSO-Signal.

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 354.1315; gefunden: 354.1314.

**7-Deaza-7-(1,2,4-triazin-6-yl)ethinyl-2'-desoxyadenosin-5'-triphosphat (2)**



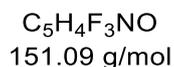
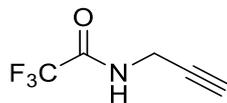
Ein ausgeheizter Kolben wurde mit 25.0 mg **27** (70.8  $\mu$ mol, 1.00 Äq) und 22.7 mg Protonenschwamm (0.11 mmol, 1.50 Äq) befüllt, mit einem Septum verschlossen und mit einer Kanüle versehen und über Nacht im Exsikkator im Hochvakuum getrocknet. Dieser Kolben wurde mit Argon geflutet und die getrockneten Substanzen in 700  $\mu$ L trockenem Trimethylphosphat gelöst. Das Gemisch wurde auf -20 °C gekühlt und 6.92  $\mu$ L POCl<sub>3</sub> (11.4 mg, 0.07 mmol, 1.05 Äq) wurden schnell zugegeben. Nach 4 h Rühren bei -20 °C wurden nochmals 2.63  $\mu$ L POCl<sub>3</sub> (4.34 mg, 0.03 mmol, 0.40 Äq) zugegeben und eine weitere Stunde rühren gelassen. Separat wurden 233 mg (nBu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (0.42 mmol, 6.00 Äq) in 850  $\mu$ L trockenem DMF (0.5 M) gelöst und mit 74  $\mu$ L nBu<sub>3</sub>N (57.7 mg, 0.31 mmol, 4.40 Äq) versetzt. Dieses Gemisch wurde auf einmal zur Reaktionslösung gegeben und das Kältebad entfernt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde das gesamte Gemisch über 40 min in 3.00 mL TEAB-Puffer (0.1 M; pH = 7.2) getropft und 4 h bei Raumtemperatur rühren lassen. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend lyophilisiert. Der erhaltene Rückstand wurde in *millipore* Wasser aufgenommen und durch SAX-HPLC (Laufmittel A: 15 % MeCN in H<sub>2</sub>O; Laufmittel B: 15 % MeCN in 0.85 M TEAB-Puffer (pH = 8.5); Gradient: 0 – 30 % B in 40 min) aufgereinigt. So konnten 8.58  $\mu$ mol des Triphosphats (12 %) als gelber Feststoff isoliert werden. Die Ausbeute wurde über die Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. Hierfür wurde näherungsweise der Extinktionskoeffizient des Nukleosids **27** verwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 9.59 (s, 1H, Aryl-H), 9.06 (s, 1H, Aryl-H), 8.22 (s, 1H, Aryl-H), 8.14 (s, 1H, Aryl-H), 6.67 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H, 1'-H), 4.30 – 4.21 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 4.16 (dd,  $J = 9.9, 5.6$  Hz, 1H, 5'-H), 2.73 (dt,  $J = 13.9, 6.9$  Hz, 1H, 2'-H), 2.60 – 2.49 (m, 1H, 2'-H). Das 3'-H Signal wird überlagert durch das D<sub>2</sub>O-Signal.

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = -8.86 (m, 1P), -11.29 (d,  $J = 19.7$  Hz, 1P), -22.91 - -23.32 (m, 1P).

**MALDI-MS:** m/z: berechnet für [M-4H]<sup>-</sup>: 589.25; gefunden: 589.72.

**2,2,2-Trifluoro-N-(prop-2-in-1-yl)acetamid (33)**<sup>[192]</sup>

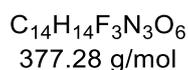
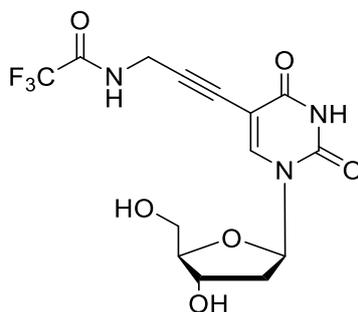


Unter Argon-Atmosphäre wurden zu einer eisgekühlten Lösung aus 3.50 mL Propargylamin (3.01 g, 54.7 mmol, 1.00 Äq) in 30 mL absolutem MeOH langsam 7.84 mL Ethyltrifluoracetat (9.32 g, 65.6 mmol, 1.20 Äq) zugetropft. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 30 mL DCM aufgenommen. Diese Lösung wurde zweimal mit 50 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen wurden noch zweimal mit 25 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (H:EE; 5:1) wurden 4.95 g **33** (60 %) als farbloses Öl erhalten.

**DC** (H:EE; 5:1): R<sub>f</sub> = 0.29

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[203]</sup>

**5-(2,2,2-Trifluoro-N-(prop-2-in-1-yl)acetamid)-2'-desoxyuridin (34)**<sup>[193]</sup>

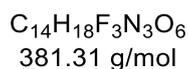
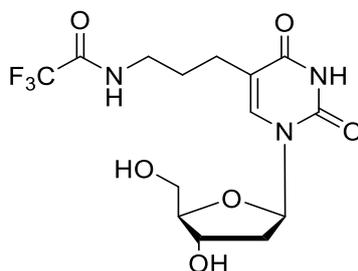


In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 1.00 g 5-Iodo-2'-desoxyuridin (2.82 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 15 mL absolutem DMF gelöst. Hierzu wurden 108 mg CuI (0.56 mmol, 0.20 Äq), 326 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.28 mmol, 0.10 Äq), 1.57 mL NEt<sub>3</sub> (1.14 g, 11.3 mmol, 4.00 Äq) und 831 mg **33** (8.47 mmol, 3.00 Äq) zugegeben und das Gemisch durch Einleiten von Argon 5 min entgast. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereinigt. So konnten 804 mg **34** (75 %) als beiger Schaum erhalten werden.

**DC** (DCM; 10 % MeOH): R<sub>f</sub> = 0.20

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[193]</sup>

**5-(2,2,2-Trifluoro-N-propylacetamid)-2'-desoxyuridin (35)**<sup>[54]</sup>

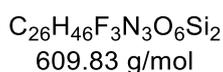
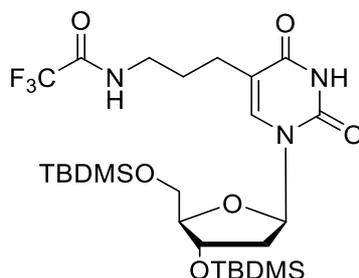


In einem Rundkolben mit Rührfisch wurden 797 mg **34** (2.11 mmol, 1.00 Äq) zusammen mit 159 mg Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20 wt%) im Hochvakuum über Nacht vorgetrocknet. Die Feststoffe wurden unter Argon-Atmosphäre in 20 mL absolutem MeOH suspendiert und mit 3.36 mL Triethylsilan (2.46 g, 21.1 mmol, 10.0 Äq) versetzt, wobei eine Gasentwicklung einsetzte. Das Gemisch wurde zunächst 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Das Filtrat wurde einkonzentriert und mittels Säulenchromatographie (DCM:Aceton; 1:1) aufgereingt. Es konnten 650 mg **35** (81 %) als weißer Schaum erhalten werden.

**DC** (DCM:Aceton; 1:1): R<sub>f</sub> = 0.20

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[54]</sup>

**3',5'-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-(2,2,2-Trifluoro-*N*-propylacetamid)-2'-desoxyuridin (36)**



Unter Argon-Atmosphäre wurden zu einer Lösung aus 1.99 g **35** (5.22 mmol, 1.00 Äq) in 30 mL trockenem DMF 1.42 g Imidazol (20.9 mmol, 4.00 Äq) hinzugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 min wurden 1.65 g TBDMS-Chlorid (11.0 mmol, 2.10 Äq) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und mit reichlich Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach anschließender Säulenchromatographie (DCM; 0 – 4 % MeOH) konnten 2.42 g **36** (76 %) in Form eines weißen Schaumes erhalten werden.

**DC** (DCM; 4 % MeOH):  $R_f = 0.18$

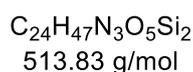
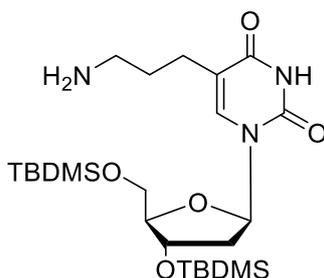
**$^1H$ -NMR** (500MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.87 (s, 1H, 3-NH), 7.64 (s, 1H,  $NHCOCF_3$ ), 7.58 (s, 1H, 6-H), 6.33 (dd,  $J = 8.1, 5.7$  Hz, 1H, 1'-H), 4.42 – 4.37 (m, 1H, 3'-H), 3.95 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, 4'-H), 3.86 (dd,  $J = 11.4, 2.7$  Hz, 1H, 5'-H), 3.76 (dd,  $J = 11.4, 2.6$  Hz, 1H, 5'-H), 3.40 – 3.25 (m, 2H,  $NHCH_2$ ), 2.38 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2H,  $NHCH_2CH_2CH_2$ ), 2.29 – 2.23 (m, 1H, 2'-H), 2.00 (ddd,  $J = 13.6, 8.1, 5.9$  Hz, 1H, 2'-H), 1.76 (p,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $NHCH_2CH_2$ ), 0.92 (s, 9H,  $Si^tBu$ ), 0.89 (s, 9H,  $Si^tBu$ ), 0.10 (s, 6H, SiMe), 0.08 (s, 3H, SiMe), 0.07 (s, 3H, SiMe).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 164.6 (C=O), 157.5 (q,  $J = 36.8$  Hz,  $NHCOCF_3$ ), 150.0 (C=O), 137.6 (6-C), 116.1 (q,  $J = 287.8$  Hz,  $CF_3$ ), 113.4 (5-C), 88.1 (4'-C), 85.2 (1'-C), 72.5 (3'-C), 63.2 (5'-C), 41.6 (2'-C), 38.2 ( $NHCH_2$ ), 28.9 ( $NHCH_2CH_2$ ), 26.1 ( $SiC(CH_3)_3$ ), 25.9 ( $SiC(CH_3)_3$ ), 23.6

(NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 18.6 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (SiMe), -4.7 (SiMe), -5.3 (SiMe), -5.3 (SiMe).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 610.2954; gefunden: 610.2956.

**5-Aminopropyl-3',5'-bis-(tert-butylidimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (37)**



440 mg **36** (0.72 mmol, 1.00 Äq) wurden in möglichst wenig MeOH gelöst, mit 10 mL 28 %-igem wässrigem Ammoniak versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 10 % MeOH) aufgereinigt. So konnten 207 mg **37** (56 %) als beiger Schaum isoliert und 140 mg des Edukts (32 %) rückgewonnen werden.

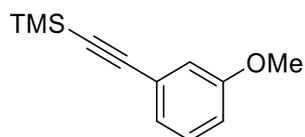
**DC** (DCM; 10 % MeOH):  $R_f = 0.11$

**$^1H$ -NMR** (500MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8.59 (br s, 2H,  $NH_2$ ), 7.49 (s, 1H, 6-H), 6.13 (dd,  $J = 8.1, 6.0$  Hz, 1H, 1'-H), 4.35 (dd,  $J = 5.7, 2.8$  Hz, 1H, 3'-H), 3.78 (td,  $J = 4.6, 2.7$  Hz, 1H, 4'-H), 3.71 (qd,  $J = 11.2, 4.6$  Hz, 2H, 5'-H), 2.75 – 2.70 (m, 2H,  $NHCH_2$ ), 2.28 – 2.21 (m, 3H,  $NHCH_2CH_2CH_2$ , 2'-H), 2.06 (ddd,  $J = 13.3, 5.9, 2.7$  Hz, 1H, 2'-H), 1.71 (p,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $NHCH_2CH_2$ ), 0.88 (s, 9H,  $Si^tBu$ ), 0.87 (s, 9H,  $Si^tBu$ ), 0.08 (s, 6H, SiMe), 0.07 (s, 6H, SiMe).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 163.4 (C=O), 150.3 (C=O), 136.7 (6-C), 112.5 (5-C), 86.8 (4'-C), 84.1 (1'-C), 72.3 (3'-C), 62.9 (5'-C), 38.4 ( $NHCH_2$ ), 26.7 ( $NHCH_2CH_2$ ), 25.8 ( $SiC(CH_3)_3$ ), 25.7 ( $SiC(CH_3)_3$ ), 23.8 ( $NHCH_2CH_2CH_2$ ), 18.0 ( $SiC(CH_3)_3$ ), 17.7 ( $SiC(CH_3)_3$ ), -4.8 (SiMe), -4.9 (SiMe), -5.4 (SiMe). Das 2'-C-Signal wird überlagert durch das DMSO-Signal.

**HR-MS (FAB)**: m/z: berechnet für  $[M+H]^+$ : 514.3133; gefunden: 514.3134.

**1-(Trimethylsilyl)ethynyl-3-methoxybenzol (39)**<sup>[194]</sup>



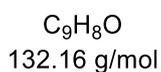
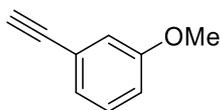
C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>OSi  
204.34 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 1.53 mL 3-Iodoanisol (3.00 g, 12.8 mmol, 1.00 Äq) unter Argon in 25 mL absolutem DMF und mit 7.11 mL NEt<sub>3</sub> (5.19 g, 51.3 mmol, 4.00 Äq) versetzt. Zu diesem Gemisch wurden 269 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.38 mmol, 0.03 Äq), 146 mg CuI (0.77 mmol, 0.06 Äq) und 2.69 mL TMS-Acetylen (1.89 g, 19.2 mmol, 1.50 Äq) zugegeben und für 1 h auf 50 °C erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und das Gemisch dreimal mit je 100 mL Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach anschließender Säulenchromatographie (H:DCM; 10:1) wurden 2.46 g **39** (94 %) als farbloses Öl erhalten.

**DC** (H:DCM; 10:1): R<sub>f</sub> = 0.33

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[194]</sup>

**1-Ethynyl-3-methoxybenzol (40)**<sup>[194]</sup>

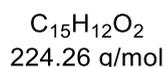
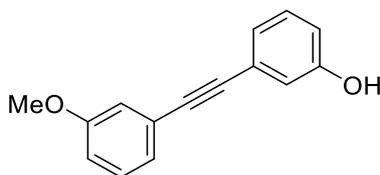


In einem Rundkolben wurden 2.46 g **39** (12.1 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 20 mL trockenem THF gelöst und 20 mL TBAF-Lösung (6.30 g, 24.1 mmol, 2.00 Äq, 1.0 M in THF) zugegeben. Nachdem das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (H:DCM; 10:1) aufgereinigt. So konnten 1.59 g **40** (quant.) als farbloses Öl erhalten werden.

**DC** (H:DCM; 10:1):  $R_f = 0.32$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[194]</sup>

**3-((3-Methoxyphenyl)ethinyl)anisol (41)**



Unter Argon-Atmosphäre wurden 1.52 g **40** (11.5 mmol, 1.00 Äq) in 45 mL trockenem MeCN gelöst und mit 153 mg CuI (0.80 mmol, 0.07 Äq), 563 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.80 mmol, 0.07 Äq) und 6.4 mL NEt<sub>3</sub> (4.65 g, 45.9 mmol, 4.00 Äq) versetzt. Das Gemisch wurde 10 min mit Argon durchströmt, mit 2.53 g 3-Iodphenol (11.5 mmol, 1.00 Äq) versetzt und 17 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Hexan – DCM) aufgereinigt. So konnten 2.08 g **41** (81 %) als gelber Feststoff isoliert werden.

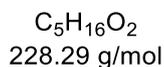
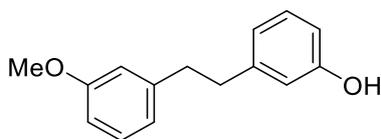
**DC** (DCM): R<sub>f</sub> = 0.35

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 9.74 (s, 1H, OH), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.22 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.13 – 7.07 (m, 2H, Aryl-H), 7.00 – 6.96 (m, 2H, Aryl-H), 6.90 (s, 1H, Aryl-H), 6.83 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H, Aryl-H), 3.78 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 159.2 (C<sub>q</sub>), 157.4 (C<sub>q</sub>), 130.0 (Aryl-CH), 129.9 (Aryl-CH), 123.8 (Aryl-CH), 123.4 (C<sub>q</sub>), 123.1 (C<sub>q</sub>), 122.3 (Aryl-CH), 117.8 (Aryl-CH), 116.4 (Aryl-CH), 116.1 (Aryl-CH), 115.4 (Aryl-CH), 89.3 (C≡C), 88.7 (C≡C), 55.3 (OMe).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 224.0837 ; gefunden: 224.0836.

**3-((3-Methoxyphenyl)ethylen)anisol (42)**



Es wurden 585 mg **41** (2.61 mmol, 1.00 Äq) zusammen mit 117 mg Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20 wt%) im Hochvakuum vorgetrocknet und schließlich unter Argon-Atmosphäre in 20 mL absolutem MeOH suspendiert. Zu diesem Gemisch wurden 4.17 mL Et<sub>3</sub>SiH (3.03 g, 26.1 mmol, 10.0 Äq) langsam zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Gemisch wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (Hexan – DCM) gereinigt, wodurch 557 mg **42** (94 %) als farblose Flüssigkeit erhalten wurden.

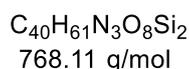
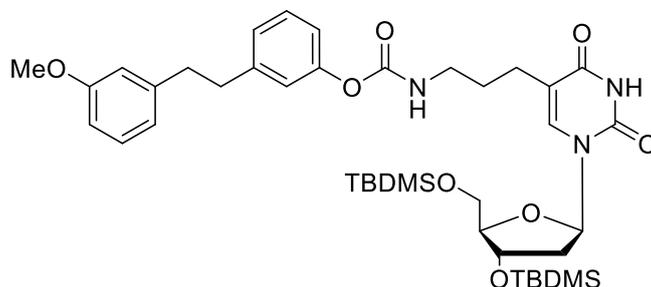
**DC (DCM):** R<sub>f</sub> = 0.33

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.23 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Aryl-H), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 6.84 – 6.74 (m, 4H, Aryl-H), 6.71 – 6.67 (m, 2H, Aryl-H), 5.30 (s, 1H, OH), 3.81 (s, 3H, OMe), 2.89 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 159.6 (C<sub>q</sub>), 155.7 (C<sub>q</sub>), 143.9 (C<sub>q</sub>), 143.6 (C<sub>q</sub>), 129.8 (Aryl-CH), 129.6 (Aryl-CH), 121.2 (Aryl-CH), 121.1 (Aryl-CH), 115.6 (Aryl-CH), 114.4 (Aryl-CH), 113.1 (Aryl-CH), 111.5 (Aryl-CH), 55.4 (OMe), 37.9 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 228.1150 ; gefunden: 228.1149.

**3-(3-Methoxyphenethyl)phenyl-N-propyl-3-((3',5'-bis-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin-5-yl)carbammat (43)**



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 41.2 mg *para*-Nitrophenylchloroformat (0.25 mmol, 2.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 1 mL trockenem DCM gelöst und mit 250 µL trockenem Pyridin versetzt. Das Gemisch wurde auf 0 °C gekühlt und hierzu eine Lösung aus 58.0 mg **42** (0.25 mmol, 2.00 Äq) in 1 mL trockenem DCM tropfenweise zugegeben. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M HCl zugegeben und mit DCM verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase so lange mit halbgesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, bis keine Gelbfärbung mehr entstand. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und schließlich unter Argon-Atmosphäre in 1 mL trockenem DCM gelöst. Es wurde eine Lösung aus 65.3 mg **37** (0.13 mmol, 1.00 Äq) in 1 mL trockenem DCM hinzugegeben und 24 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Gemisch wurde mit DCM verdünnt und mit 1 M HCl versetzt. Die organische Phase wurde mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde per Säulenchromatographie (DCM; 0 – 5 % MeOH) gereinigt, wobei 39 mg **43** (40 %) in Form eines gelben Feststoffes erhalten wurden.

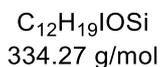
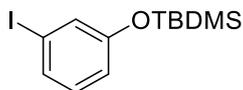
DC (DCM; 5 % MeOH): R<sub>f</sub> = 0.31

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8.70 (br s, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, 6-H), 7.27 – 7.17 (m, 1H, Aryl-H), 7.01 – 6.98 (m, 2H, Aryl-H), 6.97 – 6.94 (m, 1H, Aryl-H), 6.80 – 6.71 (m, 3H, Aryl-H), 6.32 (dd, J = 8.2, 5.7 Hz, 1H, 1'-H), 5.56 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NHCOO), 4.38 (m, 1H, 3'-H), 3.93 (q, J = 2.4 Hz, 1H, 4'-H), 3.84 (dd, J = 11.1, 2.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.75 (dd, J = 11.6, 2.9 Hz, 1H, 5'-H), 3.30 – 3.21 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.89 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.42 (td, J = 7.2, 5.1 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.23 (ddd, J = 13.1, 5.7, 2.4 Hz, 1H, 2'-H), 2.0 (ddd, J = 13.6, 8.1, 6.0 Hz, 1H, 2'-H), 1.78 (p, J = 7.0 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.92 (s, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), 0.89 (s, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), 0.11 (s, 3H, SiMe), 0.10 (s, 3H, SiMe), 0.08 (s, 3H, SiMe), 0.07 (s, 3H, SiMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 163.8 (C<sub>q</sub>), 159.7 (C<sub>q</sub>), 156.0 (C<sub>q</sub>), 154.9 (C<sub>q</sub>), 151.3 (C<sub>q</sub>), 150.2 (C<sub>q</sub>), 143.4 (C<sub>q</sub>), 143.3 (C<sub>q</sub>), 136.7 (6-C), 129.5 (Aryl-CH), 129.2 (Aryl-CH), 125.5 (Aryl-CH), 121.7 (Aryl-CH), 120.9 (Aryl-CH), 119.3 (Aryl-CH), 114.2 (Aryl-CH), 111.5 (Aryl-CH), 88.0 (4'-C), 85.1 (1'-C), 72.5 (3'-C), 63.2 (5'-C), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 41.4 (2'-C), 40.2 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.7 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 26.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.4 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 18.6 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (SiMe), -4.7 (SiMe), -5.2 (SiMe), -5.2 (SiMe).

**HR-MS (ESI):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 768.4075 ; gefunden: 768.4067.

**3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)iodobenzol (45)**

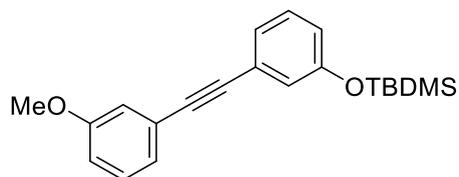


Unter Argon-Atmosphäre wurden zu einer Lösung aus 2.00 g 3-Iodophenol in 30 mL absolutem DMF 1.55 g Imidazol (22.7 mmol, 2.50 Äq) hinzugegeben. Nach 5 min wurden 1.64 g TBDMS-Chlorid (10.9 mmol, 1.20 Äq) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und zweimal mit Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über eine kurze Filtersäule (Hexan) aufgereinigt. So konnten 2.89 g **45** (95 %) in Form eines farblosen Öls erhalten werden.

**DC** (H:DCM; 10:1):  $R_f = 0.59$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[204]</sup>

**3-(((3-tert-Butyldimethylsilyl)oxyphenyl)ethynyl)anisol (46)**



C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Si  
338.52 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden 2.85 g **45** (8.51 mmol, 1.00 Äq) unter Argon-Atmosphäre in 25 mL trockenem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 417 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.60 mmol, 0.07 Äq), 113 mg CuI (0.60 mmol, 0.07 Äq), 4.72 mL NEt<sub>3</sub> (3.45 g, 34.1 mmol, 4.00 Äq) und 1.35 g **40** (10.2 mmol, 1.20 Äq) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (H:DCM; 10:1 – 5:1) aufgereinigt. Es wurden 2.78 g **46** (97 %) als farbloses Öl erhalten.

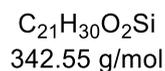
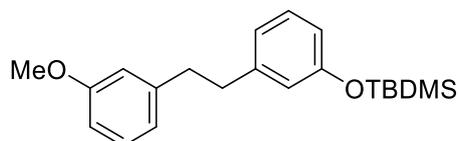
**DC** (H:DCM; 10:1): R<sub>f</sub> = 0.13

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.26 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.21 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Aryl-H), 7.16 – 7.12 (m, 2H, Aryl-H), 7.07 (dd, *J* = 2.7, 1.4 Hz, 1H, Aryl-H), 7.01 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H, Aryl-H), 6.90 (ddd, *J* = 8.2, 2.7, 1.1 Hz, 1H, Aryl-H), 6.83 (ddd, *J* = 8.1, 2.4, 1.2 Hz, 1H, Aryl-H), 3.83 (s, 3H, OMe), 1.00 (s, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), 0.22 (s, 6H, SiMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 159.5 (C<sub>q</sub>), 155.6 (C<sub>q</sub>), 129.5 (C<sub>q</sub>), 129.5 (C<sub>q</sub>), 125.0 (Aryl-CH), 124.3 (Aryl-CH), 124.3 (Aryl-CH), 123.2 (Aryl-CH), 120.8 (Aryl-CH), 116.4 (Aryl-CH), 115.1 (Aryl-CH), 89.2 (C≡C), 89.2 (C≡C), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), - 4.26 (SiMe).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 339.1780 ; gefunden: 339.1782.

**3-(((3-tert-Butyldimethylsilyl)oxyphenyl)ethylen)anisol (47)**



Es wurden 603 mg **46** (1.78 mmol, 1.00 Äq) zusammen mit 121 mg Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20 wt%) 1 h im Hochvakuum getrocknet und anschließend unter Argon-Atmosphäre in 20 mL absolutem MeOH gelöst. Zu diesem Gemisch wurden 2.85 mL Et<sub>3</sub>SiH (2.07 g, 17.8 mmol, 10.0 Äq) zugetropft und 24 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Rohgemisch wurde über Celite filtriert und mit MeOH nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt schließlich mittels Säulenchromatographie (H:DCM; 8:1 – 4:1) aufgereinigt. So konnten 560 mg **47** (92 %) als farbloses Öl erhalten werden.

**DC** (H:DCM; 4:1): R<sub>f</sub> = 0.32

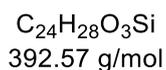
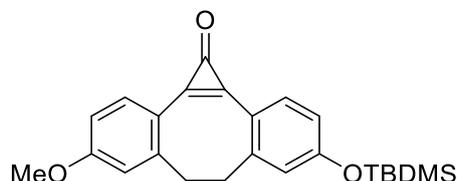
**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.19 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Aryl-H), 7.12 (d, J = 7.4 Hz, 1H, Aryl-H), 6.78 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Aryl-H), 6.75 – 6.70 (m, 2H, Aryl-H), 6.69 – 6.64 (m, 2H, Aryl-H), 3.78 (s, 3H, OMe), 2.87 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.98 (d, J = 1.1 Hz, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), 0.17 (d, J = 1.1 Hz, 6H, SiMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 159.7 (C<sub>q</sub>), 155.7 (C<sub>q</sub>), 143.5 (C<sub>q</sub>), 143.4 (C<sub>q</sub>), 129.4 (Aryl-CH), 129.3 (Aryl-CH), 121.6 (Aryl-CH), 121.0 (Aryl-CH), 120.4 (Aryl-CH), 117.7 (Aryl-CH), 114.3 (Aryl-CH), 111.4 (Aryl-CH), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 38.0 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.4 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), - 4.3 (SiMe).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 343.2093 ; gefunden: 343.2094.

**4-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-9-methoxy-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]**

**annulen-1-on (48)**



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden zu einer Suspension aus 261 mg  $AlCl_3$  (1.95 mmol, 1.20 Äq) in 19 mL trockenem DCM 300  $\mu$ L Tetrachlorcyclopropan (435 mg, 2.44 mmol, 1.50 Äq) hinzugegeben. Nach 10 min wurde das Gemisch auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und 8.14 mL **47** (558 mg, 1.63 mmol, 1.00 Äq, 0.2 M in trockenem DCM) über 15 min zugetropft. Das Gemisch wurde 2 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  rühren gelassen, über 1 h auf Raumtemperatur erwärmt und eine weitere Stunde rühren gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M HCl abgestoppt, 30 min rühren gelassen und mit Wasser verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM; 0 – 5 % MeOH) aufgereinigt. So konnten 418 mg **48** (65 %) als weißer Feststoff erhalten werden.

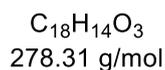
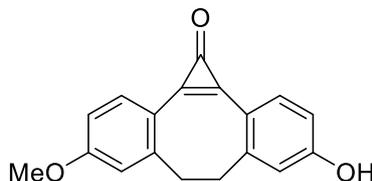
**DC** (DCM; 5 % MeOH):  $R_f = 0.33$

**$^1\text{H-NMR}$**  (500MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.96 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H; Aryl-H), 7.89 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H; Aryl-H), 6.93 – 6.88 (m, 2H, Aryl-H), 6.85 – 6.82 (m, 2H; Aryl-H), 3.89 (s, 3H; OMe), 3.41 – 3.25 (m, 2H;  $CH_2$ ), 2.63 (dt,  $J = 12.9, 6.5$  Hz, 2H;  $CH_2$ ), 1.00 (s, 9H;  $Si^tBu$ ), 0.26 (s, 6H; SiMe).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 162.6 ( $C_q$ ), 159.3 ( $C_q$ ), 154.0 ( $q$ ), 148.1 ( $C_q$ ), 148.0 ( $C_q$ ), 142.6 ( $C_q$ ), 142.4 ( $C_q$ ), 136.0 (Aryl-CH), 135.8 (Aryl-CH), 121.6 (Aryl-CH), 118.5 (Aryl-CH), 117.1 ( $C_q$ ), 116.6 ( $C_q$ ), 116.0 (Aryl-CH), 111.9 (Aryl-CH), 55.7 (O- $CH_3$ ), 37.4 ( $CH_2$ ), 37.2 ( $CH_2$ ), 25.7 (SiC( $CH_3$ )), 18.4 (SiC( $CH_3$ )), - 4.2 (Si $CH_3$ ).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für  $[M+H]^+$ : 393.1886; gefunden: 393.1688.

**4-Hydroxy-9-methoxy-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]annulen-1-on (49)**



Zu einer Lösung aus 418 mg **48** (1.06 mmol, 1.00 Äq) in 20 mL trockenem THF wurden unter Argon-Atmosphäre 2.13 mL einer TBAF-Lösung (557 mg, 2.13 mmol, 2.00 Äq, 1 M in THF) zugegeben und das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH abgestoppt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt dabei direkt auf Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM; 0 – 8 % MeOH) konnten 196 mg **49** (66 %) in Form eines weißen Feststoffes erhalten werden.

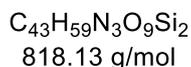
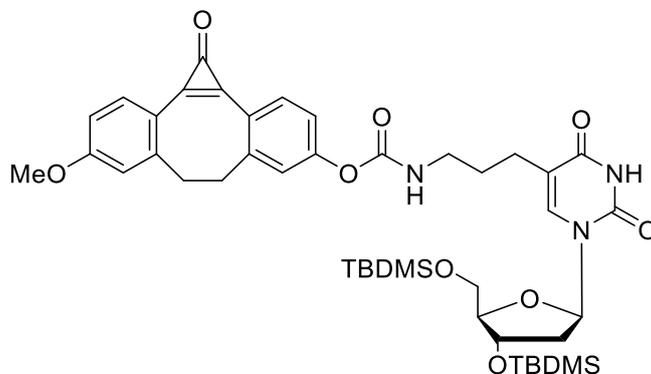
**DC** (DCM; 10 % MeOH):  $R_f = 0.58$

**$^1H$ -NMR** (500MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.44 (s, 1H, Aryl-OH), 7.78 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, Aryl-H); 7.69 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, Aryl-H), 7.09 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, Aryl-H), 7.01 (dd,  $J = 9.4, 2.7$  Hz, 1H, Aryl-H), 6.90 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, Aryl-H), 6.83 (dd,  $J = 8.3, 2.5$  Hz, 1H, Aryl-H), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.48 – 3.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.50 – 2.41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 161.9 (C<sub>q</sub>), 161.1 (C<sub>q</sub>), 152.0 (C<sub>q</sub>), 148.2 (C<sub>q</sub>), 147.9 (C<sub>q</sub>), 142.3 (C<sub>q</sub>), 140.8 (C<sub>q</sub>), 135.2 (Aryl-CH), 134.8 (Aryl-CH), 117.0 (Aryl-CH), 116.1 (C<sub>q</sub>), 115.7 (Aryl-CH), 114.5 (C<sub>q</sub>), 114.0 (Aryl-CH), 112.4 (Aryl-CH), 55.6 (OCH<sub>3</sub>), 36.4 (CH<sub>2</sub>), 36.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR-MS (FAB)**:  $m/z$ : berechnet für  $[M+H]^+$ : 279.1021; gefunden: 279.1023.

**9-Methoxy-1-oxo-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]annulen-4-yl-N-propyl-3-((3',5'-bis-(tert-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin-5-yl)carbammat (3)**



In einem ausgeheizten Schlenk-Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 32.0 mg *para*-Nitrophenylchloroformat (0.20 mmol, 1.50 Äq) in 1 mL trockenem DCM gelöst, mit 0.5 mL trockenem Pyridin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu diesem Gemisch wurde eine Lösung aus 55.0 mg **49** (0.20 mmol, 1.50 Äq) in trockenem DCM zugegeben. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion für 3 h bei Raumtemperatur fortgeführt. Anschließend wurde eine Lösung aus 67.7 mg **37** (0.13 mmol, 1.00 Äq) in 300 µL trockenem DCM zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und mit DCM verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase nochmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (DCM; 0 – 5 % MeOH) konnten 17 mg **3** (16 %) in Form eines weißen Feststoffes erhalten werden.

DC (DCM; 5 % MeOH): R<sub>f</sub> = 0.31

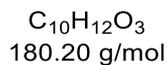
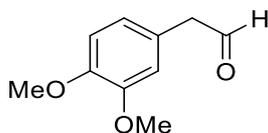
<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8.63 (br s, J = 9.7 Hz, 1H, NH), 7.98 (dd, J = 8.8, 7.3 Hz, 2H, Aryl-H), 7.53 (s, 1H, 6-H), 7.21 – 7.15 (m, 2H, Aryl-H), 6.93 – 6.88 (m, 2H, Aryl-H), 6.32 (dd, J = 8.2, 5.7 Hz, 1H, 1'-H), 5.82 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NHCOO), 4.38 (dt, J = 5.2, 2.4 Hz, 1H, 3'-H), 3.94 (d, J = 2.6 Hz, 1H, 4'-H), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.85 (dd, J = 11.5, 2.7 Hz, 1H, 5'-H), 3.75 (dd, J = 11.5,

2.7 Hz, 1H, 5'-H), 3.41 – 3.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.28 (dt, *J* = 13.1, 6.7 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.60 (dt, *J* = 17.5, 8.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.42 (dp, *J* = 13.9, 6.9 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.26 – 2.17 (m, 1H, 2'-H), 2.04 – 1.94 (m, 1H, 2'-H), 1.83 – 1.71 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.92 (s, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), 0.88 (s, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), 0.11 (d, *J* = 1.6 Hz, 6H, SiMe), 0.07 (s, 6H, SiMe).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 163.9 (C<sub>q</sub>), 162.9 (C<sub>q</sub>), 154.0 (C<sub>q</sub>), 154.0 (C<sub>q</sub>), 153.8 (C<sub>q</sub>), 150.1 (C<sub>q</sub>), 148.2 (C<sub>q</sub>), 147.3 (C<sub>q</sub>), 144.9 (C<sub>q</sub>), 141.8 (C<sub>q</sub>), 136.9 (6-C), 136.3 (Aryl-CH), 135.1 (Aryl-CH), 122.9 (Aryl-CH), 120.6 (C<sub>q</sub>), 120.3 (Aryl-CH), 116.4 (C<sub>q</sub>), 115.9 (Aryl-CH), 114.1 (C<sub>q</sub>), 112.1 (Aryl-CH), 88.1 (4'-C), 85.1 (1'-C), 72.5 (3'-C), 63.3 (5'-C), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 41.5 (2'-C), 40.2 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 37.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.7 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 26.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.2 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 18.6 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (SiMe), -4.7 (SiMe), -5.2 (SiMe), -5.2 (SiMe).

**HR-MS (FAB):** *m/z*: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 818.3870; gefunden: 818.3868.

**2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetaldehyd (52)**

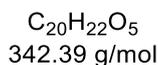
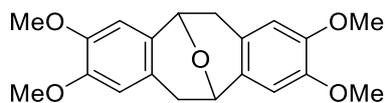


Zu einer Lösung aus 3.00 g 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethanol (16.5 mmol, 1.00 Äq) in 17 mL trockenem DCM wurden unter Argon-Atmosphäre 51.2 g Dess-Martin-Periodan (15 wt% in DCM, 18.1 mmol, 1.10 Äq) portionsweise über 30 min zugegeben. Das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 5 mL gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung und 5 mL gesättigter  $Na_2S_2O_3$ -Lösung versetzt. Nach 20 min wurde die entstandene Suspension abfiltriert und der Niederschlag mit Hexan nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit gesättigter  $NaCl$ -Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach anschließender Säulenchromatographie (H:EE; 4:1) konnten 2.09 g **52** (70 %) als hellgelbes Öl erhalten werden.

**DC** (H:EE; 4:1):  $R_f = 0.14$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[195]</sup>

**2',3',2'',3''-Tetramethoxy-2,3:6,7-dibenzo-9-oxobicyclo[3.3.1]nona-2,6-dien (53)**<sup>[197]</sup>

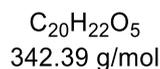
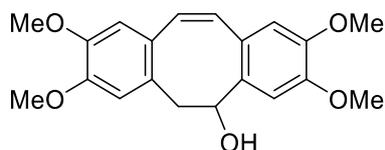


Unter Argon-Atmosphäre wurden 2.09 g **52** (11.6 mmol, 2.00 Äq) in 70 mL trockenem DCM gelöst und auf -78 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden 395 µL TMS-Iodid (555 mg, 2.77 mmol, 0.50 Äq) über 60 min zugetropft und die schwarz gefärbte Lösung weitere 2 h bei -78 °C gerührt. Das Kältebad wurde schließlich entfernt und 50 mL halbgesättigte Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, wobei sich das Gemisch wieder entfärbte. Nach 30 min wurde das Gemisch dreimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (H:EE; 10:1 – 1:1) aufgereinigt. Auf diese Weise konnten 1.61 g **53** (79 %) als weißer Feststoff isoliert werden.

**DC** (H:EE; 1:1): R<sub>f</sub> = 0.33

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[195]</sup>

**3-Hydroxy-2',3',2'',3''-tetramethoxy-1,2:5,6-dibenzocycloookta-1,5,7-trien (54)**<sup>[197]</sup>

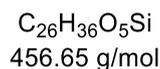
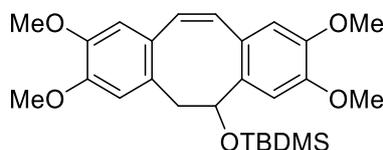


In einem Rundkolben wurden 1.60 g **53** (4.67 mmol, 1.00 Äq) im Hochvakuum vorgetrocknet, mit Argon geflutet und in 40 mL trockenem THF gelöst. Zu dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur 3.83 mL einer *n*BuLi-Lösung (2.5 M in THF, 614 mg, 9.58 mmol, 2.05 Äq) über 30 min zugetropft und das Gemisch noch 2 h rühren gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach anschließender Säulenchromatographie (DCM:EE; 10:1 – 2:1) konnten 1.28 g **54** (80 %) als weißer Schaum isoliert werden.

**DC** (DCM:EE; 2:1): R<sub>f</sub> = 0.42

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[197]</sup>

**3-(tert-Butyldimethylsilyl)oxy-2',3',2'',3''-tetramethoxy-1,2:5,6-dibenzocycloookta-1,5,7-trien (55)**

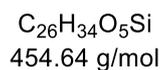
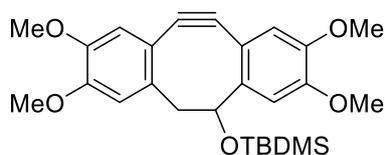


Zu einer Lösung aus 1.48 g **54** (4.33 mmol, 1.00 Äq) in 40 mL trockenem DCM und 10 mL trockenem Pyridin wurden unter Argon-Atmosphäre 3.26 g TBDMS-Chlorid (43.3 mmol, 5.00 Äq) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mittels Säulenchromatographie (H:EE; 10:1 – 3:1) aufgereinigt. So konnten 948 mg **55** (48 %) als farbloses Öl erhalten werden.

**DC** (H:EE; 4:1):  $R_f = 0.28$

Die spektroskopischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[199]</sup>

**3-(tert-Butyldimethylsilyloxy-2',3',2'',3''-tetramethoxy-7,8-didehydro-1,2:5,6-dibenzocycloookta-1,5,7-trien (56)**



Eine Lösung aus 744 mg **55** (1.63 mmol, 1.00 Äq) in 60 mL DCM wurde auf – 40 °C gekühlt und so lange Brom (84 µL, 261 mg, 1.63 mmol, 1.00 Äq) zugetropft, bis eine braune Färbung blieb. Das Gemisch wurde noch 5 min rühren gelassen und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in 60 mL THF aufgenommen, mit 2.11 g Piperazin (24.5 mmol, 15.0 Äq) und 732 mg KO<sup>t</sup>Bu (6.53 mmol, 4.00 Äq) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (H:EE; 10:1 – 3:1) aufgereinigt. So konnten 459 mg **56** (62 %) als weißer Feststoff erhalten werden.

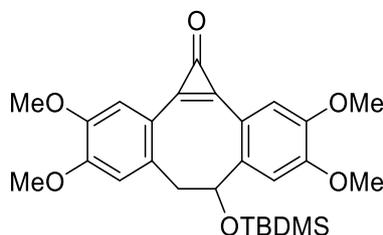
**DC** (H:EE; 4:1): R<sub>f</sub> = 0.38

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.35 (s, 1H, Aryl-H), 6.89 (s, 1H, Aryl-H), 6.82 (s, 1H, Aryl-H), 6.81 (s, 1H, Aryl-H), 4.45 (ddd, J = 3.7, 1.9, 0.7 Hz, 1H, CH), 3.93 (s, 3H, OMe), 3.91 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.02 (dd, J = 14.7, 2.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.86 (dd, J = 14.5, 3.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 0.97 (s, 9H, Si<sup>t</sup>Bu), -0.03 (s, 3H, SiMe), -0.08 (s, 3H, SiMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 150.3 (C<sub>q</sub>), 149.0 (C<sub>q</sub>), 148.6 (C<sub>q</sub>), 147.6 (C<sub>q</sub>), 147.3 (C<sub>q</sub>), 145.3 (C<sub>q</sub>), 115.9 (Aryl-CH), 113.9 (C<sub>q</sub>), 112.5 (C<sub>q</sub>), 112.3 (C<sub>q</sub>), 110.3 (C<sub>q</sub>), 109.05 (Aryl-CH), 108.9 (Aryl-CH), 108.8 (Aryl-CH), 76.4 (CH), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 50.6 (OCH<sub>3</sub>), 26.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.4 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.3 (SiMe), -4.9 (SiMe).

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>:454.2174; gefunden: 454.2176.

**6-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-3,4,9,10-tetramethoxy-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]annulen-1-on (57)**



C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>Si  
482.65 g/mol

Es wurden 207 mg **56** (0.46 mmol, 1.00 Äq) über Nacht im Hochvakuum getrocknet und schließlich unter Argon-Atmosphäre in 5 mL absolutem THF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 91 µL CHCl<sub>3</sub> (136 mg, 1.14 mmol, 2.50 Äq) zugegeben und auf -78 °C gekühlt. Hierzu wurden 455 µL *n*BuLi (2.5 M in Hexan, 72.9 mg, 1.14 mmol, 2.50 Äq) über 40 min zugetropft und 4 h bei -78 °C rühren gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mL 1 M HCl abgestoppt. Das Kältebad wurde entfernt und die Reaktion weitere 30 min rühren gelassen. Das Gemisch wurde mit Wasser verdünnt und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM; 0 – 4 % MeOH) wurden 159 mg **57** (72 %) als weißer Feststoff erhalten.

**DC** (DCM; 3 % MeOH): R<sub>f</sub> = 0.29

**<sup>1</sup>H-NMR** (500MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.47 (s, 1H, Aryl-H), 7.45 (s, 1H, Aryl-H), 7.42 (s, 1H, Aryl-H), 6.92 (s, 1H, Aryl-H), 4.68 (dd, J = 3.0, 2.1 Hz, 1H, CH), 3.99 (s, 3H, OMe), 3.98 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 3.96 (s, 3H, OMe), 3.18 (dd, J = 15.1, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.07 (dd, J = 15.0, 3.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 0.96 (s, 9H, SitBu), -0.07 (s, 3H, SiMe), -0.11 (s, 3H, SiMe).

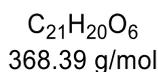
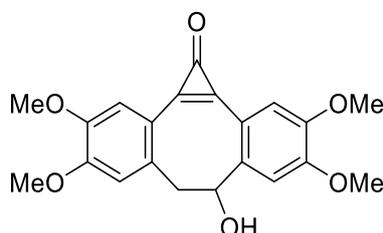
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 153.9 (C<sub>q</sub>), 152.3 (C<sub>q</sub>), 151.9 (C<sub>q</sub>), 148.0 (C<sub>q</sub>), 147.7 (C<sub>q</sub>), 143.8 (C<sub>q</sub>), 143.4 (C<sub>q</sub>), 142.1 (C<sub>q</sub>), 138.3 (C<sub>q</sub>), 116.3 (C<sub>q</sub>), 115.4 (Aryl-CH), 115.3 (Aryl-CH), 113.1 (Aryl-CH), 113.0 (C<sub>q</sub>), 107.6 (Aryl-CH), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 56.3 (OCH<sub>3</sub>), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 51.0

(CH<sub>2</sub>), 26.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.3 (SiMe), -4.8 (SiMe). Das CH-Signal wird überlagert durch das CDCl<sub>3</sub>-Signal.

**HR-MS (FAB):** m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 483.2203; gefunden: 483.2202.

**6-Hydroxy-3,4,9,10-tetramethoxy-6,7-dihydro-1H-dibenzo[a,e]cyclopropa[c][8]annulen-**

**1-on (58)**



Zu einer Lösung aus 159 mg **57** (0.33 mmol, 1.00 Äq) in 6 mL trockenem THF wurden unter Argon-Atmosphäre 0.66 mL TBAF-Lösung (1 M in THF, 172 mg, 0.66 mmol, 2.00 Äq) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt dabei direkt auf Kieselgel adsorbiert. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (DCM; 0 – 5 % MeOH) aufgereinigt. So konnten 116 mg **58** (96 %) als weißer Feststoff erhalten werden.

**DC** (DCM; 3 % MeOH):  $R_f = 0.14$

**$^1H$ -NMR** (500MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.44 (s, 1H, Aryl-H), 7.35 (s, 1H, Aryl-H), 7.34 (s, 1H, Aryl-H), 7.20 (s, 1H, Aryl-H), 6.03 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, OH), 4.53 – 4.51 (m, 1H, CHOH), 3.90 (s, 6H, OMe), 3.86 (s, 6H, OMe), 3.19 (dd,  $J = 14.7, 2.9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.87 (dd,  $J = 14.7, 3.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>).

**$^{13}C$ -NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 152.0 (C<sub>q</sub>), 151.9 (C<sub>q</sub>), 151.7 (C<sub>q</sub>), 147.4 (C<sub>q</sub>), 147.1 (C<sub>q</sub>), 144.3 (C<sub>q</sub>), 143.0 (C<sub>q</sub>), 141.6 (C<sub>q</sub>), 138.7 (C<sub>q</sub>), 115.4 (Aryl-CH), 114.9 (Aryl-CH), 114.6 (Aryl-CH), 113.6 (Aryl-CH), 112.5 (Aryl-CH), 107.6 (Aryl-CH), 74.9 (CHOH), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 49.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR-MS (FAB)**: m/z: berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 369.1338; gefunden:369.1336.

## 7.3 Enzymatische DNA-Synthese

### 7.3.1 Primerverlängerungsexperimente

Für Primerverlängerungsexperimente wurden die folgenden Template (**T**) und Primer (**P**) verwendet:

<b>T1</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AG <b>A</b> - GGC - CGG - TCG - CG - 5'
<b>T2</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AGG - G <b>C</b> A - CGG - TCG - CG - 5'
<b>T3</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AGG - G <b>C</b> A - <b>A</b> CG - TCG - CG - 5'
<b>T4</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AGG - G <b>C</b> A - CGG - <b>A</b> CG - CG - 5'
<b>T5</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AGG - G <b>C</b> A - <b>A</b> AC - TCG - CG - 5'
<b>T6</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AG <b>T</b> - GGC - CGG - ACG - CG - 5'
<b>T7</b>	3' - CTG - GGT - GAG - GTA - GCT - CTA - AAG - AGG - G <b>C</b> T - CGG - ACG - CG - 5'
<b>P1</b>	5' - <b>Fluo</b> - GAC - CCA - CTC - CAT - CGA - GAT - TTC - TC - 3'
<b>P2</b>	5' - <b>Cy5</b> - GAC - CCA - CTC - CAT - CGA - GAT - TTC - TC - 3'

**Abbildung 52:** Sequenzen der verwendeten Template und Primer.

Primerverlängerungsexperimente wurden entsprechend Tabelle 5 in einer Ansatzgröße von 20 µL durchgeführt. War eine größere Menge erforderlich, so wurden Vielfache dieses Ansatzes ausgeführt.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung eines Primerverlängerungsexperiments.

Komponente	Konzentration
Templat	900 nM
Primer	750 nM
Puffer	Einfach
DNA-Polymerase	1U
Triphosphate	200 µM

## Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden zunächst der gewünschte Templat- und Primerstrang mit dem für die verwendete DNA-Polymerase notwendigen Puffer (siehe Tabelle 6) gemischt und mit *millipore* H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 9.6 µL (KOD XL) bzw. 9.5 µL (übrige Polymerasen) verdünnt. Dieses Gemisch wurde in einem Thermocycler für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend mit einer Rate von 1.2 °C/min auf 25 °C abgekühlt.

**Tabelle 6:** Für die Primerverlängerungsexperimente verwendete DNA-Polymerasen mit den jeweiligen Reaktionspuffern.

DNA-Polymerase	Puffer	Zusammensetzung (einfach)
Vent (exo-)	Thermo Pol Reaktionspuffer	20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM KCl, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.1 % Triton® X-100, pH = 8.8
Deep Vent (exo-)		
Hemo KlenTaq	Hemo KlenTaq Reaktionspuffer	60 mM Tricine, 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 3.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 6 % Glycerol, pH = 8.7
KOD XL	KOD XL DNA Puffer	pH = 8.0

## Primerverlängerung

Nach erfolgter Hybridisierung wurde 1 U der jeweiligen DNA-Polymerase (0.5 µL für Vent (exo-), Deep Vent (exo-) und Hemo KlenTaq, bzw. 0.4 µL für KOD XL) sowie 10 µL der vorab vorbereiteten Triphosphat-Stammlösung (400 µM) zugegeben und bei der entsprechend angegebenen Temperatur für die jeweils angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Wurden für den Einbau Triphosphat-Farbstoff-Konjugate verwendet, so wurden diese unmittelbar vor der Verlängerung hergestellt und mit den übrigen Triphosphaten gemischt.

Nach erfolgter Verlängerung wurden die Proben entweder mit dem äquivalenten Volumen an Ladepuffer versetzt (Ladepuffer: 20 mM EDTA (Dinatriumsalz), 7 M Harnstoff, 89 mM Tris Base, 89 mM Borsäure, 4 % Ficoll, 0.1 % Bromphenolblau, 0.02 % Xylencyanol FF) und mittels PAGE analysiert oder zunächst entsalzt. Für Proben, welche den Cy5-markierten Primer **P2** enthielten, wurde ein Ladepuffer ohne Xylencyanol FF verwendet.

## Entsalzen

Reaktionslösungen wurden mittels *illustra NAP-5* Säulen der Firma *GE Healthcare* entsalzt. Hierfür wurden Volumina zwischen 100 und 500  $\mu\text{L}$  verwendet und die Oligonukleotide entsprechend der Herstellerangaben mit *millipore*  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Die Proben wurden anschließend lyophilisiert und erneut in *millipore*  $\text{H}_2\text{O}$  in der ursprünglichen Konzentration aufgenommen. Die entsalzten Proben wurden entweder direkt mit Ladebuffer versetzt oder zunächst für Markierungsexperimente verwendet.

## Auswertung mittels denaturierender PAGE

Für die gelelektrophoretische Auswertung wurden 12.5 %-ige Polyacrylamid-Gelmischungen aus Acrylamid/Bisacrylamid (19:1; 40 % wässrige Lösung) verwendet. Die Zusammensetzung kann Tabelle 7 entnommen werden. Gelmischungen wurden in Ansatzgrößen von 50 mL zunächst ohne Zusatz von TEMED und APS vorbereitet. Um die Polymerisation zu starten wurden TEMED und anschließend APS zugegeben, das Gel sofort gegossen und für 30 min bei Raumtemperatur polymerisiert.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der für die PAGE verwendeten Gelmischung.

Komponente	Konzentration
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1; 40 %)	12.5 %
Urea	8.3 M
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	20 mM
TEMED	2.7 mM
APS (10 %)	4.1 mM

Nach erfolgter Polymerisation wurde der Taschenkamm gezogen, die Taschen mit TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA) gespült und das Gel mit TBE-Puffer als Elektrolyt für 45 min bei 50 W und maximal 3 kV äquilibriert, um die gewünschte Trennungstemperatur

(mindestens 40 °C) zu erhalten. Die Taschen wurden anschließend erneut gespült und soweit nicht anders beschrieben mit 10 µL Probenvolumen beladen. Die Elektrophorese wurde für ca. 1 h bei 50 W (max. 3 kV) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Detektion der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe mittels Fluoreszenzimager (siehe Abschnitt 7.1, Tabelle 4).

### 7.3.2 PCR-Experimente

#### Durchführung der PCR-Experimente

Für PCR-Experimente wurden die folgenden Oligonukleotide (ON) als Template bzw. Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet:

**Tabelle 8:** Oligonukleotide (ON) als Template bzw. Vorwärts- und Rückwärtsprimer für PCR-Experimente.

ON	Sequenz (5' → 3')	Länge
<b>T8</b>	GACATCATGAGAGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAG AGCAGATCCCTGGACAGGCAAGGAATACAGGTATTTTGCCTTG	98 Nt
<b>T9</b>	GACATCATGAGAGACATCGCCTCTGGGTCCCTGGACAGGCAAGGAATACAGGT ATTTTGCCTTG	68 Nt
<b>P3</b>	Fluo-CAAGGACAAAATACCTGTATTCCTT	25 Nt
<b>P4</b>	Fluo-GACATCATGAGAGACATCGC	20 Nt
<b>P5</b>	Cy5-GACATCATGAGAGACATCGC	20 Nt

Es wurden die bereits unter Abschnitt 7.3.1 (Tabelle 6) beschriebenen DNA-Polymerasen Vent (exo-), Hemo KlenTaq und KOD XL verwendet.

PCR-Experimente wurden, soweit nicht anders beschrieben, in 20 µL Ansätzen entsprechend der in Tabelle 9 beschriebenen Zusammensetzung durchgeführt.

## Experimentaltteil

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der PCR-Experimente. <sup>1)</sup> Soweit nicht anders beschrieben, wurde kein MgSO<sub>4</sub> zugesetzt. <sup>2)</sup> Die exakten Triphosphat-Konzentrationen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Komponente	Konzentration
Templat	250 nM
Vorwärtsprimer	2 μM
Rückwärtsprimer	2 μM
Reaktionspuffer	Einfach
DNA-Polymerase	1 Unit
MgSO <sub>4</sub>	0 – 2 mM <sup>1)</sup>
Triphosphate	50 - 800 μM <sup>2)</sup>

Die fertigen PCR-Reaktionsgemische wurden dem folgenden Temperaturprogramm unterzogen, wobei die Zeiten der verschiedenen Schritte variiert wurden:

**Tabelle 10:** Temperaturprogramm zur Durchführung der PCR-Experimente. <sup>1)</sup> Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Schritte A – C in Form von Schleifen 30-mal durchgeführt.

	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Vorheizen	95 °C	3 min
2 <sup>1)</sup>	A Denaturieren	95 °C	1 – 3 min
	B Anlagerung	53 °C	1 min
	C Verlängerung	72 °C	1 – 60 min
3	Finale Verlängerung	72 °C	5 – 10 min

Nach den beendeten Experimenten wurden die Reaktionsgemische entweder direkt mit Ladepuffer versetzt (siehe Abschnitt 7.3.1) und mittels PAGE analysiert, direkt mit Farbstoff inkubiert oder zunächst entsalzt (siehe Abschnitt 7.3.1).

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden als Vergleichsproben jeweils Positiv- ( $T^+/A^+$ ) sowie Negativkontrollen ( $T^-/A^-$ ) in gleicher Vorgehensweise generiert.

**Tabelle 11:** Triphosphatkonzentrationen der verschiedenen PCR-Experimente (angegeben in  $\mu\text{M}$ ).

dNTP	$T^+$	$T^-$	$1^{200}/1^{400}$	$1^{400}T$	$A^+$	$A^-$	$2^{200}/2^{400}$
TTP	200	-	-	50	200	200	200
dATP	200	200	200	200	200	-	-
dCTP	200	200	200	200	200	200	200
dGTP	200	200	200	200	200	200	200
<b>1</b>	-	-	200 / 400	400	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	200 / 400

### Auswertung mittels denaturierender PAGE

Für die gelelektrophoretische Auswertung wurden 5- oder 10 %-ige Polyacrylamid-Gele aus Acrylamid/Bisacrylamid (19:1; 40 % wässrige Lösung) verwendet. Die Gelmischungen beinhalteten zudem Urea (8.3 M), Tris (89 mM), Borsäure (89 mM) und EDTA (20 mM). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED (2.7 mM) und 10 %-iger wässriger APS-Lösung (4.1 mM) gestartet und das Gel anschließend sofort gegossen. Nach 20 min war die Polymerisation abgeschlossen und das Gel wurde für weitere 20 min bei einer Stromstärke von 30 mA unter Verwendung von TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA) als Elektrolyt äquilibriert. Vor und nach dem Äquilibrieren wurden die Taschen mit TBE-Puffer gespült um überschüssigen Harnstoff herauszulösen. Soweit nicht anders beschrieben wurde 5  $\mu\text{L}$  Probenvolumen aufgetragen und die elektrophoretische Trennung bei konstanter Spannung von 120 V für ca. 1 h durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch Detektion der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe mittels Fluoreszenzimager (siehe Abschnitt 7.1, Tabelle 4).

### 7.3.3 Kinetische Messungen

Die Bestimmung der Echtzeit-Geschwindigkeitskonstanten wurde von der Firma Dynamic Biosensors GmbH (Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde ein DRX<sup>2</sup> Biosensor verwendet und nach einem bereits publizierten Protokoll gearbeitet.<sup>[53]</sup>

Die Sequenzen der verwendeten Template und Primer sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Oligonukleotide (ON) für die Bestimmung der Echtzeit-Geschwindigkeitskonstanten.

ON	Sequenz (5' → 3')	Länge
T10	Fluorophor-TCTCCACGCCGACTCTAATGCTGGTTACATCACTCTTTATCTCGT TACATCACTCTTTATGCTCACACTTCAGGTTACTC-C6-thiol	80 Nt
P6	GAGTAACCTGAAGTGTGAGCATAAAGAGTGATGTAACGAGATAAAGAGTGA TGTAACCAGCATTAGAG	68 Nt
P7	GAGTAACCTGAAGTGTGAGCATAAAGAGTGATGTAACGAGATAAAGAGTGA TGTAACCAGCATTAGAGT	69 Nt

Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurde zunächst die Oberfläche des verwendeten ENZ-80-R1-Biochips mit einer Regenerationslösung gewaschen. Anschließend wurde der Primer (500 nM in 10 mM Trizma<sup>®</sup> HCl, 40 mM NaCl, 50 µM EDTA, 50 µM EGTA, 0.05 % Tween20, pH 7.4) hybridisiert. Danach wurde die Hemo KlenTaq-DNA-Polymerase gebunden (0.04 U/µL, Flussrate: 200 µL/min) bevor die jeweiligen Triphosphatmischungen (je 80 µM) injiziert wurden (Flussrate: 50 µL/min). Die Verlängerung wurde durch Beobachtung der Fluoreszenzänderung im *fluorescence proximity mode* mit konstanter Spannung ( $V_{att} = V_{rep} = -0.1$  V) verfolgt. Die Messungen wurden in einem Puffer (30 mM Trizma<sup>®</sup> Base, 30 mM KCl, 0.01 % Tween20, 0.001 % Brij35, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.7) bei 37 °C durchgeführt.

## 7.4 Bioorthogonale Markierung

### 7.4.1 Postsynthetische Markierung mittels iEDDA

Alle Farbstoffe wurden als Stammlösungen in DMSO verwendet.

Primerverlängerungsprodukte wurden entweder mit oder ohne vorherigem Entsalzen in Markierungsexperimenten eingesetzt. Nicht entsalztes Oligonukleotid wurde in der vorliegenden Konzentration (750 nM; bezogen auf den Primer) verwendet, entsalztes Oligonukleotid wurde lyophilisiert und wieder in der ursprünglichen Konzentration in *millipore* H<sub>2</sub>O gelöst. Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Markierungsexperimente je 10 µL Probe mit 1000 Äquivalenten (bezogen auf den Primer) des gewünschten Farbstoffes bei Raumtemperatur für die gewünschte Zeitspanne inkubiert und anschließend mit 10 µL Ladepuffer versetzt. Direkt im Anschluss erfolgte die Auswertung mittels denaturierender PAGE.

Für die duale Markierung mit dem Baustein **28** wurden Primerverlängerungsexperimente in einer Ansatzgröße von 500 µL durchgeführt und anschließend entsalzt, wobei ein Gesamtvolumen von 1 mL enthalten wurde. Diese Verdünnung wurde für die nachfolgenden Markierungsexperimente genutzt. Nach dem ersten Markierungsschritt wurden die Proben erneut entsalzt, lyophilisiert und in der ursprünglichen Konzentration aufgenommen bevor der zweite Markierungsschritt durchgeführt wurde.

Triphosphate wurden in *millipore* H<sub>2</sub>O gelöst und mit je 1 Äquivalent des entsprechenden Reaktionspartners bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis des jeweiligen Triphosphat-Farbstoff-Konjugats erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Für die Markierung von PCR-Produkten wurden diese in einer Ansatzgröße von 100 µL hergestellt, entsalzt, lyophilisiert und entsprechend der ursprünglichen Konzentration in *millipore* H<sub>2</sub>O aufgenommen. Für die bioorthogonale Markierung wurden 10 µL Probe mit 10 Äquivalenten (bezogen auf die maximal eingebaute Anzahl an Triazinmodifikationen) des BCN-Rhodamins **15** für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 10 µL Ladepuffer versetzt und mittels denaturierender PAGE analysiert.

### **Bestimmung der Markierungsausbeuten**

Für die Bestimmung der Markierungsausbeuten wurde mit Hilfe des Programms *AIDA Image Analyzer v.450* der Firma *Raytest* die Fluoreszenzintensitäten der Edukt- und Produktbanden ermittelt. Die angegebenen Ausbeuten entsprechen dabei dem relativen Verhältnis der Integralfläche der Produktbande zur Summe der Integralfläche aller Fluorescein- bzw. Cy5-Banden.

### **7.4.2 Photoinduzierte SPAAC an Cycloproponen**

#### **Photolytische Decarboxylierung**

Die Cycloproponone wurden als Stammlösungen entweder in Methanol (**3** und **48**) oder Dichlormethan (**57**) verwendet. Für die Belichtung wurden 1 mL Quarzglasröhrchen verwendet und die Proben für ein definiertes Zeitintervall mit der jeweils angegebenen LED belichtet. Im Anschluss wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um die Reaktion zu verfolgen.

#### **Photoinduzierte SPAAC**

Die jeweiligen Cycloproponone wurden in 1 mL Quarzglasröhrchen durch Belichtung in die jeweiligen Alkine überführt. Im Anschluss wurde Benzylazid (im gleichen Lösungsmittel: Methanol für **3** und **48**, bzw. Dichlormethan für **57**) zugegeben und gemischt. Für verschiedene Äquivalente (10, 100, 1000) wurden unterschiedliche Stammlösungen des Benzylazids verwendet, um das pipettierte Volumen konstant zu halten. Um die Reaktion zu beobachten wurden Absorptionsspektren nach verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen.

#### **Nachweis der entstandenen Produkte**

Für den Nachweis der entstandenen Produkte wurden direkt aus den verwendeten Reaktionsgemischen Proben entnommen. Die jeweils gebildeten Alkine und Triazole wurden mit Hilfe von hochauflösender ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen.

Die jeweils berechneten und gefundenen Massen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** HR-MS (ESI) Daten der Alkine und Triazole, gebildet durch die photoinduzierte SPAAC.

Verbindung	Summenformel	berechnet	gefunden
<b>3a</b>	C <sub>42</sub> H <sub>59</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> Si <sub>2</sub>	790.3919 [M+H] <sup>+</sup>	790.3905 [M+H] <sup>+</sup>
<b>3b</b>	C <sub>49</sub> H <sub>66</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> Si <sub>2</sub>	923.4559 [M+H] <sup>+</sup>	923.4545 [M+H] <sup>+</sup>
<b>48a</b>	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> Si	365.1937 [M+H] <sup>+</sup>	365.1923 [M+H] <sup>+</sup>
<b>48b</b>	C <sub>30</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Si	498.2577 [M+H] <sup>+</sup>	498.2566 [M+H] <sup>+</sup>
<b>57a</b>	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> Si	455.2254 [M+H] <sup>+</sup>	454.2168 [M+H] <sup>+</sup>
<b>57b</b>	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Si	588.2894 [M+H] <sup>+</sup>	588.2887 [M+H] <sup>+</sup>

## 7.5 Zellexperimente

*HeLa*-Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, high glucose, Gibco), angereichert mit 10 % fötalem Kalbserum und Penicillin/Streptomycin (1U/mL), kultiviert und bei 37 °C unter 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert.

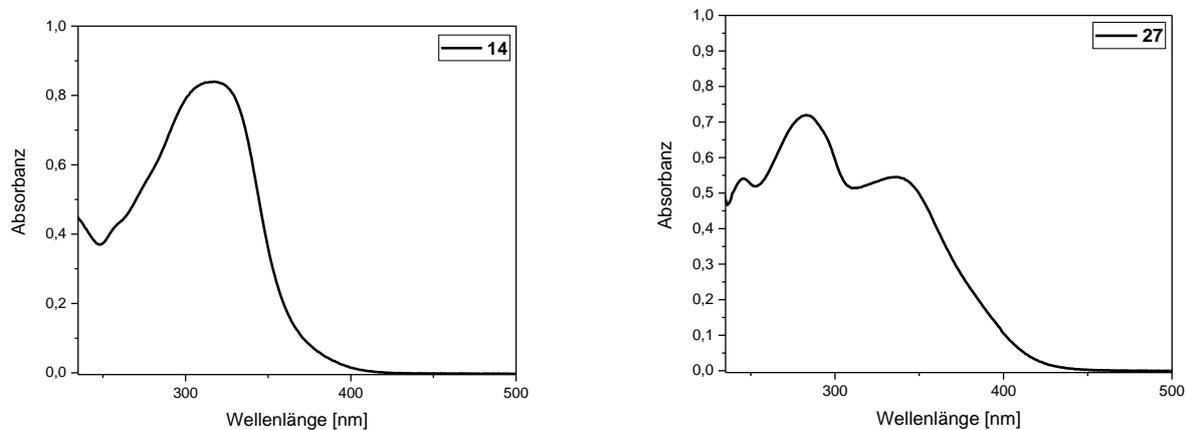
Die für die Transfektionsexperimente verwendete DNA wurde nach den Markierungsschritten nochmals doppelt entsalzt, um möglichst viel ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Transfektion wurde entsprechend einem von *ScreenFect*<sup>®</sup> bereitgestellten Transfektionsprotokoll durchgeführt. Dafür wurden 150 ng der markierten DNA mit 0.85 µL *ScreenFect*<sup>®</sup> versetzt, mit dem zugehörigen Verdünnungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 40 µL verdünnt und für die Bildung der Lipoplexe 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 x 10<sup>4</sup> (pro 200 µL) trypsinierte und resuspendierte *HeLa*-Zellen zu den Lipoplexen zugegeben und in 8-Well Zellkultur-Objektträger (*Ibidi*, µ-slide 8 well) überführt. Nach 24 h wurde die Transfektion durch dreimaliges Waschen der Zellen mit DMEM beendet.

Die Visualisierung wurde mit einem Konfokalmikroskop (*DMI400*) der Firma *Leica* mit einem *ACS APO 40x/1.15 OIL* Objektiv durchgeführt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit der *Leica Application Suite X (LAS X)* Software in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln und einer Tiefe von 8 Bit aufgenommen. Die Anregung des BODIPY-Fluorophors erfolgte mit einem

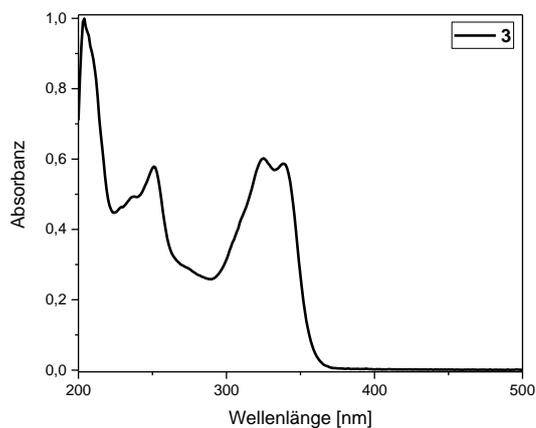
Argon-Laser bei 488 nm, die des Rhodamin-Fluorophors mit einem *DPSS*-Laser bei 532 nm. Die BODIPY-Emission wurde in einem Wellenlängenbereich von 502 – 522 nm, die des Rhodamins zwischen 560 und 580 nm aufgenommen.

## 7.6 Anhang

### 7.6.1 Absorptionsspektren der Nucleoside



**Abbildung A1:** Absorptionsspektren der triazinmodifizierten Nucleoside **14** und **27** in Wasser + 1 % DMSO.



**Abbildung A2:** Absorptionsspektrum des cyclopropenonmodifizierten Nucleosids **3** in Methanol.

### 7.6.2 Ergänzende massenspektrometrische Analysen

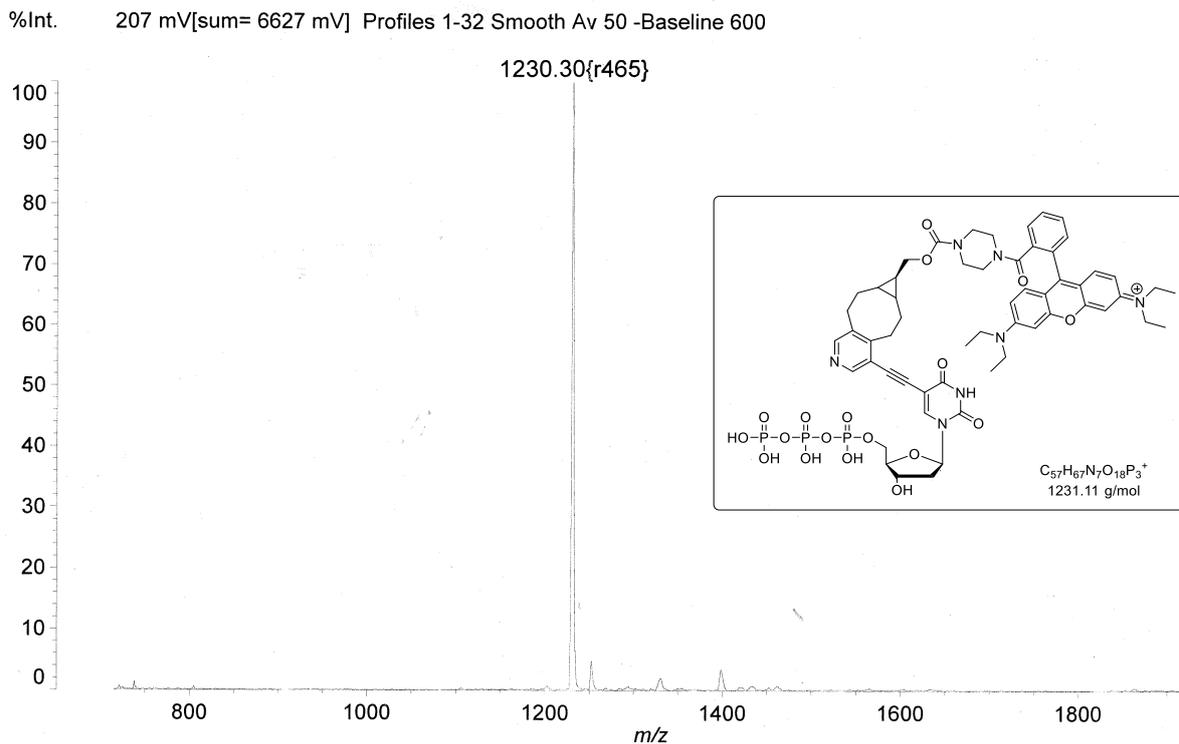


Abbildung A3: MALDI-TOF Spektrum von **1**, markiert mit **15** (Rh-dUTP **1**<sup>Rh</sup>):  $m/z = 1230.30$  [M-H]<sup>-</sup>.

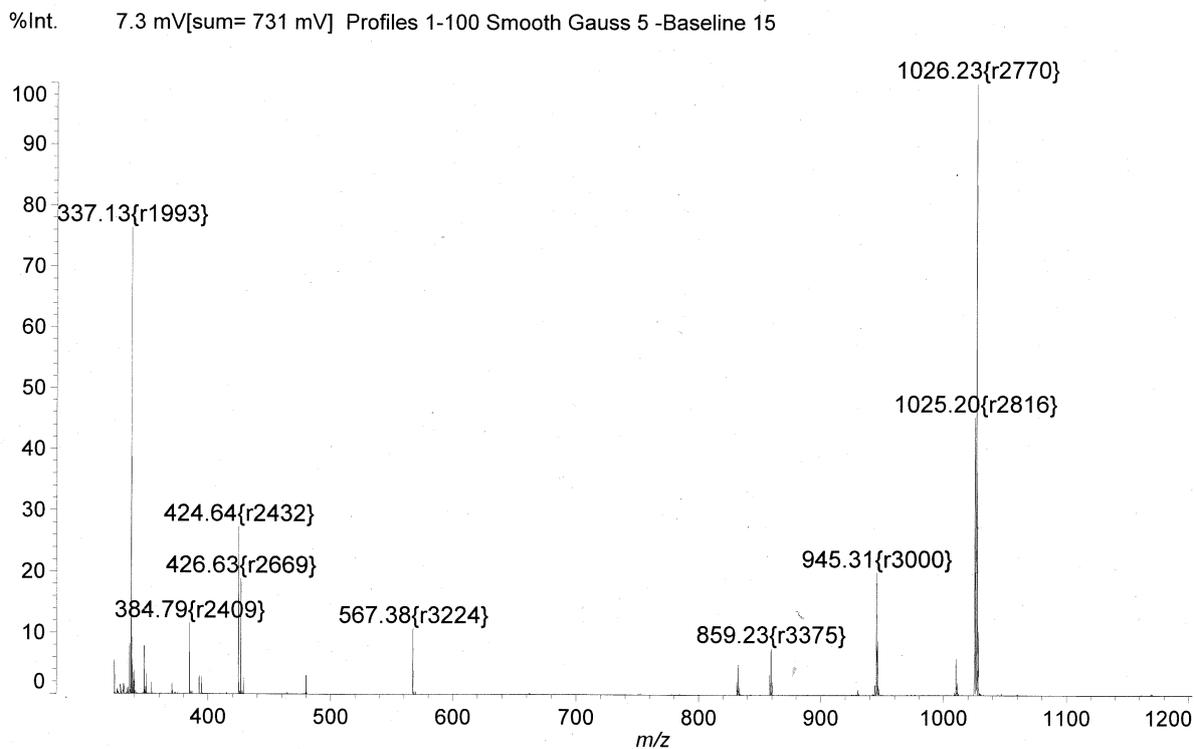
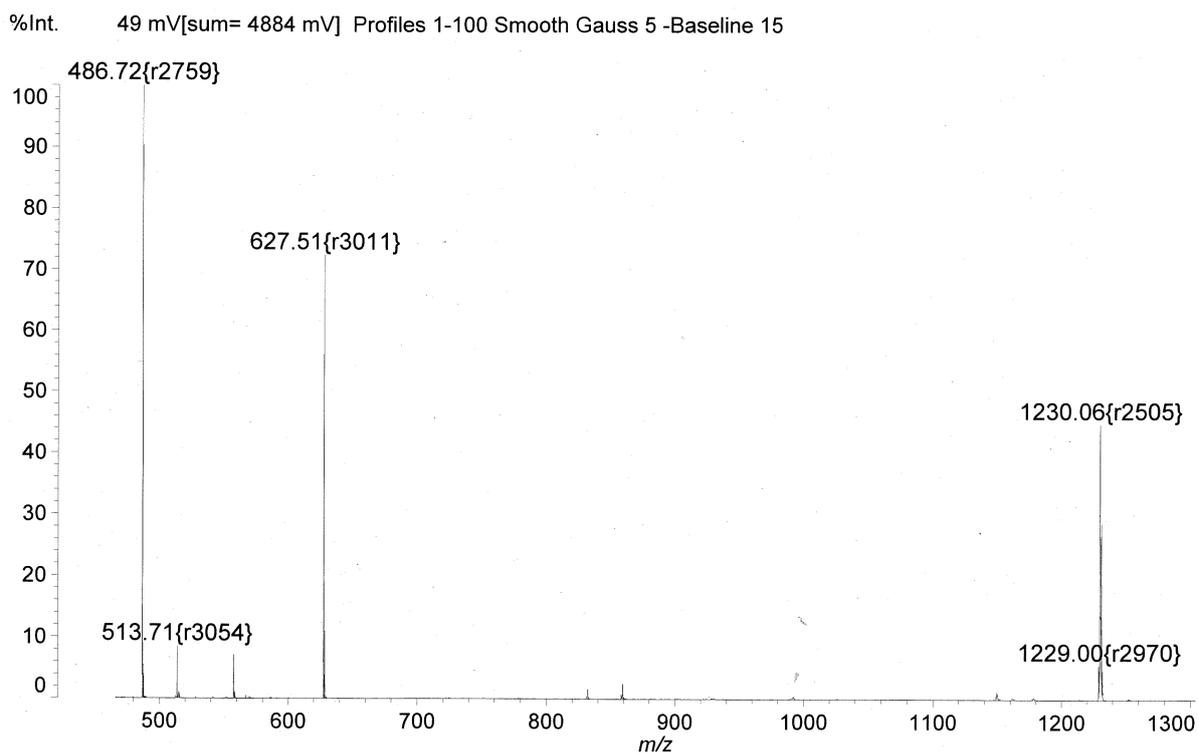
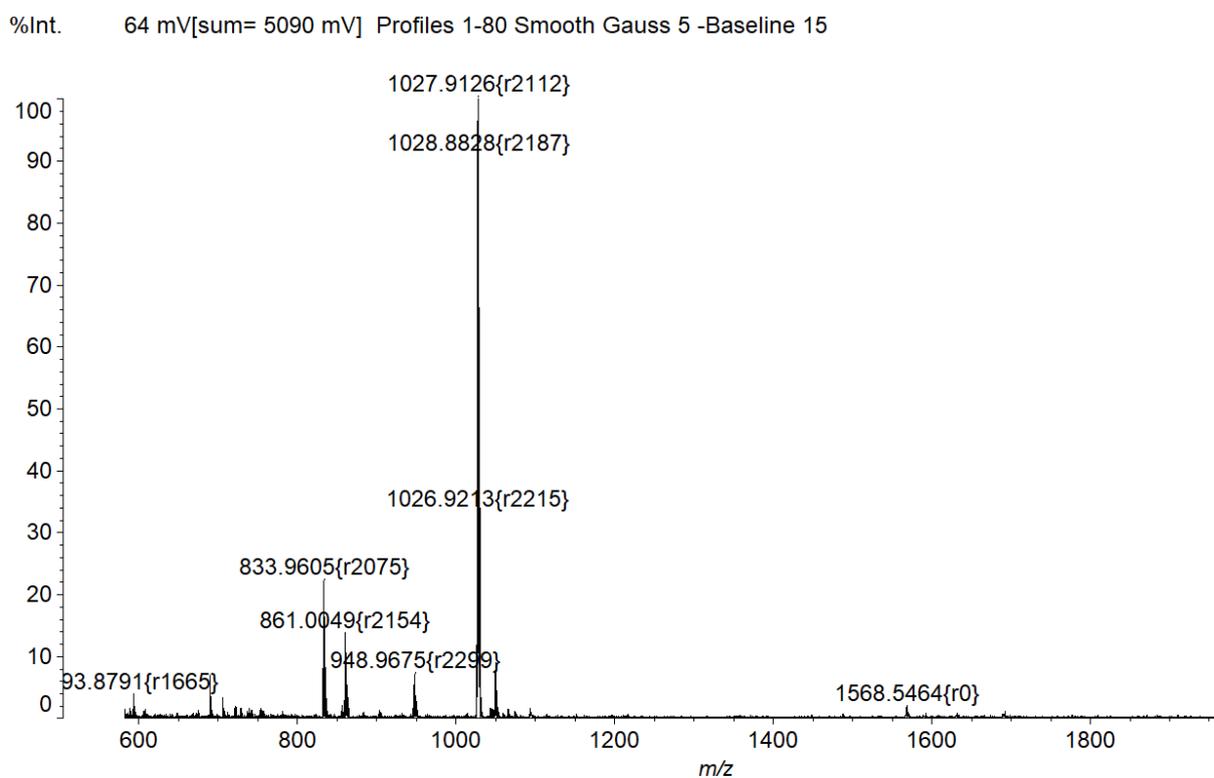


Abbildung A4: MALDI-TOF-Spektrum von TCO-CF640R **17**.  $m/z = 1026.23$  [M+H]<sup>+</sup>.

## Experimententeil

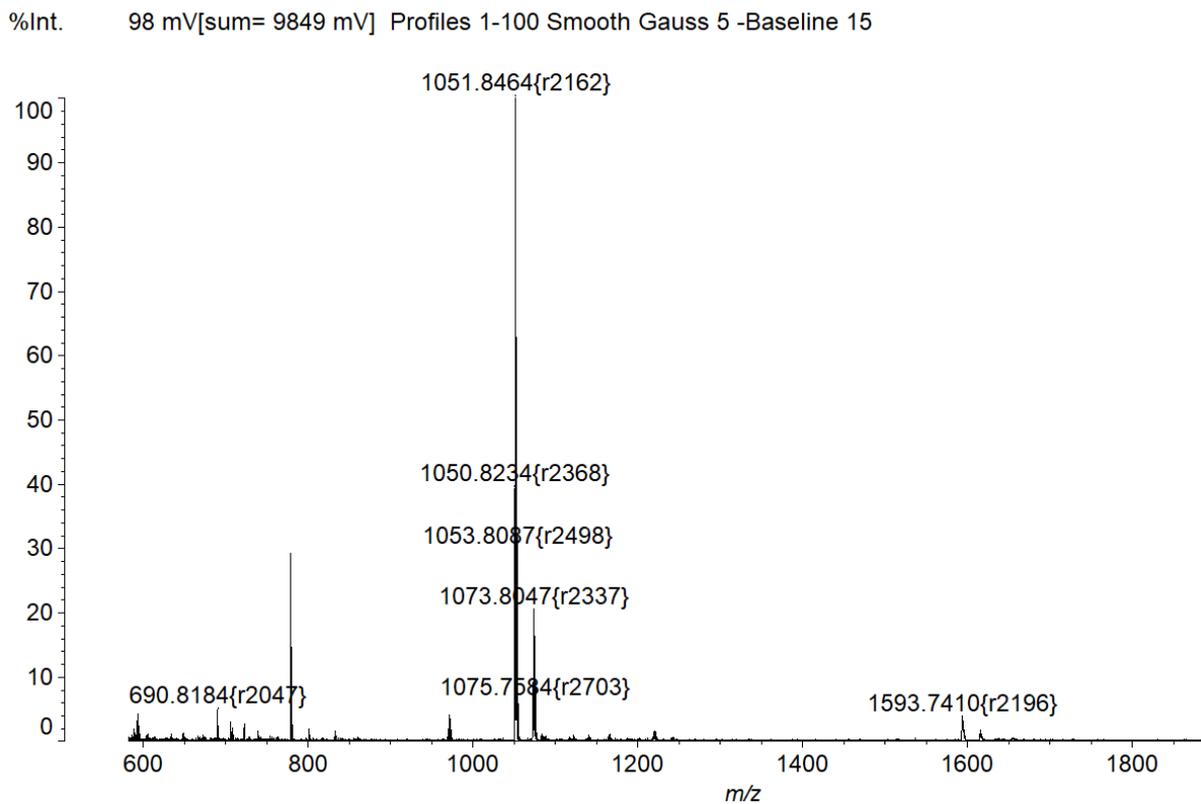


**Abbildung A5:** MALDI-TOF-Spektrum der Konjugation zwischen **17** und 3,6-Diphenyl-1,2,4,5-tetrazin. Oxidiertes Konjugationsprodukt:  $m/z = 1230.06$   $[M+H]^+$ .

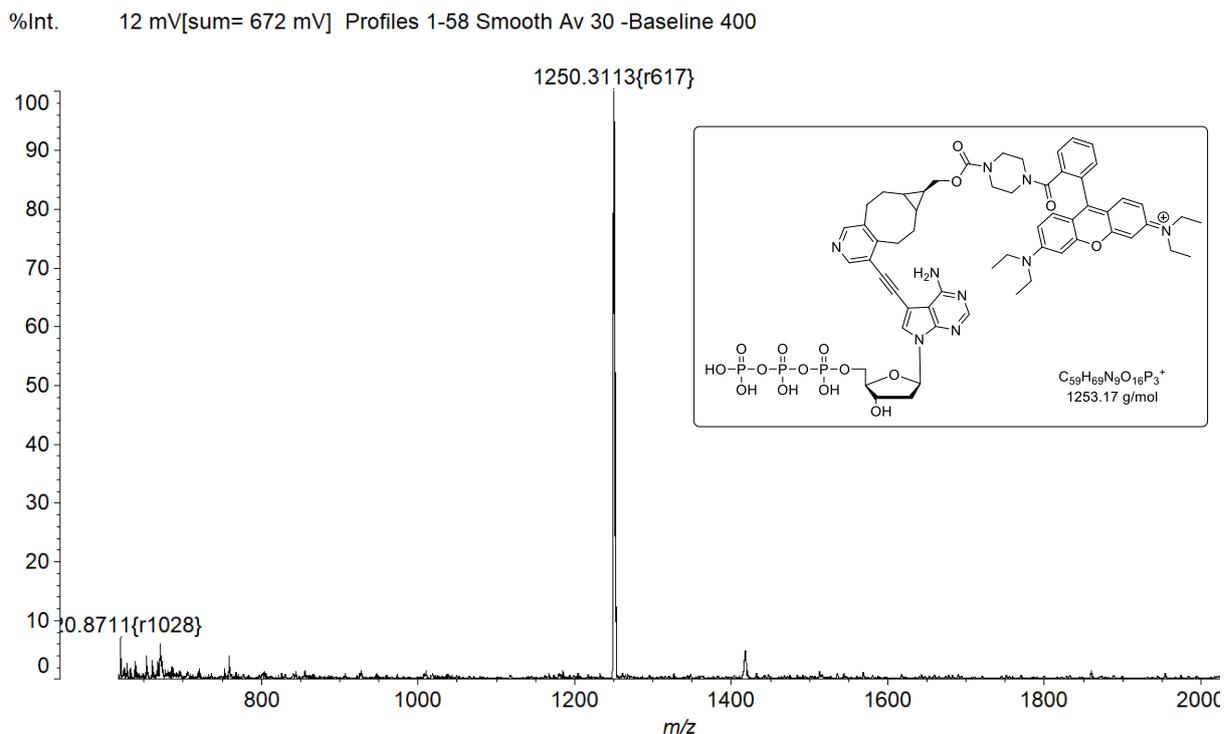


**Abbildung A6:** MALDI-TOF-Spektrum der versuchten Konjugation zwischen **1** und **17**.  $m/z = 1027.91$  entspricht dem freien Farbstoff **17**,  $m/z = 1568.55$  entspricht dem Konjugat.

## Experimentaltteil

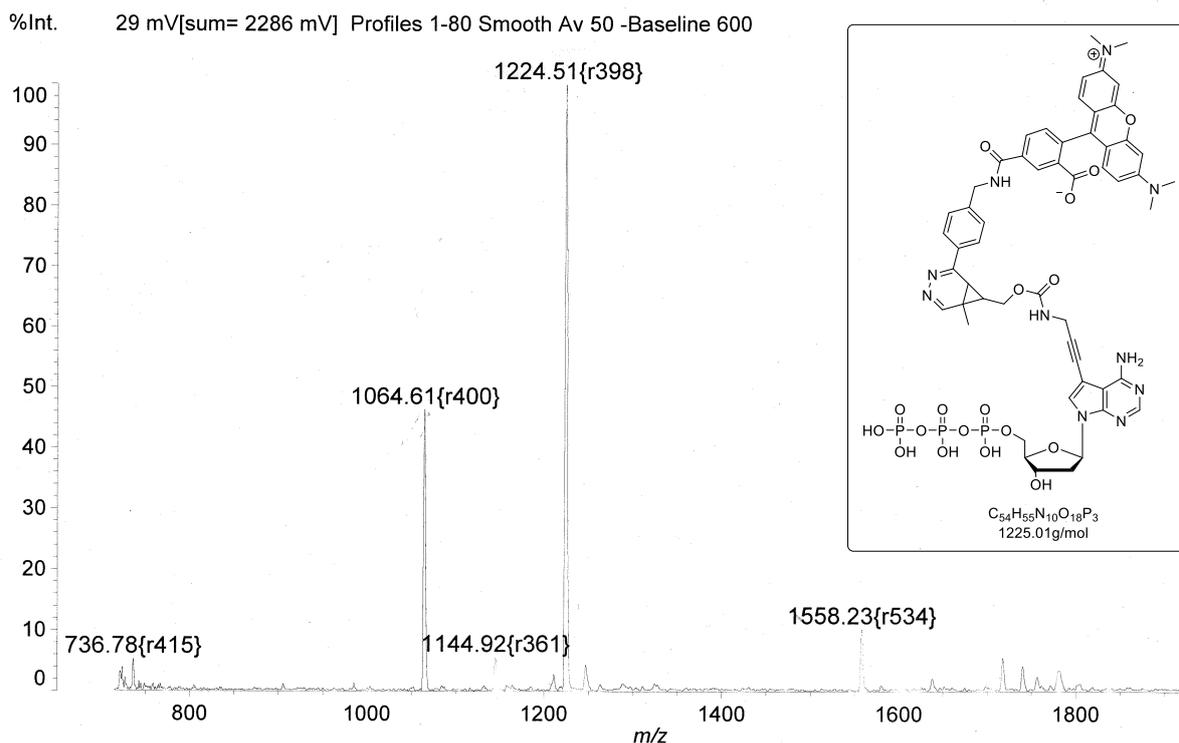


**Abbildung A7:** MALDI-TOF-Spektrum der versuchten Konjugation zwischen **1** und **18**.  $m/z = 1051.85$  entspricht dem freien Farbstoff **18**,  $m/z = 1593.74$  entspricht dem Konjugat.

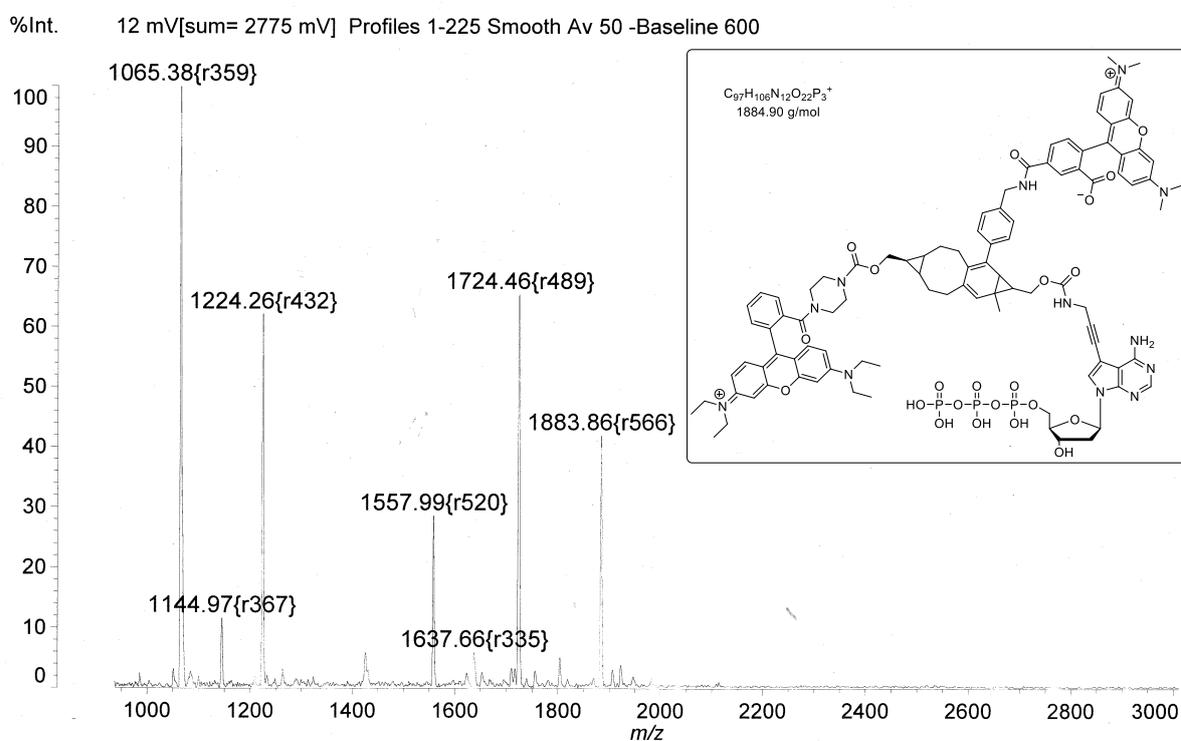


**Abbildung A8:** MALDI-TOF Spektrum von **2**, markiert mit **15** (Rh-dATP **2<sup>Rh</sup>**):  $m/z = 1250.31$  [M-4H].

## Experimentaltteil

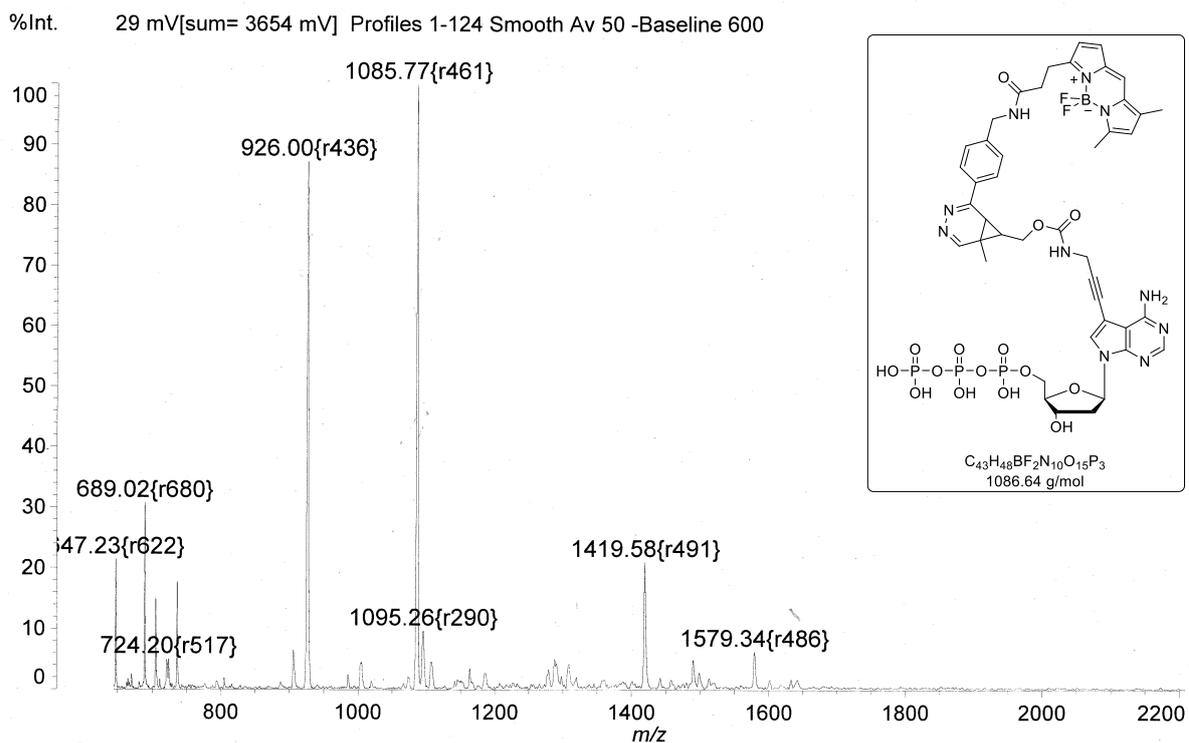


**Abbildung A9:** MALDI-TOF Spektrum von **28**, markiert mit **29** (TAMRA-dATP):  $m/z = 1224.51$  [M-H].  
 $m/z = 1064.61$  entspricht dem konjugierten Monophosphat (TAMRA-dAMP) [M-H].



**Abbildung A10:** MALDI-TOF Spektrum von **28**, markiert mit **29** und **15** (TAMRA-Rh-dATP):  $m/z = 1883.86$  [M-H].  
 $m/z = 1724.46$  entspricht dem konjugierten Monophosphat (TAMRA-Rh-dAMP) [M-H].

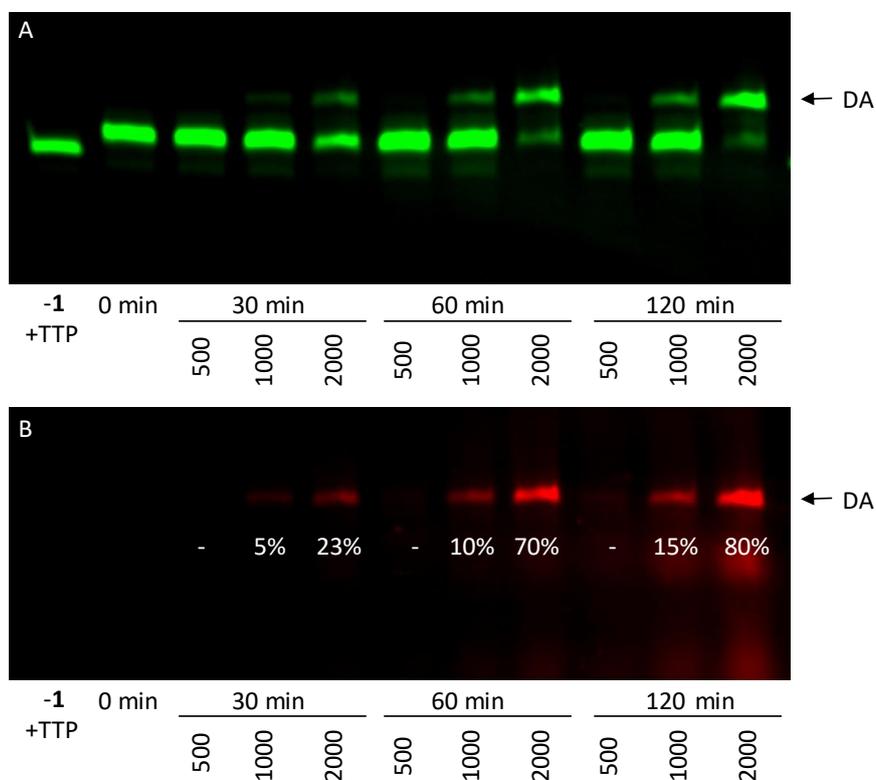
## Experimentaltteil



**Abbildung A11:** MALDI-TOF Spektrum von **28**, markiert mit **30** (BODIPY-dATP):  $m/z = 1085.77$  [M-H]<sup>-</sup>.  $m/z = 926.00$  entspricht dem konjugierten Monophosphat (BODIPY-dAMP) [M-H]<sup>-</sup>.

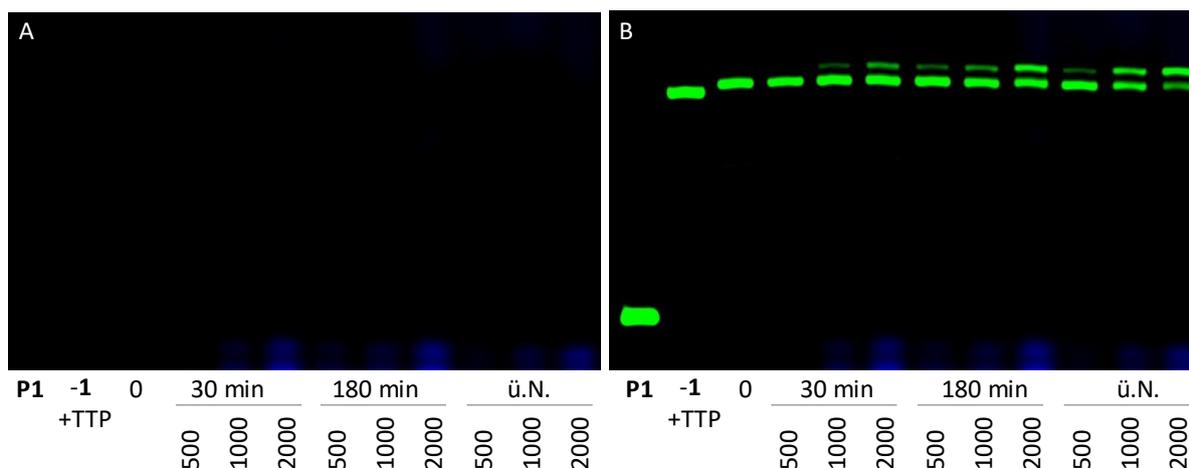
### 7.6.3 Ergänzende PAGE-Analysen

#### Markierungsexperimente mit Baustein 1 ohne Entsalzen

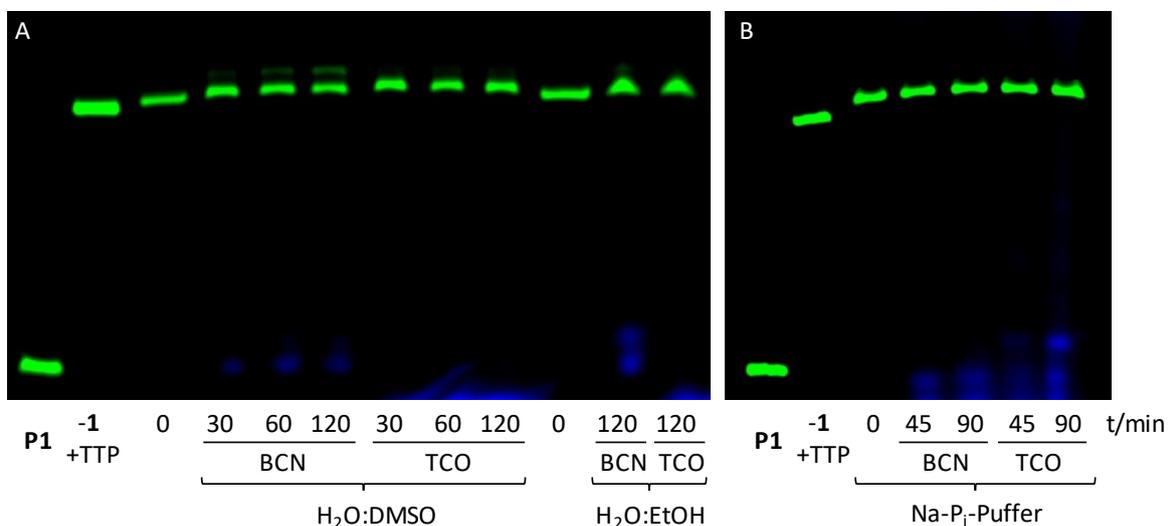


**Abbildung A12:** PAGE Analyse der iEDDA der triazinmodifizierten DNA (**P1/T2**, verlängert mit **1**, dATP, dGTP, dCTP, Vent (exo-) bei 37 °C für 60 min) mit dem BCN-Rhodamin **15** bei Raumtemperatur ohne vorheriges Entsalzen der DNA. Getestet wurden verschiedene Farbstoffäquivalente (500, 1000 und 2000), sowie verschiedene Inkubationszeiten. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollständig verlängerter **P1** (35 Nt). (A) Fluorescein-Kanal:  $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm. (B) Rhodamin-Kanal:  $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm. Die entsprechenden Markierungsausbeuten sind im Rhodamin-Kanal (B) angegeben. Mit 500 Äq konnte kein Diels-Alder-Produkt (DA) detektiert werden.

Markierungsexperimente mit Baustein 1 und TCO-CF640R 17 bzw. BCN-CF640R 18

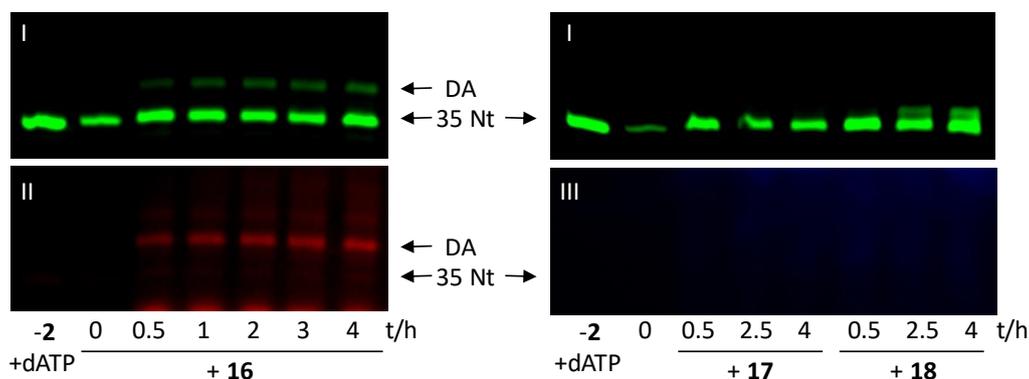


**Abbildung A13:** Denaturierende PAGE-Analyse der Markierungsexperimente der entsalzten triazinmodifizierten DNA (P1/T2, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, verlängert mit 1, dATP, dGTP und dCTP) mit BCN-CF640R 18 bei Raumtemperatur für unterschiedliche Inkubationszeiten mit 500, 1000 und 2000 Äquivalenten des Farbstoffes. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollständig verlängerter P1 (35 Nt). (A) Emission des CF640R-Farbstoffes ( $\lambda_{exc} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$ , blau). (B) Überlagerung mit dem Fluorescein-Kanal ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ , grün); dieser ist in Abbildung 13C in Kapitel 4.1.3 gezeigt.



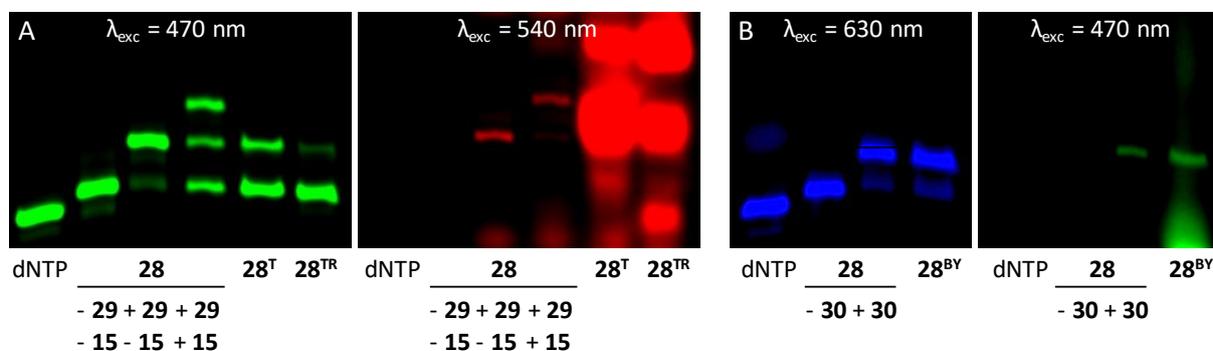
**Abbildung A14:** Denaturierende PAGE-Analyse der Markierungsexperimente der entsalzten triazinmodifizierten DNA (P1/T2, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, verlängert mit 1, dATP, dGTP und dCTP) mit BCN-CF640R 18 und TCO-CF640R 17 (je 1000 Äq) bei Raumtemperatur in H<sub>2</sub>O:DMSO (1:1) bzw. H<sub>2</sub>O:Ethanol (1:1) Lösungsmittel-Gemischen (A) oder Na-P<sub>i</sub>-Puffer (B) für unterschiedliche Inkubationszeiten. „-1/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollständig verlängerter P1 (35 Nt). Gezeigt ist die Überlagerung der Fluorescein- ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ , grün) mit der CF640R-Emission ( $\lambda_{exc} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$ , blau).

## Markierungsexperimente mit Baustein 2 und COMBO-Rhodamin (16), TCO-CF640R (17) und BCN-CF640R (18)

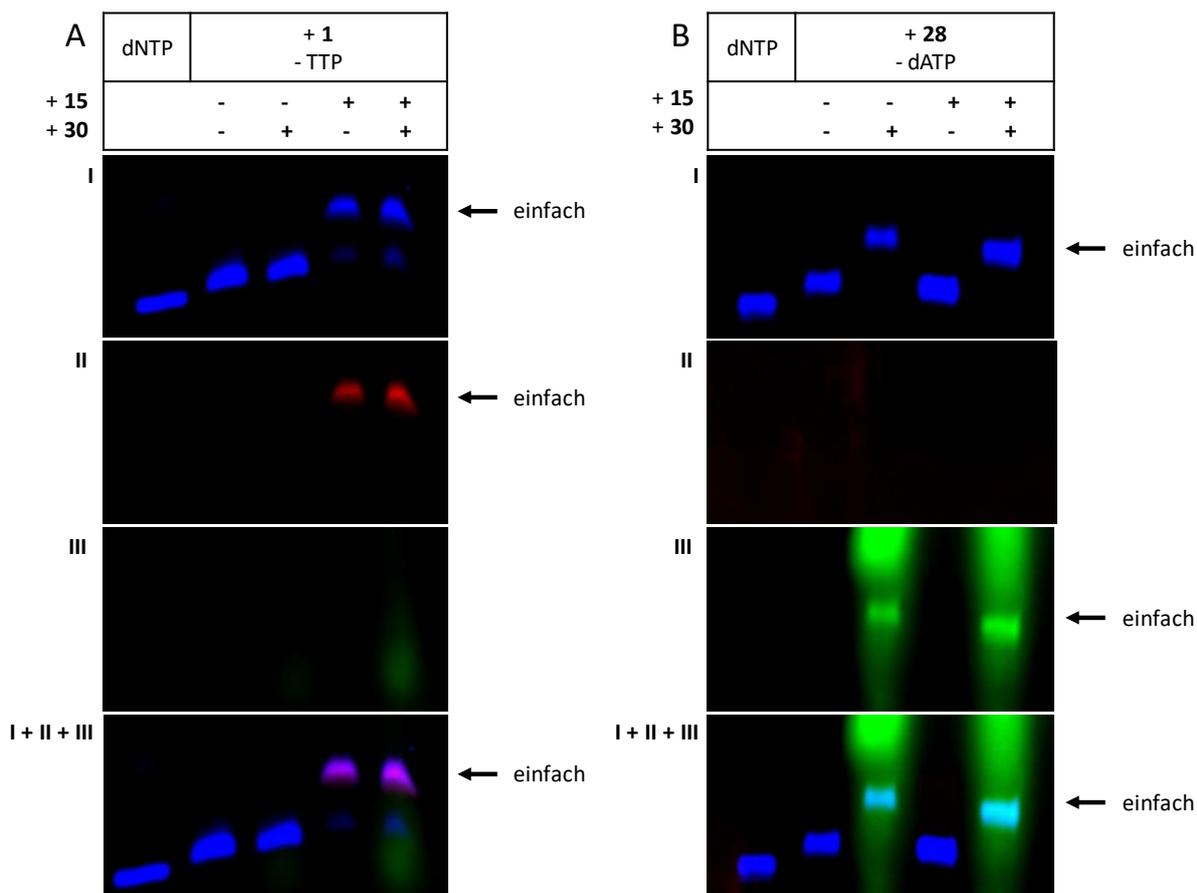


**Abbildung A15:** PAGE-Analyse der Markierungsexperimente der entsalzten triazinmodifizierten DNA (**P1/T7**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, verlängert mit **2**, TTP, dGTP und dCTP) mit den Farbstoffen COMBO-Rhodamin **16**, TCO-CF640R **17** und BCN-CF640R **18** bei Raumtemperatur für verschiedene Zeitintervalle. „-2/+TTP“: mit natürlichen dNTPs vollständig verlängerter **P1** (35 Nt). (I) Fluorescein-Emission ( $\lambda_{exc} = 470$  nm,  $\lambda_{em} = 540$  nm), (II) Rhodamin-Emission ( $\lambda_{exc} = 540$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm), (III) CF640R-Emission ( $\lambda_{exc} = 630$  nm,  $\lambda_{em} = 700$  nm). Die entsprechenden Überlagerungen sind in Abbildung 18 in Kapitel 4.2.3 dargestellt.

## Ergänzende Markierungsexperimente mit Baustein 28 und 1

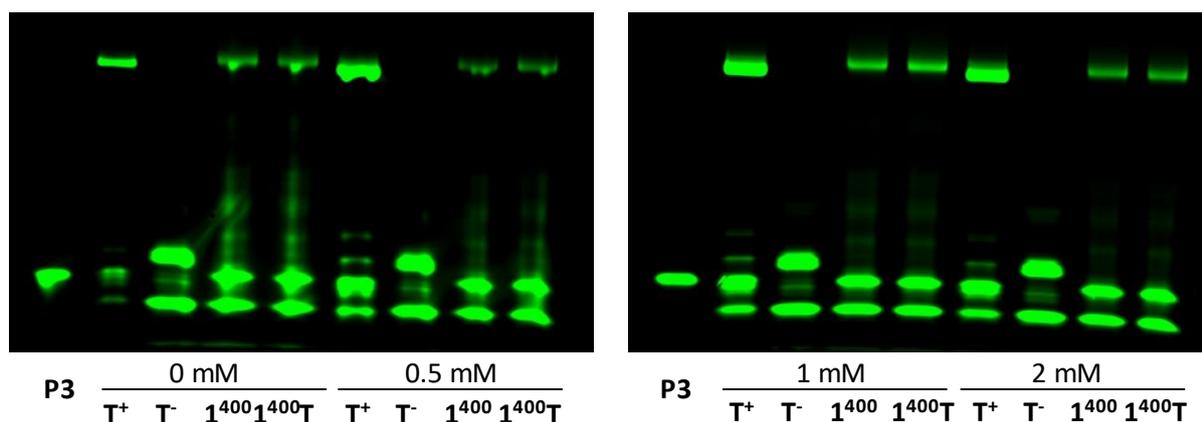


**Abbildung A16:** Vergleich des enzymatischen Einbaus des cyclopropenmodifizierten dATPs **28** (mit anschließender bioorthogonaler Markierung mit den Farbstoffen **29** und **15**, oder **30**) mit dem des vorab konjugierten Triphosphats (**28<sup>T</sup>**: TAMRA-Konjugat, **28<sup>TR</sup>**: TAMRA-Rhodamin-Konjugat, **28<sup>BY</sup>**: BODIPY-Konjugat). „dNTP“: mit natürlichen Triphosphaten vollständig verlängerter Primer. „**28**“: Entsalztes PEX-Produkt für die Verlängerung von (A) **P1/T2** oder (B) **P2/T2** (Vent (exo), 37 °C, 30 min, mit TTP, dGTP, dCTP und **28**). „**28<sup>T</sup>/28<sup>TR</sup>**“: PEX-Produkt unter Verwendung von **28<sup>T</sup>** oder **28<sup>TR</sup>**, TTP, dGTP und dCTP (**P1/T2**, KOD XL, 72 °C, 30 min). „**28<sup>BY</sup>**“: PEX-Produkt unter Verwendung von **28<sup>BY</sup>**, TTP, dGTP und dCTP (**P2/T2**, KOD XL, 72 °C, 30 min).



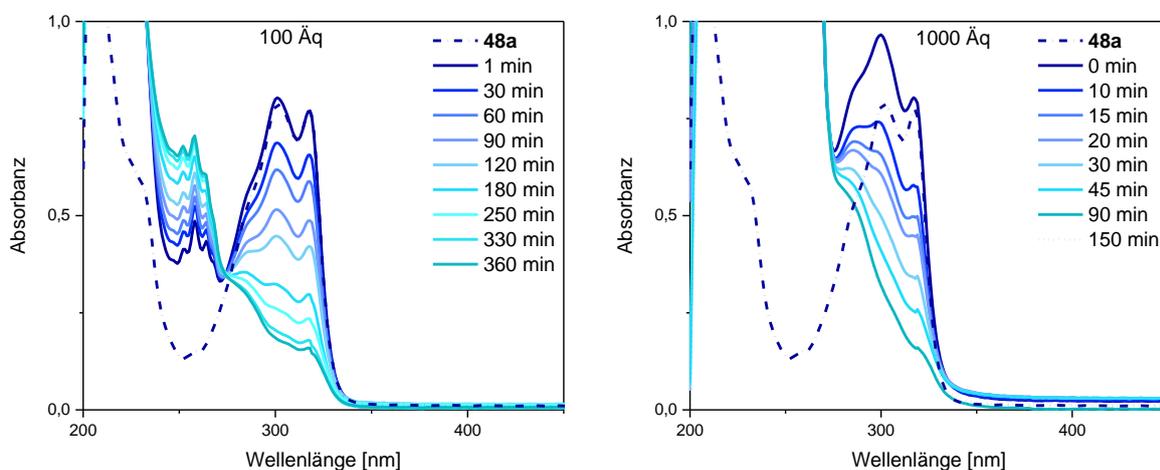
**Abbildung A17:** PAGE-Analyse der bioorthogonalen Markierung einfach modifizierter DNA (**P1/T2**, Vent (exo-), 37 °C, 30 min, mit **1** (A) oder **28** (B) in Kombination mit den restlichen natürlichen Triphosphaten) mit BCN-Rhodamin **15** (30 min Inkubation) und anschließend/oder Tetrazin-BODIPY **30** (15 min Inkubation). „dNTP“: mit natürlichen dNTPs vollständig verlängerter **P2**. (I) Cy5:  $\lambda_{exc} = 630 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 700 \text{ nm}$ ; (II) Rhodamin:  $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$ ; (III) BODIPY:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ . Bei Überlagerung der Kanäle entstehen gemischte Farben, wenn verschiedene Signale vorhanden sind: magenta für Cy5 (blau) + Rhodamin (rot); cyan für Cy5 (blaub) + BODIPY (grün). Das entsprechende Markierungsexperiment mit der doppelt modifizierten DNA kann Abbildung 26 (Kapitel 4.3) entnommen werden.

Ergänzende PAGE-Analysen der PCR-Experimente

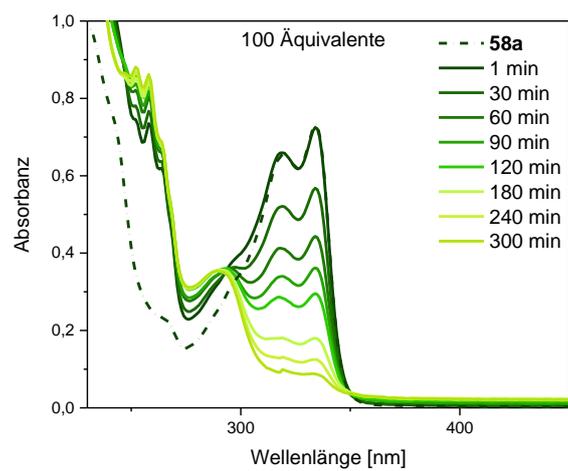


**Abbildung A 18:** PAGE-Analyse der PCR-Experimente (**P3/P4/T8**, KOD XL, 30 Zyklen: 3 min 95 °C, 1 min 53 °C, 3 min 72 °C) unter Zusatz unterschiedlicher MgSO<sub>4</sub>-Konzentrationen. Gezeigt ist die Fluorescein-Emission:  $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ . Für die Zusammensetzung der verschiedenen Triphosphatmischungen siehe Tabelle 11 (Kapitel 7.3.2).

7.6.4 Weiterführende Absorptionsspektren



**Abbildung A19:** Untersuchungen der Absorption im Verlauf der Reaktion von **48a** mit Benzylazid (100 bzw. 1000 Äquivalente); aufgenommen in Methanol.



**Abbildung A20:** Zeitlicher Verlauf der SPAAC zwischen **58a** und Benzylazid (1000 Äquivalente); aufgenommen in Dichlormethan.



## 8. Literaturverzeichnis

- [1] James Watson - Banquet speech  
<<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/watson/speech/>>,
- [2] R. Dahm, *Dev. Biol.* **2005**, 278, 274-288.
- [3] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.
- [4] A. D. Hershey, M. Chase, *J. Gen. Physiol.* **1952**, 36, 39-56.
- [5] R. Y. Tsien, *Ann. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544.
- [6] R. Y. Tsien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5612-5626.
- [7] C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 651-653.
- [8] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13-21.
- [9] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974-6998.
- [10] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1589-1600.
- [11] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 16-20.
- [12] G. Ben-Nissan, M. Sharon, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3627-3637.
- [13] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 592-605.
- [14] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.
- [15] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
- [16] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [17] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [18] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17993-18001.
- [19] L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, 21, 1393.
- [20] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350-8358.
- [21] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1541-1553.
- [22] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1912-1916.
- [23] M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6511-6526.
- [24] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8051-8056.

- [25] P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams, *Chem. Commun.* **2008**, 2459-2461.
- [26] V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8150-8151.
- [27] E. G. Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154-6162.
- [28] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125-1128.
- [29] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.
- [30] M. F. Debets, J. C. M. v. Hest, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6439-6455.
- [31] I. Chen, M. Howarth, W. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 99.
- [32] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [33] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 619-635.
- [34] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.
- [35] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877.
- [36] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [37] O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1928**, *460*, 98-122.
- [38] R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [39] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646-9649.
- [40] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1736-1738.
- [41] A.-C. Knall, M. Hollauf, C. Slugovc, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4763-4766.
- [42] D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H.-W. Shih, K. N. Houk, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13680-13683.
- [43] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [44] K. Gutmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405-2408.
- [45] A. M. Pyka, C. Domnick, F. Braun, S. Kath-Schorr, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1438-1443.
- [46] J. Schoch, A. Jäschke, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 4181-4183.
- [47] C. Domnick, F. Eggert, S. Kath-Schorr, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8253-8256.
- [48] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8846-8847.
- [49] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638-18643.
- [50] J. Yang, J. Šečkutè, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476-7479.

- [51] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [52] J. Šečkutě, J. Yang, N. K. Devaraj, *Nucl. Acids Res.* **2013**, *41*, e148-e148.
- [53] D. Ploschik, F. Rönicke, H. Beike, R. Strasser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1949-1953.
- [54] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538.
- [55] F. Eggert, S. Kath-Schorr, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7284-7287.
- [56] 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.
- [57] S. Ameta, J. Becker, A. Jäschke, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4701-4707.
- [58] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422-9425.
- [59] F. Thalhammer, U. Wallfahrer, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851-6854.
- [60] M. Royzen, G. P. A. Yap, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3760-3761.
- [61] D. Svatunek, C. Denk, V. Rosecker, B. Sohr, C. Hametner, G. Allmaier, J. Fröhlich, H. Mikula, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2016**, *147*, 579-585.
- [62] A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, J. M. Fox, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770-3776.
- [63] I. Nikić, T. Plass, O. Schraidt, J. Szymański, J. A. G. Briggs, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2245-2249.
- [64] R. D. Row, J. A. Prescher, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1073-1081.
- [65] P. N. Asare-Okai, E. Agustin, D. Fabris, M. Royzen, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7844-7847.
- [66] X. Ren, A. El-Sagheer, T. Brown, *Analyst* **2015**, *140*, 2671-2678.
- [67] K. Wang, D. Wang, K. Ji, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, B. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 909-915.
- [68] G. B. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Synthesis* **2015**, *47*, 2738-2744.
- [69] H. Wu, B. T. Cisneros, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17942-17945.
- [70] A. Nadler, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408-2410.
- [71] S. J. Siegl, J. Galeta, R. Dzijak, A. Vázquez, M. Del Río-Villanueva, M. Dračínský, M. Vrabel, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 886-890.
- [72] S. J. Siegl, A. Vázquez, R. Dzijak, M. Dračínský, J. Galeta, R. Rampmaier, B. Klepetářová, M. Vrabel, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 2426-2432.
- [73] A. Vázquez, R. Dzijak, M. Dračínský, R. Rampmaier, S. J. Siegl, M. Vrabel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1334-1337.

- [74] A. Wieczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506-1510.
- [75] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [76] J. Yang, Y. Liang, J. Šečkutė, K. N. Houk, N. K. Devaraj, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3365-3375.
- [77] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [78] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298.
- [79] D. Wang, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, K. Wang, B. Ke, B. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3950-3955.
- [80] EP1867638A1, 2007.
- [81] D. N. Kamber, Y. Liang, R. J. Blizzard, F. Liu, R. A. Mehl, K. N. Houk, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8388-8391.
- [82] K. A. Horner, N. M. Valette, M. E. Webb, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 14376-14381.
- [83] K. Peewasan, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1473-1476.
- [84] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [85] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [86] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Vib. Spectrosc* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [87] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [88] E. M. Sletten, H. Nakamura, J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799-11805.
- [89] B. R. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, S. Béni, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 822-828.
- [90] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- [91] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- [92] G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443-2447.
- [93] Chelsea G. Gordon, C. R. Bertozzi, in *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*, **2017**.
- [94] F. Friscourt, C. J. Fahrni, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809-18815.
- [95] F. Friscourt, C. J. Fahrni, G. J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 13996-14001.
- [96] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16.
- [97] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188-5240.
- [98] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789-793.
- [99] J. M. Holstein, D. Schulz, A. Rentmeister, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4478-4481.

- [100] X. Ren, M. Gerowska, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4384-4390.
- [101] M. Shelbourne, T. Brown, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11184-11186.
- [102] Á. Eördögh, J. Steinmeyer, K. Peewasan, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 457-464.
- [103] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60-70.
- [104] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3725-3728.
- [105] C. P. Ramil, Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 89-95.
- [106] S. Arndt, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14580-14582.
- [107] B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7579-7582.
- [108] J. Li, L. Huang, X. Xiao, Y. Chen, X. Wang, Z. Zhou, C. Zhang, Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15943-15949.
- [109] J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1362-1369.
- [110] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832-2835.
- [111] S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang, T. Luo, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702-4705.
- [112] Y. Zhang, W. Liu, Z. K. Zhao, *Molecules* **2014**, *19*, 306-315.
- [113] A. Padwa, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 371-378.
- [114] J. O. Mueller, F. G. Schmidt, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10284-10288.
- [115] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7993-7995.
- [116] R. Kumar, L. I. Wiebe, E. E. Knaus, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 1609-1615.
- [117] K. Rakesh, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2749-2766.
- [118] A. Poloukhtine, V. V. Popik, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7833-7840.
- [119] N. K. Urdabayev, A. Poloukhtine, V. V. Popik, *Chem. Commun.* **2006**, 454-456.
- [120] A. A. Poloukhtine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.
- [121] D. A. Sutton, V. V. Popik, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 8850-8857.
- [122] S. Arumugam, V. V. Popik, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2702-2708.
- [123] D. A. Sutton, S.-H. Yu, R. Steet, V. V. Popik, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 553-556.
- [124] S. Nainar, M. Kubota, C. McNitt, C. Tran, V. V. Popik, R. C. Spitale, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8090-8093.
- [125] C. D. McNitt, H. Cheng, S. Ullrich, V. V. Popik, M. Bjercknes, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14029-14032.

- [126] G. d. Almeida, L. C. Townsend, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3038-3041.
- [127] M. Martínek, L. Filipová, J. Galeta, L. Ludvíková, P. Klán, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4892-4895.
- [128] C. D. McNitt, V. V. Popik, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8200-8202.
- [129] J. Sági, A. Szemző, K. Ébinger, A. Szabolcs, G. Sági, É. Ruff, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2191-2194.
- [130] N. Müller, G. Eisenbrand, *Chemico-Biological Interactions* **1985**, *53*, 173-181.
- [131] F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3233-3240.
- [132] F. Seela, G. Becher, *Synthesis* **1998**, *1998*, 207-214.
- [133] F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1781-1790.
- [134] S. N. Rao, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3048-3053.
- [135] S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071-15082.
- [136] D. M. Perrin, T. Garestier, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1556-1563.
- [137] C. Lam, C. Hipolito, D. M. Perrin, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 4915-4923.
- [138] H. Cahová, R. Pohl, L. Bednárová, K. Nováková, J. Cvačka, M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3657-3660.
- [139] P. Čapek, H. Cahová, R. Pohl, M. Hocek, C. Gloeckner, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6196-6203.
- [140] J. Matyašovský, P. Perlíková, V. Malnuit, R. Pohl, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15856-15859.
- [141] A. Marx, M. P. MacWilliams, T. A. Bickle, U. Schwitter, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1131-1132.
- [142] T. Chen, N. Hongdilokkul, Z. Liu, R. Adhikary, S. S. Tsuen, F. E. Romesberg, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 556.
- [143] J. Matyašovský, R. Pohl, M. Hocek, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 14938-14941.
- [144] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [145] T. Ohbayashi, M. Kuwahara, M. Hasegawa, T. Kasamatsu, T. Tamura, H. Sawai, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2463-2468.
- [146] M. Welter, D. Verga, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10131-10135.
- [147] A. Hottin, A. Marx, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418-427.
- [148] H. M. Kropp, K. Diederichs, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 5457-5461.
- [149] E. E. Vail, L. I. Kirilova, W. M. Barnes, M. B. Kermekchiev, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, e40-e40.
- [150] H. Kong, R. B. Kucera, W. E. Jack, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1965-1975.
- [151] [http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/KOD-XL-DNA-Polymerase,EMD\\_BIO-71087#documentation](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/KOD-XL-DNA-Polymerase,EMD_BIO-71087#documentation), abgerufen am 12.04.2019

- [152] P. Cano-Soldado, M. Pastor-Anglada, *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 428-457.
- [153] N. Huynh, C. Dickson, D. Zencak, D. H. Hilko, A. Mackay-Sim, S.-A. Poulsen, *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 400-409.
- [154] L.-L. Huang, K. Liu, Q. Zhang, J. Xu, D. Zhao, H. Zhu, H.-Y. Xie, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11620-11627.
- [155] C. Meier, *Antivir. Chem. Chemother.* **2017**, *25*, 69-82.
- [156] US2016251361, 2016.
- [157] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068.
- [158] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133.
- [159] B. Lehmann, *Nukleosidische Diarylthetrazole zur lichtinduzierten und fluorogenen Markierung von DNA*, Karlsruher Institut für Technologie **2018**.
- [160] M. Quintiliani, J. Balzarini, C. McGuigan, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 9111-9119.
- [161] I. Dhimitruka, J. SantaLucia Jr, *Synlett* **2004**, *2004*, 0335-0337.
- [162] T.-M. Chin, L.-K. Huang, L.-S. Kan, *J. Chin. Chem. Soc.* **1997**, *44*, 413-416.
- [163] F. Seela, B. Westermann, U. Bindig, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 697-702.
- [164] F. Seela, M. Zulauf, *Synthesis* **1996**, *1996*, 726-730.
- [165] J. Steinmeyer, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 431-436.
- [166] P. Kielkowski, H. Macíčková-Cahová, R. Pohl, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8727-8730.
- [167] H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederweiser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827-10829.
- [168] A. Y. Kobitski, A. Nierth, M. Helm, A. Jäschke, G. U. Nienhaus, *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 2047-2059.
- [169] X. Zhuang, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 399-414.
- [170] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymański, R. Mueller, M. Wießler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166-4170.
- [171] K. Gutsmedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6877-6883.
- [172] P. M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [173] M.-L. Winz, E. C. Linder, J. Becker, A. Jäschke, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11781-11784.
- [174] D. Ploschik, *Ph.D. thesis*, (Karlsruher Institut für Technologie (KIT)), **2018**.
- [175] A. Coutinho, L. M. S. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4726-4736.
- [176] M. Merzlyakov, K. Hristova, *Chapter 6 Forster Resonance Energy Transfer Measurements of Transmembrane Helix Dimerization Energetics*, Vol. 450, **2008**.
- [177] A. Coutinho, L. M. S. Loura, M. Prieto, *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 696-701.

- [178] K. B. Mullis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1209-1213.
- [179] A. Langer, M. Schraml, R. Strasser, H. Daub, T. Myers, D. Heindl, U. Rant, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12066.
- [180] H. Cahová, A. Panattoni, P. Kielkowski, J. Fanfrlík, M. Hocek, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3165-3171.
- [181] A. Panattoni, R. Pohl, M. Hocek, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3962-3965.
- [182] M. Tera, S. M. K. Glasauer, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1939-1943.
- [183] L. Lercher, J. F. McGouran, B. M. Kessler, C. J. Schofield, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10553-10558.
- [184] V. Borsenberger, S. Howorka, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, 1477-1485.
- [185] V. Raindlová, R. Pohl, M. Sanda, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1064-1066.
- [186] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4146-4150.
- [187] R. Breslow, R. Haynie, J. Mirra, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 247-248.
- [188] M. E. Vol'pin, Y. D. Koreshkov, D. N. Kursanov, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **1959**, 506.
- [189] R. Gleiter, M. Merger, *Synthesis* **1995**, 1995, 969-972.
- [190] K. A. Netland, L.-L. Gundersen, F. Rise, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 1767-1777.
- [191] H.-W. Shih, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10036-10039.
- [192] A. S. K. Hashmi, T. Häffner, W. Yang, S. Pankajakshan, S. Schäfer, L. Schultes, F. Rominger, W. Frey, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10480-10486.
- [193] Y. Saito, Y. Shinohara, S. S. Bag, Y. Takeuchi, K. Matsumoto, I. Saito, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 934-939.
- [194] H. Ueda, M. Yamaguchi, H. Kameya, K. Sugimoto, H. Tokuyama, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4948-4951.
- [195] M. Bezagu, C. Errico, V. Chaulot-Talmon, F. Monti, M. Tanter, P. Tabeling, J. Cossy, S. Arseniyadis, O. Couture, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7205-7208.
- [196] P. M. Pelphrey, V. M. Popov, T. M. Joska, J. M. Beierlein, E. S. D. Bolstad, Y. A. Fillingham, D. L. Wright, A. C. Anderson, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 940-950.
- [197] M. E. Jung, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.
- [198] M. E. Jung, A. B. Mossman, M. A. Lyster, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3698-3701.
- [199] H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.
- [200] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [201] S. Meneni, I. Ott, C. D. Sergeant, A. Sniady, R. Gust, R. Dembinski, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3082-3088.
- [202] A. Dierckx, F.-A. Miannay, N. Ben Gaided, S. Preus, M. Björck, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5987-5997.

- [203] A. Arcadi, S. Cacchi, L. Cascia, G. Fabrizi, F. Marinelli, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2501-2504.
- [204] B. Figadere, A. W. Norman, H. L. Henry, H. P. Koeffler, J. Y. Zhou, W. H. Okamura, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2452-2463.



## **9. Appendix**

### **9.1 Publikationen**

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

„Light-induced functions in DNA“

U. Reisacher, L. Antusch, R. Hofsäß, C. Schwechheimer, B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 40, 119 - 126.

„Copper-free dual labeling of DNA by triazines and cyclopropenes as minimal orthogonal *and* bioorthogonal functions“

U. Reisacher, D. Ploschik, F. Rönicke, G. B. Cserép, P. Kele, H.-A. Wagenknecht *Chem. Sci.* **2019**, 10, 4032-4037.

“Triazine-Modified 7-Deaza-2'-deoxyadenosines: Better Suited for Bioorthogonal Labeling of DNA by PCR than 2'-Doxyuridines“

U. Reisacher, B. Groitl, R. Strasser, G. B. Cserép, P. Kele, H.-A. Wagenknecht *Bioconjugate Chem.* **2019**, 30, 6, 1773-1780.

### **9.2 Auszeichnungen und Stipendien**

2015: *PROMOS* Stipendium des DAAD zur Förderung der Masterarbeit an der *Johns Hopkins University (JHU)* in Baltimore, MD, USA

2016 *Rétey-Preis* des Instituts für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) für exzellente Studienleistungen

2016: Reisestipendium der GDCh zur Teilnahme an der Konferenz *Chemical Biology* am EMBL in Heidelberg

- 2017: Reisestipendium der GDCh zur Teilnahme an der Konferenz XVII *Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components* in Český Krumlov, Tschechien
- 2018 *Kongressreisen-Stipendium* des DAAD sowie Reisestipendium der GDCh zur Teilnahme an der Konferenz *XXIII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* in San Diego, CA, USA

### 9.3 Posterbeiträge und Konferenzen

- 08/2016 *Chemical Biology* am EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) in Heidelberg, Posterpräsentation
- 09/2016 *III. Doktorandenseminar* der *Deutschen Nukleinsäuregemeinschaft (DNG)*, Bad Herrenalb, Posterpräsentation
- 06/2017 *XIIIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components* in Český Krumlov, Tschechien, Posterpräsentation
- 09/2017 *VIII. Nukleinsäurechemietreffen* der *Deutschen Nukleinsäuregemeinschaft (DNG)* in Bad Herrenalb, Posterpräsentation
- 08/2018 *XXIIIth International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* in San Diego, CA, USA, Posterpräsentation
- 09/2018 *IV. Doktorandenseminar* der *Deutschen Nukleinsäuregemeinschaft (DNG)*, Bad Herrenalb, Posterpräsentation

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Karlsruhe, den 11.06.2019

---

Ulrike Reisacher