

**SYNTHESE UND ENTWICKLUNG  
FLUORESZENTER ARCHITEKTUREN  
ZUR VISUALISIERUNG VON DNA UND RNA**

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. Larissa Doll**  
aus Bruchsal

**Karlsruhe, 2020**

Dekan:	Prof. Dr. Manfred Wilhelm
Referent:	Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferent:	Prof. Dr. Ute Schepers
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Juli 2020



*Meiner Familie*



*„Zusammenkunft ist ein Anfang,  
Zusammenhalt ein Fortschritt,  
Zusammenarbeit ein Erfolg.“*

*– Henry Ford –*



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2017 bis Juni 2020 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung und die interessante Themenstellung. Ihr Vertrauen in mein selbstständiges Arbeiten hat es mir ermöglicht, zahlreiche Ideen zu entwickeln und umzusetzen. Sie haben mich immer angetrieben, nicht aufzugeben, auch wenn es aussichtslos schien (Azirin). Außerdem bedanke ich mich für ihre stetige Ansprechbarkeit, ihren Einsatz bei manch suspekten Finanzlagen und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Im Speziellen möchte ich mich auch bedanken bei:

- dem *Graduiertenkolleg 2039* (DFG) für die wissenschaftlichen Möglichkeiten sowie das Erlangen von nicht fachlichen Kompetenzen (*Soft Skills*) und die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.
- dem *DAAD* für die finanzielle Unterstützung für einen Konferenzbesuch in San Diego/Kalifornien.
- Prof. Dr. Ute Schepers (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) und ihrem ganzen Arbeitskreis für die gute Zusammenarbeit trotz Einschränkungen in Corona-Zeiten. Danke Dominik, dass du mein Vermittler warst und immer alles organisiert hast.
- Prof. Dr. Ulrich Nienhaus und Dr. Karin Nienhaus (Institut für Angewandte Physik, KIT) für die erfolgreichen Messungen der Fluoreszenzlebenszeiten sowie ihren Mitarbeitern Dr. Mathilde Bichelberger und Jens Lackner für die Durchführung der Experimente, die endlosen Diskussionen und Ideensammlungen sowie die Einführung in eure Aufbauten und Messmethoden.
- Prof. Dr. Uwe Strähle und Dr. Sepand Rastegar (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) für die äußerst interessanten und lehrreichen Meetings und ihren Mitarbeiterinnen Dr. Vanessa Gerber und Luisa Lübke für die Abgebrühtheit, Zebrafische zu sezieren, Gehirne in Schnitte zu schneiden und mit einer Kanüle zu verletzen. Danke Luisa für die vielen schönen und lustigen Gespräche und die schönen Bilder, die bei diesem Projekt entstanden sind.

- Dr. Franziska Rönicke für die Einführung in die Zellkultur und Unterstützung bei der Mikroskopie.
- Annette Hochgesand für das unermüdliche Messen zahlreicher, vor allem RNase-freier Proben, die vielen Bestellungen und das Herumschlagen mit den Vertretern sowie die morgendlichen Gespräche im verlassenen AKW und die Verköstigungen mit Weihnachtsplätzchen, Marmelade und Crêpes.
- Claudia Sommer für ihre positive, lustige Art und „dass ma a mol schwätze kann, wie oim de Schnabl gwachse isch“. Manchmal ist die Welt doch kleiner als man denkt! Danke auch für die Unterstützung in allen organisatorischen Angelegenheiten, ohne die jeder im Arbeitskreis verloren wäre.
- Dr. Andreas Rapp, Dr. Norbert Foitzik, Angelika Mösle, Pia Lang und Tanja Ohmer-Scherrer für die Messung analytischer Proben sowie Richard von Budberg für die schnelle und sorgfältige Reparatur meiner Glasgeräte und die morgendlichen Unterhaltungen.
- Lara Hirsch für die schnelle und oftmals spontane Messung meiner Proben und die zahlreichen Versuche an der LC-MS. Ohne dich wäre das Azirin-Projekt Geschichte.
- Erik Schneider aus dem Arbeitskreis von Dr. Patrick Weis für die Nano-ESI-Messung meines „Azirin-Triphosphats“.
- Sara Müller, Katja Krell, Fabian Lang und Julian Gebhard für das Korrekturlesen meiner Arbeit.
- Daniel, Fabienne und Arthur für das Messen der NMR-Proben am 500 MHz-Spektrometer.
- Meinen Kollegen: Dr. Claudia Stubinitzky, Dr. Sebastian Barrois, Dr. Effi Bätzner, Dr. Peggy Bohländer, Dr. Martin Weiser, Dr. Philipp Ensslen, Dr. Marcus Merkel, Dr. Stefanie Arndt, Dr. Nadine Gaß, Dr. Heidi Walter, Dr. Krisana Peewasan, Dr. Barbara Reiß, Dr. Christian Schwechheimer, Dr. David Rombacher, Dr. Sergej Hermann, Dr. Damian Ploschik, Dr. Jeannine Merkel, Dr. Robert Hofsäß, Dr. Benjamin Lehmann, Dr. Ulrike Reisacher, Dr. Yannic Fritz, Dr. Samantha Wörner, Linda Nötzel, Fabienne Speck, Arthur Kuhlmann, Fabian Weick, Fabian Lang, Sara Müller, Julian Gebhard, Hülya Ucar, Katja Krell, Christoph Bickmann, Daniel Sack, Dennis Harijan, Dorothée Ganz, Lara Hirsch, Dr. Franziska Rönicke, Leonora Nurcaj, Isabel Weiß, Judith Winsauer, Karen Möbius, Joana Krämer, Manuel Schupp, Michaela Mijic, Nicola Seul, Andreas Dittmer, Nathalie Wagener, Katharina Gress, Felix Mazza, Lisa Gramespacher, Sina Jaschik, Fabienne Urbanek und Benjamin Felker für die



angenehme Arbeitsatmosphäre, gute Zusammenarbeit, unvergesslichen Themen während den Pausen und Abendstunden und besonders für die einzigartige Zeit im AKW.

- meinen Vertiefer- und Bachelorstudenten Sarah Al Muthafer, Lena Pilz und Roman Graf sowie meiner Azubine Katharina Gress und meiner HiWi Karen Möbius für die interessierte, begeisterte Mitarbeit und Unterstützung bei meiner Arbeit.
- Pille, Marcus, Jack, Nadschke, Steffie und Heidi für die schöne Aufnahme in den Arbeitskreis, wenn es euch nicht gegeben hätte, wäre ich vielleicht nie im AKW geblieben.
- Jeannine für die Einführung in die Welt der HPLC, ihre ruhige, lustige und bemutternde Art und ihr immer offenes Ohr. Unseren morgendlichen Kaffee habe ich immer sehr genossen! Danke auch für die Rezeptvorschläge – ich bin immer fast gestorben vor Hunger - und Spitznamenfindungen während des Praktikums.
- Benni für deine Hilfsbereitschaft in Sachen IT - danke nochmal für meinen Login-Namen – und dass du nicht nur austeilen, sondern auch einstecken konntest. Es hat immer sehr viel Spaß mit dir gemacht.
- Robse für deine ruhige Art, dass du mich so liebevoll im Luder-Labor aufgenommen hast und wir von A-Z alles anhören konnten: „Pelikan, Peli-Peli-Pelikan, Soll ich dich mitnehm‘ in meim Auto? Wir sind ein Team, *brd bang bang*“
- Sami dafür, dass wir einfach immer Hanni und Nanni waren und immer bleiben werden! Von dir habe ich nicht nur wissenschaftliche Dinge (wie z.B. OCD) gelernt, sondern auch selbstbewusst zu sein und sich nicht verstecken zu müssen. Danke, dass du genauso einen Ordnungswahn hast wie ich und immer für jeden Spaß zu haben bist (wir müssen dringend ein paar schöne Bilder und nicht nur Quatschfotos machen).
- Sara, dass du so bist wie du bist! Liebevoll, hilfsbereit, selbstlos, ehrlich, Dorfkind, mega schreckhaft, mal mehr oder weniger motiviert, aber immer bereit für einen gemütlichen, lustigen Abend mit einem Gläschen Wein (oder vllt auch mehr). Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mir immer gezeigt hast, was wichtig ist. Du bist die beste Gesellschaft, die man sich wünschen kann!
- Katschi alias Katschipedia, Glaszerstörerin, Glitter-Kleber-Königin, Photoshop-Profi, Pumpen-Reparateur, Kaffeejunkie, Schnecken-Liebhaberin, Beste-Milchschnitten-Laborpartnerin der Welt... die Liste könnte ewig fortgeführt werden. Du bist einfach ein Multitalent und das bewundere ich sehr. Danke, dass du dich mir immer anvertraut hast und genau weißt, womit du mich aufheitern kannst!

- Yannic, dass du unsere Studienzeit unvergesslich gemacht hast. Du warst anfangs Yannic der Tänzer, einer der „Spaßgruppe 40 %“ und warst/bist definitiv der verrückteste Vogel, den ich bisher kennen lernen durfte, aber du bist mir sehr ans Herz gewachsen und ohne dich hätte ich das nie überstanden. Danke, dass du mich über die Jahre mit zahlreichen P\*\*\* und vielen lustigen Momenten beschenkt hast!
- Fabian für dein absolutes Organisationstalent und deine Hilfsbereitschaft, wenn ich mal wieder zu blöd war und meine zwei Bildschirme während einer PowerPoint-Präsentation vertauscht habe oder irgendein Programm zur Auswertung benötigt habe. Danke für deinen regelmäßigen Lieferservice vor allem in letzter Zeit und deine Verköstigungen mit Pizza, Wok mit Erdnussbuttersauce oder gebrannten Nüssen aller Art.
- Julian für deine ruhige, ehrliche und liebevolle Art. Du bist nicht nur ein gebürtiger HPLC-Nachfolger, sondern auch beste Weintasting-Partie. Danke, dass ich dein Fußelpartner sein durfte und du mich auch ohne viel Worte verstehst.
- Hülya, dass du mich morgens nicht alleine gelassen hast und immer dann von dir ein Knaller kam, wenn man es am wenigsten erwartet hat.
- Fabienne, Arthur und Fabian aka Kinderlabor für eure Verrücktheit und (fast) immer gute Laune. Auch wenn ihr mich ab und zu in ungünstigen Momenten erwischt habt (löscht auf jeden Fall dieses Foto/Video), seid euch sicher, ich habe euch öfter ertappt! Danke für „Uno Momento“, „Louis, Louis“, „Saufen morgens, mittags, abends...“ und viele mehr!
- Tim und Jens für den ein oder anderen Kaffee und die schönen, lustigen, aber auch anregenden und produktiven Gespräche. Wenn Samantha und ich Hanni und Nanni sind, dann seid ihr Ernie und Bert!

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinem Freund Domenic. Ihr habt mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Ihr habt es mir nie übelgenommen, wenn ich mal weniger Zeit für euch hatte oder total launisch war. Ihr hattet immer Verständnis für meine Situation und vor allem Geduld, gerade in den letzten Monaten. Ich bin dankbar, dass ihr immer hinter mir steht, mich zum Lachen bringt und für ausreichend Abwechslung zu meinem Laboralltag sorgt. Ich bin froh, dass es euch gibt und hab euch unglaublich lieb!





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Motivation und Themenstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>4</b>
2.1 Fluoreszenzspektroskopie.....	4
2.1.1 Fluoreszenzlebenszeit und deren Messung .....	6
2.1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) .....	7
2.2 Markierungsmethoden für Nukleinsäuren .....	10
2.2.1 Bioorthogonale Markierungen .....	11
2.2.2 Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH).....	21
2.2.3 Energietransferbasierte Nukleinsäure-Architekturen .....	25
<b>3 Photoclick-Reaktion mit Azirinen</b> .....	<b>34</b>
3.1 Einführung .....	36
3.1.1 Eigenschaften, Synthese und Photochemie von Azirinen.....	36
3.1.2 Anwendung der lichtinduzierten Click-Reaktion mit Azirinen zur postsynthetischen Markierung.....	38
3.2 Synthese der azirinmodifizierten Nukleoside.....	40
3.2.1 Synthese des 5-Azirinyl-2'-desoxyuridins 1 .....	40
3.2.2 Synthese des 5-Azirinyl-uridins 2 .....	44
3.3 Studien zur Reaktivität .....	46
3.4 Lichtinduzierte Azirin-Alken-Cycloaddition.....	48
3.4.1 Charakterisierung der azirinmodifizierten Nukleoside 1 und 2 .....	48
3.4.2 Untersuchung der Anwendbarkeit in einer photoclickartigen Reaktion .....	49
3.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	57
<b>4 Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierungssonden (FISH)</b> .....	<b>59</b>
4.1 Synthese der FISH-Sonden mittels CuAAC.....	60
4.2 Synthese der Click-Bausteine und Azid-Farbstoffe .....	62

4.2.1	Synthese des acyclischen 3-Butin-1-yl-Linkers (cB).....	62
4.2.2	Synthese der Anomere des cRibo-Bausteins (cR).....	64
4.2.3	Synthese der Thiazol-Derivate TO1 und TO2 .....	65
4.3	Hybridisierungsstudien der Click-Bausteine cU, cB, cR .....	67
4.3.1	Untersuchung der Hybridisierungsstärke .....	68
4.3.2	Studien zur Hybridisierungssensitivität .....	70
4.3.3	Analyse der Fluorogenität .....	79
4.4	Hybridisierungsexperimente in Gewebe.....	81
4.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	84
<b>5</b>	<b>Wellenlängenverschiebende siRNA-Sonden .....</b>	<b>86</b>
5.1	Einführung .....	88
5.1.1	Mechanismus der Genregulierung – RNA Interferenz.....	88
5.1.2	Modifikation von siRNA.....	90
5.2	Synthese und optische Charakterisierung wellenlängenverschiebender siRNA Sonden.....	92
5.3	Knockdown-Experimente .....	103
5.4	Messung der Fluoreszenzlebenszeiten.....	110
5.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	117
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>122</b>
7.1	Materialien und Methoden.....	122
7.2	Synthesevorschriften .....	128
7.2.1	Azirin-modifiziertes 2'-Desoxyuridin 1 .....	128
7.2.2	Azirin-modifiziertes Uridin 2.....	134
7.2.3	Click Bausteine cB und cR für den Einbau in FISH Sonden .....	141
7.2.4	Azidmodifizierte TO-Farbstoffe.....	153
7.2.5	Click-Bausteine cL und cAraU für den Einbau in siRNA Sonden .....	160

7.3	Oligonukleotide .....	170
7.3.1	Synthese modifizierter DNA .....	170
7.3.2	Synthese modifizierter RNA .....	176
7.3.3	HPLC-Methoden .....	181
7.3.4	Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide .....	182
7.4	Regulierung der GFP Expression mittels siRNA .....	190
7.4.1	Zellkultur .....	190
7.4.2	Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie .....	191
7.5	FLIM Experimente .....	191
7.5.1	Messung der Fluoreszenzlebenszeit mittels TCSPC .....	192
7.5.2	Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM) .....	192
7.6	<i>In-vivo</i> Experimente .....	193
7.7	Belichtungsexperimente .....	194
7.8	Zusätzliche Spektren und Daten .....	195
7.8.1	Photoclick-Reaktion mit 2H-Azirinen .....	195
7.8.2	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierungssonden .....	198
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>202</b>
<b>9</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>217</b>
9.1	Publikationen .....	217
9.2	Konferenzen und Posterbeiträge .....	217
9.3	Stipendien .....	218
9.4	Lehre .....	218





## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∅	Durchschnitt	CuAAC	kupfer(I)katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
°	Grad		
°C	Grad Celsius	D	Donor
%	Prozent	d	Dublett
Δ	Hitze, Delta	Da	Dalton
®	registrierte Warenmarke	dA	2'-Desoxyadenosin
Å	Ångström	DABCYL	4-(4'-Dimethylaminophenyl-azo)benzoesäure
A	Akzeptor, Absorption, Amplitude	DAD	Diodenarraydetektor
a	Amplitude	DC	Dünnschichtchromatographie
abs	Absorption	dC	2'-Desoxycytidin
abs.	absolut	DCM	Dichlormethan
Ago2	Agonaut 2	dG	2'-Desoxyguanosin
AHP	akute hepatische Porphyrie	DIBO	Dibenzocyclooctin
app	offensichtlich ( <i>apparent</i> )	DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
ATP	Adenosintriphosphat	DMF	Dimethylformamid/-fumarat
a.u.	willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )	DMSO	Dimethylsulfoxid
BARAC	Biarylazacyclooctinon	DMTr	Dimethoxytrityl
BHQ	<i>black hole quencher</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BODIPY	Bor-Dipyrromethen	ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
bzw.	beziehungsweise	dT	2'-Desoxythymidin
ca.	circa	δ	chemische Verschiebung
cAraU	2'- <i>O</i> -Propargylarabinouridin	E	Energietransfereffizienz
Cas	CRISPR assoziiertes Protein	e	<i>enhanced</i>
cL	Prop-2-yn-1-yl-( <i>R</i> )-(2, 4-dihydroxybutyl)carbammat	ε <sub>260</sub>	Extinktionskoeffizient bei 260 nm
cm	Zentimeter	ECHO	<i>exciton-controlled hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotides</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid		
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
CPG	<i>controlled pore glas</i>	EE	Essigsäureethylester
cU	2'- <i>O</i> -Propargyluidin		

EI	Elektronenstoßionisation		h mit Frequenz $\nu$
eq.	Äquivalente	HOMO	höchst besetztes Molekülorbital ( <i>highest occupied molecular orbital</i> )
ESI	Elektronenspraionisation		
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )		
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin	HPA	Hydroxypicolinsäure
EtOH	Ethanol	HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
F	Fluoreszenz		
f	Population	HR	hochauflösend ( <i>high resolution</i> )
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>		
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )	HSV	Herpes simplex Virus
FAM	Carboxyfluorescein	I	Intensität
FC	<i>Flash Säulenchromatographie</i>	I <sub>2</sub>	Iod
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	IC	Innere Umwandlung ( <i>internal conversion</i> )
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung	iEDDA	Diels-Alder mit inversem Elektronenbedarf ( <i>inverse electron demand Diels-Alder</i> )
FIT	<i>forced intercalation</i>	IR	Infrarot
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie ( <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i> )	ISC	( <i>intersystem crossing</i> )
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer	J	Kopplungskonstante
$\Phi_F$	Fluoreszenzquantenausbeute	kcal	Kilokalorie
G	Guanosin	k <sub>em</sub>	Geschwindigkeitskonstante Emission
GalNAc	N-Acetylgalactosamin	kJ	Kilojoule
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	k <sub>ns</sub>	Geschwindigkeitskonstante nichtstrahlender Prozesse
h	Stunde	konz.	konzentriert
hATTR	hereditäre Transthyretin-vermittelte Amyloidose	KO <sup>t</sup> Bu	Kaliumtertbutanolat
HeLa	Henrietta Lacks	$\kappa$	Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor
hv	planksches Wirkungsquantum	LNA	<i>locked</i> Nukleinsäure
		Lsg.	Lösung
		$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge

$\lambda_{\text{exc}}$	Anregungswellenlänge	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
M	molar	ns	Nanosekunde
m	Multiplett	v	Brechungsindex
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>	P	Phosphoreszenz
MB	<i>Molecular Beacon</i>	p.a.	pro analysi
MeCN	Acetonitril	PA-Cl	2-Cyanothyl-diisopropyl-chlorophosphoramidit
MeOH	Methanol	PALM	<i>Photoactivated Localization Microscopy</i>
M-FISH	multiplex fluorescence in-situ hybridization	PAMAM	Polyamidoamin Generation 5
mg	Milligramm	G <sub>5</sub>	
MHz	Megahertz	PAZ	PIWI, Argonaut, Zwillie/Pinhead
min	Minute	PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
miRNA	<i>micro RNA</i>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	Palladiumacetat
mL	Milliliter	PEG	Polyethylenglykol
mM	millimolar	PET	Positronen-Emissions-Tomographie
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )	pH	pH-Wert
MS	Massenspektroskopie	PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
$\mu\text{m}$	Mikrometer	pmol	Pikomol
$\mu\text{M}$	mikromolar	PNA	Peptid-Nukleinsäure
N <sub>2</sub>	Stickstoff	pos.	positiv
NaCl	Natriumchlorid	PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphan
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid	ppm	<i>parts per million</i>
NaOH	Natriumhydroxid	pre	Vorstufen- ( <i>precursor</i> )
NaP <sub>i</sub>	anorganischer Natriumphosphatpuffer	pri	primäre
NEt <sub>3</sub> *HF	Triethylamintrihydrofluorid	quant.	quantitativ
NH <sub>3</sub>	Ammoniak	quart.	quarternär
nM	nanomolar	r	Radius
nm	Nanometer	rA	Adenosin
NMM	N-Methylmaleinimid		
nmol	Nanomol		

rC	Cytidin	TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
Rel.	relativ	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor	TBDMS-	Tert-butyldimethylsilylchlorid
rG	Guanosin	Cl	
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	TBTA	Tris(benzyltriazolylmethyl)amin
RNA	Ribonukleinsäure	TCSPC	Zeitkorrelierte Einzelphotonen-zählung
RNAi	RNA-Interferenz		( <i>time-correlated single photon counting</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )	THF	Tetrahydrofuran
rpm	<i>rounds per minute</i>	™	unregistrierte Warenmarke
RT	Raumtemperatur	T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
rU	Uridin	T <sub>n</sub>	Triplett-Zustand n
s	Sekunde, Singulett	TO	Thiazolorange
s.	siehe	TR	Thiazolrot
SF	<i>ScreenFect</i> ®	τ	(Fluoreszenz-)Lebenszeit
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	usw.	und so weiter
sm	<i>single molecule</i>	UV	Ultraviolett
S <sub>n</sub>	Singulett-Zustand n	vgl.	vergleiche
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	Vis	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichtes ( <i>visible</i> )
SPAAC	ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition ( <i>strain promoted azide-alkyne-cycloaddition</i> )	VR	Schwingungsrelaxation ( <i>vibrational relaxation</i> )
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )	vs.	versus
STED	<i>stimulated emission depletion</i>	WED	<i>white light emitting DNA</i>
t	Zeit, Triplett	z.B.	Zum Beispiel
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit		

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*<sup>1</sup> und den von der *IUPAC-IUB-Kommission*<sup>2</sup> empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden kursiv dargestellt.

<sup>1</sup> *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

<sup>2</sup>*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.

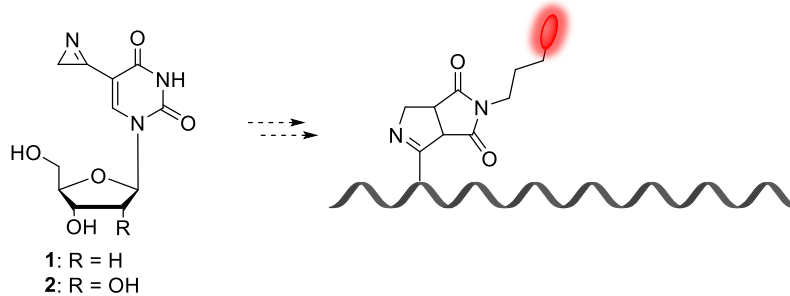


## 1 MOTIVATION UND THEMENSTELLUNG

Kaum etwas fasziniert die Menschen mehr als das Phänomen der Biolumineszenz. Im Gegensatz zu einer Glühbirne, welche 90 % der Energie als Wärme abgibt, weist die Biolumineszenz eine Lichtausbeute von 100 % auf.<sup>[1-2]</sup> Vor allem in der Tiefsee ist dieses Phänomen weit verbreitet, wobei 90 % aller Meeresbewohner Licht durch chemische Reaktionen erzeugen sollen.<sup>[1]</sup> Das wohl bekannteste Beispiel in Europa stellt jedoch das Glühwürmchen dar, welches sowohl bei der Balz, als auch zur Kommunikation Licht aussendet. Verantwortlich dafür ist die Oxidation von Luciferin in Anwesenheit des Enzyms Luciferase, Sauerstoff und Adenosintriphosphat (ATP), wobei die freigesetzte Energie in Form von Licht abgegeben wird.<sup>[3-4]</sup> Während die Biolumineszenz in Flora und Fauna dem Zweck der Anlockung, Kommunikation, Verteidigung oder Tarnung dient, eröffnete sie mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins einer Qualle, für welche O. SHIMOMURA, M. CHALFIE und R. Y. TSIEN 2008 den Nobelpreis erhielten, zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der biomedizinischen Forschung.<sup>[5]</sup> So konnten nach der erfolgreichen Klonierung der *gfp* cDNA durch PRASHER sowie die Expression des Gens in Berührungs-Rezeptor-Neuronen in *C. elegans* durch CHALFIE<sup>[6-7]</sup> nicht nur die Dynamik und Lokalisierung von Proteinen überwacht,<sup>[8]</sup> sondern auch deren Interaktionen studiert<sup>[9]</sup> oder das Wachstum von Tumorzellen visualisiert werden.<sup>[10]</sup> Auf diese Weise können allerdings nur Proteine, jedoch keine anderen Biomoleküle wie Kohlenhydrate, Lipide oder Nukleinsäuren markiert werden.<sup>[11]</sup> Dabei stellt vor allem die Größe des Proteins ein limitierender Faktor dar, wodurch die Struktur und damit die natürliche Funktion der Biomoleküle beeinflusst werden.<sup>[12]</sup> Eine Lösung dafür bietet die Markierung mit kleinen organischen Molekülen über sogenannte postsynthetische Verfahren. Hierbei wird synthetisch eine funktionelle Gruppe in das zu untersuchende Biomolekül eingebracht und anschließend mit einem Fluorophor verknüpft. Mithilfe dieser Markierung können wiederum verschiedene fluoreszente Systeme, wie Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungs- (FISH) oder Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Sonden (FRET), entwickelt werden, um die optimale Sensitivität und Spezifität zu erhalten.<sup>[13]</sup>

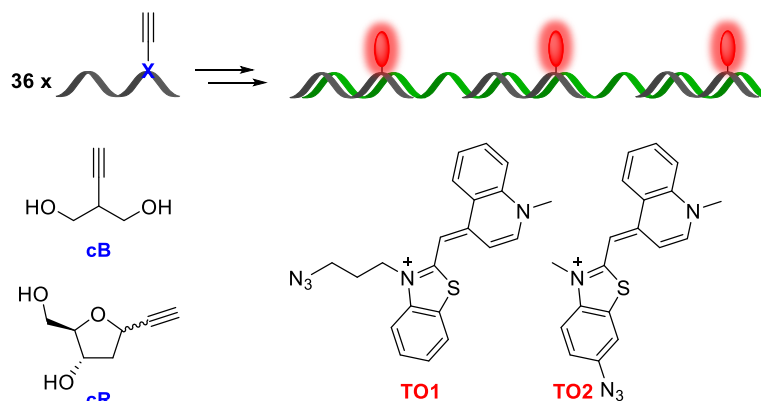
Die Forschung dieser Arbeit leistet einen Beitrag zur Weiterentwicklung solcher fluoreszenten Architekturen für die Visualisierung von Oligonukleotiden *in vitro* als auch *in vivo*. Im ersten Teil sollte eine kupferfreie, bioorthogonale Markierungsmethode entwickelt werden, die durch Licht induziert wird und somit eine räumlich und zeitlich kontrollierte

Reaktion erlaubt. Hierfür sollten die azirinmodifizierten Nucleoside **1** und **2** synthetisiert und in einer Photoclick-Reaktion angewandt werden (Abbildung 1). Die direkte Anknüpfung und Größe der Modifikation soll dabei einen enzymatischen oder metabolischen Einbau in DNA bzw. RNA erleichtern.



**Abbildung 1:** Strukturen und Konzept der kupferfreien Azirin Photoclick-Reaktion.

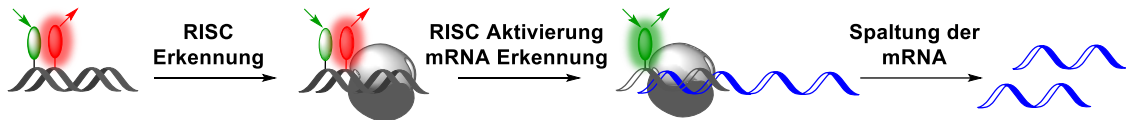
Das zweite Projekt beschäftigte sich mit der Entwicklung und Optimierung von Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungs-Sonden zur Visualisierung und Lokalisierung von mRNA auf Einzelmolekülebene im Gewebe. Für diesen Zweck sollte mithilfe der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) zunächst ein Verfahren entwickelt werden, welches die Synthese von 36 einzelmarkierte DNA-Sequenzen in nur einem Ansatz erlaubt. Diese sollten nach Hybridisieren mit der Zielsequenz ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zeigen und somit in Zebrafish-Hirngewebe zur Detektion einer, nach gezielter Verletzung, hochregulierten mRNA angewandt werden. Zur Optimierung des Konzeptes sollten zudem die alkinmodifizierten Bausteine **cB** und **cR** sowie die Farbstoffe **TO1** und **TO2** synthetisiert und deren optische Eigenschaften auf eine Hybridisierungssensitivität oder Fluorogenität untersucht werden (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Strukturen und Konzept der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung für die Anwendung im Gewebe.



Zuletzt sollte das Konzept der „siRNA Traffic Lights“<sup>[14-17]</sup> derart optimiert werden, dass deren Transport sowie Prozessierung während des RNA-Interferenz-Mechanismus nicht nur durch einen optimalen Fluoreszenzfarbwechsel, sondern auch durch die eindeutige Änderung der Fluoreszenzlebenszeit in lebenden Zellen beobachtet werden kann (Abbildung 3). Mithilfe von GFP-Genregulierungs-Experimenten sollte eine intakte, biologische Aktivität nachgewiesen werden.



**Abbildung 3:** Konzept der „siRNA Traffic Lights“.

---

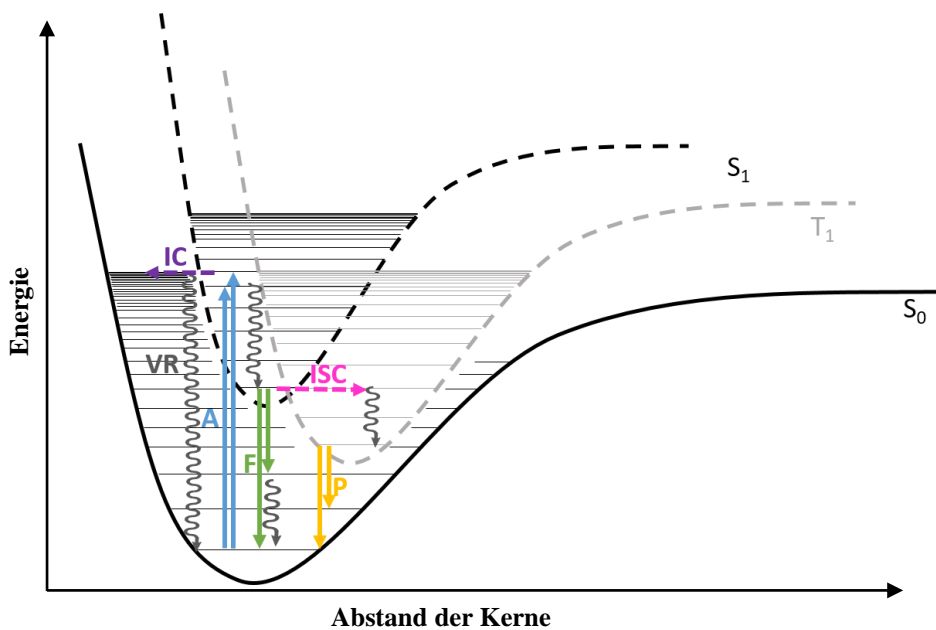
## 2 THEORETISCHER HINTERGRUND

### 2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Wie bereits zuvor beschrieben, wird das Phänomen der Biolumineszenz durch chemische Reaktionen ausgelöst. Im Gegensatz dazu wird die Emission von Licht nach Anregung eines Moleküls durch elektromagnetische Strahlung als Photolumineszenz bezeichnet. Dabei wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Neben diesen strahlenden Prozessen finden allerdings auch zahlreiche andere strahlungslose Prozesse statt, die mithilfe des JABŁOŃSKI-Diagrammes (Schema 1) beschrieben werden können.

Nach Absorption eines Photons kommt es zu einem vertikalen Übergang vom Grundzustand  $S_0$  in Schwingungsniveaus höherer elektronischer Singulettzustände ( $S_n$ ). FRANCK und CONDON postulierten, dass dieser elektronische Übergang so schnell vonstattengeht ( $10^{-15}$  s)<sup>[18]</sup>, dass die Kerne aufgrund ihrer Masse nicht darauf reagieren können. Quantenmechanisch betrachtet ist somit ein Übergang in eine dem Grundzustand ähnliche Schwingungswellenfunktion am wahrscheinlichsten. In der Regel existieren mehrere Schwingungsniveaus, die eine annähernd gleiche Wellenfunktion aufweisen und deshalb auch eine Population in diese Zustände beobachtet werden kann.<sup>[19]</sup> Von dort aus können unterschiedliche Mechanismen ablaufen, um Energie wieder abzugeben und in den Grundzustand  $S_0$  zu gelangen. Durch Schwingungsrelaxation (*vibrational relaxation* VR,  $10^{-12}$  s) in das niedrigste Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes  $S_1$  und anschließendem spin-erlaubten Übergang in den Singulett-Grundzustand  $S_0$  wird Energie in Form von Fluoreszenz frei ( $10^{-8}$  s). Diese emittierte Strahlung besitzt eine geringere Energie, als zuvor absorbiert wurde, und führt somit zu einer Verschiebung der Wellenlänge, auch STOKES-Verschiebung genannt. Betrachtet man ein Absorptions- im Vergleich zum Emissionsspektrum eines Farbstoffes, so wird deutlich, dass sich diese Spektren wie Bild und Spiegelbild verhalten (*mirror-image rule*). Denn wie bei der Absorption werden auch bei der Emission, nach FRANCK-CONDON, verschiedene Schwingungsniveaus des Singulettgrundzustandes  $S_0$  besetzt.<sup>[20]</sup> Laut KASHA und VAVILOV sollte zudem die Emissionswellenlänge  $\lambda_{em}$  bzw. Quantenausbeute  $\Phi_F$  unabhängig von der Anregungswellenlänge immer identisch sein.<sup>[21-22]</sup> Dies liegt darin begründet, dass die Schwingungsrelaxation deutlich schneller abläuft als die Fluoreszenz ( $10^{-12}$  s vs.  $10^{-8}$  s). Bei der inneren Umwandlung (*internal conversion* IC) erfolgt ein strahlungsloser, isoenergetischer Übergang in ein Schwingungsniveau des nächsttieferen, elektronisch angeregten Zustandes derselben

Multiplizität ( $10^{-12}$  s). Im Gegensatz dazu findet bei der Interkombination (*intersystem crossing* ISC) unter Spinumkehr ein Übergang von höheren Schwingungsniveaus des ersten angeregten Singulettzustandes ( $S_1$ ) in den Triplettzustand ( $T_1$ ) statt. Nach Relaxation in das niedrigste Schwingungsniveau kehrt das angeregte Molekül zum Singulett-Grundzustand ( $S_0$ ) zurück. Die dabei freiwerdende Emission wird als Phosphoreszenz bezeichnet und weist aufgrund des spin-verbotenen Übergangs ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) eine deutlich längere Lebenszeit auf als die Fluoreszenz. Zudem besitzt der Triplettzustand eine geringere Energie als der Singulettzustand, weshalb die Phosphoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz zu längeren Wellenlängen verschoben ist.



**Schema 1:** JABLOŃSKI-Termschema zur Beschreibung von strahlungslosen und strahlenden Prozessen nach Anregung durch elektromagnetische Strahlung. A: Absorption; F: Fluoreszenz; P: Phosphoreszenz; VR: Schwingungsrelaxation (*vibrational relaxation*); IC: innere Umwandlung; ISC: Interkombination; adaptiert von Dr. B. Reiß.<sup>[23]</sup>

Charakteristisch für Fluoreszenz (und Phosphoreszenz) sind die Quantenausbeute sowie die Lebenszeit. Letztere soll im nächsten Kapitel näher beschrieben werden. Unter der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  versteht man das Verhältnis emittierter relativ zur Anzahl absorbierter Photonen. Mithilfe dieser Kenngröße kann der Anteil eines strahlenden Prozesses an der Gesamtrelaxation beschrieben werden.

$$\Phi_F = \frac{k_{em}}{k_{em} + k_{ns}} \quad (1)$$

- $\Phi_F$ : Fluoreszenzquantenausbeute  
 $k_{em}$ : Geschwindigkeitskonstante des fluoreszenten Zerfalls  
 $k_{ns}$ : Geschwindigkeitskonstante der strahlungslosen Prozesse

Um die Fluoreszenzquantenausbeute eines Fluorophors zu verbessern, muss somit der Anteil an nicht strahlenden Prozessen möglichst geringgehalten werden. Dies wird zum einen durch eine starre Struktur des Farbstoffes erreicht, wodurch die Rotation und folglich ein Energieverlust verhindert wird. Zum anderen sollte eine starke Spin-Bahn-Kopplung aufgrund von schweren Atomen, wie z.B. Iod vermieden werden, da damit eine Interkombination begünstigt werden würde.

### 2.1.1 Fluoreszenzlebenszeit und deren Messung

Die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  beschreibt die durchschnittliche Zeit, in der das Molekül im angeregten Zustand  $S_1$  verbleibt, bevor es unter spontaner Emission in den Grundzustand zurückkehrt. Ebenso wie die Fluoreszenzquantenausbeute kann die –lebenszeit durch die reziproke Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller strahlungslosen ( $k_{ns}$ ) und strahlenden Prozesse ( $k_{em}$ ) formuliert werden.

$$\tau = \frac{1}{k_{em} + k_{ns}} \quad (2)$$

Da die Geschwindigkeitskonstante der strahlungslosen Prozesse stark von dem Einfluss der Umgebung auf den Fluorophor abhängig ist, ist es möglich, mithilfe des Zerfalls eine Aussage über diesen Einfluss zu treffen. Im einfachsten Fall folgt die Desaktivierung einer monoexponentiellen Zerfallskinetik.<sup>[24]</sup>

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (3)$$

Bei Biomolekülen oder anderen komplexen Molekülen wird allerdings häufig eine multiexponentielle Kinetik beobachtet.

$$I(t) = I_0 \sum_i a_i e^{-t/\tau_i} \quad (4)$$

- $I(t)$ : detektierte Fluoreszenzintensität  
 $I_0$ : Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t = 0$

- $t$ : Zeit  
 $\tau$ : Fluoreszenzlebenszeit  
 $a_i$ : Amplitude

Dies kann durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Lösungsmittel, Einfluss der direkten Umgebung auf einen einzelnen Chromophor, die Anwesenheit zweier Fluorophore mit unterschiedlicher Lebenszeit oder aber einem Energietransfer hervorgerufen werden. Werden die strahlungslosen Prozesse nicht berücksichtigt, so spricht man von der intrinsischen oder natürlichen Fluoreszenzlebenszeit.

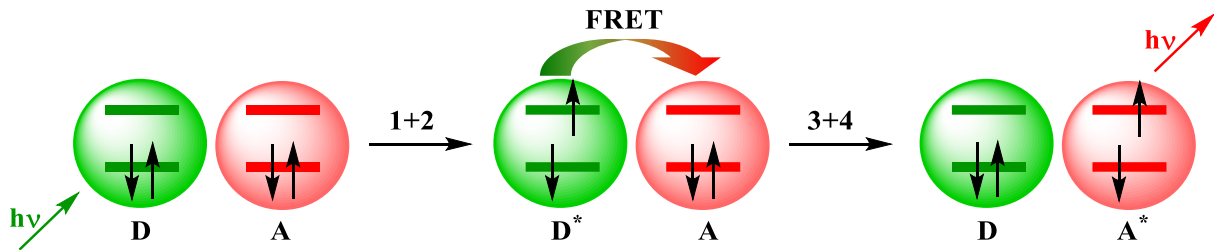
$$\tau_n = \frac{1}{k_{em}} \quad (5)$$

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Messmethoden, mit denen die Fluoreszenzlebenszeit bestimmt werden kann: zum einen die Datenerfassung im Zeitbereich (*time domain*) oder in der Frequenz-Domäne (*frequency domain*). Die am häufigsten verwendete Technik stellt die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (*time correlated single photon counting* TCSPC) in der Zeit-Domäne dar. Dabei wird die Probe mit einem kurzen Laser-Puls angeregt und die Verteilung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme durch Zählen jedes einzelnen Photons detektiert. Eine Erweiterung dieser Methodik ist die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy* FLIM). Diese Technik ermöglicht eine Beobachtung der Fluoreszenzlebenszeit innerhalb lebender Zellen und wird deshalb häufig für die Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Systemen verwendet, um strukturelle Änderungen zu analysieren.

### 2.1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der von THEODOR FÖRSTER erstmals 1946 postulierte Energietransfer beschreibt einen photophysikalischen Prozess, in welchem die Energie des angeregten Zustandes eines Donors (D) strahlungslos auf den Grundzustand eines Akzeptors (A) über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen wird (Abbildung 4).<sup>[25-26]</sup> Dies setzt voraus, dass die Emission des Donors mit der Absorption des Akzeptors überlappt und somit einige Übergänge dieselbe Energie aufweisen müssen.<sup>[27]</sup> Nach Energieübertragung kehrt der Donor in den Grundzustand zurück und der Akzeptor wird in den angeregten Zustand angehoben. Dies hat zur Folge, dass zum einen die Fluoreszenzlebenszeit des Donors verkürzt wird und

zum anderen der Akzeptor Strahlung anderer Wellenlänge emittiert, um wieder in den Grundzustand zu gelangen.



**Abbildung 4:** Darstellung eines Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET): Anregung des Donors (1), Energietransfer auf den Akzeptor (2), Rückkehr des angeregten Donors in den Grundzustand (3) und Anregung des Akzeptors (4).

THEODOR FÖRSTER legte die mathematische Grundlage für diesen Mechanismus und formulierte folgende Gleichung für die Geschwindigkeit  $k_{FRET}$  des sogenannten Förster-Resonanz- oder auch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers FRET<sup>[27-29]</sup>:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (6)$$

$$R_0 = \left( \frac{8.79 \cdot 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{n^4} \right)^{1/6} \quad (7)$$

$k_{FRET}$ : Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers

$\tau_D$ : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

$R_0$ : Förster-Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)

$r$ : Abstand zwischen Donor und Akzeptor

$\kappa^2$ : Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor

$\Phi_D$ : Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

$J(\lambda)$ : spektrales Überlappungsintegral

$n$ : Brechungsindex des Mediums zwischen den Chromophoren

Daraus lässt sich erkennen, dass neben der Überlappung des Emissions- und Absorptionsspektrums ( $J(\lambda) \neq 0$ ) auch noch weitere Voraussetzungen erfüllt werden müssen, um einen möglichst schnellen Förster-Resonanz-Energietransfer zu erzielen. So sollte die

Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_D$  des Donors möglichst hoch und der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  der Übergangsdipolmomente nicht zu klein sein ( $\kappa^2 \neq 0$ ). Das bedeutet, dass bei einer parallelen Ausrichtung der Farbstoffe der FRET sehr effizient verläuft, während dieser bei einer senkrechten Orientierung vernachlässigbar gering wird.<sup>[30]</sup>

Ein weiterer wichtiger Wert zur Evaluierung des Förster-Resonanz-Energietransfer ist die FRET-Effizienz  $E$ :<sup>[31]</sup>

$$E = \frac{k_{FRET}}{\tau_D^{-1} + k_{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (8)$$

Hierbei wird deutlich, dass die Effizienz des Energietransfers im Wesentlichen vom Abstand  $r$  der beiden Chromophore beeinflusst wird. Aus diesem Grund wird der FRET häufig als „*spectroscopic ruler*“ eingesetzt, um den Abstand von interagierenden Molekülen wie z.B. Proteinen zu untersuchen.<sup>[32-33]</sup> Für gewöhnlich werden dabei Distanzen von 10 - 100 Å beobachtet.<sup>[28]</sup>

Da der Energietransfer ein Löschen der Donor-Fluoreszenz auslöst, kann die Effizienz allerdings auch mithilfe des Quotienten aus der Fluoreszenzquantenausbeuten des Donor in Anwesenheit des Akzeptors ( $\Phi_{DA}$ ) und in Abwesenheit des Akzeptors ( $\Phi_D$ ) beschrieben werden.<sup>[34]</sup>

$$E = 1 - \frac{\Phi_{DA}}{\Phi_D} \quad (9)$$

In direkter Verbindung dazu steht die Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors ( $\tau_{DA}$ ) und in Abwesenheit des Akzeptors ( $\tau_D$ ).<sup>[35-36]</sup> Da die Fluoreszenzlebenszeit unabhängig von der Konzentration des Farbstoffes ist, wird mit dieser Berechnung der Fehler der FRET-Effizienz minimiert.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (10)$$

## 2.2 Markierungsmethoden für Nukleinsäuren

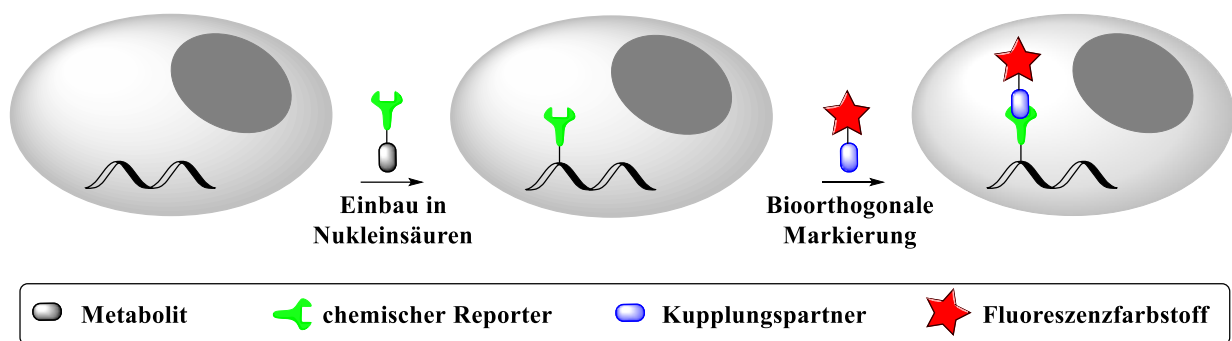
Um biologische Prozesse, sei es der Grad an Proteinrezeptoren an der Zelloberfläche oder komplexere Mechanismen wie eine Genregulierung oder die Interaktion zwischen Biomolekülen, auf molekularer und zellulärer Ebene verstehen zu können, ist es äußerst wichtig, diese zu visualisieren und zu detektieren.<sup>[37]</sup> Eine große Herausforderung stellt dabei die Beobachtung solcher Prozesse im lebenden Organismus (*in vivo*) dar.<sup>[38]</sup> Im Gegensatz zu Studien außerhalb des lebenden Organismus und Gewebes (*in vitro*) werden hierbei spezifischere und sensitivere Methoden, wie beispielsweise die markierungsfreie Detektion mittels Raman-Konfokalmikroskopie oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), gefordert.<sup>[12]</sup> Aufgrund ihrer hohen Sensitivität hat sich besonders die fluoreszente Bildgebung für die Markierung von Biomolekülen *in vivo* etabliert.<sup>[39]</sup> Durch die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welche im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis gekürt wurde,<sup>[5]</sup> die Verbesserung der Fluoreszenzmikroskopie durch erhöhte Bildauflösung (Nobelpreis 2014)<sup>[40]</sup> und die Entwicklung von Markierungsmethoden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden signifikante Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt. Doch eine Vielzahl dieser Methoden wird bis heute hauptsächlich für die Identifizierung von Proteinen verwendet, während die Visualisierung von Nukleinsäuren eine Herausforderung bleibt.<sup>[11]</sup> Die fluoreszenten Proben müssen nicht nur unter physiologischen Bedingungen stabil und nicht zelltoxisch sein, sondern sollten auch die Zellmembran passieren können. Außerdem müssen sie eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber der Zielsequenz aufweisen und dürfen dabei deren Funktion nicht beeinflussen. Darüber hinaus ist es wichtig, außerhalb des Absorptionsbereiches von DNA und RNA, das bedeutet, durch sichtbares Licht anzuregen und damit Photoschäden zu verhindern.<sup>[41-42]</sup> Ein weiterer Vorteil wäre eine Änderung des Fluoreszenzverhaltens bei Wechselwirkung mit dem Zielmolekül, um das Signal im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz, aufgrund von ungebundenen Proben, zu verbessern.<sup>[12]</sup>

Im Folgenden soll näher auf einige dieser Fluoreszenzmarkierungstechniken eingegangen werden, wobei der Fokus auf der in dieser Arbeit verwendeten Methoden liegt.



### 2.2.1 Bioorthogonale Markierungen

Während dynamische Vorgänge von Proteinen sehr simpel mittels genetisch codierter, fluoreszenter Marker wie das grün fluoreszierende Protein GFP visualisiert werden können, sind Nucleinsäuren mit dieser Technik nur schwer zugänglich. Dagegen haben sich sogenannte bioorthogonale Reaktionen etabliert, bei welchen ein Metabolit mit einer funktionellen Gruppe, dem chemischen Reporter, in das Zielmolekül eingebaut wird und anschließend in einer spezifischen Reaktion mit einem Kupplungspartner komplementärer Funktionalität reagiert (Abbildung 5).<sup>[43-45]</sup>

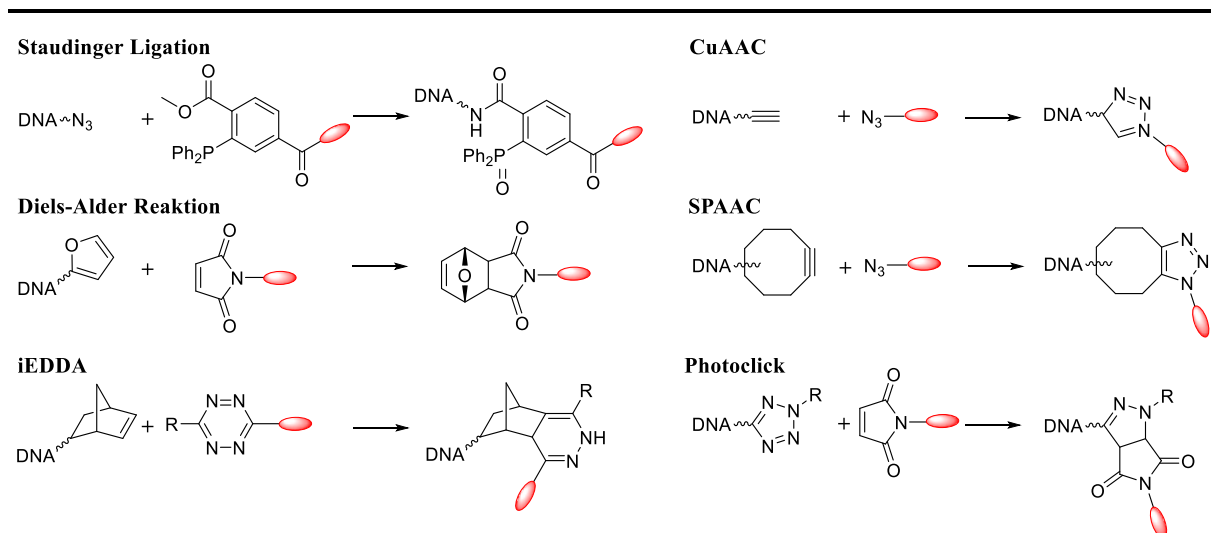


**Abbildung 5:** Schematische Darstellung einer bioorthogonalen Markierung von Nucleinsäuren. Der chemische Reporter wird zunächst in das Biomolekül eingebracht und anschließend mit einem, an einen Farbstoff gebundenen, Kupplungspartner markiert.

Dabei ist zu beachten, dass keine zellulären Funktionen beeinträchtigt werden oder eine Nebenreaktion mit anderen funktionellen Gruppen oder Biomolekülen stattfindet. Bioorthogonale Reaktionen zeichnen sich dadurch aus, dass sie in lebenden Organismen nicht nur sehr chemoselektiv, sondern auch mit hohen Ausbeuten und einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit ablaufen.<sup>[46-47]</sup> Diese folgen häufig einer Kinetik zweiter Ordnung und sind somit von der Konzentration beider Reaktionspartner abhängig.<sup>[48]</sup> Da Biomoleküle *in vivo* allerdings in äußerst geringen Mengen vorhanden sind, wäre (bei einer schlechten Reaktionskinetik) eine relativ hohe Konzentration an Markierungsreagenz notwendig. Infolgedessen muss wiederum auf die Löslichkeit und die Toxizität geachtet werden, um den Organismus nicht zu schädigen. Aus diesem Grund ist es notwendig, bioorthogonale Reaktionen zu entwickeln, die chemisch inert und unter physiologischen Bedingungen (neutraler pH, Körpertemperatur, Normaldruck, Sauerstoff-Atmosphäre und in wässrigem

Medium) mit so hohen Geschwindigkeiten ablaufen, dass die Konzentration an Marker ebenfalls geringgehalten werden kann.<sup>[43, 48-53]</sup>

Zu den wichtigsten Vertretern dieser bioorthogonalen Reaktionen gehören unter anderem die Staudinger-<sup>[54]</sup> sowie die Diels-Alder-Reaktion mit normalem oder inversem Elektronenbedarf (iEDDA)<sup>[55]</sup>, die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), die ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC) und die Photoclick-Reaktion (Schema 2).<sup>[56]</sup>

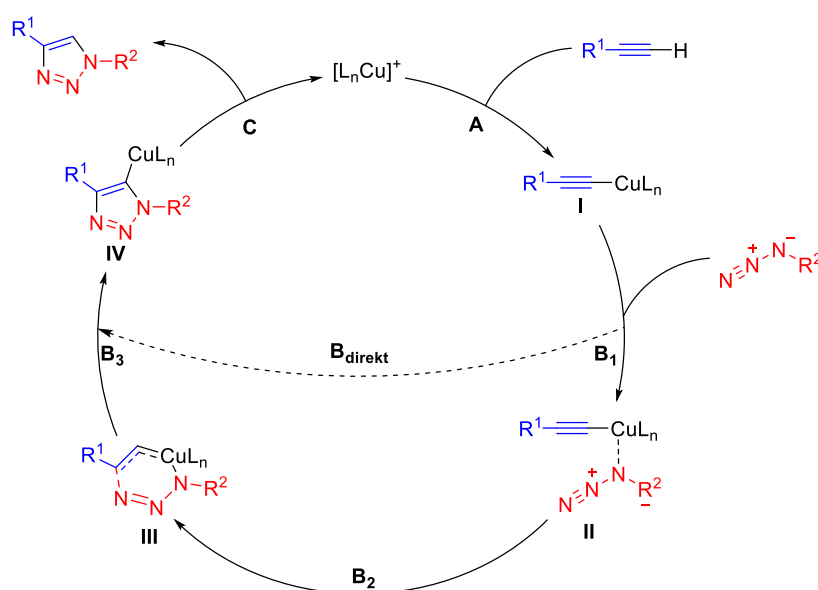


**Schema 2:** Übersicht der wichtigsten Vertreter postsynthetischer, bioorthogonaler Markierungen für Nukleinsäuren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fluoreszenz-Sonden ausschließlich mithilfe der kupferkatalysierten Click-Reaktion markiert und als Alternative dazu eine kupferfreie Photoclick-Methode entwickelt, weshalb im weiteren Verlauf näher auf diese Verfahren eingegangen werden soll.

### Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) – Click-Reaktion

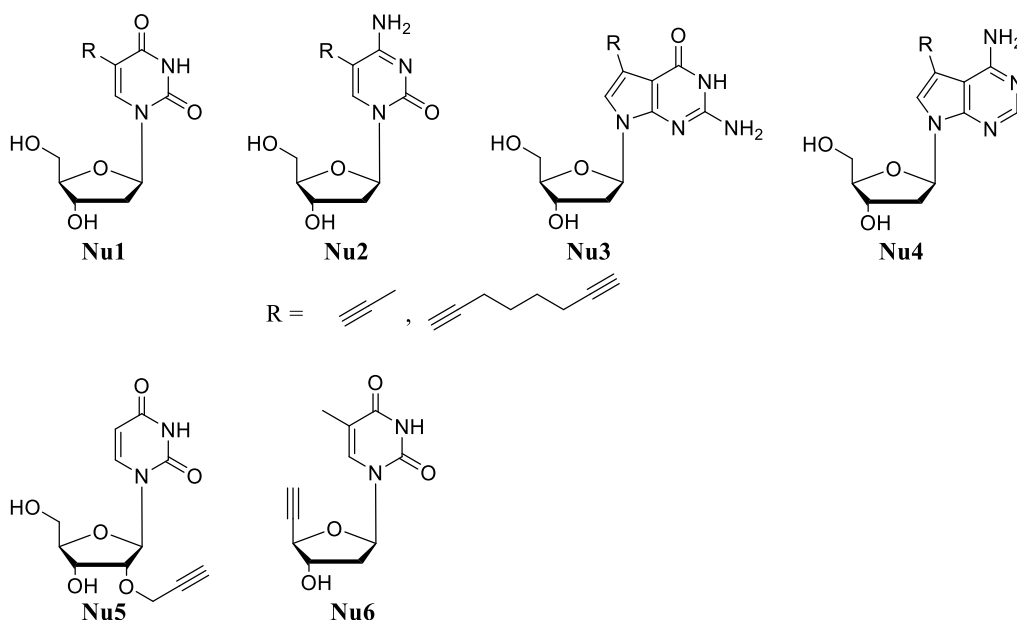
Die wohl bekannteste und meist verwendete Methode zur bioorthogonalen Markierung von Peptiden und Nucleinsäuren stellt die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) dar, wobei selektiv 1,2,3-Triazole gebildet werden.<sup>[57]</sup> Diese Reaktion verläuft nach einem konzertierten Mechanismus und wurde erstmals von ROLF HUISGEN publiziert.<sup>[58-61]</sup> Aufgrund der hohen Temperaturen und Drücke, die zur Aktivierung der Reaktion notwendig waren, eignete sich diese Methode jedoch nicht für die Anwendung in lebenden Organismen.<sup>[53]</sup> Nachdem SHARPLESS<sup>[62]</sup> und MELDAL<sup>[63]</sup> allerdings unabhängig voneinander zeigten, dass der Zusatz von Kupfer(I) die Reaktion um fast sieben Größenordnungen, im Vergleich zum unkatalysierten Huisgen-Verfahren, beschleunigt, etablierte sich diese Methode.<sup>[53]</sup> Der allgemeine Katalysezyklus ist in Schema 3 gezeigt.<sup>[62]</sup> Dieser beginnt mit der Bildung eines Kupfer(I)-Acetylids **I**, welches voraussichtlich nicht direkt in einer [3+2]-Cycloaddition mit dem Azid reagiert, sondern schrittweise über einen sechsgliedrigen Übergangszustand **III** zum Produkt umgesetzt wird. Die CuAAC weist neben ihrer hohen Effizienz unter physiologischen Bedingungen auch eine hohe Toleranz gegenüber einer Vielzahl an funktionellen Gruppen auf und ist darüber hinaus eine der schnellsten bioorthogonalen Markierungsmethoden ( $k = 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).<sup>[48]</sup> Damit erfüllt sie die von SHARPLESS formulierten Bedingungen der Click-Chemie<sup>[64]</sup> und wurde als die Click-Reaktion bekannt.



**Schema 3:** Katalysezyklus der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition nach SHARPLESS. A Bildung eines Kupfer(I)-acetylids **I**, B konzertierte [3+2]-Cycloaddition mit Zwischenstufen **B<sub>1</sub>**, **B<sub>2</sub>** und **B<sub>3</sub>**, C Regenerierung des Katalysators.

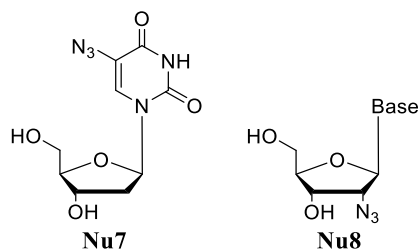
Doch die Kupferkatalyse brachte auch den großen Nachteil der Toxizität mit sich. Durch Redoxreaktionen bildet Kupfer reaktive Sauerstoffspezies, sogenannte ROS, die zu oxidativem Stress innerhalb der Zelle<sup>[65]</sup> und zudem zu DNA- und RNA-Strangbrüchen<sup>[66]</sup> führen können. Aus diesem Grund wurden kupfer(I)-stabilisierende Liganden wie beispielsweise Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA) oder Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) entwickelt, um nicht nur Oxidationen zu verhindern, sondern auch um die Wasserlöslichkeit zu verbessern und die Reaktionsgeschwindigkeit weiter zu erhöhen.<sup>[67-69]</sup> Dadurch wurde die Anwendung der Click-Reaktion *in vivo* ermöglicht,<sup>[70]</sup> was wiederum dazu führte, dass zahlreiche Alkin- und Azid-modifizierte Nucleoside synthetisiert wurden.

Prinzipiell können solche Modifikationen an verschiedene Positionen der Nucleobase, dem Zucker oder aber am Rückgrat angebracht werden.<sup>[71]</sup> CARELL, welcher ein Protokoll für die postsynthetische Modifizierung von Oligonucleotiden mithilfe der CuAAC entwickelte, veränderte die Nucleobase eines 2'-Deoxyuridins. Er funktionalisierte das Nucleosid **Nu1**, wie in Abbildung 6 gezeigt, mit zwei unterschiedlich langen Alkin-Linkern, baute diese erfolgreich über Festphasensynthese oder Polymerasen-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR) in DNA ein und untersuchte die Anwendbarkeit der Click-Reaktion für die Mehrfachmarkierung.<sup>[72-74]</sup> SEELA et al. vervollständigten das genetische Alphabet **Nu2-4** unter Verwendung derselben Alkin-Linker.<sup>[75-76]</sup> Da durch die Modifikation der Nucleobase die Struktur sowie Stabilität des DNA-Duplex beeinflusst werden, modifizierten unter anderem WAGENKNECHT et al. die 2'-Position eines Uridins **Nu5** anstelle der Nucleobase.<sup>[77]</sup> Eine weitere Möglichkeit stellt die Veränderung des Rückgrates dar. Dadurch sollen die thermodynamische Stabilität, die Resistenz gegenüber Nucleasen sowie die Aufnahme in die Zellen verbessert werden. VARIZHUK et al. synthetisierten ein Dinucleotid mit einem Triazol-Linker unter Verwendung der Click-Reaktion mit **Nu6** anstelle einer Phosphatbrücke und stellten signifikante Auswirkungen auf den Duplex fest. Durch die verkürzte Distanz zwischen den Nucleosiden (Anknüpfung von C4' und C3' anstelle C5' und C3') wird die Helix verzerrt und somit die Stabilität stark herabgesetzt.<sup>[78]</sup> Aufgrund der fehlenden negativen Ladungen sollten solche rückgratmodifizierten Oligonucleotide dennoch zellgängiger sein.<sup>[79]</sup>



**Abbildung 6:** Übersicht alkylnylfunktionalisierter 2'-Desoxyuridine **Nu1-4** und **Nu 6** sowie eines Uridins **Nu5** für die postsynthetische Modifikation von DNA/RNA mittels CuAAC.

Im Gegensatz zur Alkinmodifikation lassen sich Azide nicht über die Phosphoramidit-Festphasensynthese in Oligonukleotide einbauen. Aufgrund ihrer chemischen Instabilität gegenüber verschiedener Reagenzien während der Festphasensynthese sowie der Aufreinigung und der Tatsache, dass Azide mit Phosphor(III) eine Staudinger-Reaktion eingehen, muss auf andere Verfahren zum Einbau in DNA gesetzt werden.<sup>[80]</sup> WAGENKNECHT et al. bauten ein kommerziell erhältliches 5-Iodo-2'-desoxyuridin über Standard-Phosphoramiditmethode in DNA ein und ermöglichten mit einem Überschuss an Natriumazid die Generierung eines Azido-Oligonukleotids **Nu7** (Abbildung 7) *in situ*. Dies wurde noch auf der festen Phase mit dem Farbstoff geklickt, damit das Azid nicht während der Abspaltung und Aufarbeitung abreagiert.<sup>[81]</sup> Die Wissenschaftler um MICURA kombinierten die Standard-Phosphoramidit- mit der Phosphotriestermethode, um 2'-azidmodifizierte Nucleoside **Nu8** in RNA einzubauen. Dabei wurde die Standardmethode vor dem Einbau des modifizierten Bausteins unterbrochen und das Nucleosid manuell gekuppelt.<sup>[82-83]</sup> Diese hier gezeigten Nucleoside stellen nur eine kleine Auswahl der bisher synthetisierten alkin- und azidmodifizierten Bausteine dar, um die Möglichkeiten der Modifizierung zu verdeutlichen.



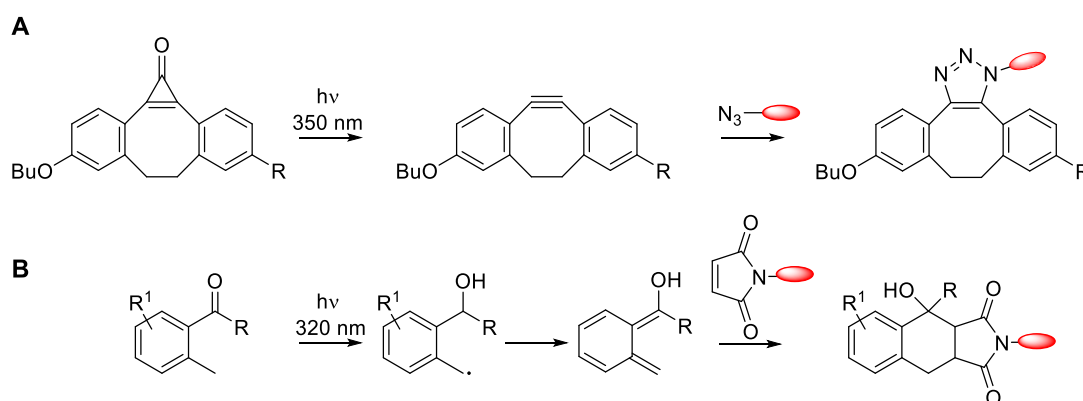
**Abbildung 7:** 5-Azido-2'-Desoxyuridin **Nu7** und 2'-Azido-2'-Desoxynucleosid **Nu8** für die Anwendung zur postsynthetischen Markierung mittels CuAAC.

Obwohl es einige Fortschritte auf diesem Gebiet gibt, bleibt die Anwendung der CuAAC für *in vivo* Experimente dennoch umstritten. Um die Verwendung von zelltoxischem Kupfer zu vermeiden, ist deshalb die Entwicklung kupferfreier Methoden unerlässlich.<sup>[84-85]</sup> Ein bekanntes Beispiel ist die ringspannungsgesteuerte Alternative der Click-Reaktion. Während bereits im Jahr 1953 BLOMQUIST und LIU die Reaktion zwischen Cyclooctin und Phenylazid als explosionsartig beschrieben,<sup>[86]</sup> fanden WITTIG und KREBS 1961 heraus, dass dabei selektiv nur ein Produkt, das Triazol, gebildet wird.<sup>[87]</sup> Inspiriert durch die Forschung dieser Wissenschaftler wandte BERTOZZI diese Chemie als bioorthogonale Markierung für Biomoleküle an und prägte damit den Begriff der ringspannungsgesteuerten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).<sup>[88]</sup> Da die Reaktion allerdings nicht wesentlich schneller als die Staudinger-Ligation ablief, wurden weitere Derivate des Cyclooctins entwickelt, um die Kinetik zu verbessern.<sup>[53, 89-93]</sup> Trotzdem kann bis heute die Reaktionsgeschwindigkeit der kupferkatalysierten Click-Reaktion ( $k = 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  vs.  $k_{\text{SPAAC}} = 10^{-2} - 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) nicht erreicht werden.<sup>[45]</sup> Zudem führt die erhöhte Hydrophobizität einiger Cyclooctin-Derivate (z.B. DIBO und BARAC) zu unspezifischen Anknüpfungen an andere Biomoleküle oder Insertion in die Zellmembran.<sup>[94]</sup>

Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Forschung, neben der Synthese fluoreszenter DNA und RNA Sonden mithilfe der Kupfer-Click-Reaktion, auch auf der Entwicklung einer metallfreien, photoinduzierten, bioorthogonalen Markierungsmethode. Im weiteren Verlauf soll näher auf diese Art Reaktion eingegangen werden.

## Lichtinduzierte Click-Reaktionen

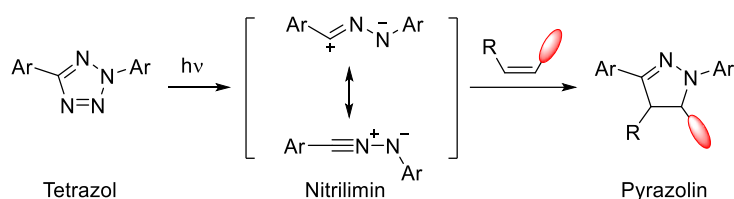
Anders als thermisch oder katalytisch aktivierte Reaktionen bieten lichtinduzierte Reaktionen durch die Verwendung von Licht als Initiator den Vorteil der präzisen Kontrolle von Start und Ende der Reaktion sowie der gezielten Aktivierung zu spezifischen Zeitpunkten an bestimmten Stellen innerhalb der Zelle oder des Organismus.<sup>[95]</sup> Diese Reaktionen beruhen auf der photochemischen Freisetzung kleiner Moleküle, wie N<sub>2</sub>, CO oder CO<sub>2</sub>, wobei hochreaktive Intermediate entstehen. Dies macht sie für die Anwendung in bioorthogonalen Konjugationen sehr attraktiv. Zudem erfüllen viele solcher Reaktionen die Bedingungen der Click-Chemie, wie beispielsweise die photoinduzierte Variante der SPAAC. POPIK et al. synthetisierten ein diarylsubstituiertes Cycloproponon, welches nach Anregung mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  innerhalb weniger Picosekunden decarboxyliert und in quantitativen Ausbeuten ein Diarylcyclooctin bildet (Schema 4 A).



**Schema 4:** Photoinduzierte, bioorthogonale Markierungsmethoden. **A** Ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition unter Verwendung eines cyclopropononmaskierten Cyclooctins, **B** Diels-Alder-Reaktion mithilfe der *in situ* Erzeugung von Photoenolen.

Dies reagiert in einer ringspannungsgesteuerten Cycloaddition mit einem Azid zum Triazol. Damit konnten nicht nur Oberflächen funktionalisiert, sondern auch lebende Zellen markiert werden.<sup>[96-97]</sup> Neben der SPAAC wurde auch die Diels-Alder-Reaktion derart verändert, dass sie mithilfe von Licht initiiert werden kann. Dabei werden aus Methylphenylketonen oder -aldehyden Photoenole generiert, die anschließend mit Maleinimiden in einer *in situ* [4+2]-Cycloaddition reagieren (Schema 4 B). BARNER-KOWOLLIK et al. gelang es damit, Polymere zu verknüpfen,<sup>[98]</sup> Oberflächen zu funktionalisieren<sup>[99]</sup> und DNA-Protein-Konjugate herzustellen.<sup>[100]</sup>

Eine weitere lichtinduzierte Cycloaddition stellt die 1,3-dipolare Cycloaddition von Tetrazolen mit elektronenarmen Alkenen zu Pyrazolinen dar, welche in Schema 5 dargestellt ist. Bereits im Jahr 1967 entdeckten HUISGEN und SUSTMANN, dass durch Erhitzen Stickstoff aus dem Tetrazol entweicht, wobei ein Nitrilimin gebildet wird, das mithilfe von Dipolarophilen abgefangen werden kann.<sup>[101]</sup> Etwa 40 Jahre später griffen Lin et al. diese Reaktion auf und generierten das Zwischenprodukt durch Belichten des Diaryltetrazol mit UV-Licht ( $\lambda_{\text{exc}} = 302 \text{ nm}$ ).<sup>[102]</sup> Die sogenannte Photoclick-Reaktion verläuft sehr selektiv sowohl *in vitro* als auch in lebenden Zellen.<sup>[103]</sup> Um jedoch Photoschäden in Organismen zu verhindern oder zumindest zu minimieren, ist eine Aktivierung bei höheren Wellenlängen unabdingbar.



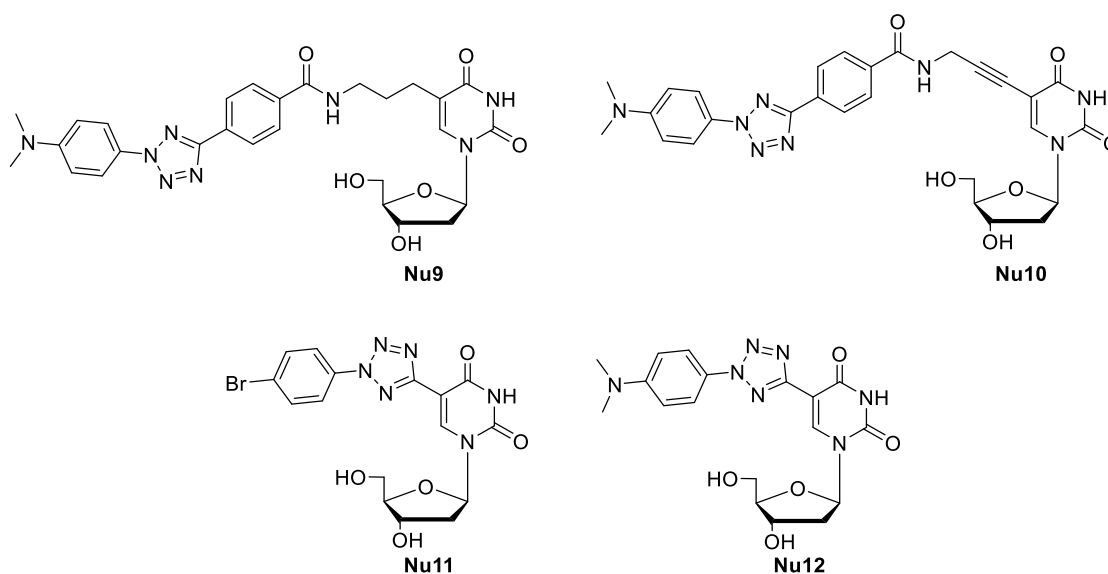
**Schema 5:** Mechanismus der Photoclick-Reaktion. Durch Belichtung des Tetrazols entweicht elementarer Stickstoff, wobei ein Nitrilimin gebildet wird. Dieses reagiert mit einem elektronenarmen Alken in einer Cycloaddition zum Pyrazolin.

LIN untersuchte den Einfluss verschiedener Substituenten am N-Phenylring und konnte damit zeigen, dass elektronenschiebende Gruppen in para-Position mit dem  $\pi$ -System des Tetrazols interagieren und deshalb das Absorptionsmaximum bathochrom verschieben. In der ortho-Position dagegen beeinflussen die Substituenten die planare Anordnung und führen zu einer hypsochromen Verschiebung.<sup>[104]</sup> In direkter Verbindung dazu steht die Reaktionsgeschwindigkeit. Durch die elektronenschiebenden Gruppen in para-Position des N-Phenylrings wird das höchst besetzte Orbital (HOMO) des Tetrazols und somit des Nitrilimins angehoben und die Geschwindigkeit der Photoclick-Reaktion erhöht.<sup>[105-106]</sup> Über die Jahre wurden viele weitere Tetrazolderivate synthetisiert, wobei über einen Zwei-Photonenprozess oder unter Verwendung von Aufkonversions-Nanopartikeln Anregungswellenlängen von  $\lambda_{\text{exc}} = 700 \text{ nm}$  bis hin zu  $\lambda_{\text{exc}} = 974 \text{ nm}$  ermöglicht wurden.<sup>[107-110]</sup> Da die Anregungswellenlänge also keine große Rolle mehr spielte, wurde verstärkt auf die Biokompatibilität geachtet. So kann die Reaktion nicht nur in organischen, sondern auch in protischen Lösungsmitteln, wie Wasser oder Puffer, durchgeführt werden.<sup>[102]</sup> Dabei ergeben sich allerdings auch Nachteile bezüglich



der Chemoselektivität, denn das Nitrilimin ist so reaktiv, dass es mit Wasser zu einem Hydrazid abreagiert.<sup>[106, 109, 111]</sup> In der zellulären Umgebung, welche eine Vielzahl an verschiedenen Funktionalitäten und Ionen enthält, werden zusätzlich Nebenreaktionen begünstigt. So können Reaktionen mit Thiolen, Aminen oder Carbonsäuren stattfinden.<sup>[112-115]</sup> Um das Biomolekül hinsichtlich Struktur und Dynamik möglichst wenig zu stören, wurde außerdem der Einbau von Alkenen anstelle des Tetrazols und die darauffolgende postsynthetische Photoclick-Reaktion untersucht.<sup>[103, 106, 116]</sup> Unter Verwendung von Spirohexenen kann dabei die Reaktionsgeschwindigkeit auf bis zu  $k = 34000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  gesteigert werden.<sup>[117]</sup> Ein besonderer Vorteil bietet zudem die fluorogene Wirkung des gebildeten Pyrazolins. LIN et al. synthetisierten dafür zwei verschiedene Taxoid-Tetrazole, welche eine intramolekulare Reaktion eingehen und dabei eine starke Pyrazolin-Fluoreszenz zeigen.<sup>[114, 118]</sup>

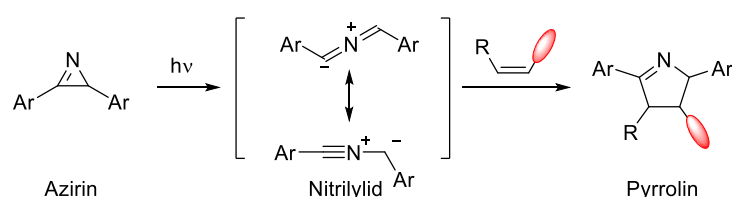
Die hier zusammengefassten Experimente wurden anfangs lediglich an Proteinen durchgeführt,<sup>[103, 106]</sup> während im Bereich der Nukleinsäurechemie kaum etwas in der Literatur zu finden war. WAGENKNECHT et al. synthetisierten die ersten Tetrazol-2'-desoxynukleoside **Nu9-12** (Abbildung 8) und bauten diese erfolgreich über Festphasensynthese sowie enzymatisch in DNA ein.<sup>[84, 119-120]</sup>



**Abbildung 8:** Strukturen der synthetisierten Tetrazol-2'-desoxynukleoside **Nu9-12** für die postsynthetische Markierung von DNA und RNA mittels Photoclick-Reaktion.

Photoclick-Experimente mit einem Sulfo-Cy3-Maleinimid und einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ ,  $365 \text{ nm}$  und  $405 \text{ nm}$  in wässrigem Medium lieferten Geschwindigkeitskonstanten von  $k_2 = 23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bis  $k_2 = 89 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Interessanterweise konnte bei dieser Architektur ein Energietransfer von dem gebildeten Pyrazolin auf den Farbstoff beobachtet werden. Das umgekehrte Verfahren wurde von RENTMEISTER et al.<sup>[121]</sup> und ZHANG et al.<sup>[122]</sup> in DNA und RNA angewandt. Erstere bauten ein 4-Vinylbenzyl-5'-Guanosin enzymatisch am 5'-Ende einer RNA ein und konnten diese erfolgreich mit einem Diaryltetrazol markieren, während ZHANG et al. 5-Vinyl-2'-desoxyuridin metabolisch in DNA einbrachten und mit einem wasserlöslichen Tetrazol clickten ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ ).

Eine Alternative zur Photoclick-Reaktion wurde von LIN et al. entwickelt. Hierbei wird durch Photolyse eines Diaryl-2*H*-azirins eine Ringöffnung ausgelöst und ein Nitrilylid gebildet, welches mit elektronenarmen Alkenen zu einem Pyrrolin weiterreagiert (Schema 6).<sup>[123]</sup> Damit konnten bereits erfolgreich Proteine markiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Intermediat im Vergleich zum Nitrilimin, welches durch Rotation um die Doppelbindung Energie abgibt, kaum Energie verliert und aufgrund dessen schneller mit dem Dipolarophil reagiert. Folglich sollte die Azirin-Alken-Cycloaddition eine höhere Geschwindigkeitskonstante als die Photoclick-Reaktion aufweisen.



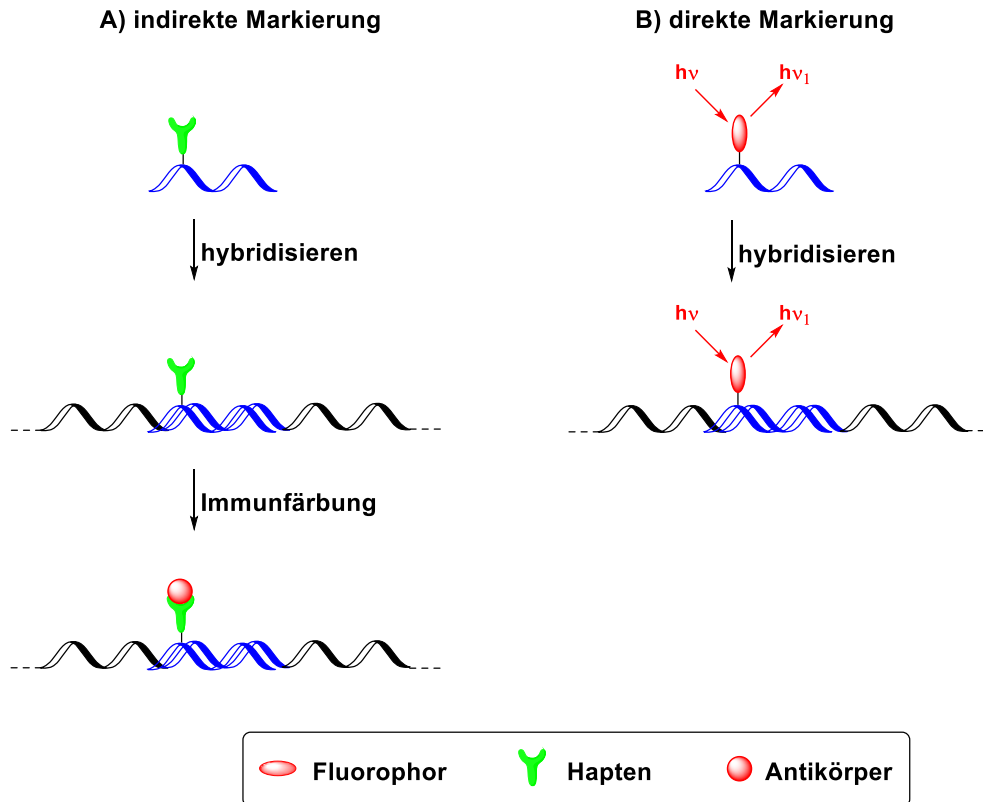
**Schema 6:** Mechanismus der Photoclick-Reaktion mit 2*H*-Azirinen. Durch Belichtung wird der Heterozyklus geöffnet, wobei ein Nitrilylid entsteht, welches mit elektronenarmen Alkenen zu einem Pyrrolin reagiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene azirinmodifizierte Nucleoside zur Detektion von DNA und RNA synthetisiert und deren Anwendung in einer photoclick-artigen Reaktion getestet. Aus diesem Grund wird im Kapitel 3 näher auf die Eigenschaften, Synthese und Reaktivität von Azirinen eingegangen.

### 2.2.2 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Als *in-situ*-Hybridisierung wird ein Verfahren zur Detektion und Lokalisierung von DNA und RNA innerhalb von Zellen oder Gewebe bezeichnet, welches auf der Hybridisierung einer markierten Nukleotid-Sonde mit der Zielsequenz beruht. Anfänglich wurden dafür radioaktive Moleküle verwendet, die in das Nukleotid eingebaut wurden und nach Anbinden an das gewünschte Biomolekül mithilfe der Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. Diese Isotopenmarkierung, erstmals von GALL und PARDUE im Jahr 1969 verwendet, brachte jedoch einige Nachteile mit sich.<sup>[124]</sup> Zum einen sind radioaktive Proben nicht nur kostspielig und gefährlich, sondern auch sehr instabil, da die Isotope mit der Zeit zerfallen. Dadurch kann kein dauerhaft konstantes Signal erzeugt werden. Zum anderen werden lange Belichtungszeiten benötigt, um ein messbares Signal zu erhalten. Obwohl die Radiographie als sehr sensitive Methode gilt, hat sie zudem nur eine geringe Auflösung.<sup>[125-126]</sup> Die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung weist dagegen eine verbesserte Auflösung, Geschwindigkeit und Sicherheit auf und ermöglichte außerdem die parallele Detektion von mehreren Zielmolekülen, eine quantitative Analyse und die Bildgebung in lebenden Zellen.<sup>[126]</sup> Bei dieser Methode werden anstelle von radioaktiven Molekülen fluoreszente Marker verwendet, wobei zwischen indirektem und direktem Markieren unterschieden wird. Während RUDKIN und STOLLAR<sup>[127]</sup> DNA-RNA-Hybride mit Antikörpern anfärbten und diese über Immunofluoreszenz visualisierten, verknüpften BAUMANN et al.<sup>[128]</sup> die gewünschte RNA-Sequenz kovalent mit einem Fluorophor (s. Abbildung 9).

Zu Beginn sollten mit dieser Methode ganze Gene auf den Chromosomen detektiert werden, weshalb auch die Fluoreszenzsonden sehr lang waren. Diese wurden beispielsweise über das Wachstum mithilfe eines Vektors, der *Nick*-Translation oder *in-vitro* Transkription (Polymerasenkettenreaktion PCR) hergestellt.<sup>[129]</sup> Doch lange Stränge haben oft sich wiederholende Sequenzteile und binden sehr unspezifisch, wodurch es zu einem hohen Hintergrundsignal kommt. Werden die Proben verkürzt, kann dieser Nachteil umgangen werden. Damit ging der Trend zusätzlich Richtung Detektion kürzerer Zielsequenzen wie z.B. nicht-codierende RNAs (vor allem miRNA).<sup>[130]</sup> Oft sind die Zielmoleküle jedoch in geringer Konzentration in der Zelle vorhanden, weshalb nur ein sehr schwaches Signal erhalten wird, das schwer zu detektieren ist. Mithilfe der Entwicklung verbesserter Algorithmen zur Auswertung der Fluoreszenzsignale und dem Fortschritt auf dem Gebiet der Mikroskopie hin



**Abbildung 9:** Grundlegendes Prinzip der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung. (A) indirekte Markierung durch Immunostaining; (B) direkte Markierung mittels kovalenter Verknüpfung eines Fluorophors an die Sequenz.

zur Hochauflösung wurde es jedoch möglich, auch schwache Signale gut aufzulösen. Daneben wurde zudem die Synthese der FISH-Sonden sowie deren Design stetig verbessert, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse aufgrund von unspezifischer Bindung oder unhybridisierter Probe zu verhindern. Vor allem die Sensitivität, Spezifität und Auflösung standen dabei im Fokus. Es wurden Sonden hergestellt, die aufgrund der Verwendung von spektroskopisch deutlich unterscheidbaren Fluorophoren die simultane Detektion von mehreren Spezies erlaubt.<sup>[131-133]</sup> Weiterhin wurden PNA sowie LNA-Stränge modifiziert oder ähnliche Antisense-Modifikationen angewendet, mit dem Ziel, die Affinität und Spezifität gegenüber der Zielsequenz zu erhöhen und ein stärkeres Hybrid zu generieren. Infolgedessen haben sich zahlreiche, verschiedenartige Anwendungen der FISH-Technologie entwickelt. Die meisten Varianten werden durch die Kombination eines entsprechenden Präfixes mit dem Akronym FISH benannt, z.B. *multiple* FISH (M-FISH), CasFISH, PNA-FISH, *single molecule* FISH (smFISH) und viele mehr.<sup>[134]</sup>

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Detektion einer mRNA auf Einzelmolekülebene, weshalb die Einzelmolekül FISH-Technik (smFISH) angewandt wurde. Bereits 1998 veröffentlichten SINGER et al.<sup>[135-136]</sup> eine Methode, deren Sensitivität ausreicht, um einzelne mRNA-Sequenzen zu analysieren. Wie in Abbildung 10 A gezeigt, markierten sie die Sonden mit bis zu fünf Farbstoffen, um auch einzelne, gering konzentrierte mRNA-Stränge visualisieren zu können. Ein großer Nachteil zeigte sich jedoch durch das unspezifische Binden dieser Proben. Denn das intensive Signal der ungebundenen Sequenz konnte nicht von dem tatsächlichen Hybrid unterschieden werden. Um dies zu umgehen, entwickelten RAJ et al. eine ähnliche smFISH-Methode (Abbildung 10 B).<sup>[137-138]</sup> Sie markierten mehrere Stränge, die alle zu einem anderen Teil der mRNA komplementär sind, mit jeweils nur einem Farbstoff. Dadurch sollen falsch positive Ergebnisse vermindert werden, da das Signal erst dann detektierbar wird, wenn mindestens zehn Proben an die Zielsequenz binden.<sup>[139]</sup> Alle sogenannten *off-target* Proben, die nicht spezifisch binden, generieren lediglich ein schwaches, diffuses Signal und können eindeutig von einem positiven Ergebnis unterschieden werden.

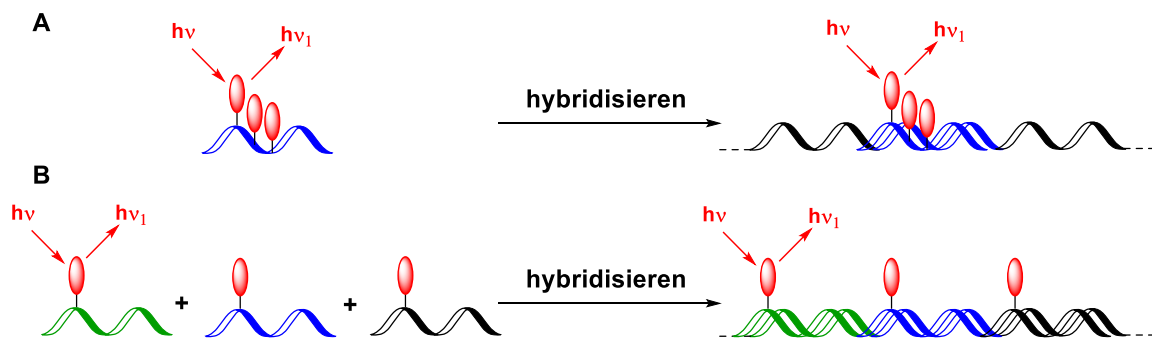


Abbildung 10: Einzelmolekül Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (smFISH) nach SINGER A und RAJ B.

Trotz des großen Fortschritts im Bereich der FISH-Technologie bleibt dennoch bis heute der Nachteil des starken Hintergrundsignals durch nicht ausgewaschene, ungebundene Probe, welches das Ergebnis verfälscht und für die Anwendung unbrauchbar macht. Um dieses Hintergrundrauschen zu reduzieren, wurden andere Verfahren, wie beispielsweise das durch Interkalation erzwungene Aufleuchten (*Light-up* oder *forced intercalation probes* FIT), entwickelt. Während SVANVIK et al.<sup>[140]</sup> einen TO-Farbstoff über einen Linker an Peptid-Nukleinsäuren einbaute, verwendeten SEITZ et al.<sup>[141-142]</sup> ein TO-Basensurrogat. In beiden Fällen interkaliert der Farbstoff nach dem Hybridisieren in die Helix, löst dadurch einen

Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute aus. Die Gruppe von SEITZ konnte jedoch zeigen, dass FIT Proben sensitiver als Light-Up Sonden sind, da die Interkalation nicht so stark von der PNA-Sequenz abhängig ist.<sup>[143]</sup> Mit dieser Methode ist es möglich, auch Fehlpaarungen zu detektieren, denn dadurch bleibt dem TO-Farbstoff mehr Raum zum Rotieren, wodurch ein Großteil der Energie strahlungslos abgegeben wird.

Eine andere Möglichkeit, das Hintergrundsignal zu reduzieren, ist die Verwendung von exzitonkontrollierten hybridisierungssensitiven Oligonukleotiden (ECHO). Diese von OKAMOTO et al.<sup>[144]</sup> entwickelte Methode nutzt ebenfalls die Fähigkeit des TO-Farbstoffes, in DNA zu interkalieren. Dafür wurde ein diaminomodifiziertes 2'-Desoxynukleosid in DNA eingebaut und postsynthetisch mit zwei Farbstoffen markiert. Im Einzelstrang findet aufgrund der räumlichen Nähe zueinander ein Löschen der Emission durch Exziton-Wechselwirkung statt. Hybridisiert die Sonde jedoch mit der Zielsequenz, so interagieren die TO-Chromophore mit dem Duplex und die Emission steigt an.

Außer den hier beschriebenen Methoden gibt es auch photochemische Konzepte, die auf einem Energietransfer beruhen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine der Fluoreszenzsonden basierend auf einem Energietransfer entwickelt, weshalb dieses Thema in dem nächsten Kapitel näher beschrieben werden soll.

### 2.2.3 Energietransferbasierte Nukleinsäure-Architekturen

#### Allgemeines

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 erläutert wurde, eignet sich ein FRET-System, aufgrund der Abstandsabhängigkeit und Empfindlichkeit gegenüber der Orientierung der Farbstoffe zueinander, für die Beobachtung verschiedenartigster, biologischer Prozesse. Häufig wird die Technik als „*spectroscopic ruler*“ verwendet,<sup>[27-28, 32-33]</sup> um die Kinetik von Proteinfaltungen,<sup>[145]</sup> Spaltungen oder Bindungen von Biomolekülen zu untersuchen. Zusammen mit den Entwicklungen im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich solche Verhaltensweisen mittlerweile sogar in Echtzeit auf Einzelmolekülebene in lebenden Zellen oder *in vivo* detektieren.<sup>[146]</sup> Im Vergleich zu den Biosensoren mit nur einem Farbstoff bietet die FRET-Technik zahlreiche Vorteile. Denn erst genannte erfordern einen zusätzlichen Waschschritt, da auch ungebundene Proben oder Farbstoff fluoreszieren und damit das Ergebnis verfälschen. Außerdem können die Signale der traditionell verwendeten Biosensoren oftmals nicht von der Autofluoreszenz der Zelle oder des Gewebes unterschieden werden. Unter Verwendung von FRET-Systemen wird das Fluoreszenzsignal erst durch Wechselwirkung mit dem Zielmolekül verändert bzw. aktiviert, was das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis und folglich die Sensitivität verbessert. Generell lassen sich FRET-basierte Nukleinsäure-Sonden in zwei große Klassen einteilen: Fluorophor-*Quencher*-Paare,<sup>[147]</sup> bei welchen die Änderung des Fluoreszenzsignals auf der Intensitätsänderung beruht oder Fluorophor-Fluorophor-Paare,<sup>[148]</sup> die einen Wechsel der Fluoreszenzfarbe hervorrufen. Neben organischen Molekülen können hierfür auch anorganische Materialien verwendet werden. Dazu zählen Metall-Nanopartikel,<sup>[149]</sup> Kohlenstoff-Nanomaterialien oder Quantenpunkte (*quantum dots*),<sup>[150]</sup> auf die jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Eine Herausforderung bei der Wahl des FRET-Paares stellt das Wechselspiel von optimalem Grad an spektraler Überlappung von Donor-Emission und Akzeptor-Absorption und spektraler Verschiebung der Emission von Donor und Akzeptor dar. Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, ist eine maximale Überlappung notwendig, um einen effizienten Energietransfer zu erzielen. Überlappen die beiden Spektren jedoch zu stark, so können die Farbstoffe nicht mehr unabhängig voneinander angeregt werden, was den FRET vermindert. Außerdem ist es wichtig, dass die Emission des Akzeptors deutlich von der des Donors unterscheidbar ist. Deshalb wird häufig ein Akzeptor mit einer großen STOKES-Verschiebung eingesetzt. Darüber hinaus sollten Farbstoffe für die Hochauflösungs-Mikroskopie hell sein, hohe

Fluoreszenzquantenausbeuten aufweisen, kaum ausbleichen und im sichtbaren UV- oder IR-Bereich emittieren.<sup>[151-152]</sup> Häufig verwendete Farbstoffe sind BODIPYs, Fluoresceine, Cyanine oder Rhodamine sowie ATTO und Alexa.<sup>[153-155]</sup> Auch der *Quencher*, welcher die Energie des angeregten Donor-Farbstoffes absorbiert, jedoch lediglich strahlungslos wieder abgibt, sollte eine große spektrale Überlappung mit dem Emissionsspektrum des Donors aufweisen. Oft werden „*Black hole quencher*“ (BHQ) oder 4-(4'-Dimethylaminophenyl-azo)benzoesäure (DABCYL) als Fluoreszenzlöscher verwendet.<sup>[156]</sup> Diese organischen Moleküle können je nach gewünschter Anwendung in unterschiedliche Nukleinsäure-Architekturen wie *Molecular Beacons*, Aptamere, Origamis, DNAzyme oder wellenlängenverschiebenden Sonden als Basensurrogate direkt eingebaut oder über Linker kovalent verknüpft werden.<sup>[157]</sup>

### **DNA/RNA-Sonden mit einem Fluorophor-*Quencher*-Paar (Fluoreszenzlöschung)**

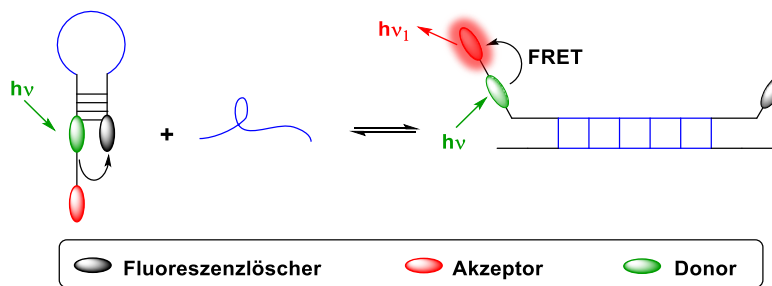
*Molecular Beacons* (MBs) sind die wohl am häufigsten verwendeten Strukturen, die mit einem Donor-Akzeptor-Paar versehen wurden, um Hybridisierungen mit DNA oder RNA in Echtzeit in lebenden Zellen zu untersuchen. MBs sind einzelsträngige Oligonukleotide, die aus einer Schlaufe und einer Stammregion bestehen (Abbildung 11). Die Schlaufe enthält die Erkennungssequenz für das Zielmolekül und wird von den beiden Armen der Stammregion flankiert. In Abwesenheit des Zielmoleküls bleibt die Stammregion geschlossen und öffnet sich erst durch Hybridisieren mit diesem.<sup>[158-160]</sup> Im Jahr 1996 modifizierten TYAGI und KRAMER<sup>[147]</sup> die Stammregion mit einem Fluorophor an einem und einem Fluoreszenzlöscher am anderen Arm. Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Moleküle wird die Fluoreszenz durch einen Energietransfer gelöscht. Sobald die Zielsequenz jedoch auf das MB stößt, hybridisieren die beiden Stränge und es kann infolge der konformativen Änderung kein Energietransfer mehr stattfinden, wodurch der Farbstoff emittiert. Viele weitere MBs wurden entwickelt, um die Sensitivität zu erhöhen und die Detektion in Echtzeit zu ermöglichen. Dabei wurden unter anderem zusätzliche Farbstoffe verwendet, die nach Hybridisieren interkalieren und dabei die Fluoreszenz ansteigt,<sup>[161]</sup> oder aber die Sequenz der Schlaufe mit photogeschützten Nukleosiden versehen, damit die Stränge erst durch Aktivierung mit Licht hybridisieren können.<sup>[162]</sup> Trotzdem erfolgt dabei das Auslesen der Ergebnisse lediglich über die Intensität nur einer Wellenlänge.<sup>[163]</sup> Um diesen Nachteil zu umgehen, wurden Nukleinsäure-Sonden entwickelt, die auf dem Prinzip der Wellenlängenverschiebung anstelle der Fluoreszenzlöschung beruhen.



## DNA/RNA-Sonden mit einem Fluorophor-Fluorophor-Paar (Wellenlängenverschiebung)

### Molecular Beacons

TYAGI und KRAMER verbesserten ihr *Molecular Beacon* mithilfe eines zusätzlichen Emitters und prägten somit den Begriff der wellenlängenverschiebenden Energietransfersonden. Sie versahen das MB am 5'-Ende mit einem Fluorophor (Fluorescein), sodass es in der Haarnadelstruktur in direkter Nähe zum Fluoreszenzlöcher (DABCYL), welcher am 3'-Ende angebracht wurde, platziert war. Zusätzlich wurde am 5'-Ende, in einer Distanz von mehreren Nukleotiden, ein Emitter (TAMRA, Texas Red, 6-Carboxyrhodamin) kovalent verknüpft.

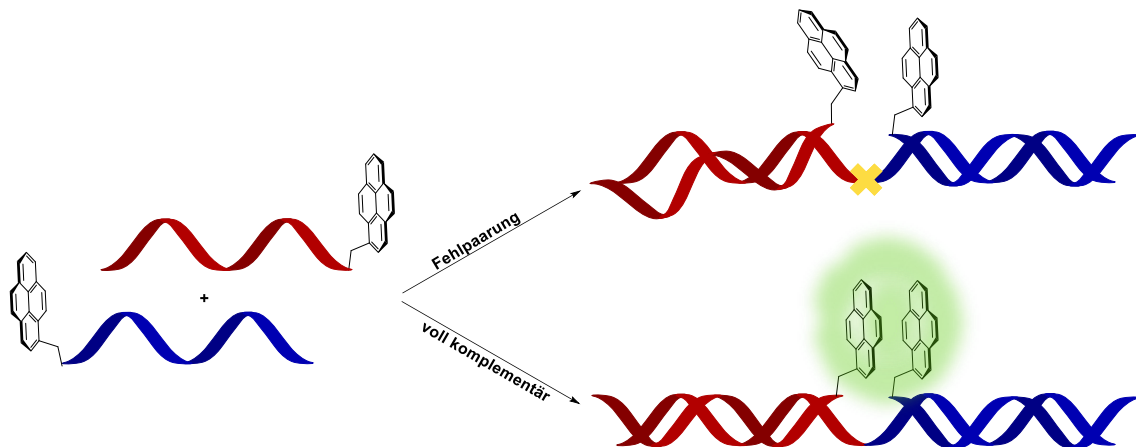


**Abbildung 11:** Prinzip des wellenlängenverschiebenden *Molecular Beacons* nach TYAGI und KRAMER.

Dadurch konnte in Abwesenheit der Zielsequenz kein Signal detektiert werden, während sich nach Hybridisierung die zuvor geschlossene Struktur öffnet und ein Energietransfer auf den Emitter stattfinden kann (Abbildung 11).<sup>[148]</sup> Im Gegensatz dazu ersetzen ZHANG et al. den Fluoreszenzlöcher direkt durch einen zweiten Farbstoff. Durch die räumliche Nähe in der geschlossenen Form ist ein Energietransfer vom Donor (Coumarin) auf den Akzeptor (6-Carboxyfluorescein, 6-FAM) möglich. In der offenen Form ist der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren für einen FRET zu weit. Dabei ändert sich die Emissionswellenlänge, was als Farbänderung mit dem bloßen Auge beobachtet werden kann und somit die Detektion vereinfacht.<sup>[163]</sup> Diese Sonden wurden über die Jahre immer weiter entwickelt. Es wurden andere Farbstoffe oder fluoreszente Nukleobasen eingesetzt, die neben der *steady-state* Fluoreszenzspektroskopie auch Fluoreszenzlebenszeitmessungen erlauben, sowie die Hybridisierung der Stammregion durch erhöhten Grad an G-C-Paaren verstärkt.<sup>[164-166]</sup>

### Bildung von Excimeren

Ein weiteres Beispiel beruht auf der Wellenlängenverschiebung aufgrund von Excimer-Bildung. Pyren-Pyren-Excimere sind ein beliebtes System, da dabei eine Verschiebung der Emissionswellenlänge von ungefähr 120 nm erreicht werden kann.<sup>[167-168]</sup> Häufig werden diese zur Erkennung von Fehlpaarungen eingesetzt,<sup>[169]</sup> so z. B. der pyren-2'-deoxyadenosin-modifizierte MB von KIM et al.<sup>[170]</sup> Dieses zeigt eine starke Excimer-Fluoreszenz, solange die Haarnadelstruktur intakt ist. Nach Hybridisieren mit einer voll komplementären Zielsequenz ist eine hypsochrome Verschiebung zu beobachten, die für die Pyren-Monomer-Fluoreszenz spricht. Liegt jedoch eine Fehlpaarung vor, so kann der MB nicht an das Zielmolekül binden und behält die geschlossene Form bei.<sup>[170]</sup> Abbildung 12 zeigt eine ähnliche Architektur, welche von WENGEL et al. synthetisiert wurde. Dabei wurden zwei LNA-Sequenzen am 3'- und 5'-Ende mit Pyreneinheiten so modifiziert, dass sie bei Anwesenheit einer vollkomplementären Sequenz in direkter Nähe zueinanderstehen und aufgrund der Excimerbildung stark emittieren. Bei einem sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) kann der Excimerkomplex nicht ausgebildet werden.<sup>[171]</sup> Neben Pyren-Pyren-Excimeren wurden auch Chromophore wie Thiazolorange (TO) als wellenlängenverschiebende Sonden eingesetzt, um die Hybridisierung mit DNA/RNA oder den Transport in die Zelle zu studieren.<sup>[172-173]</sup>

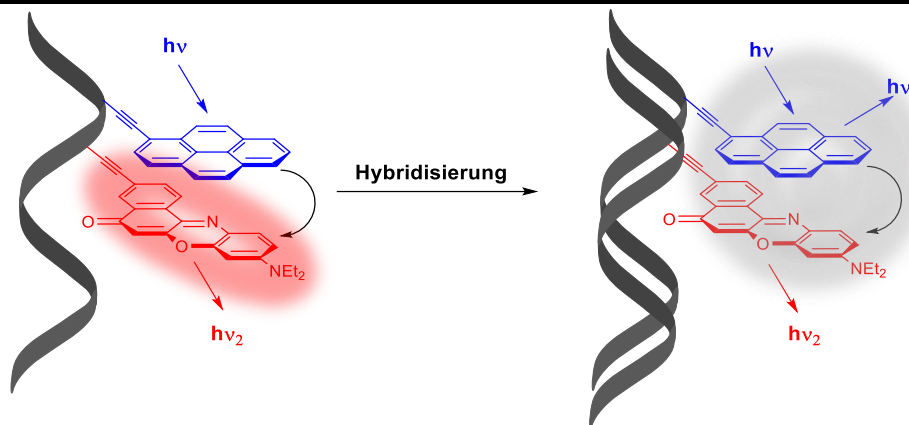


**Abbildung 12:** Prinzip der Wellenlängenverschiebung aufgrund von Pyren-Pyren-Excimeren nach WENGEL et al.

### Weißlicht emittierende DNA (*white light emitting DNA*, WED)

Desweiteren entwickelten die Wissenschaftler um WAGENKNECHT die sogenannte Weißlicht emittierende DNA (WED, s. Abbildung 13).<sup>[174-175]</sup> In dieses System wurden Pyren

( $\lambda_{em} = 400 - 600 \text{ nm}$ ) und Nilrot ( $\lambda_{em} = 600 - 750 \text{ nm}$ ) über Ethinylbrücken an die 5-Position von 2'-Desoxyuridinen angeknüpft und anschließend mittels Festphasensynthese erfolgreich in DNA eingebaut. Dabei ermöglicht der unflexible Alkinlinker nicht nur eine sterische Trennung der Pyreneinheit vom Basenstapel, sondern auch eine starke elektronische Kupplung zwischen dem Farbstoff und der Nukleobase, was das Emissionsverhalten erheblich beeinflusst.<sup>[176-177]</sup> Die beiden Bausteine wurden in direkter Nachbarschaft zueinander eingebaut, um eine optimale elektronische Interaktion der beiden zu gewährleisten. Nach Anregung des Pyren-Farbstoffes im Einzelstrang erfolgt ein sehr effizienter Energietransfer (92 %) auf Nilrot mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $k = 5.24 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ , woraufhin eine rote Emission beobachtet werden kann. Im Doppelstrang hingegen werden die beiden Chromophore helikal gegeneinander verdreht, was zu einer Änderung der Dipolmoment-Anordnung führt und dadurch die Effizienz des Energietransfers (83 %;  $k = 1.69 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ ) herabgesetzt wird. Das bedeutet, dass die Emission des Nilrots fällt, während gleichzeitig die Fluoreszenz des Pyren ansteigt.



**Abbildung 13:** Prinzip der white-light emitting DNA (WED) nach WAGENKNECHT et al.

Die Kombination dieser beider Fluoreszenzfarben ergibt eine weiße Emission, welcher WEDs ihren Namen verdanken. Im Jahr 2010 wurde dieses Konzept auf MBs übertragen und damit eine mehrfarbige Architektur geschaffen. In der Haarnadelstruktur sind die Farbstoffe in optimaler Distanz zueinander, weshalb ein Energietransfer stattfinden und die rote Emission des Nilrot beobachtet werden kann. Nach Zugabe der Zielsequenz entfernen sich die Chromophore voneinander. Als Konsequenz emittiert das Pyren in seiner typisch blauen Farbe. Ist der MB nicht vollständig komplementär zum Zielmolekül und enthält

Fehlpaarungen, so kommt es lediglich zu einer partiellen Hybridisierung, was wiederum zu einer weißen Fluoreszenz führt.<sup>[178]</sup>

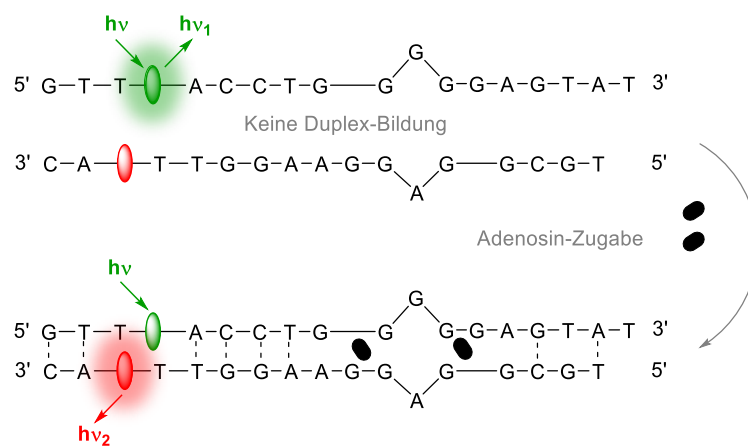
### **DNA/RNA-Traffic-Lights**

Wie bereits erwähnt, stellt die Wahl der verwendeten Farbstoffe eine der größten Herausforderung für die Entwicklung solcher Konzepte dar. Denn im Hinblick auf die Anwendungen im lebenden Organismus sollten die Chromophore unter anderem mit einer Wellenlänge über 450 nm anregbar sein und zudem eine große bathochrome Verschiebung aufweisen, um die Autofluoreszenz einiger Zellbestandteile zu umgehen und das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu verbessern.<sup>[179]</sup> Das Cyanin-Farbstoffpaar Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR) ist ein sehr beliebtes Energietransferpaar, welches die oben genannten Kriterien erfüllt ( $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{shift} = 140 \text{ nm}$ ) und wurde in einer Reihe verschiedener wellenlängenverschiebender Architekturen (MB, Aptasensoren oder siRNA-Sonden) eingeführt. Aufgrund des Emissions-Farbwechsels von grün nach rot ist dieses Konzept auch unter dem Namen „**DNA/RNA-Traffic-Lights**“ bekannt.<sup>[14-16, 180-181]</sup> In dieser Arbeit liegt der Fokus unter anderem auf der Verbesserung dieses Konzepts, weshalb näher darauf eingegangen wird.

In die „DNA/RNA-Traffic-Lights“ wurden die beiden Farbstoffe entweder über einen acyclischen Linker als Basensurrogate oder mithilfe der CuAAC eingebaut.<sup>[14-16, 180-181]</sup> Aufgrund der Verwendung des acyclischen Linkers fehlt das Zuckergerüst und die Nukleobase. Dadurch soll eine Interkalation der Farbstoffe in den Basenstapel ermöglicht werden, um den Duplex zu stabilisieren. Hierbei werden Grundzustands-Dimere ausgebildet, die jedoch nicht mehr unabhängig voneinander angeregt werden können. Dies führt dazu, dass die Energietransfereffizienz herabgesetzt wird.<sup>[180, 182]</sup> Deshalb wurde der Einfluss der Orientierung von Donor und Akzeptor sowie die Distanz zwischen den beiden Chromophoren und die Umgebung näher untersucht.<sup>[15, 181]</sup>

Ein möglichst hohes Kontrastverhältnis von roter zu grüner Emission ( $I_A/I_D$ ) ist besonders für bioanalytische Anwendungen von großer Bedeutung. So wurde dieses Konzept zunächst an MBs entwickelt und optimiert und anschließend auf ein Aptamer als Biosensor (Aptasensor) übertragen.<sup>[15]</sup> Aptamere sind einzelsträngige DNA oder RNA Sequenzen, die mit einer Bindungsstelle versehen sind und zur Detektion von kleinen Molekülen eingesetzt werden.<sup>[183]</sup> Sie können mithilfe des SELEX-Verfahrens, das im Jahr 1990 von SZOSTAK<sup>[184-185]</sup> und GOLD<sup>[186]</sup> publiziert wurde, aus einer Bibliothek vieler zufälliger Sequenzen isoliert werden.

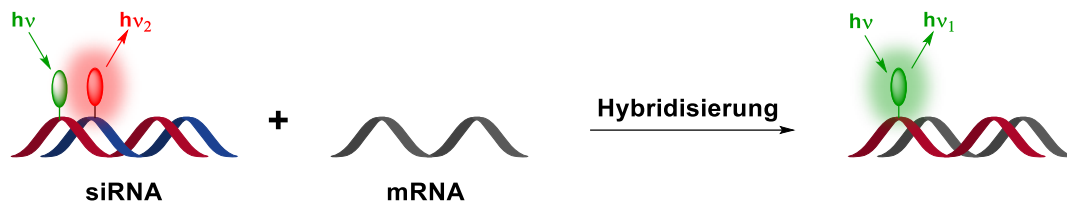
Aufgrund ihrer besonderen Sekundär- und Tertiärstruktur können die Zielmolekül mit sehr hoher Affinität und Selektivität gebunden werden. WAGENKNECHT et al. modifizierten zwei teilweise komplementäre Einzelstränge mit jeweils einem der beiden Cyaninfarbstoffe. Nach Zugabe des Zielmoleküls Adenosin wird ein Duplex ausgebildet, wodurch die Chromophore in räumliche Nähe zueinander gelangen und ein Energietransfer stattfinden kann. Strukturell ähnliche Moleküle wie 2'-Desoxyadenosin, -guanosin oder das 2'-Desoxynukleosid des 2-Aminopurins konnten mithilfe des Kontrastverhältnisses deutlich vom eigentlichen Zielmolekül unterschieden werden.<sup>[15]</sup>



**Abbildung 14:** Prinzip des wellenlängenverschiebenden Aptasensors nach WAGENKNECHT et al.

Dieses Konzept wurde weiterhin auf nicht-codierende, kurze interferierende RNA (siRNA) Sonden transferiert, die den Namen „RNA-Traffic-Lights“ tragen.<sup>[14, 16]</sup> Dabei handelt es sich um kurze doppelsträngige RNA-Sequenzen, die aus einem *Sense*- und einem *Antisense*-Strang bestehen. Der *Antisense*-Strang ist dabei voll komplementär zum Zielgen, der Boten-RNA (mRNA). Nach Hybridisieren der beiden Stränge wird die Zielsequenz mithilfe eines Enzyms an einer bestimmten Stelle geschnitten und das darauf codierte Gen kann nicht mehr exprimiert werden (Kapitel 5.1.1). Durch die Verwendung des „Traffic-Lights“-Konzeptes soll die Visualisierung des Transports in die Zelle und die Dynamik der RNA innerhalb der Zelle ermöglicht werden, ohne dabei die genregulierende Funktion zu beeinflussen. Dafür wurde eine siRNA gewählt, die komplementär zur mRNA des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) ist. Der *Sense*-Strang wurde mit dem Akzeptor (TR) und der *Antisense*-Strang mit dem Donor (TO) versehen, sodass im intakten siRNA-Doppelstrang ein FRET stattfinden kann.

Sobald die mRNA gebunden und der *Sense*-Strang ausgeschleust wird, ist dagegen nur noch die grüne Emission detektierbar, wie in Abbildung 15 dargestellt wird.



**Abbildung 15:** Vereinfachtes Prinzip der wellenlängenverschiebenden siRNA-Sonden.

CHO-K1-Zellen wurden mit dieser siRNA transfiziert und die intakte Funktion über einen GFP-*Knockdown* bestätigt.<sup>[14]</sup> Ähnlich dazu modifizierten auch HELM et al. siRNA-Sonden, um deren Zellgängigkeit, die endosomale Freisetzung und Genregulierung zu untersuchen.<sup>[187-189]</sup> Im Unterschied zu den „Traffic Lights“ sind diese Proben allerdings terminal mit Chromophoren versehen. Durch deren Flexibilität lässt sich kaum Einfluss auf die Orientierung der Farbstoffe und damit der Effizienz des Energietransfers nehmen.

Im Hinblick auf die bioanalytische Anwendung und die dafür eingesetzten hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Techniken (FLIM, PALM, STED), zeigen die hier verwendeten Farbstoffe TO und TR auch einige Nachteile. Sie haben nur eine geringe Halbwertszeit ( $t_{1/2}(\text{TO}) = 32 \text{ min}$ ,  $t_{1/2}(\text{TR}) = 7 \text{ min}$ ) und damit verbunden eine geringe Photostabilität. Aus diesem Grund wurden photostabilere Farbstoffe synthetisiert, die hohe Quantenausbeuten und Helligkeiten in Anwesenheit von Oligonukleotiden aufweisen.<sup>[190-192]</sup> Durch den Einbau in MBs für die Detektion von miRNAs, in adenosinbindende Aptasensoren, DNA-Origamis und siRNA konnte zudem gezeigt werden, dass sich die neuen Cyaninfarbstoffe hervorragend als FRET-Paar eignen.<sup>[17, 193-196]</sup> Hierbei wurde neben dem direkten Einbau als Basensurrogat auch ein postsynthetischer Ansatz gewählt, um die Synthese zu vereinfachen, Grundzustands-Dimere zu vermeiden und schnell andere Farbstoffe als Energietransferpaare zu testen.<sup>[181]</sup> Dafür wurden ein ribo- als auch ein arabino-konfigurierter Uridin-Baustein in DNA und RNA eingebaut und deren Einfluss auf den FRET untersucht. Verschiedene Kombinationen und Orientierungen wurden analysiert, um die besten optischen Eigenschaften zu erhalten. Im Vergleich zur bisher verwendeten Architektur mit dem acyclischen Linker konnte bereits mithilfe der Kombination von zwei ribo-konfigurierten Uridinen das Kontrastverhältnis auf 1:60 (vgl. 1:16) erhöht werden.<sup>[193]</sup> Wird diese Kombination jedoch auf RNA übertragen, so

weisen die Farbstoffe eine äußerst kurze Distanz zueinander auf, was zu einer Fluoreszenzlöschung führt. Dies kann durch die gestauchte helikale Struktur der RNA im Vergleich zur DNA erklärt werden. Um dieses Problem zu lösen, wurde ein arabino-konfigurierter Baustein eingesetzt, der die Farbstoffe in die große Furche zwingen soll, in welcher diese mehr Raum haben, sich optimal zueinander anzuordnen. Molekulardynamische Simulationen haben diese Aussage bestätigt. Sie bewiesen, dass bei der ribo-Konfiguration ein starrer  $\pi$ -Stapel mit einer geringen Distanz der Chromophore vorliegt, während die Fluorophore geknüpft an den arabino-Baustein äußerst flexibel bleiben. Dies äußert sich in einer signifikanten Steigerung der FRET Effizienz.<sup>[197]</sup> Damit die Auswertung nicht nur auf das Auslesen der Fluoreszenzfarbe bzw. Wellenlänge beruht, sollte der FRET zusätzlich mit der Fluoreszenzlebenszeit-Mikroskopie (FLIM) verknüpft werden. Somit wäre es möglich, die siRNA in ihren verschiedenen Stadien aufgrund der sich ändernden Fluoreszenzlebenszeit des Donors zu unterscheiden. Während die Fluoreszenzlebenszeit des Donors im Doppelstrang stark herabgesetzt wird, sollte diese im Einzelstrang deutlich ansteigen. Bindet der *Antisense*-Strang an die mRNA, so sollte die Fluoreszenzlebenszeit weiter zunehmen, da in der geordneten Struktur der Helix weniger Energie verloren geht. Mit den bisher verwendeten Cyanin-Farbstoffen konnten die siRNA „Traffic-Lights“ nicht für solche FRET-FLIM-Experimente eingesetzt werden, da diese Farbstoffe mehrere Fluoreszenzlebenszeiten für jedes einzelne Stadium zeigten.<sup>[17]</sup> Daraus ergab sich das Projekt zur Verbesserung des siRNA „Traffic-Lights“-Models, welches in Kapitel 5 beschrieben wird.

### 3 PHOTOCCLICK-REAKTION MIT AZIRINEN

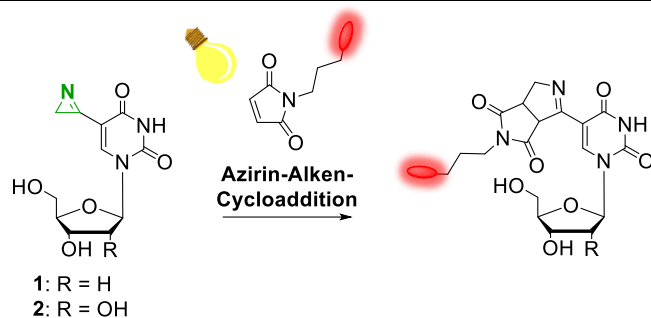
Kupfer ist ein wichtiges Spurenelement, welches vor allem bei der Zellatmung eine entscheidende Rolle spielt. Es ist Bestandteil vieler Enzyme (z.B. Albumin, Transcuprein, Coeruloplamsin), die auch katalytische Funktionen haben und beim Elektronentransfer mitwirken.<sup>[198]</sup> Über den Magen und Darm aufgenommen, wird Kupfer mithilfe verschiedener Proteine zur Leber transportiert und von dort je nach Bedarf über die Blutlaufbahn an andere Organe und das Gewebe abgegeben.<sup>[199]</sup> Für gewöhnlich werden überschüssige Mengen an Kupfer an die Galle übergeben und anschließend über Darm und Nieren ausgeschieden. Ist dieser Kupferstoffwechsel jedoch gestört, so kann es zu seltenen Krankheiten wie z.B. Morbus Wilson kommen, wobei das Spurenelement in der Leber gespeichert und nicht ausgeschieden werden kann. Folgen sind Hepatitis, Leberzirrhose und Leberversagen.<sup>[200]</sup> Der Überschuss an Kupfer löst oxidativen Stress aus, was zu Schädigungen von Membranen und Makromolekülen führen kann,<sup>[201]</sup> denn Kupferionen sind in der Lage reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, die nachweislich z.B. DNA-Schäden verursachen.<sup>[202-205]</sup> Folglich ist es von großem Nachteil, dieses Metall zur Markierung von Oligonukleotiden einzusetzen, um deren Strukturen, Funktionen und Interaktionen in natürlicher Umgebung zu untersuchen. Die Entwicklung zahlreicher kupfer(I)-stabilisierender Liganden (Kapitel 2.2.1) ermöglicht zwar dennoch deren Anwendung, allerdings haben sich kupferfreie, bioorthogonale Methoden etabliert, die wie im Falle der Photoclick-Reaktion auf der Bildung reaktiver Zwischenstufen basieren. Der Einsatz von Licht als Initiator bietet dabei den Vorteil, die Reaktion zeitlich und räumlich kontrollieren zu können.

Aufgrunddessen sollte im Rahmen dieser Arbeit eine photoinduzierte Markierungsmethode unter Verwendung von hochreaktiven *2H*-Azirinen entwickelt werden, um Oligonukleotide detektieren zu können (Abbildung 16). Dazu sollte, basierend auf den Arbeiten von KUMAR<sup>[206]</sup>, ein 5-Azirinyl-2'-desoxyuridin **1** sowie das entsprechende Ribonukleosid **2** synthetisiert und dessen Anwendbarkeit in einer Photoclick-Reaktion untersucht werden. Hierbei öffnet sich durch Belichtung mit geeigneter Wellenlänge der Heterozyklus, sodass ein Nitrilylid entsteht und eine Reaktion mit dem Reaktionspartner stattfinden kann. Durch die geringe Größe der Modifikation sollte zugleich ein späterer enzymatischer Einbau des Azirin-Nukleosids in DNA/RNA ermöglicht werden, da DNA-Polymerasen sowie Kinasen dafür bekannt sind, geringe Veränderungen natürlicher Basen zu akzeptieren, während sterisch anspruchsvolle Substituenten, die direkt an der Nukleobase verknüpft sind, nicht erkannt und deshalb nicht eingebaut werden.<sup>[207-208]</sup>



Mithilfe dieser Methode wären somit eine zeitlich kontrollierte und ortsspezifische Detektion und Visualisierung von Oligonukleotiden ohne den Zusatz von zelltoxischem Kupfer möglich.

---



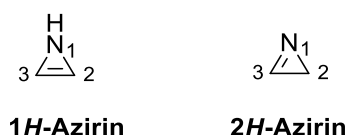
**Abbildung 16:** Lichtinduzierte Azirin-Alken-Cycloaddition mithilfe eines 5-Azirinylnukleosides **1** oder **2** als bioorthogonale Markierung von Oligonukleotiden.

---

### 3.1 Einführung

#### 3.1.1 Eigenschaften, Synthese und Photochemie von Azirinen

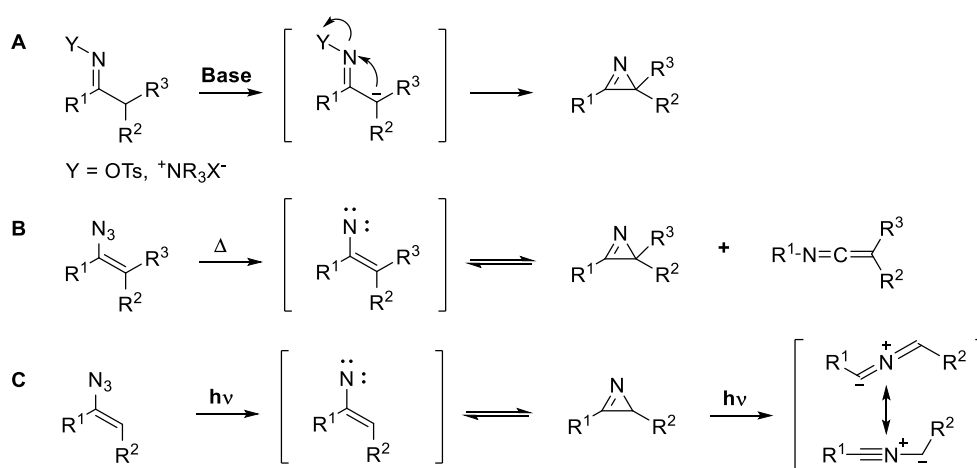
Azirine zählen zu den kleinsten ungesättigten Heterozyklen, die aus einem Stickstoff- und zwei Kohlenstoffatomen bestehen und eine Doppelbindung im Dreiring aufweisen. Je nach Position der Doppelbindung wird zwischen *1H*- und *2H*-Azirin unterschieden (Abbildung 17).<sup>[209]</sup> Aufgrund des zyklischen  $4\pi$ -Elektronensystems, gilt das *1H*-Azirin laut HÜCKEL-Regel als Antiaromat.<sup>[209-211]</sup> Deshalb wird davon ausgegangen, dass dieses Isomer nicht planar ist. Es konnte ein Winkel von ca.  $72^\circ$  zwischen der Ebene der N-H-Bindung und der Ringebene ermittelt werden, der deutlich größer ist als für das *2H*-Azirin.<sup>[209, 212]</sup> Außerdem haben MO-Berechnungen gezeigt, dass das *1H*-Azirin um ca. 30 kcal/mol instabiler ist als ein *2H*-Azirin.<sup>[210, 212]</sup> Aus diesem Grund ist es fast unmöglich, dieses Isomer zu isolieren oder spektroskopisch nachzuweisen, weshalb in der organischen Synthese überwiegend *2H*-Azirine zum Einsatz kommen. Azirine gelten somit als äußerst reaktiv, weshalb sie vor allem als Vorstufen für die Synthese einer Vielzahl an Stickstoffheterozyklen eingesetzt werden.<sup>[213]</sup> Ihre Reaktivität ist nicht nur auf die ungünstige elektronische Struktur, sondern auch auf die hohe Ringspannung (170 kJ/mol) zurückzuführen, welche die Reaktivität der C=N-Bindung zusätzlich verstärkt und außerdem eine Ringöffnung erleichtert. Die strukturellen Besonderheiten führen dazu, dass Azirine als Nukleophile, Elektrophile, Dienophile oder Dipolarophile agieren können.<sup>[214]</sup>



**Abbildung 17:** Strukturen der beiden Isomere *1H*-Azirin und *2H*-Azirin.

Die gespannten Heterozyklen können über verschiedene Synthesemethoden hergestellt werden. Neben intramolekularen Umlagerungen von beispielsweise N-funktionalisierten Iminen, Vinylaziden oder Isoxazolen führen auch bimolekulare Reaktionen zwischen Nitrilen und Carbenen oder Nitrenen und Acetylenen zu Azirinen.<sup>[214]</sup> Obwohl die Zahl der Herstellungsmethoden stetig zunimmt, bleiben dennoch die NEBER-Umlagerung sowie die Photo- oder Thermolyse von Vinylaziden die meist verwendeten Verfahren.<sup>[215]</sup> Bei der NEBER-Umlagerung handelt es sich um die erste, von NEBER et al.<sup>[216]</sup> publizierte, Synthese

für Azirine. Wie in Abbildung 18 A gezeigt, wurden diese als Intermediat bei der Herstellung von Aminoketonen aus Oxim-*p*-toluolsulfonat unter Verwendung einer Base erhalten. Heute werden für die Umlagerung auch *N,N,N*-Trimethylhydrazoniumiodide eingesetzt. Damit wird die Darstellung vieler, strukturell unterschiedlicher Azirine erlaubt.<sup>[217-218]</sup> Trotz intensiver Erforschung dieser gespannten Heterozyklen erweist sich die Synthese, aufgrund der hohen Reaktivität und Instabilität, jedoch immer noch als sehr problematisch. Werden Vinylazide thermisch aktiviert (Abbildung 18 B), um einen Ringschluss zu generieren, so muss auf die Wahl des Lösungsmittels und der Temperatur geachtet werden. Denn das Produkt selbst ist auch thermisch aktiv und würde bei zu hohen Temperaturen direkt weiter reagieren oder zu einem Curtius-Umlagerungsprodukt führen.<sup>[213]</sup> Außerdem können beispielsweise nukleophile Lösungsmittel wie Methanol oder Wasser das Produkt angreifen. Infolgedessen werden für die Thermolyse inerte Lösungsmittel mit Siedetemperaturen zwischen 98 – 110 °C (z.B. Toluol, Heptan, Dioxan) gewählt.<sup>[214]</sup> Auch bei der Photolyse (Abbildung 18 C) kann es zu Nebenprodukten kommen.<sup>[213-214, 219]</sup> Neben lichtinduzierten Polymerisationen ist es vorstellbar, dass es zu einer irreversiblen Ringöffnung kommt. Diese Ringöffnung, ausgelöst durch Licht, stellt die Grundlage für die Entwicklung einer kupferfreien, bioorthogonalen Markierungsmethode für Nukleinsäuren dar.



**Abbildung 18:** Darstellung von Azirinen. (A) NEBER-Umlagerung, (B) Thermolyse und (C) Photolyse.

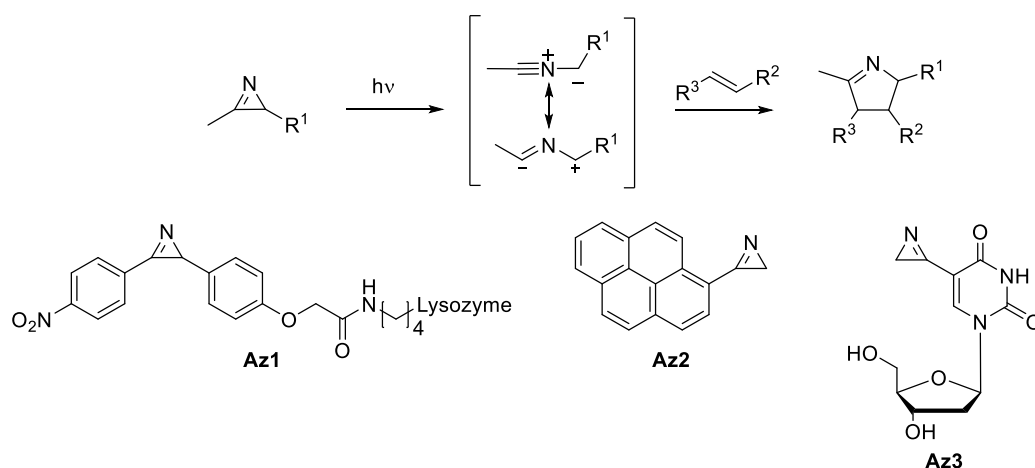
Dabei ist der Verlauf der Reaktion und somit das Reaktionsprodukt abhängig von der verwendeten Wellenlänge. Während die Belichtung mit Wellenlängen über 300 nm zu einem C-N-Bindungsbruch und damit zu der Bildung von Vinylnitrenen führt, resultiert die Belichtung mit Wellenlängen unter 300 nm in Nitrilyden durch Spaltung der

C-C-Bindung.<sup>[220-221]</sup> Desweiteren können auch die Substituenten am Azirin kontrollieren, welche der beiden Bindungen gespalten wird.<sup>[222-223]</sup> So konnten beispielsweise INUI und MURATA zeigen, dass die Einführung elektronenziehender Gruppen (z.B. NO<sub>2</sub>) am C2-Atom zu einer Spaltung der C-N-Bindung führt, wobei das entstandene Vinylnitren durch Sauerstoff abgefangen werden kann und Aldehyde sowie Isoxazoline entstehen.<sup>[221]</sup> Während dieser Reaktionsweg über einen Triplettzustand verlaufen soll, sind an der Spaltung der C-C-Bindung lediglich Singulett-Zustände beteiligt.<sup>[223-224]</sup> Das dabei gebildete Nitrilylid ist äußerst reaktiv und kann unter anderem mit elektronenarmen Alkenen in einer Cycloaddition zu einem  $\Delta^1$ -Pyrrolin weiterreagieren (s. Abbildung 19).<sup>[225]</sup> Im Gegensatz zu Nitriliminen, die bei der Belichtung von Tetrazolen entstehen, verlieren Nitrilylide in ihrem angeregten Zustand kaum Energie. Aufgrund der starren Doppelbindung ist eine Rotation um selbe nicht möglich. Infolgedessen kann von einer erhöhten Reaktivität und somit einer schnelleren Photoclick-Reaktion ausgegangen werden.<sup>[226-229]</sup> Diese erhöhte Reaktivität führt jedoch auch zu zahlreichen Nebenreaktionen, sodass das Azirin bei Belichtung selbst mit Lösungsmitteln wie Methanol reagieren kann.<sup>[219]</sup>

### 3.1.2 Anwendung der lichtinduzierten Click-Reaktion mit Azirinen zur postsynthetischen Markierung

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, die Azirine als Vorstufe für die Synthese von neuen stickstoffhaltigen Heterozyklen verwenden. Dahingegen ist sehr wenig über die Photoclick-Reaktion in Bezug auf das bioorthogonale Markieren bekannt. Im Jahr 2010 berichteten LIN et al. über die erste Azirin-Alken-Cycloaddition unter Einwirkung von Licht, um Proteine im biologischen Milieu zu visualisieren.<sup>[123, 230]</sup> Dafür synthetisierten sie zunächst einige Diphenylazirine (z. B. **Az1**, Abbildung 19) und bestimmten die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit Dimethylfumarat ( $k = 0.0379 \text{ s}^{-1}$ ). Diese [3+2]-Cycloaddition läuft sehr schnell und selektiv ab, ohne dass dabei Michael-Addukte als Nebenprodukte entstehen. Daraufhin untersuchten sie die Anwendbarkeit als bioorthogonale Markierungsmethode und modifizierten ein Lysozym mit einem *p*-Nitrodiphenylazirin, welches in einer Photoclick-artigen Reaktion mit einem Dimethylfumarat reagiert. Ein großer Nachteil bei dem Einsatz dieser Azirin-Derivate stellt jedoch die Anregungswellenlänge von ca. 300 nm zur Generierung des Nitrilylids dar. Dieses energiereiche Licht könnte zu Schäden der DNA und anderen Zellkompartimenten führen. Dieses Problem könnte durch eine geeignete Modifizierung des Azirins und damit der Verschiebung der Anregungswellenlänge

in den sichtbaren Bereich gelöst werden. BARNER-KOWOLLIK et al. stellten beispielsweise ein pyrensubstituiertes Azirin (**Az2**), wie es in Abbildung 19 dargestellt ist, her, wodurch die Anregung zwischen  $\lambda_{\text{exc}} = 400 - 420 \text{ nm}$  ermöglicht wird.<sup>[231]</sup> Allerdings wurde dieses Molekül nicht für die postsynthetische Markierung eingesetzt. Bis heute gibt es kein Beispiel für eine lichtinduzierte Azirin-Alken-Cycloaddition, die für die Visualisierung und Detektion von Oligonukleotiden angewendet wird. KUMAR et al. synthetisierten im Jahr 1996 das erste und einzige, bisher bekannte Azirin-Nukleosid, 5-(2-(1-azirinyl))-2'-desoxyuridin **Az3**, mit der Erwartung einen neuen antiviralen Wirkstoff gegen Herpes Simplex Viren Typ 1 (HSV-1), Typ 2 (HSV-2) und den Vacciniavirus zu finden.<sup>[206, 232]</sup>



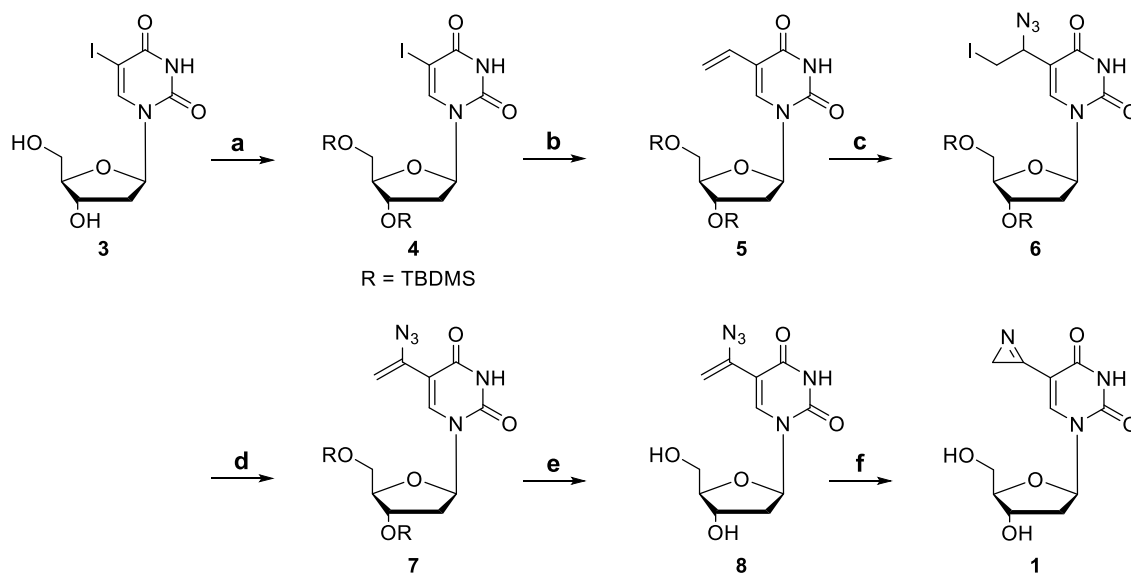
**Abbildung 19:** Reaktionsverlauf einer Azirin-Alken-Cycloaddition und Strukturen bereits synthetisierter Azirine zur Verwendung in einer bioorthogonalen Markierung (**Az1**), Verschiebung der Anregungswellenlänge in den sichtbaren Bereich (**Az2**) und als mögliches Anti-Herpes-Mittel (**Az3**).

Dies verdeutlicht, dass die Azirin-Alken Cycloaddition eine unerforschte, alternative Methode zur Tetrazol-Chemie (Kapitel 2.2.1) für die bioorthogonale Markierung von Nucleinsäuren darstellt. Besonders hinsichtlich ihrer geringen Größe sollten im Rahmen dieser Arbeit zwei Azirin-Nucleoside **1** und **2** (Abbildung 16) hergestellt und deren Anwendbarkeit in einer Photoclick-Reaktion für die postsynthetische Markierung von Nucleinsäuren untersucht werden.

## 3.2 Synthese der azirinmodifizierten Nukleoside

### 3.2.1 Synthese des 5-Azirinyl-2'-desoxyuridins **1**

Die Synthese des 5-Azirinyl-2'-desoxyuridins **1** orientierte sich an den Arbeiten von KUMAR et al.<sup>[206]</sup> und wurde zur Steigerung der Ausbeuten und Verbesserung der Regioselektivität in einigen Reaktionsschritten optimiert.

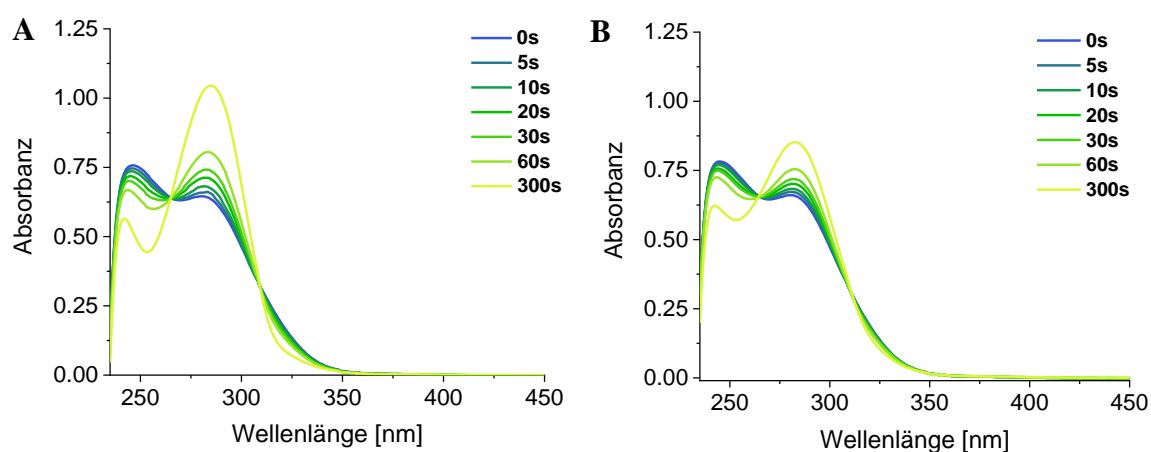


**Schema 7:** Syntheschema zur Herstellung von **1**. **a)** TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, über Nacht, 97 %; **b)** 1. Pd(OAc)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMF, 64 °C, 2. Vinylacetat, DMF, 80 °C, über Nacht, 78 %; **c)** NaN<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, MeOH, RT, 2.5 h, 97 %; **d)** KOtBu, THF, 0 °C, 3.5 h, 91 %; **e)** 1 M TBAF/THF, THF, RT, über Nacht, 78 %; **f)** λ = 365 nm, Ethanol, RT, 2.25 h, 86 %.

Da die Synthese von KUMAR mit der Umsetzung von 5-Vinyl-2'-desoxyuridin **5** beginnt, musste zunächst der Zucker ausgehend von 5-Iod-2'-desoxyuridin **3** mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) geschützt und anschließend in einer Heck-Kupplung zum 5-Vinyl-2'-desoxyuridin **5** umgesetzt werden. Dabei konnten die Reaktionszeiten verkürzt und die Ausbeuten von 49 %<sup>[233]</sup> auf 75 % über zwei Schritte gesteigert werden. Anschließend sollte mithilfe von N-Bromsuccinimid und Natriumazid *in-situ* ein hoch reaktives Bromazid erzeugt und an die Doppelbindung addiert werden. Allerdings konnte dabei kein Umsatz beobachtet werden, weshalb andere Strategien getestet wurden. So wurde das Vinylazid anfänglich mit Natriumazid und Kaliumiodid in Anwesenheit des Oxidationsmittels Natriumperodat in Essigsäure umgesetzt. Dadurch entsteht anstelle von Bromazid ein ebenso reaktives Iodazid, welches über einen radikalischen Mechanismus das Alken angreift und ein Iodazid-2'-desoxyuridin **6** bildet. Nach der Literatur

sollte diese Variante sehr selektiv zu einem Anti-Markovnikov-Produkt führen.<sup>[234]</sup> Allerdings konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung eine Mischung aus beiden Regioisomeren isoliert werden. Dieser Reaktionsschritt erwies sich nicht nur als äußerst schwer reproduzierbar, ein weiteres Problem ergab sich auch bei der darauffolgenden Dehalogenierung. Wird die Eliminierung, die einem E2-Mechanismus folgt, mit dem Reaktionsgemisch durchgeführt, so werden nur sehr schlechte Ausbeuten (25 %) und mehrere Nebenprodukte erhalten. Das Hauptprodukt dieser Dehalogenierung war somit ein Methylketon, welches durch einen nukleophilen Angriff und anschließender Umlagerung entsteht. Nach Separation beider Isomere voneinander und anschließender Eliminierung, konnte festgestellt werden, dass das Anti-Markovnikov-Produkt quantitativ zum 5-Vinylazid-2'-desoxyuridin **7** reagiert, während das Markovnikov-Produkt fast ausschließlich Nebenprodukte bildet. Aus diesem Grund wurden die Bedingungen der Iodazid-Addition angepasst, um selektiv das Anti-Markovnikov-Produkt zu erhalten. Dies wurde mithilfe von elementarem Iod zusammen mit Natriumazid in Methanol als Lösungsmittel erzielt. Auf diese Weise konnte nicht nur die Ausbeute des Iodazid-Nukleosids **6**, sondern auch die des Vinylazid-Derivates **7** deutlich gesteigert werden. Um schließlich das Zielmolekül **1** zu erhalten, wurden ausgehend von **7** zunächst zwei Reaktionspfade verfolgt. Während bei der einen Synthese zuerst das Azirin generiert und anschließend das Nukleosid entschützt werden sollte, verfolgte der zweite Weg die umgekehrte Reihenfolge. Dabei stellte sich die Entschützung der 3'- und 5'-Hydroxyfunktion durch Zusatz von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) zu **8** mit anschließender Azirinsynthese **1**, aufgrund dessen Reaktivität, als bessere Methode heraus. Gewöhnlich werden solche Entschützung wässrig aufgearbeitet, um entstandene Salze heraus zu waschen. Da das Nukleosid **8** jedoch ebenfalls in Wasser löslich ist, musste auf eine andere Methode zurückgegriffen werden. Folglich wurden zur Reaktionsmischung Calciumcarbonat, welches die Fluoride abfangen soll, und ein Ionenaustauscher hinzugefügt. Als Ionenaustauscher wurde leicht saures Dowex (50WX8, Wasserstoff-Form, Porengröße 200 – 400, SIGMA ALDRICH) verwendet, sodass die Ammoniumsalze durch Protonen ausgetauscht werden konnten. Die Ausbeuteverluste sind auf die unvollständige Umsetzung zurückzuführen. Zudem benötigte die Entschützung dieses Moleküls deutlich mehr Zeit als anderer Nukleoside. Zur Ringschließung wurde zunächst eine Thermolyse gewählt. Da hierbei jedoch nur sehr geringe Ausbeuten erzielt und die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden konnten, wurde die Photolyse zur Azirinsynthese eingesetzt. Diese wurde zunächst über UV/Vis-Spektroskopie und Umkehrphasen-

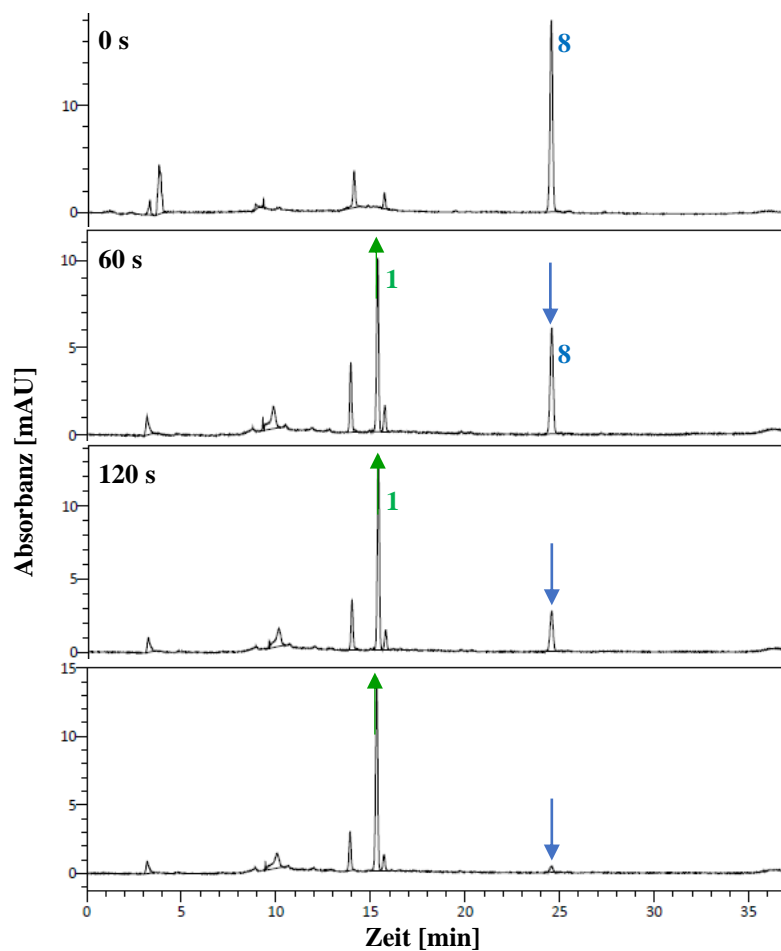
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) verfolgt, um den genauen Zeitpunkt der vollständigen Umsetzung zu bestimmen. Dafür wurde das Nukleosid **8** in Ethanol bzw. Puffer für RP-HPLC (10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7) mit einer Wellenlänge von 365 nm sowie 300 nm angeregt. Letztere wurde verwendet, da das Nitrilylid bei dieser Wellenlänge entsteht und durch Zugabe des geeigneten Reaktionspartners direkt zum Photoaddukt weiterreagieren könnte. Anhand der isosbestischen Punkte bei 265 nm sowie 310 nm im Absorptionsverlaufs in Abbildung 20 ist zu erkennen, dass in beiden Belichtungen eine selektive Umsetzung stattfindet. Diese läuft bei höherer Anregungswellenlänge deutlich schneller ab, was womöglich auf die Leistung der verwendeten LED zurückzuführen ist.



**Abbildung 20:** Änderung der Absorption von **8** nach Belichtung bei (A) 365 nm sowie (B) 300 nm. Messparameter: [**8**] = 80  $\mu$ M.

Auch die Verfolgung des Reaktionsverlaufs per RP-HPLC, dargestellt in Abbildung 21, zeigt eine klare Umsetzung des Vinylazids **8** zum Azirin **1**, sodass dieses nach zehn Minuten Reaktionszeit ohne weitere Aufreinigung erhalten werden konnte. Die charakteristische Verschiebung der Azirin-Protonen konnte mittels NMR bestätigt werden. Das gewünschte 5-Azirinyl-2'-desoxyuridin **1** konnte somit durch Belichten mit einer Wellenlänge von 365 nm in Ethanol mit einer Gesamtausbeute von 45 % über sechs Schritte dargestellt werden.



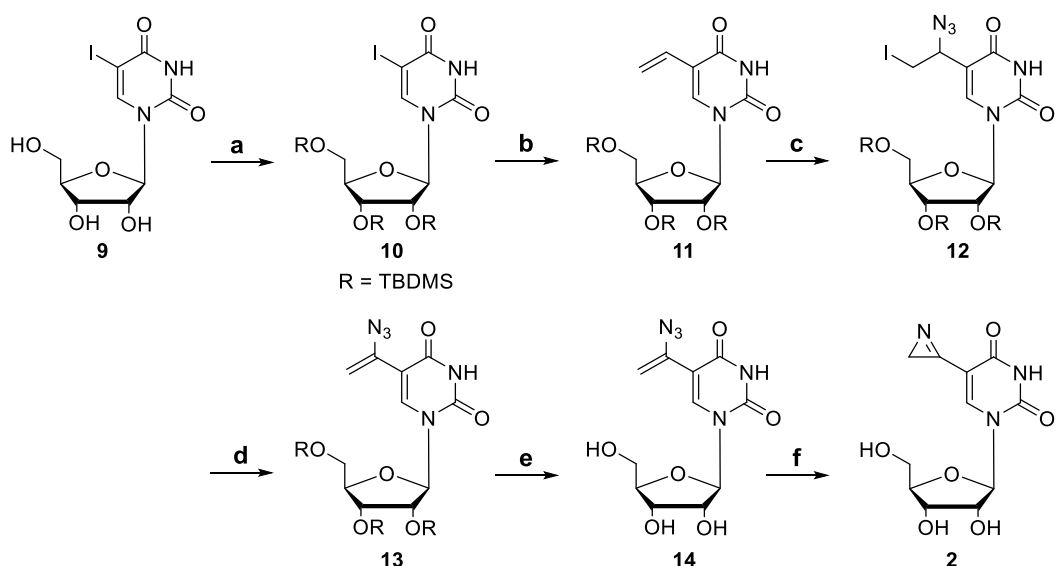


**Abbildung 21:** HPL-Chromatogramme (260 nm) zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs der Belichtung von **8** bei 365 nm in Puffer (10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7), Trennmethode s. Kapitel 7.3.3 Tabelle 16.

### 3.2.2 Synthese des 5-Azirinyl-uridins **2**

Mithilfe der optimierten Syntheseroute sollte anschließend das entsprechende Ribonukleosid hergestellt werden (Schema 8). Dieses ist nicht nur aufgrund der Tatsache, RNA markieren zu können, interessant, sondern auch, da RNA-Nukleoside ohne Zusatz von Salzsäure zur Denaturierung über einen metabolischen Weg in das Biomolekül eingebaut werden können. Damit wäre dieser Einbau des 5-Azirinyl-uridins **2** eine äußerst elegante Methode zur Markierung von RNA.

Hierfür wurde 5-Iodouridin **9** mit TBDMS-Schutzgruppen versehen (**10**) und anschließend mittels Heck-Kupplung zum 5-Vinyluridin **11** umgesetzt. Die Addition von Iodazid (**12**) sowie die darauffolgende Dehalogenierung zur Zwischenstufe **13** benötigten dabei eine längere Reaktionszeit, um (zum entsprechenden Desoxyribonukleosid-Derivat) vergleichbare Ausbeuten zu liefern. Auch die Abspaltung der Silyl-Schutzgruppen zu **14** führte zu Ausbeuteverlusten, da hier teilschutzte Produkte erhalten wurden. Für den entscheidenden Reaktionsschritt zum Produkt **2** wurde wieder eine Photolyse gewählt, die über Absorptionsmessungen, dargestellt in Abbildung 22, verfolgt wurde.

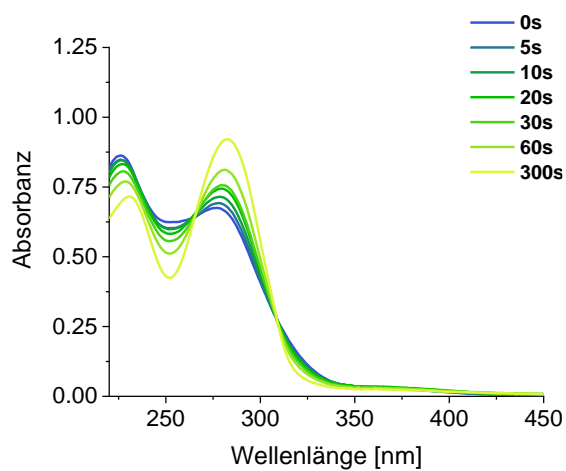


**Schema 8:** Syntheschema zur Herstellung von **2**. **a)** TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, über Nacht, 97 %; **b)** 1. Pd(OAc)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMF, 64 °C, 2. Vinylacetat, DMF, 80 °C, über Nacht, 53 %; **c)** NaN<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, MeOH, RT, 7 h, 87 %; **d)** KOtBu, THF, -5 °C, 9 h, 98 %; **e)** 1 M TBAF/THF, THF, RT, 9.5 h, 53 %; **f)** λ = 365 nm, Ethanol, RT, 2 h, quantitativ.

Die isosbestischen Punkte bei 310 nm sowie 265 nm stimmen mit denen von **1** überein und verdeutlichen einen quantitativen Umsatz. Zudem wird eine neue Bande bei 230 nm gebildet,

die charakteristisch für das Azirin ist. Somit war die Übertragung der zuvor optimierten Reaktionsbedingungen erfolgreich, wodurch das 5-Azirinyl-uridin **2** in einer Gesamtausbeute von 23 % über sechs Schritte erhalten werden konnte.

---



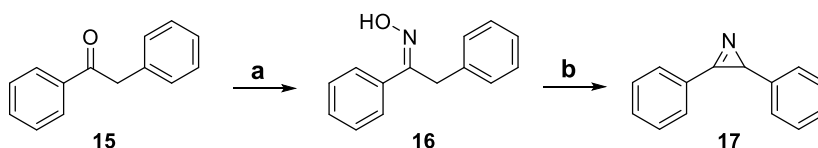
**Abbildung 22:** Änderung der Absorption von **14** nach Belichtung bei 365 nm. Messparameter:  $[14] = 80 \mu\text{M}$ .

---

### 3.3 Studien zur Reaktivität

Wie bereits beschrieben, sind Azirine sehr instabile und hochreaktive Moleküle, was den Einbau in Oligonukleotide erschweren könnte. Demzufolge sollte die Reaktivität des 2*H*-Azirins in Bezug auf die, innerhalb einer Triphosphatsynthese zum enzymatischen Einbau und einer Festphasensynthese eingesetzten Chemikalien genauer untersucht werden.

Aufgrund der sechsstufigen, aufwendigen Synthese von **1** und **2** wurde dafür zunächst ein unsubstituiertes Diarylazirin **17** hergestellt (Schema 9). Als Synthesestrategie wurde hier die NEBER-Umlagerung gewählt, wobei ausgehend von 2-Phenylacetophenon **15** ein Oxim **16** erzeugt wurde. Dies wurde anschließend tosyliert, um nach Deprotonierung des aciden Protons in  $\alpha$ -Position eine gute Abgangsgruppe zu erhalten und einen Ringschluss zum Azirin **17** zu gewährleisten.



**Schema 9:** Synthese eines Diphenylazirins **17** mithilfe der Neber-Umlagerung. **a)**  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (20:1), RT, 3 h; **b)** 1.  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 0 °C, 30 min, 2. DBU, 30 min; Gesamtausbeute 61%.

Nach erfolgreicher Synthese wurden in einem Screening verschiedene Lösungsmittel sowie Säuren und Basen zum Azirin hinzugegeben und der Einfluss von Licht und Hitze untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Da die gespannten Heterozyklen als sehr lichtempfindlich gelten, wurde zunächst unter Lichtausschluss gearbeitet. Deutlich zu erkennen ist hierbei, dass das Azirin äußerst reaktiv auf Säuren und Basen reagiert. Lediglich die schwachen, nicht nukleophilen Basen *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) haben keinen Einfluss. Ebenso verhält es sich mit den Lösungsmitteln. Während das Molekül in Wasser bzw. wässriger Pufferlösung (Triethylammoniumbicarbonat, TEAB) nicht löslich ist und deshalb keine Aussage über die Empfindlichkeit getroffen werden kann, ist zu beobachten, dass sich Methanol als protisches, leicht saures Lösungsmittel nicht eignet. Dabei konnte mithilfe von NMR Messungen ein nukleophiler Angriff an das Azirin festgestellt werden. Diese Reaktionen lassen sich sogar mit dem bloßen Auge erkennen, denn die Lösungen färbten sich zu einem intensiven, dunklen Gelbton. Infolgedessen sind diese Ansätze für

weitere Experimente ausgeschlossen, wohingegen die intakten Proben dem Tageslicht ausgesetzt wurden.

Die NMR-Spektren bewiesen, dass ausschließlich der Heterozyklus in Dichlormethan (DCM) einer strukturellen Änderung obliegt, die, im Vergleich zu den Säuren und Basen, jedoch nur geringfügig ausgeprägt ist. Deshalb wird davon ausgegangen, dass hier ein nukleophiler Angriff eines Chlorid-Ions an die Doppelbindung des Azirins stattgefunden hat.

Zuletzt wurde der Einfluss von Hitze auf die Reaktivität des Heterozyklus überprüft. Da Tetrahydrofuran (THF) den geringsten Siedepunkt besitzt, wurden die Proben zunächst auf diese Temperatur (ca. 68 °C) erhitzt. Das Azirin blieb in allen Fällen stabil, sodass die Temperatur weiter erhöht wurde, um die Grenze auszutesten (ca. 80 °C). Auffällig war dabei, dass nur dann eine Reaktion mit dem Lösungsmittel stattfand, sobald die Temperatur deutlich über dem Siedepunkt des jeweiligen Lösungsmittels lag.

*Table 1:* Screening der Instabilität und Reaktivität eines Azirins gegenüber verschiedenen Parametern wie Lösungsmittel, Säuren, Basen, Lichteinwirkung und Temperatur.

	HCl	POCl <sub>3</sub>	LiOH	Et <sub>3</sub> N	Bu <sub>3</sub> N	DIPEA	DMAP
<b>Licht-</b> <b>ausschluss</b>	instabil	instabil	instabil	instabil	instabil	stabil	stabil
<b>Licht</b>						stabil	stabil
<b>Temperatur</b>						stabil	stabil

	H <sub>2</sub> O	TEAB	EtOH	MeOH	MeCN	DMF	DCM	THF
<b>Licht-</b> <b>ausschluss</b>	unlöslich	unlöslich	stabil	instabil	stabil	stabil	stabil	stabil
<b>Licht</b>			stabil		stabil	stabil	instabil	stabil
<b>Temperatur</b>			stabil		stabil	stabil		instabil

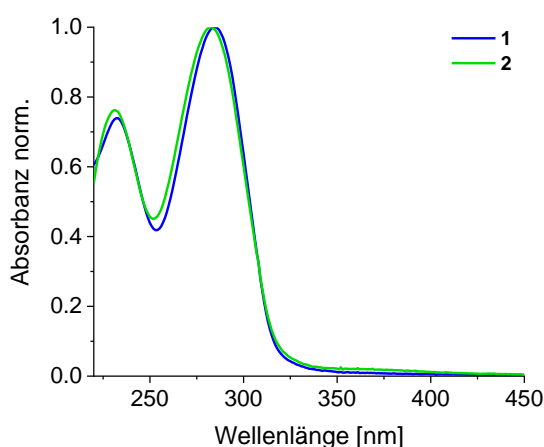
Daraus kann geschlussfolgert werden, dass grundsätzlich bei der weiteren Umsetzung von Azirinen darauf zu achten ist, lediglich nicht nukleophile Basen und sehr schwache Säuren zu verwenden. Zudem sollte unter Lichtausschluss gearbeitet werden, denn nicht nur Intermediate wie das explosive Iodazid, sondern auch die Azid-Zwischenstufen sowie das gewünschte Azirin sind lichtempfindlich und müssen deshalb geschützt werden. Daneben ist es wichtig, auch die Temperatur zu kontrollieren, um keine Ringöffnung oder Dimerisierung auszulösen.

Aufgrund dieser hier beschriebenen Faktoren stellt die Synthese eines Triphosphats, Phosphoramidits oder Phosphonats sowie deren Einbau in DNA oder RNA eine große Herausforderung dar, was wiederum den metabolischen Einbau als eleganteste Methode bestätigt. Folglich sollte zunächst die Photoclick-Reaktion der azirinmodifizierten Nucleoside **1** und **2** analysiert werden.

### 3.4 Lichtinduzierte Azirin-Alken-Cycloaddition

#### 3.4.1 Charakterisierung der azirinmodifizierten Nucleoside **1** und **2**

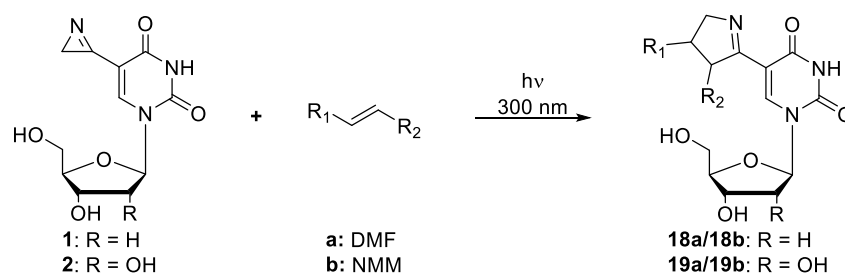
Bevor die synthetisierten, azirinmodifizierten Nucleoside **1** und **2** in einer lichtinduzierten Reaktion Anwendung finden sollten, wurden diese optisch charakterisiert. Hierzu wurden das Absorptionsverhalten sowie der Extinktionskoeffizient (Kapitel 7.8.1 Abbildung 74) in Puffer vermessen, um biologische Bedingungen nachzuahmen. Die Absorptionsspektren von **1** und **2** zeigen neben der charakteristischen Absorbanz eines Nucleosids zwischen 260-290 nm auch ein Maximum bei 230 nm, welches dem Azirin zugeordnet werden kann und mit den Literaturdaten übereinstimmt.<sup>[221-222, 227]</sup> Das Absorptionsmaximum des Ribonucleosid **2** ist hierbei im Vergleich zum Desoxyribonucleosid **1** um 3 nm hypsochrom verschoben. Dennoch ist der Verlauf nahezu identisch, weshalb lediglich der Extinktionskoeffizient von **1** bei 260 nm bestimmt wurde. Dieser liegt mit  $5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  im Bereich strukturell vergleichbarer cyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynucleoside.<sup>[235]</sup>



**Abbildung 23:** Normiertes Absorptionsspektrum von **1** und **2**. Messparameter: 80  $\mu\text{M}$  in 10 mM  $\text{NaP}_i$ -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.

### 3.4.2 Untersuchung der Anwendbarkeit in einer photoclickartigen Reaktion

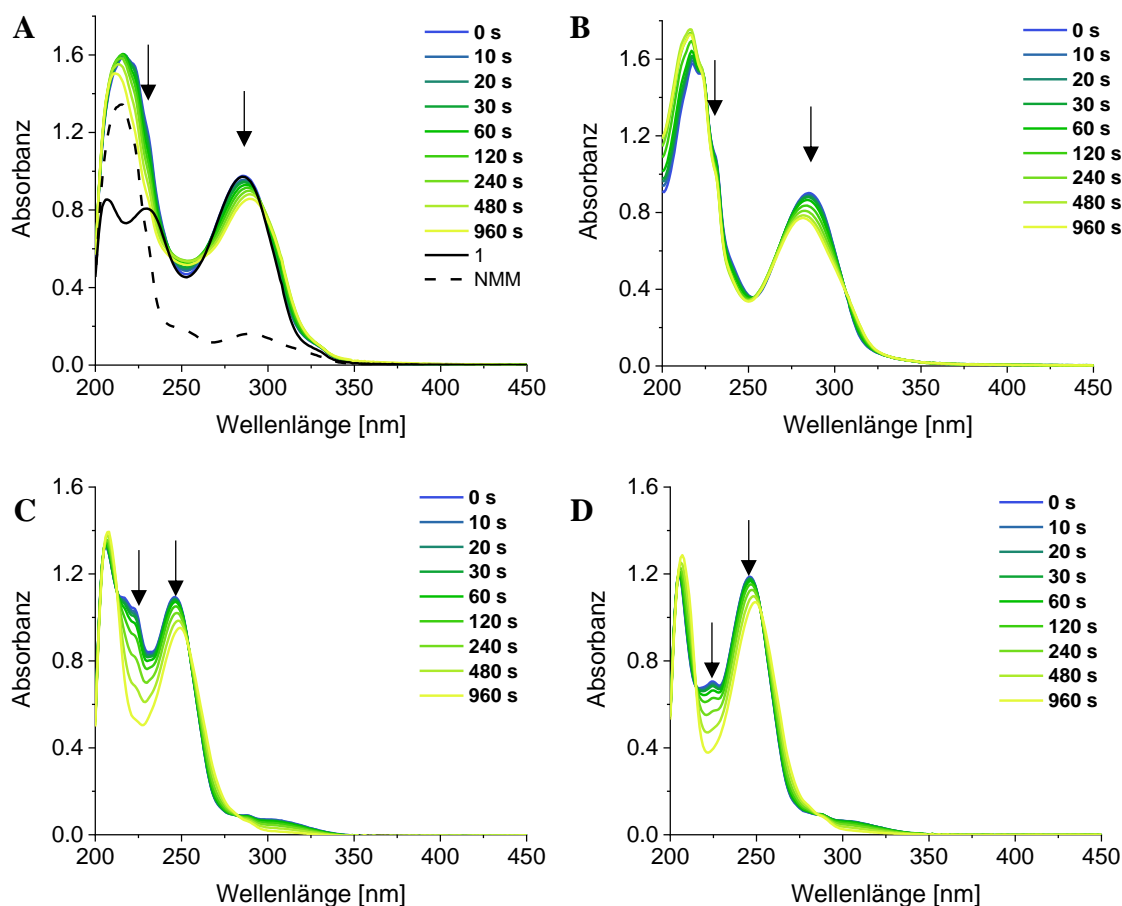
Im Anschluss an die optische Charakterisierung sollte die Verwendung der azirinmodifizierten Nucleoside **1** und **2** in einer lichtinduzierten Cycloaddition mit Alkenen untersucht werden (Schema 10). Die Durchführung orientierte sich dabei zunächst an den Arbeiten von LIN et al., in welchen elektronenarme Olefine eingesetzt und die Kompatibilität mit protischen Lösungsmitteln wie Ethanol und Wasser bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm getestet wurde.<sup>[123]</sup> Die Wahl des Reaktionspartners fiel in dieser Arbeit auf Dimethylfumarat (DMF), welches nach LIN et al. die schnellste Photoclick-Reaktion zeigte, sowie N-substituiertes Maleinimid. Beide Alkene besitzen zwei elektronenziehende Carbonylfunktionen, wodurch die Doppelbindung besonders stark positiv polarisiert und damit die Reaktivität erhöht wird. Zudem bietet das Maleinimid aufgrund der Substitutionsstelle am Stickstoffatom zahlreiche Markierungsmöglichkeiten.



**Schema 10:** Allgemeines Reaktionsschema zur lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition unter Verwendung der 5-(2H-Azirinyloxy)-Nucleoside **1** und **2**.

Bei den ersten Experimenten wurde **1** mit der stöchiometrischen Menge N-Methylmaleinimid (NMM) in Ethanol bzw. Wasser als Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 300 nm für definierte Zeitintervalle (0 s, 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 120 s, 240 s, 360 s, 480 s, 960 s) belichtet und der Reaktionsverlauf mittels Absorptionsmessungen verfolgt. Dabei ist eine Abnahme der Absorptionsbande bei 286 nm zu beobachten, die in Ethanol um 3 nm bathochrom (Abbildung 24A), in Wasser dagegen hypsochrom verschoben ist (Abbildung 24B). Aufgrund der starken Überlagerung der Absorptionen des NMMs mit denen von **1**, dargestellt in schwarz in Abbildung 24A, kann eine Änderung der charakteristischen Azirinbande sowie der Anstieg einer neuen Bande kaum wahrgenommen werden. Daher wurde zusätzlich das Diarylazirin **17**, bei welchem die Azirinbande eindeutig separiert ist, mit NMM belichtet. Aufgrund der Löslichkeit von **17** war dies lediglich in Ethanol möglich. Der Absorptionsverlauf zeigt eine bathochrome Verschiebung sowie eine Abnahme der Bande bei

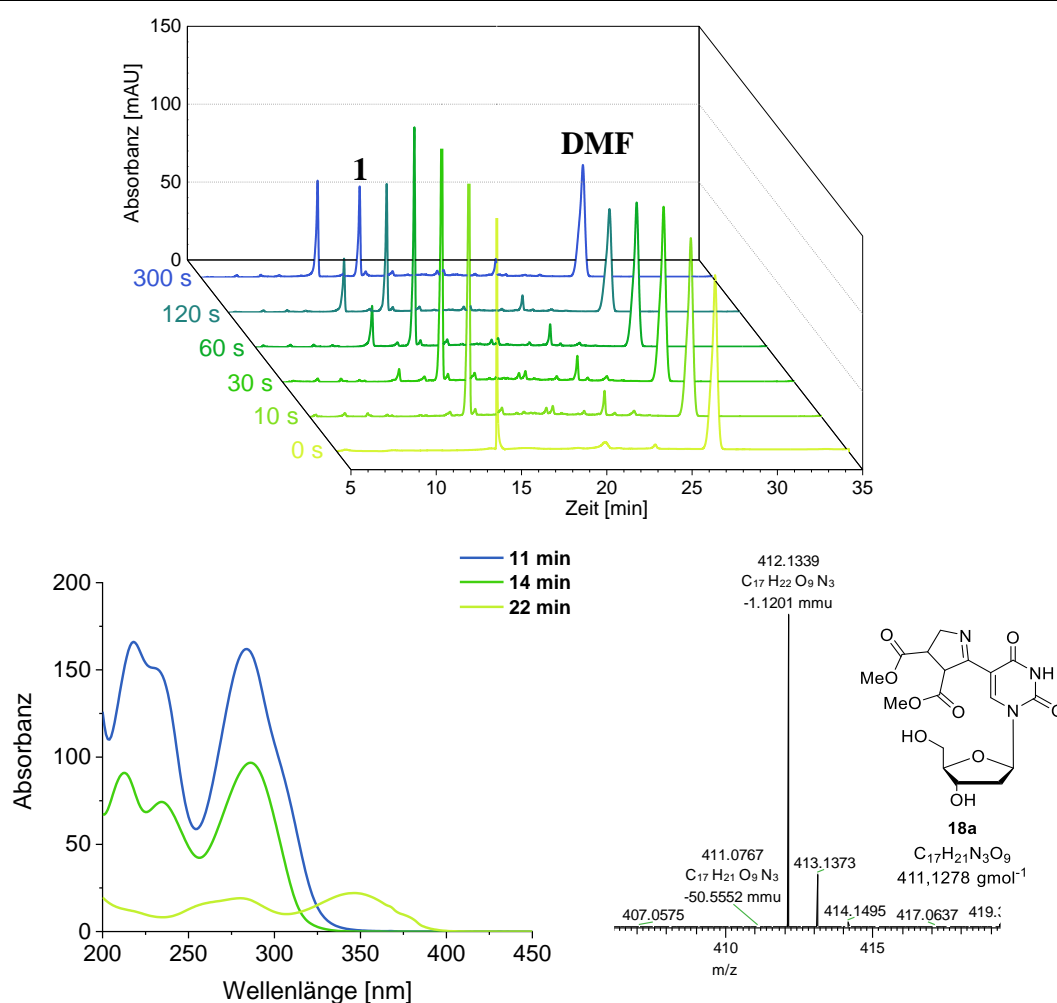
245 nm. Zudem lassen der isosbestische Punkt bei 283 nm sowie die Abnahme der Azirinbande auf einen quantitativen Umsatz von **17** schließen. Allerdings wird hierbei keine neue Bande gebildet, die auf ein Cycloaddukt hindeuten würde. Betrachtet man im Vergleich dazu die Belichtung von **17** ohne Reaktionspartner (Abbildung 24D), so kann ein ähnlicher Absorptionsverlauf festgestellt werden, weshalb der Umsatz während der Cycloaddition maßgeblich auf eine Änderung des Azirins zurückzuführen ist. Es ist denkbar, dass aufgrund der stöchiometrischen Zugabe des Reaktionspartners eine Reaktion des Azirins mit dem Lösungsmittel favorisiert wird. Allerdings ist es auch möglich, dass dennoch das Cycloaddukt gebildet wurde, jedoch über die Absorption nicht beobachtet werden kann. Da keine Masse detektiert werden konnte, kann keine Aussage über das tatsächlich, gebildete Produkt getroffen werden.



**Abbildung 24:** Absorptionsverlauf der Belichtung von (A) **1** mit NMM<sub>1</sub> in EtOH, (B) in H<sub>2</sub>O sowie die Belichtung von (C) **17** mit NMM<sub>2</sub> in Ethanol und (D) **17** ohne Reaktionspartner. Parameter: [**1**] = 80 μM, [NMM<sub>1</sub>] = 80 μM, [**17**] = 50 μM, [NMM<sub>2</sub>] = 50 μM, λ<sub>exc</sub> = 300 nm.

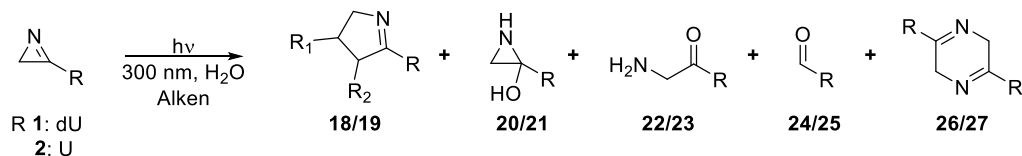


Infolge der starken Überlagerung der Absorptionsbanden des azirinmodifizierten Nucleosids mit dem Reaktionspartner, konnte die Reaktion mittels Absorptionsspektroskopie nicht verfolgt werden. Aus diesem Grund wurde die Cycloaddition mittels RP-HPLC analysiert. Hierfür wurde nicht nur die Konzentration an Azirin von 100  $\mu\text{M}$  auf 500  $\mu\text{M}$  erhöht, um die Bildung des Cycloaddukts zusätzlich über Massenspektrometrie nachweisen zu können, sondern auch ein Überschuss an Olefin (5 Äq., 10 Äq.) hinzugegeben, mit dem Zweck, Nebenreaktionen möglichst zu reduzieren. Des Weiteren wurde die lichtinduzierte Reaktion in reinem Wasser durchgeführt, um nahe am biologischen System zu bleiben und physiologische Bedingungen nachzuahmen. Anschließend wurden nach definierten Zeitintervallen der Belichtung 20  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung entnommen und in die HPLC injiziert.



**Abbildung 25:** HPL-Chromatogramme der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition zwischen **1** und DMF in Wasser nach 0 s, 10 s, 30 s, 60 s, 120 s und 300 s Belichtungsdauer sowie die zugehörigen Absorptionsspektren der Signal bei 11 min, 14 min und 22 min und die Masse von **18a**. Messparameter:  $[\mathbf{1}] = 500 \mu\text{M}$ ,  $[\text{DMF}] = 5000 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ , Trennmethode s. Kapitel 7.3.3 Tabelle 16.

In Abbildung 25 sind exemplarisch HPLC-Chromatogramme der Belichtung von **1** mit DMF dargestellt. Dabei können die Signale bei 14 min sowie 27 min eindeutig den Edukten **1** (14 min) und DMF (27 min) zugeordnet werden, da diese zuvor ohne den jeweiligen Reaktionspartner untersucht wurden. Während des Reaktionsverlaufes ist eine deutliche Reduktion dieser Signale zu erkennen, wobei gleichzeitig zwei neue Verbindungen mit einer Retentionszeit von 11 min sowie 21 min entstehen. Auffällig ist dabei, dass letzteres bereits nach 30 s Belichtungsdauer seine maximale Ausbeute erreicht und erst im Anschluss daran die Verbindung bei 11 min gebildet wird, welches das Hauptprodukt der Reaktion darstellt. Das zugehörige Absorptionsspektrum zeigt einen dem azirinmodifizierten Nukleosid **1** ähnlichen Verlauf. Dabei sind sowohl die für Nukleoside typischen Absorptionsmaxima bei ca. 220 nm sowie 260 nm, als auch eine Bande bei 230 nm und eine leichte Schulter bei 305 nm zu erkennen. Das Signal bei 22 min weist hingegen zwei breite Banden bei 260 nm sowie 350 nm auf. In Anbetracht der literaturbekannten Reaktivität von *2H*-Azirinen ist es denkbar, dass bei dieser Reaktion neben einem Cycloaddukt **18** auch ein hydrolysiertes Azirinderivat **20/22**, ein Dimer **26** oder aber ein durch Sauerstoff oxidiertes Produkt **24** entsteht.



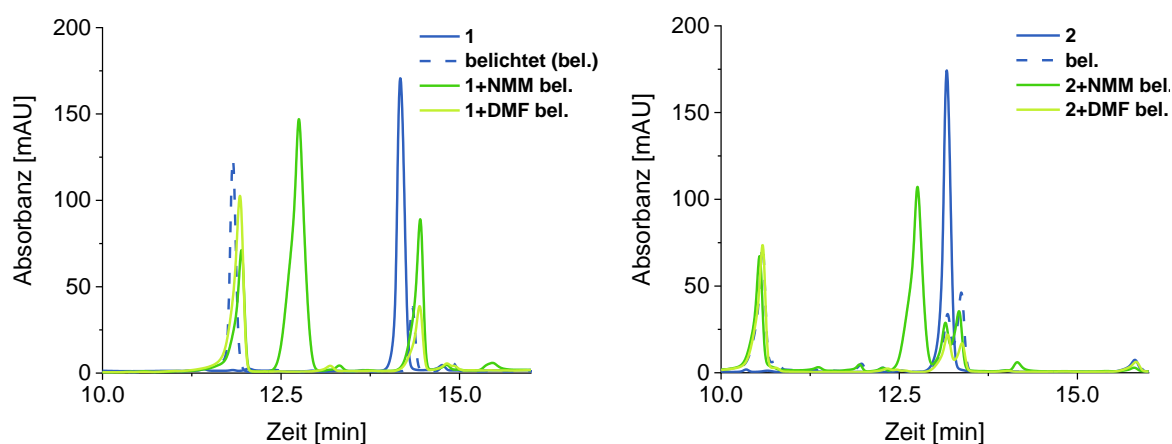
**Abbildung 26:** Strukturen der möglichen Reaktionsprodukte bei einer lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition.

Um die Signale eindeutig einem dieser möglichen Produkte zuordnen zu können, wurden diese fraktioniert gesammelt und massenspektrometrisch analysiert. Aufgrund der geringen Konzentration und der schlechten Ionisierbarkeit der Probe war dies allerdings nicht erfolgreich. Dennoch konnte die gewünschte Produktmasse in der Reaktionsmischung über Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nachgewiesen werden (Abbildung 25).

Um die Reaktivität gegenüber anderen elektronenarmen Alkenen zu überprüfen und eine erfolgreiche lichtinduzierte Cycloaddition zu verifizieren, wurden weitere Experimente mit NMM sowie unter Verwendung des azirinmodifizierten Nukleosides **2** durchgeführt. Durch

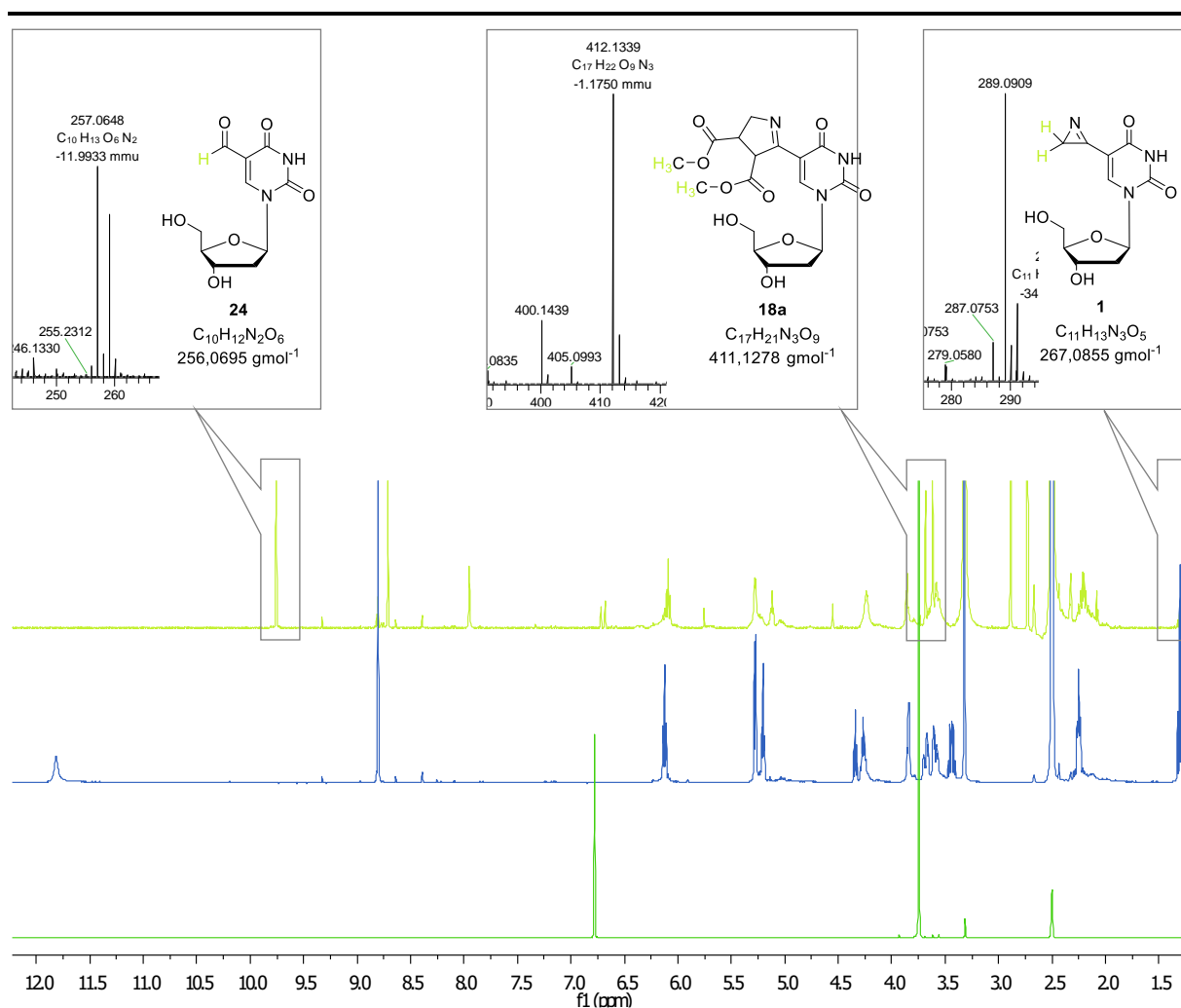
eine längere Belichtungsdauer und das Erhöhen des Alken-Überschusses auf 20 Äquivalente sollte zudem eine vollständige Umsetzung des azirinmodifizierten Nucleosides sowie eine höhere Ausbeute des Clickproduktes erreicht werden. Dabei verhielten sich die HPL-Chromatogramme (Kapitel 7.8.1, Abbildung 75, 76, 77) im zeitlichen Verlauf wie zuvor beschrieben. Es entstand ein neues Hauptprodukt bei geringeren Retentionszeiten (11 min für **1**, 10 min für **2**), dessen Absorptionsspektrum neben den typischen Nucleosid-Signalen eine Bande bei 230 nm sowie eine Schulter bei 305 nm aufwies. Daneben konnten nur wenige Signale mit sehr geringer Intensität beobachtet werden, was einen selektiven Verlauf der Reaktion verdeutlicht. Da jedoch alle Spektren unabhängig von Nucleosid und Reaktionspartner ein ähnliches Verhalten zeigten und somit die Bildung eines der möglichen Nebenprodukte **20-27** als Hauptprodukt bestärkte, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen. Hierfür wurde zunächst Acetonitril als aprotisches Lösungsmittel gewählt, um eine Hydrolyse auszuschließen. Auch dieses Experiment lieferte denselben Reaktionsverlauf, weshalb **20-23** nicht entstehen können. Somit findet keine Reaktion mit Wasser statt, was die Anwendbarkeit der Azirin-Alken-Cycloaddition als bioorthogonale Reaktion zur Markierung von Oligonucleotiden bekräftigt.

Dennoch sollte diese Auffälligkeit weiter analysiert werden, woraufhin die azirinmodifizierten Nucleoside **1** und **2** ohne Reaktionspartner belichtet wurden. In Abbildung 27 sind die Überlagerungen der HPL-Chromatogramme des jeweiligen Nucleosides vor und nach Belichtung bei 300 nm sowie der lichtinduzierten Cycloadditionen mit NMM bzw. DMF dargestellt.



**Abbildung 27:** Überlagerung der HPL-Chromatogramme des azirinmodifizierten Nucleosides vor sowie nach Belichtung und der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloadditionen zwischen (A) **1** und DMF bzw. NMM und (B) **2** und DMF bzw. NMM in Wasser nach 20 min Belichtungsdauer. Messparameter: [**1**] = [**2**] = 500 µM, [DMF] = [NMM] = 10 mM,  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ , Trennmethode s. Kapitel 7.3.3 Tabelle 16.

Dabei ist zu erkennen, dass das Edukt auch ohne Reaktionspartner fast vollständig abreagiert und ein neues Signal bei geringeren Retentionszeiten (ca. 11 min für **1**, 10 min für **2**) entsteht, welches mit dem gebildeten Hauptprodukt der jeweiligen Cycloadditionen übereinstimmt. Folglich muss bei der Belichtung neben dem Cycloaddukt, welches in allen Reaktionslösungen (**1**+NMM, **1**+DMF, **2**+NMM, **2**+DMF) massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte, auch eines der Nebenprodukte **24/25** oder **26/27** entstehen. Um dies eindeutig identifizieren zu können, waren kernspinresonanzspektroskopische (NMR) Analysen notwendig. Hierfür wurde beispielhaft die Reaktion zwischen **1** und DMF (1 Äq.) in mehreren Ansätzen unter denselben Bedingungen durchgeführt, anschließend vereinigt, lyophilisiert und das NMR-Spektrum der Reaktionsmischung mit den Edukten verglichen (Abbildung 28).



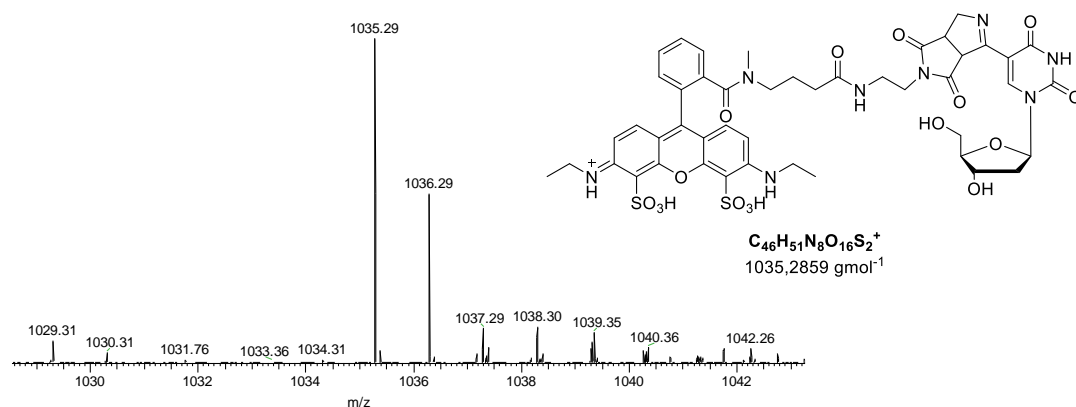
**Abbildung 28:** Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der lichtinduzierten Cycloaddition zwischen **1** und DMF (oben), **1** (Mitte) und DMF (unten) sowie die zugehörigen ESI-Massen und Strukturen der erhaltenen Produkte **24** und **18a**.

Im Spektrum der lichtinduzierten Cycloaddition, dargestellt in gelb, kann ein geringer Anteil an azirinmodifiziertem Nukleosid **1** anhand des charakteristischen Azirin-Signals bei 1.3 ppm festgestellt werden, wohingegen der Reaktionspartner DMF vollständig verbraucht zu sein scheint. Im Bereich zwischen 3.5 und 3.8 ppm entstehen zwei neue Singulets, die den Methylestergruppen zugeordnet werden können. Auch die chemische Verschiebung der Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum entspricht den Erwartungen und bestätigt somit die Bildung des Cycloaddukts. Besonders auffällig im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist das Singulett bei ca. 10 ppm. Eine solch charakteristische Tieffeldverschiebung wird vor allem durch Säuren oder Aldehyde hervorgerufen, was auf 5-Formyl-2'-desoxyuridin **24** als Nebenprodukt hindeutet. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Werte mit den Literaturdaten<sup>[236]</sup> (Kapitel 7.8.1, Abbildung 78) verglichen und zusätzlich die Masse der Reaktionsmischung gemessen. Dies bestätigte die Bildung des Cycloadduktes **18a** sowie 5-Formyl-2'-desoxyuridin **24** als Produkte der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition. Zur Quantifizierung dieser Reaktion wurden außerdem die Ausbeuten der Produkte über das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bestimmt. Dabei wurde **24** in einer Ausbeute von 53 % und **18a** mit 32 % erhalten.

Eine Reaktion mit Sauerstoff über eine Imin-Zwischenstufe, welches neben einem Nitrilylid ebenfalls bei Belichtung des 2*H*-Azirins entstehen kann, würde den Bedingungen einer bioorthogonalen Markierungsreaktion widersprechen. Allerdings konnten die Produkte nicht den Signalen des HPLC-Chromatogramms zugeordnet werden, weshalb die genaue Verfolgung des Reaktionsverlaufs nicht möglich war. Aus diesem Grund ist unklar, zu welchem Zeitpunkt das oxidierte Produkt entsteht. Es wäre möglich, dass zunächst das Cycloaddukt entsteht und es erst bei längerer Belichtungsdauer zur Bildung des Nebenproduktes kommt. Damit könnte die Markierungsreaktion durch die Belichtungszeit gesteuert und möglicherweise die Ausbeuten gesteigert werden.

Im Hinblick auf eine spätere Anwendung in der Bildgebung wurde in einem weiteren Versuch ein Fluoreszenzfarbstoff als Markierungsreagenz eingesetzt. Die Wahl fiel dabei auf ATTO532-Maleinimid, welches wasserlöslich ist und zudem einen Absorptionsbereich außerhalb des azirinmodifizierten Nukleosids im sichtbaren Bereich des Lichts aufweist. Die Belichtungsexperimente wurden wiederum in Wasser mit einer Azirin-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Allerdings wurden hierbei lediglich 1.5 Äquivalente Farbstoff verwendet, da die Konzentration innerhalb einer Zelle ebenfalls geringgehalten werden sollte. Nach 20 Minuten Belichtungsdauer bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm konnte die

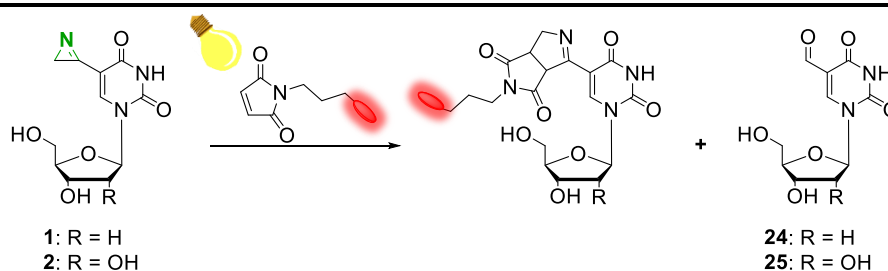
Masse über ESI-MS erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 29). Damit erweist sich die Azirin-Alken-Cycloaddition als alternative, bioorthogonale Methode zur Markierung von Nukleinsäuren.



**Abbildung 29:** Struktur und ESI-Masse des Cycloaddukts der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition von **1** und ATTO532-Maleinimid. Messparameter: Messparameter:  $[1] = 500 \mu\text{M}$ ,  $[\text{ATTO532}] = 750 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ .

### 3.5 Zusammenfassung und Ausblick

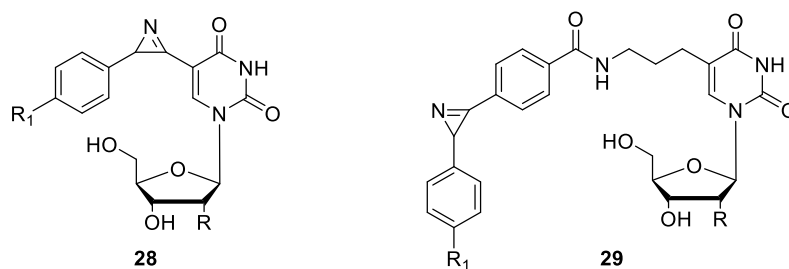
Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Synthese nach KUMAR et al.<sup>[206]</sup> erfolgreich optimiert und auf ein Ribonukleosid transferiert werden. Dabei trugen vor allem die geänderten Reaktionsbedingungen der Azidoiodierung mithilfe von Iod und Natriumazid in Methanol sowie der Ringschließung mittels Photolyse zu einer Steigerung der Ausbeute bei. Somit konnten die azirinmodifizierten Nukleoside **1** und **2** in reproduzierbaren Ausbeuten von 45 % (**1**) und 23 % (**2**) synthetisiert werden. Reaktivitäts-Studien sowie die Synthesen selbst zeigten, dass nicht nur die Azid-Zwischenstufen, sondern auch das 2*H*-Azirin äußerst empfindlich gegenüber Hitze, Licht, nukleophilen Basen und starken Säuren sowie Lösungsmitteln wie Methanol oder DCM reagieren. Dennoch gelang erstmals der Nachweis einer lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition an Nukleosiden in wässrigem Medium. Hierfür wurden die azirinmodifizierten Nukleoside **1** und **2** mit einem Überschuss an Reaktionspartner (DMF, NMM oder ATTO532) in Wasser bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm für 20 Minuten belichtet. Mithilfe von HPL-Chromatogrammen, ESI-MS- sowie NMR-Messungen konnten die jeweiligen Cycloaddukte nachgewiesen sowie die entsprechenden 5-Formyl-Nukleoside **24/25** als Nebenprodukte identifiziert werden.



**Abbildung 30:** Lichtinduzierte Azirin-Alken-Cycloaddition von **1** bzw. **2** mit NMM und daraus gebildete Produkte **18b/19b** und **24/25**.

Zur Optimierung der Reaktion ist es notwendig, den Reaktionsverlauf genauer zu studieren und damit den Zeitpunkt der Bildung von **24/25** herauszufinden. Wird dieses erst in Folge des Cycloaddukts gebildet, so könnte durch geeignete Belichtungsdauer die Synthese des Nebenproduktes verhindert werden. Desweiteren könnten die Nukleoside **1** und **2** in Oligonukleotide eingebaut und eine Markierungsreaktion unter Verwendung eines an Maleinimid gekuppelten Farbstoffes getestet werden. Aufgrund der Sensitivität des 2*H*-Azirins stellt dabei der metabolische Einbau von **2** in RNA den elegantesten Weg dar. Um dennoch auch einen Einbau in DNA zu ermöglichen, wäre es denkbar, anstelle des

azirinmodifizierten Nucleosides **1** (oder **2** für RNA) die weniger reaktive Vinylazid-Zwischenstufe **8** (bzw. **14**) für weitere Experimente zu verwenden und im Anschluss an den Einbau zum Azirin zu belichten. Um die Anregungswellenlänge weiter in den sichtbaren Bereich zu verschieben und dadurch Zellschäden zu vermeiden, könnten substituierte, azirinmodifizierte Nucleoside wie beispielsweise **28** oder **29** in Abbildung 31 hergestellt werden. Dabei bietet die para-Position eine hervorragende Möglichkeit, um elektronenschiebende Substituenten anzubringen, sodass zusätzlich das 2*H*-Azirin stabilisiert wird.



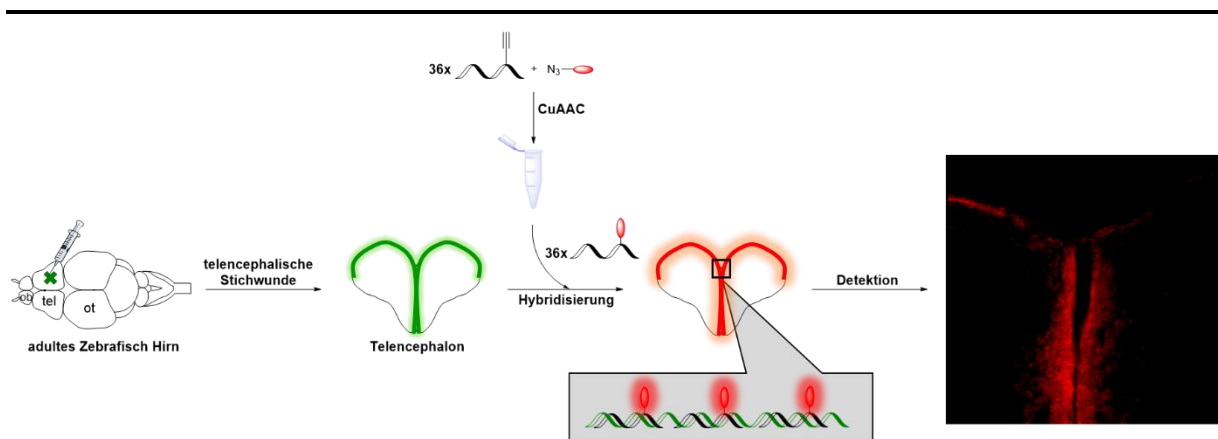
**Abbildung 31:** Strukturen weiterer, möglicher azirinmodifizierter Nucleoside zur Anwendung in einer lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition.



#### 4 FLUORESZENZ *IN-SITU* HYBRIDISIERUNGSSONDEN (FISH)

Zebrafische besitzen, im Gegensatz zu Säugetieren wie Menschen, die bemerkenswerte Fähigkeit, Verletzungen des zentralen Nervensystems zu regenerieren.<sup>[237]</sup> Diese neuronale Regeneration kann durch verschiedene Moleküle und Mechanismen, wie beispielsweise Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren, Neurotrophine, Gene oder nicht-kodierende RNA ausgelöst werden, welche in aktivierten Stammzellen, angesiedelt in neurogenen Nischen, wie die ventrikuläre Zone, ausgeschüttet werden. Diese wiederum generieren Neuroblasten, die als Vorläuferzellen für Neuronen gelten.<sup>[238]</sup> Die detaillierte Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen könnte somit wichtige Hinweise zur Entwicklung neuer Therapien für neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington liefern.

Aufgrunddessen fokussierte sich dieser Teil der Arbeit auf die Visualisierung von mRNA, die nach Verletzung des Zebrafisch-Gehirns zur Regeneration des adulten Nervengewebes exprimiert wird. Eine weit verbreitete Methode, um Nukleinsäuren in ihrer natürlichen Umgebung zu analysieren, stellt dabei die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung dar. Basierend auf dieser Bildgebungstechnik wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, welches mithilfe der CuAAC die Synthese von 36 einfachmodifizierten Sequenzen in nur einem Ansatz erlaubt. Anschließend sollte die Qualifikation dieser fluoreszenten Architektur als Marker für eine einzelne mRNA in *gfp* sowie *sox9a* exprimierendem Zebrafisch Hirn-Gewebe evaluiert werden. Durch die hohe Zahl einfachmarkierter, kurzer Sonden sollte das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis verbessert werden.

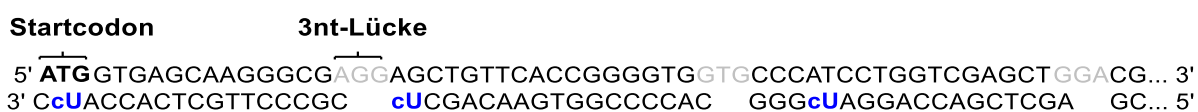


**Abbildung 32:** Schematische Darstellung des Konzeptes der optimierten FISH in Zebrafisch durch 36 einfachmodifizierte DNA-Sequenzen.

Um dieses Konzept weiter zu optimieren, wurden zudem diverse Click-Bausteine und Farbstoffe auf ihre Hybridisierungssensitivität sowie Fluorogenität untersucht. Damit wäre es möglich, auf das Herauswaschen überschüssiger, ungebundener Probe zu verzichten und dennoch die Sensitivität sowie das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu verbessern.

#### 4.1 Synthese der FISH-Sonden mittels CuAAC

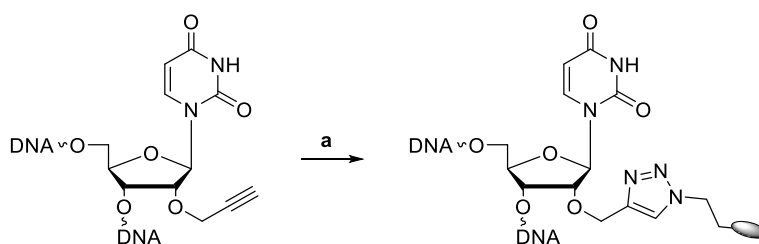
Um die Detektion einzelner mRNA Moleküle in Gewebe mit hoher Sensitivität zu ermöglichen, wurde, angelehnt an die Arbeiten von S. TYAGI et al.<sup>[137]</sup>, eine Auswahl an DNA-Strängen mit jeweils einem Farbstoff markiert. Diese Oligonukleotide sind alle zu einem anderen Abschnitt der Ziel-mRNA komplementär, wodurch die Emissionsintensität des Signals erhöht wird, sobald alle Stränge hybridisiert sind. Damit bietet diese Methode nicht nur den Vorteil einer höheren Sensitivität gegenüber gering konzentrierten Zielmolekülen, sondern verbessert auch das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Im Gegensatz zu einer terminalen Modifizierung der Sequenzen mittels Amidkupplung nach TYAGI wurde in dieser Forschungsarbeit ein Verfahren etabliert, welches die simultane Markierung aller Stränge mit dem Farbstoff über eine CuAAC erlaubt. Als erster Ansatz und zum Nachweis der Methode wurde hierfür ein 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**) mittels automatisierter Festphasensynthese in 36 DNA-Sequenzen insertiert, die komplementär zur grün-fluoreszierenden Protein (GFP) kodierenden mRNA oder *sox9a* (Transkriptionsfaktor) mRNA sind. Bei der Wahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass diese aus 17 - 22 Nukleotiden bestanden, um eine gute Hybridisierung zu gewährleisten. Von Vorteil wäre es zudem, möglichst nahe an einem Startcodon (ATG) zu beginnen, wobei der G-C-Gehalt nicht über 50 % liegen und ein Abstand von mindestens 3 Nukleotiden (nt) zwischen den Strängen eingehalten werden sollte, um ein Selbstlöschen der Emission zu vermeiden. Um, trotz andersartiger Anknüpfung, den Experimenten von TYAGI möglichst nahe zu kommen und diese zu „reproduzieren“, wurde jedes erste Thymin, gezählt vom 3'-Ende, durch ein **cU** ersetzt (s. schematische Darstellung in Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Repräsentative Darstellung von drei der 36 synthetisierten **cU**-modifizierten DNA-Stränge, komplementär zur GFP mRNA, zur Anwendung als FISH-Sonden.

---

Nach einer ersten Aufreinigung der Dimethoxytrityl-geschützten Stränge über *Glen-Pak*<sup>TM</sup>-Säulen und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) wurden jeweils 20 nmol vereinigt und lyophilisiert. Somit konnten bereits während der Festphasensynthese entstandene Abbruchstränge eliminiert werden. Die Bibliothek an Oligonukleotiden wurde anschließend, wie in Schema 11 gezeigt, mit ATTO532 bzw. Cyanin 5 (**Cy5**) via CuAAC geklickt. Diese Methode erlaubt damit den schnellen Austausch des Farbstoffes, um den spektralen Anforderungen des Experiments gerecht zu werden. Eine abschließende Reinigung über HPLC, bei welcher ab dem geringsten Anstieg bis zum Ende der Farbstoffabsorption fraktioniert gesammelt wurde, soll überschüssigen Farbstoff sowie einen Großteil der ungeclickten Stränge von der gewünschten Bibliothek an FISH-Sonden abtrennen.

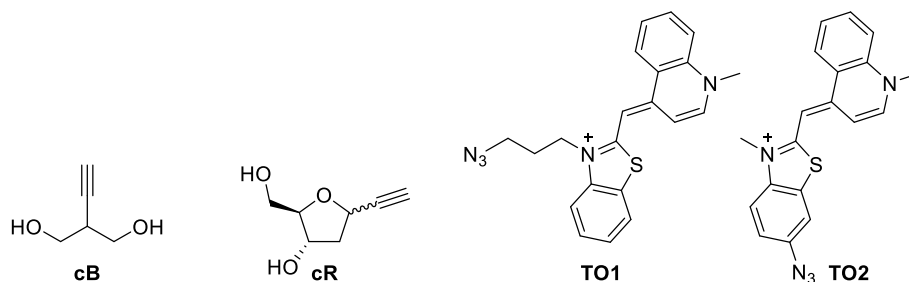


**Schema 11:** Kupferkatalysierte Click-Reaktion am Beispiel von **cU**-modifizierter DNA. a) Farbstoff-Azid,  $\text{CuPF}_6(\text{CH}_3\text{CN})_4$ , Na-Ascorbat, TBTA, DMSO/*t*BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 60°C, 1.5 h.

## 4.2 Synthese der Click-Bausteine und Azid-Farbstoffe

Um das Konzept der FISH in Bezug auf das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis weiter zu optimieren, wurden der acyclische 3-Butin-1-yl-Linker (**cB**)<sup>[239]</sup> sowie zwei Anomere eines alkinmodifizierten 2-Desoxyribose-Bausteins **cR**  $\alpha/\beta$ <sup>[240]</sup> synthetisiert (Abbildung 34) und in DNA eingebaut. Aufgrund der fehlenden Base sollte das Interkalieren der Chromophore in den Basenstapel verbessert und, infolge der  $\pi$ -Stapelung und geänderten Umgebung, ein Fluoreszenzanstieg erzielt werden. Des Weiteren sollte durch die Anknüpfung an ein  $\alpha$ - oder  $\beta$ -konfiguriertes **cR** die Orientierung der Farbstoffe variiert werden, um einen möglichen Einfluss auf das Emissionsverhalten zu untersuchen.

Solche hybridisierungssensitiven Sonden erfordern zusätzlich die Verwendung geeigneter Chromophore. Aus diesem Grund wurden zwei Thiazolorange-Derivate **TO1** und **TO2** hergestellt, an welche das Azid über unterschiedlich lange (Alkyl-)Linker angeknüpft wurde. Dabei wurde neben einem Propyl-Linker auch eine direkte, kovalente Bindung des Azids gewählt, um die Auswirkungen der Flexibilität sowie die Fluorogenität zu analysieren.

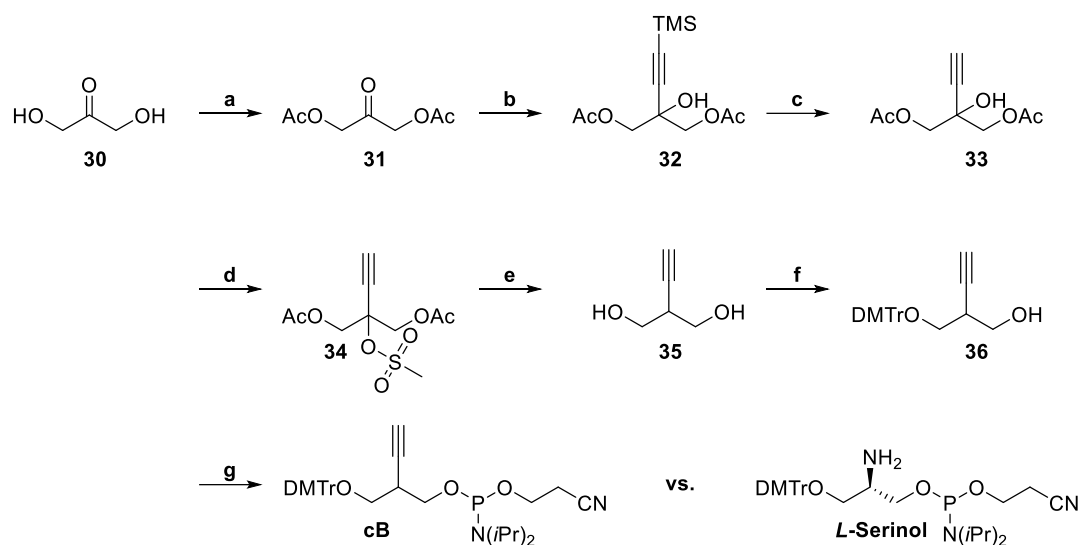


**Abbildung 34:** Strukturen der synthetisierten, alkinmodifizierten Bausteine **cB** sowie **cR** und der Azidfarbstoffe **TO1** und **TO2** für die Anwendung in FISH-Sonden.

### 4.2.1 Synthese des acyclischen 3-Butin-1-yl-Linkers (**cB**)

Die Art der Konjugation eines Fluoreszenzfarbstoffes an Oligonukleotide ist ein entscheidender Aspekt, der die Hybridisierungssensitivität bestimmt.<sup>[241]</sup> So verhindert beispielsweise der von SEITZ et al. entwickelte azyklische *L*-Serinol-Linker (s. Schema 12) eine Wechselwirkung des angeknüpften TO-Farbstoffes mit der DNA im Einzelstrang, lässt jedoch ausreichend Flexibilität zu, sodass im Doppelstrang die Fluoreszenz ansteigt.<sup>[142, 241-243]</sup> Angelehnt an diese Arbeiten, wurde im Arbeitskreis um WAGENKNECHT ein azyklischer 3-Butin-1-yl-Linkers (**cB**) synthetisiert, der aufgrund der Ähnlichkeit zur natürlichen

2-Desoxy-*D*-ribose keine strukturellen Veränderungen der B-DNA-Konformation hervorrufen und darüber hinaus die Anknüpfung des Chromophors über eine CuAAC erlauben soll.<sup>[243]</sup>



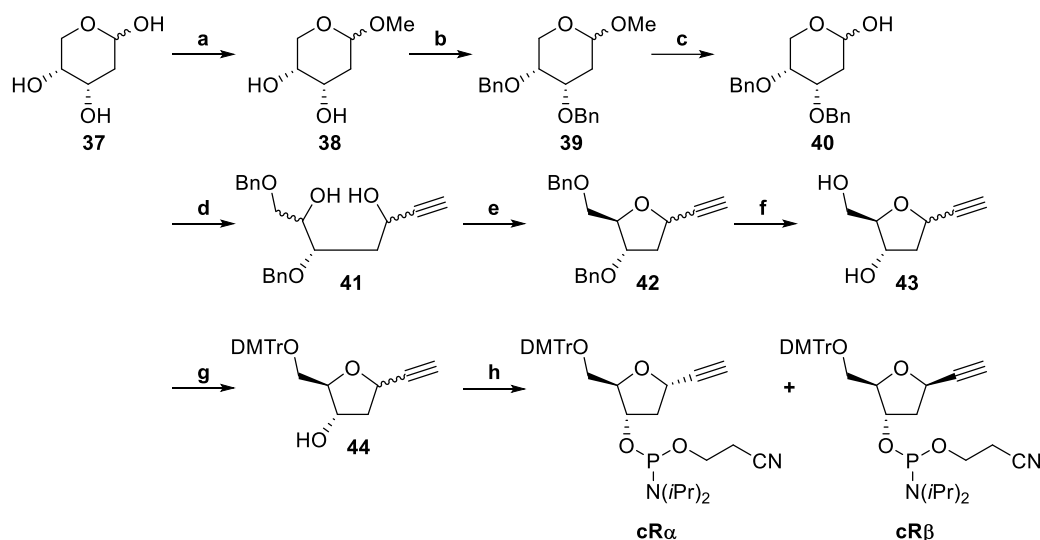
**Schema 12:** Syntheseroute zur Herstellung des **cB**. a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, RT, 1 h, 92 %, b) 1. Li-TMS-acetylid, THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h, 56 %, c) 1 M TBAF/THF, THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min, 94 %, d)  $\text{Et}_3\text{N}$ , MsCl, DCM,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h, 80 %, e)  $\text{LiAlH}_4$ , THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h, 44 %, f) DMTr-Cl, Pyridin, RT, über Nacht, 40 %, g) DIPEA, PA-Cl, DCM, RT, 3 h, 63 %.

Grundlage dieser Syntheseroute bildete die Vorschrift nach BATES et al.<sup>[239]</sup> Dabei wurde zunächst das kommerziell erhältliche Dihydroxyacetone **30** acetyliert, um die Alkoholgruppen zu schützen und im Anschluss die für die Click-Reaktion notwendige Alkin-Funktion einzuführen. Hierfür wurde Lithiumtrimethylsilylacetylid an **31** addiert und die Acetylengruppe von **32** mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entschützt. Zur Abspaltung der Hydroxylgruppe in **33** wurde diese mithilfe von Methansulfonylchlorid in eine bessere Abgangsgruppe überführt (**34**), sodass eine reduktive Eliminierung zusammen mit den Acetyl-Schutzgruppen ermöglicht werden konnte und das Produkt **35** gebildet wurde. Aufgrund der Volatilität der Substanz wurde das Lösungsmittel nicht vollständig entfernt und **35** direkt mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) zum geschützten Linker **36** umgesetzt. Da DMTr-Cl keinerlei chirale Information enthält, wurde hierbei lediglich ein Enantiomergemisch isoliert, welches von JULIAN GEBHARD synthetisiert und dankenswerterweise bereitgestellt wurde.

Dieser Linker **36** wurde im letzten Schritt zum Phosphoramidit **cB** umgesetzt und in FISH-Sonden eingebaut.

#### 4.2.2 Synthese der Anomere des cRibo-Bausteins (cR)

Als Alternative zum azyklischen Linker **cB** wurde ein alkin-funktionalisierter 2-Desoxy-*D*-ribose-Baustein (**cR**) hergestellt, der den natürlichen Nucleosiden deutlich ähnlicher ist. Hierbei wurde eine stereospezifische Synthese nach den Arbeiten von PERGOLI et al.<sup>[240]</sup> verfolgt, sodass über acht Stufen, ausgehend von der 2-Desoxy-*D*-ribose **37**, die beiden Anomere **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$**  hergestellt werden konnten.



**Schema 13:** Syntheseroute zur Herstellung der **cR**-Anomere. a) Acetylchlorid, MeOH, RT, 1 h, quantitativ, b) Benzylchlorid, KOH, THF, Rückfluss, 24 h, 84 %, c) AcOH/H<sub>2</sub>O 80:20, 49 °C, 2 d, quantitativ, d) Ethynylmagnesiumbromid/THF, THF, 0 °C – RT, 46 h, 27 %  $\alpha$  und 52 %  $\beta$ , e) TsCl, 5 M KOH/H<sub>2</sub>O, RT, 13 h ( $\alpha$ )/52 h ( $\beta$ ), 83 %  $\alpha$  und 84 %  $\beta$ , f) 1 M BCl<sub>3</sub>/DCM, DCM, -78 °C, 1.5 h, quantitativ, g) DMTr-Cl, Pyridin, RT, 5 h, 74 %  $\alpha$  und 31 %  $\beta$ , h) DIPEA, Pyridin, RT, 3 h, 69 %  $\alpha$  und 77 %  $\beta$ .

Im ersten Schritt erfolgte eine Fischer-Helferich-Glykosylierung, wobei die Hydroxylfunktion am C1 der 2-Desoxy-*D*-ribose **37** säurekatalysiert durch Methanol ersetzt und nach Abspaltung eines Protons **38** gebildet wurde. Dieses wurde in quantitativen Ausbeuten vollständig mit Benzyl-Schutzgruppen verethert (**39**), um anschließend durch Erhitzen in verdünnter Essigsäure die glykosydische Bindung zu **40** zu hydrolysieren. An dieser Position konnte nun die Alkin-Funktion angeknüpft werden. Dafür wurde eine Grignardreaktion gewählt, die zu einer Ringöffnung und zur Bildung von zwei Diastereoisomeren **41** führte. Nach säulenchromatographischer Trennung wurden die beiden Diole unabhängig voneinander

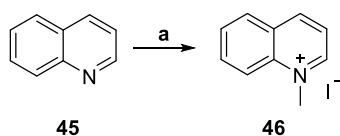
mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und Base weiter zu den Anomeren **42 $\alpha$**  und **42 $\beta$**  umgesetzt und durch Zugabe von Brotrichlorid in Dichlormethan entschützt (**43 $\alpha$**  und **43 $\beta$** ). Um die Click-Bausteine für die automatisierte Festphasensynthese vorzubereiten, wurde an der 5-Hydroxylgruppe eine 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe eingeführt und die geschützten Zucker **44 $\alpha$**  und **44 $\beta$**  in einem letzten Schritt mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zu den Phosphoramiditen **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$**  umgesetzt.

Die Bausteine **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$**  konnten somit in einer Gesamtausbeute von 10 % und 9 % über acht Syntheseschritte hergestellt und in die entsprechenden FISH-Sequenzen eingebaut werden.

#### 4.2.3 Synthese der Thiazol-Derivate TO1 und TO2

Thiazolorange (TO) gilt aufgrund der Drehbarkeit um die Methinbrücke, die durch die Umgebung beeinflusst werden kann, als hybridisierungssensitiver Farbstoff. Während TO im Einzelstrang eine geringe Emission aufweist, wird die Rotation durch Interkalation in die Doppelhelix unterbunden, was eine Verstärkung der Fluoreszenz zu Folge hat.<sup>[244-248]</sup> Aus diesem Grund wurden die beiden Farbstoffderivate **TO1** und **TO2** (Abbildung 34)<sup>[249]</sup> für die Anwendung in FISH-Sonden synthetisiert. Dabei bestehen beide Derivate aus einem modifizierten Chinolin, welches über eine Methinbrücke mit einer Benzothiazol-Komponente verknüpft ist.

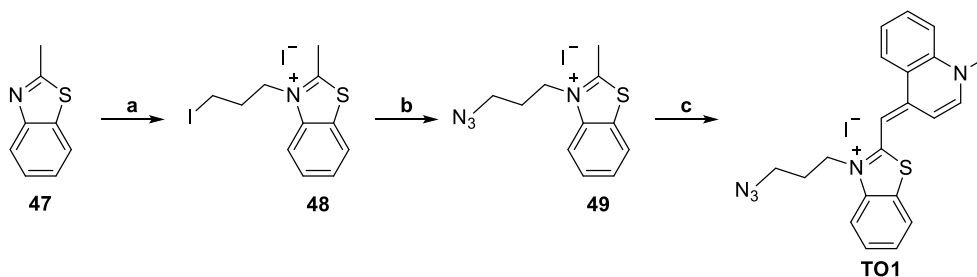
Demnach wurde zur Herstellung beider Chromophore zunächst Chinolin **45** mit Methyljodid am Stickstoff alkyliert, wobei **46** erhalten wurde.



**Schema 14:** Synthese zur Herstellung der Chinolin-Komponente **34** für **TO1** und **TO2**. a) Iodmethan, Dioxan, Rückfluss, 1 h, 96 %.

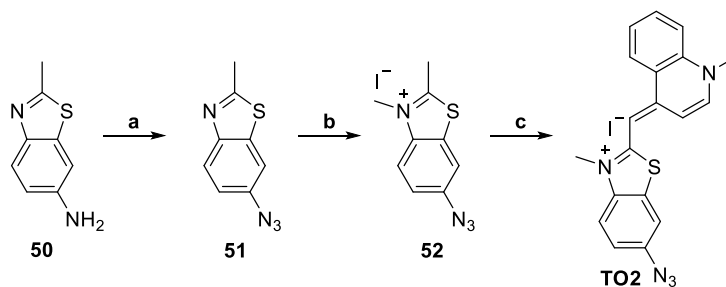
Für die Synthese des Chromophores **TO1** wurde, entsprechend den Vorschriften von BROWN et al.<sup>[250]</sup>, 2-Methylbenzothiazol **47** mit 1,3-Diodpropan zu **48** alkyliert und anschließend das Iod mithilfe von Natriumazid durch ein Azid (**49**) substituiert. Dieses konnte in einer

basischen Lösung selektiv an der para-Position des methylierten Chinolins **46** angreifen und so den gewünschten Farbstoff **TO1** in einer Ausbeute von 2 % über 4 Stufen bilden.



**Schema 15:** Syntheseroute zur Herstellung von **TO1**. a) Diiodpropan, MeCN, Rückfluss, 48 h, 25 %, b)  $\text{NaN}_3/\text{H}_2\text{O}$ , MeCN, RT, 19 h, 89 %, c) **46**,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM/MeOH 1:1, RT, 16 h, 11 %.

Im Gegensatz dazu wurde zur Synthese des Chromophors **TO2** mit direkter, kovalenter Verknüpfung des Azids 6-Amino-2-methylbenzothiazol **50** als Ausgangsmaterial eingesetzt.<sup>[249]</sup> Dieses wurde unter Verwendung von salpetriger Säure diazotiert und das entstehende Diazoniumsalz mit Natriumazid zum Azid **51** umgesetzt. Nach Alkylierung mittels Methyljodid wurde **52** mit **46** in einer basischen Lösung verknüpft und somit das zweite Thiazolderivat **TO2** in einer Ausbeute von 8 % über vier Stufen erhalten.

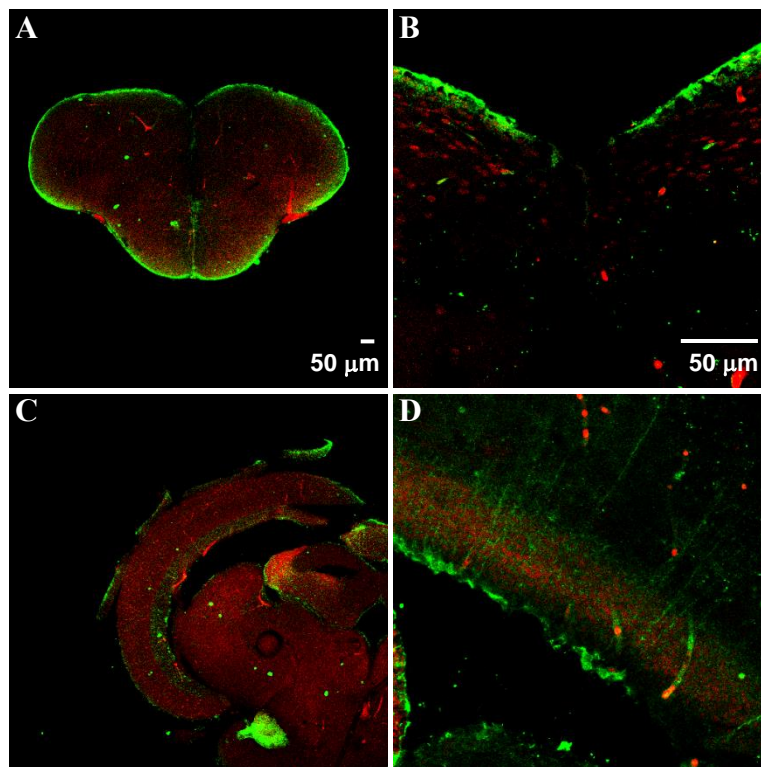


**Schema 16:** a) 1.  $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{O}$ , HCl, 0°C, 10 min, 2.  $\text{NaN}_3/\text{NaOAc}$ , 0 °C, 20 min, 73 %, b) MeI, Rückfluss, 6 h, 57 %, c) **46**, KOH, MeOH, Rückfluss, 30 min, 20 %.



### 4.3 Hybridisierungsstudien der Click-Bausteine cU, cB, cR

Wie bereits beschrieben, wurde zunächst cU in 36 zur GFP-kodierenden mRNA komplementäre DNA-Sequenzen eingebaut und mit ATTO532 bzw. Cy5 mittels CuAAC modifiziert. Um die Anwendbarkeit der Methode zu verifizieren, wurden Zebrafisch-Hirnschnitte einer transgenen Linie, welche *gfp* im Ventrikel des Telencephalons exprimiert, mit der Sonde hybridisiert und über konfokale Mikroskopie beobachtet. Bei einer erfolgreichen FISH wäre eine Überlagerung der Chromophor-Emission (rot) mit dem Signal des GFP (grün) zu erwarten. Allerdings konnten die Bilder der Hirnschnitte dies nicht bestätigen. Stattdessen wurde unspezifisch jeder Zellkern angefärbt, was in Abbildung 35 dargestellt ist.



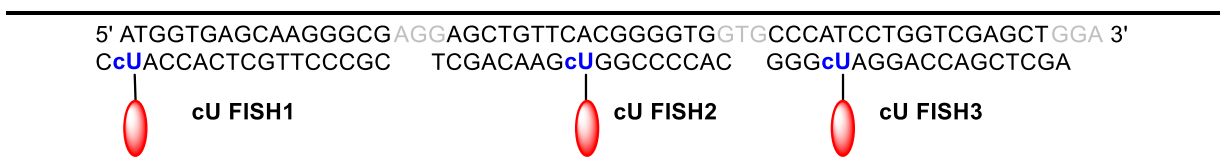
**Abbildung 35:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von Zebrafisch-Hirnschnitten hybridisiert mit 36 Cy5-cU-modifizierten DNA-Fish-Sequenzen, die komplementär zur GFP kodierenden mRNA sind.

Aus diesem Grund wurden Studien zur Untersuchung der Hybridisierungsstärke durchgeführt, um auszuschließen, dass das Strangdesign und die Tatsache, dass DNA anstelle von RNA verwendet wurde, Ursache für die Resultate der biologischen Experimente waren. Des Weiteren sollte das Prinzip der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung durch

Fluoreszenzverstärkung nach Hybridisierung oder Clicken eines Fluorophors optimiert werden.

#### 4.3.1 Untersuchung der Hybridisierungsstärke

Um die biologischen Experimente verstehen und optimieren zu können, wurden die ersten drei der 36 cU modifizierten DNA-Sequenzen schrittweise mit einer käuflich erworbenen DNA hybridisiert, deren Sequenz den ersten 58 nt der Ziel-mRNA entspricht (Abbildung 36). Neben Absorption und Emission wurden auch die Fluoreszenzquantenausbeuten und Schmelztemperaturen bestimmt, um ihre optischen und physikalischen Eigenschaften zu untersuchen.

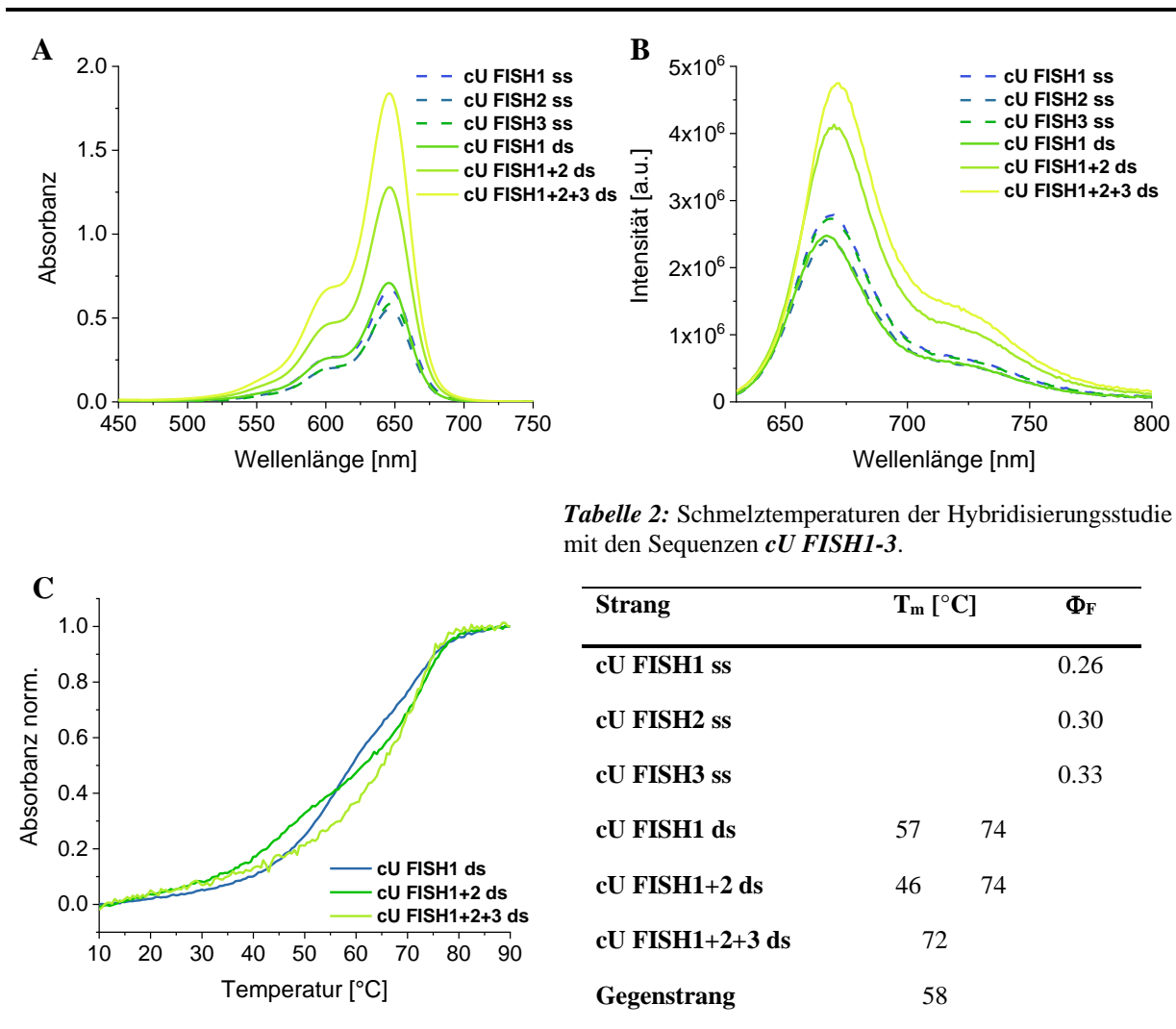


**Abbildung 36:** Sequenzen der cU-modifizierten FISH-Oligonukleotide **cU FISH1-FISH3** hybridisiert an eine komplementäre, käuflich erworbene DNA.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 37 A) zeigt das typische Absorptionsmaximum des **Cy5**-Chromophors bei  $\lambda_{\text{abs}} = 646 \text{ nm}$  sowie eine Schulter bei ca. 600 nm. Während die Extinktionskoeffizienten der Einzelstränge ähnlich sind, nimmt dieser, wie erwartet, additiv mit Anzahl der hybridisierten Sequenzen und dem damit steigenden Gehalt an Farbstoff zu. Dasselbe Verhalten kann auch im Emissionsspektrum, dargestellt in Abbildung 37 B, beobachtet werden. Die charakteristischen Fluoreszenzmaxima bei  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$  sowie bei 724 nm sind deutlich zu erkennen. Während sich die Intensitäten der Einzelstränge kaum unterscheiden, ist auch hier nach Hybridisieren mit der komplementären Sequenz ein Anstieg zu erkennen. Allerdings verläuft dieser nicht linear, was durch ein Löschen der Emission in **cU FISH3** aufgrund eines Energietransfers auf die benachbarten Guanosine erklärt werden kann. Dennoch bekräftigt das Emissionsspektrum das Prinzip dieser hier verwendeten FISH-Methode zur Verstärkung des Detektionssignals.

Um die Hybridisierung mehrerer Stränge gegen eine lange Sequenz, wie eine mRNA, bewerten zu können, wurden zusätzlich Schmelztemperaturen nach Hybridisierung jeder einzelnen FISH-Sequenz gemessen (Abbildung 37 C). Dabei wurden zwei Schmelzpunkte

erhalten, eine niedrige bei  $T_m = 55^\circ\text{C}$  und eine hohe bei  $T_m = 74^\circ\text{C}$ , solange nicht alle drei Stränge an die Ziel-Sequenz gebunden waren. Dies ließ darauf schließen, dass der Gegenstrang selbstkomplementär ist und eine Haarnadelstruktur ausbildete, deren kurze Stammregion zur geringeren Schmelztemperatur führte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die unmodifizierte DNA-Sequenz ohne Gegenstrang hybridisiert und ebenfalls vermessen. Daraus resultierte eine Schmelztemperatur von  $T_m = 58^\circ\text{C}$  und verifizierte somit die Selbstkomplementarität.



**Abbildung 37:** Absorptions- (A) und Emissionsspektren (B) der Einzelstränge *cUFISH01-cUFISH03* sowie nach sequentieller Hybridisierung und Darstellung der Schmelztemperaturen(C).

Infolge dieser starken Bindung des Hybrids war es notwendig, auch die Bedingungen der FISH im Gewebe entsprechend anzupassen und die biologischen Experimente bei höheren

Temperaturen durchzuführen. Die erhaltenen Resultate werden im Kapitel 4.4 genauer beschrieben.

#### 4.3.2 Studien zur Hybridisierungssensitivität

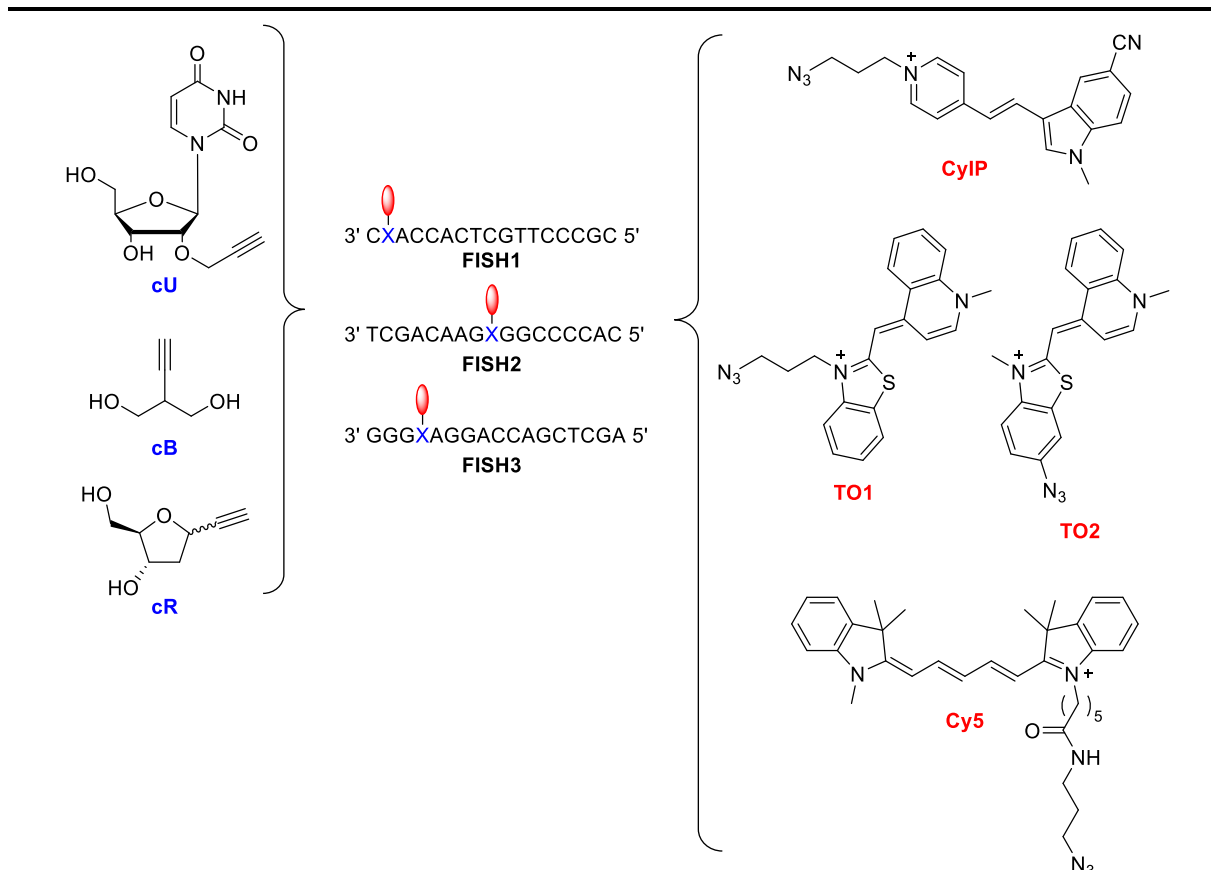
Da das Konzept der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung aufgrund hoher Hintergrundfluoreszenz durch ungebundene Sonde oder abgebauten Farbstoff oftmals eine schlechte Sensitivität aufweist, sollte diese Methode weiter optimiert werden. Hierzu sollten Sonden entwickelt werden, die erst nach Hybridisieren mit der Zielsequenz Fluoreszenz zeigen. So wäre es möglich, nicht nur das Hintergrundsignal zu reduzieren, sondern auch auf exzessives Herauswaschen überschüssiger Probe zu verzichten und dennoch ein ausreichend starkes Signal zu erhalten, da mehrere Sonden an das Zielmolekül binden.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden neben dem bereits beschriebenen **cU** auch der azyklische Linker **cB** sowie die beiden Anomere des **cR** in die drei Sequenzen **FISH1-FISH3** eingebaut. Durch die verschiedenen Strukturen der Alkin-Bausteine sollten sich somit nicht nur andere Auswirkungen auf die Stabilität der Doppelhelix ergeben, sondern auch unterschiedliche Konfigurationen der angeknüpften Chromophore erzwungen werden. Zudem wurden diverse Cyanin-Farbstoffe, die in Abbildung 38 dargestellt sind, zur Markierung der Oligonukleotide verwendet. Diese sind dafür bekannt, nicht durch photoinduzierten Ladungstransfer auf Nukleobasen, sondern aufgrund von *cis-trans*-Isomerisierung strahlungslos Energie zu verlieren. In der Literatur finden vor allem **TO**-Farbstoffe zahlreiche Anwendung als umgebungssensitive Chromophore.<sup>[141-142, 242-243, 251-252]</sup> Allerdings konnte in der Arbeitsgruppe um WAGENKNECHT auch ein Fluoreszenzanstieg für die Kombination aus **cB** und einem eigens hergestellten Cyanin-Indol-Pyridin-Farbstoff **CyIP** nachgewiesen werden, weshalb diese hier ebenfalls Anwendung fand. Da die Synthese der **cR**-modifizierten FISH1-Stränge äußerst schlechte Ausbeuten lieferte, ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit nachfolgende Kombinationen aus Sequenz, Baustein und Farbstoff:

## Fluoreszenz in-situ Hybridisierungssonden (FISH)

**Tabelle 3:** Kombinationen aus Sequenz, Click-Baustein und Farbstoff zur Studie der Hybridisierungssensitivität.

	FISH1				FISH2				FISH3			
	cU	cB	cR $\alpha$	cR $\beta$	cU	cB	cR $\alpha$	cR $\beta$	cU	cB	cR $\alpha$	cR $\beta$
<b>Cy5</b>	✓				✓			✓	✓			✓
<b>TO1</b>							✓	✓			✓	✓
<b>TO2</b>			✓				✓	✓			✓	✓
<b>CyIP</b>		✓	✓			✓	✓	✓		✓	✓	✓

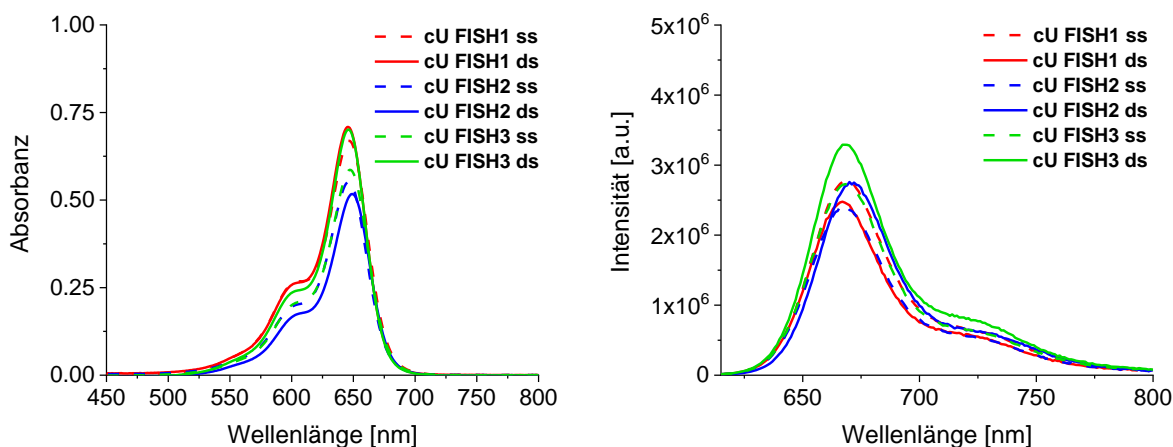


**Abbildung 38:** Strukturen der verwendeten Alkin-modifizierten Bausteine **cU**, **cB** und **cR** sowie die via CuAAC verknüpften Chromophore **CyIP**, **TO1**, **TO2** und **Cy5**.

Nach erfolgreicher Synthese dieser Stränge wurden deren optische Eigenschaften mithilfe von UV/Vis, Emission, Schmelztemperaturen und Quantenausbeuten bestimmt, um über die Anwendung als hybridisierungssensitive FISH-Sonden zu urteilen. Dabei wurde der Einfluss der Basenabfolge, des Click-Bausteins sowie des Farbstoffes durch Vergleich der jeweiligen Kombinationen untersucht.

### Einfluss der Umgebung

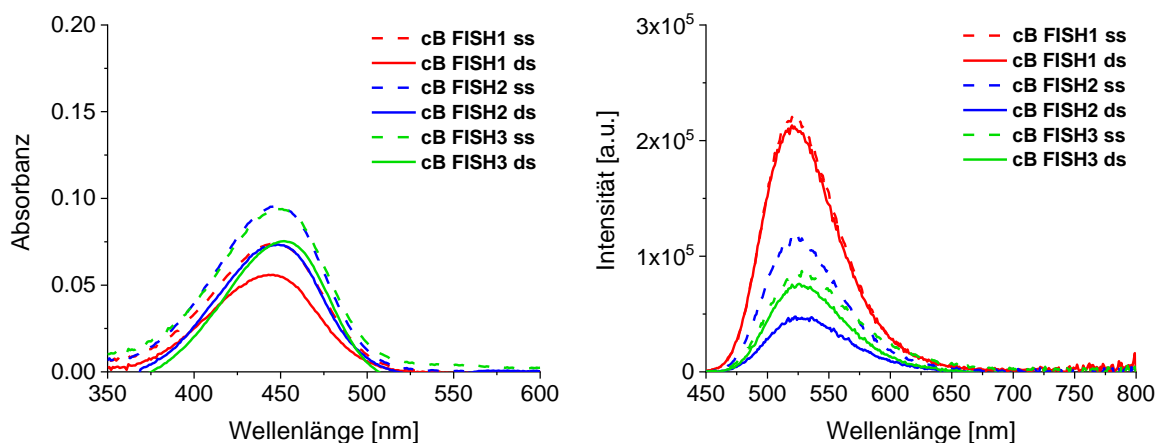
Der Vergleich der Emissionsspektren der **Cy5**-markierten **cU-FISH**-Sonden zeigt eine Abhängigkeit von den umgebenden Nukleobasen. Während für die Doppelstränge **cU FISH2 ds** und **cU FISH3 ds** ein leichter Fluoreszenzanstieg zwischen 15 - 20 % beobachtet werden kann, nimmt die Intensität in **cU FISH1 ds** um 10 % ab. Diese Abnahme könnte einerseits durch die endständige Position im Strang erklärt werden. Denn hier ist die Hybridisierung etwas schwächer, sodass das Ende frei beweglich ist und der Farbstoff weniger fluoresziert. Andererseits trägt die benachbarte Pyrimidinbase Cytosin zu einer schlechteren  $\pi$ -Stapelung bei und destabilisiert damit **cU FISH1 ds**. Im Vergleich dazu erhöhen die Purine Adenin und Guanin die Fluoreszenzintensität, was durch die Emissionsspektren von **cU FISH2 ds** und **cU FISH3 ds** bestätigt werden kann. Auffällig ist dabei, dass das Emissionsmaximum des **cU FISH2 ds** eine leichte bathochrome Verschiebung um 4 nm zum Einzelstrang **cU FISH2 ss** zeigt, die durch dieselbe Rotverschiebung der Extinktion erklärt werden kann.



**Abbildung 39:** Absorption (links) und Emission (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cU FISH1** – **cU FISH3** markiert mit **Cy5**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM  $\text{NaP}_i$ -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20  $^{\circ}$ C;  $\lambda_{\text{exc}}$ = 600 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Trotz des hier erhaltenen Intensitätsanstiegs, ist dieser doch zu gering, um in *in-vivo* Experimenten die hybridisierte von der ungebundenen Sonde deutlich unterscheiden zu können. Aus diesem Grund eignet sich die Kombination aus **cU**-Baustein und **Cy5**-Fluorophor nicht für die Anwendung in hybridisierungssensitiven FISH-Experimenten.

Im Gegensatz zu den **cU FISH** Sequenzen soll der eingebaute, azyklische **cB**-Linker aufgrund der fehlenden Base ein Interkalieren des angeknüpften **CyIP** Farbstoffes vereinfachen und damit einen deutlichen Emissionsgewinn liefern. Doch entgegen den Ergebnissen aus vorherigen, unpublizierten Studien zeigen die **cB**-modifizierte Stränge, geklickt an **CyIP**, keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach dem Hybridisieren. Zudem weisen alle Sequenzen, verglichen mit dem Einzelstrang, eine geringere Extinktion im Doppelstrang auf. Berücksichtigt man die Hyperchromizität der DNA, so würde diese Absorptionsabnahme des Fluorophors durch  $\pi$ -Stapelung mit den Nukleobasen hervorgerufen werden, was bedeutet, dass der Farbstoff in die Helix interkaliert. Betrachtet man die zugehörigen Emissionsspektren, so wird jedoch eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenz des Cyanin-Farbstoffes **CyIP** von den umgebenden Nukleobasen deutlich. Während sich die Intensitäten der Doppelstränge **cB FISH1 ds** und **cB FISH3 ds** nur gering von den entsprechenden Einzelsträngen unterscheiden, wird die Emission des Doppelstrangs **cB FISH2 ds** sogar stark gelöscht. Entgegen den Hypothesen der Literatur, die Emissionabnahme sei lediglich Ursache einer cis-trans-Isomerisierung,<sup>[245-246, 253-254]</sup> kann das Löschen von **cB FISH2 ds** nur durch einen Ladungstransfer auf die beiden direkt benachbarten Guanin-Basen erklärt werden. Denn laut Literatur würde der Farbstoff durch die Guanin-Basen gut stabilisiert werden und hätte somit die höchste Intensität.<sup>[244, 248, 253, 255]</sup> Dennoch besitzt der Einzelstrang **cU FISH2 ss** mit zwei benachbarten Guaninen eine höhere Intensität als **cU FISH3 ss** mit nur einem G, was wiederum auf die cis-trans-Isomerisierung hindeuten würde. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass hier ein komplexes Zusammenspiel beider Phänomene zusammen mit der Abhängigkeit des Farbstoffes von der Umgebung vorliegt. Folglich scheint auch diese Kombination aus Click-Baustein und Farbstoff nicht für die Anwendung in hybridisierungssensitiven FISH-Sonden geeignet zu sein. Des Weiteren weist der Farbstoff eine nur geringe Extinktion sowie Fluoreszenzquantenausbeute auf, weshalb ein anderer Farbstoff für das Markieren von Oligonukleotiden in lebenden Zellen bzw. Gewebe von Vorteil wäre.



**Abbildung 40:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cB FISH1** – **cB FISH3** markiert mit **CyIP**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}$ = 435 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Um einen Fluoreszenzanstieg nach dem Hybridisieren sicherzustellen, wurden deshalb in einem weiteren Versuch zwei Thiazolorange-Derivate (**TO1** und **TO2**) eingesetzt. Wie in Abbildung 38 dargestellt, unterscheiden sich die beiden Farbstoffe in der Länge des Azid-Linkers sowie dessen Position. Absorptions- sowie Emissionsmessungen (Abbildung 41 und Kapitel 7.8.2 Abbildung 82) konnten zeigen, dass die allgemeinen Tendenzen für beide Farbstoffe annähernd gleich sind und sich hauptsächlich in ihrer Fluoreszenzintensität differenzieren. Aus diesem Grund sind hier beispielhaft die Ergebnisse des **TO1**-Derivates gezeigt.

Entsprechend dem **cB**-Linker soll auch der Alkynyl-Ribose-Baustein **cR**, aufgrund der abasischen Stelle, eine Interkalation des geklickten Chromophores ermöglichen und ähnelt dabei deutlich stärker einem natürlichen Nucleosid. Dadurch wird die Struktur der DNA-Helix durch die Modifikation selbst nicht wesentlich beeinflusst, sondern lediglich durch die Markierung mit dem Chromophor. Des Weiteren erlaubt der getrennte Einbau der beiden Anomere **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$**  eine Analyse des Einflusses der Orientierung der Farbstoffe auf die optischen Eigenschaften, insbesondere das Emissionsverhalten im Doppelstrang.

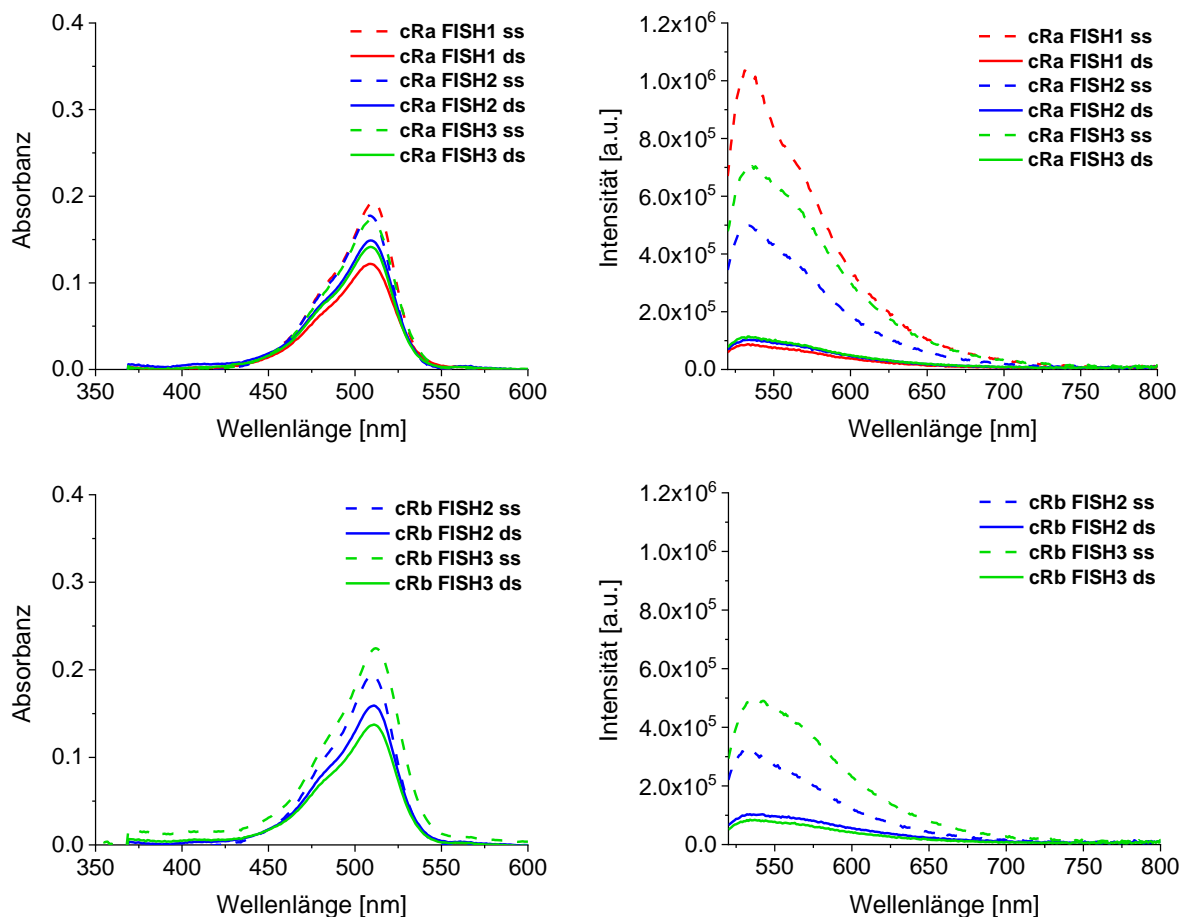
Vergleicht man zunächst die Emissionsspektren der verschiedenen Einzelstränge **cR $\alpha$  FISH1-3**, so lässt sich erneut eine Sequenz-Abhängigkeit der Fluoreszenz erkennen. Der Einzelstrang **cR $\alpha$  FISH1 ss** zeigt die höchste, **cR $\alpha$  FISH2 ss** die geringste Emissionsintensität. Dies lässt sich auf den Gehalt an umgebenden Guaninbasen zurückführen: je mehr G in direkter Nachbarschaft zum Fluorophor, desto geringer die



Emission. Im Doppelstrang verhalten sich jedoch alle Stränge gleich. Die Fluoreszenz wird auf nahezu dieselbe Intensität gelöscht, was bedeutet, dass die Rotation der Cyanin-Farbstoffe nicht durch  $\pi$ -Stapelung unterbunden wird. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Chromophore nicht in die Doppelhelix interkalieren. Basierend auf den zuvor getroffenen Annahmen, dass die Extinktionsabnahme im Doppelstrang auf eine Interkalation hindeutet, widerlegen die Absorptionsspektren wiederum diese mögliche Ursache. Damit wäre es denkbar, dass das durch die Click-Reaktion gebildete Triazol bereits mit den Nukleobasen wechselwirkt, sodass dem Farbstoff nur noch wenig Platz im Basenstapel zur Verfügung steht und der Chinolin-Teil deshalb außerhalb der Helix frei drehbar vorliegt.

Ein ähnliches Verhalten kann auch für das  $\beta$ -Analogon beobachtet werden, welches der Konfiguration eines natürlichen Nukleosides entspricht. Die Einzelstränge **cB $\beta$  FISH2 ss** und **cB $\beta$  FISH3 ss** besitzen zwar eine geringere Fluoreszenzintensität als die entsprechende Sequenz mit dem  $\alpha$ -Anomer, allerdings wird die Emission im Doppelstrang genauso stark gelöscht. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der  $\alpha$ -Ribose-Baustein die Konformation der  $\beta$ -konfigurierten Modifikation im Doppelstrang nachahmt und damit die Orientierung der Farbstoffe kaum beeinflusst wird. Dies wird auch durch die Schmelztemperaturen deutlich, die sich nur minimal voneinander unterscheiden.

Somit scheint die kupferkatalysierte Reaktion keine geeignete Methode zu sein, Oligonukleotide mit Thiazolorange-Derivaten zu markieren.



**Abbildung 41:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cRa FISH1** – **cRa FISH3** (oben) und **cRb FISH2** – **cRb FISH3** (unten) markiert mit **TO1**. Messparameter: 2.5  $\mu\text{M}$  DNA in 10 mM  $\text{NaP}_i$ -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20  $^\circ\text{C}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}=505$  nm, Spaltbreite 2/2 nm.

**Tabelle 4:** Schmelztemperaturen und Fluoreszenzquantenausbeuten der **cRa** und **cRb** Stränge geklickt an **TO1**.

	FISH1 TO1		FISH2 TO1		FISH3 TO1	
	cRa	cRb	cRa	cRb	cRa	cRb
$T_m$ [ $^\circ\text{C}$ ]			71	72	69	71
$\Phi_F$ ss	20.0	27.0	13.9	9.1	20.4	17.9
$\Phi_F$ ds	5.9	10.6	7.3	6.7	6.6	7.5

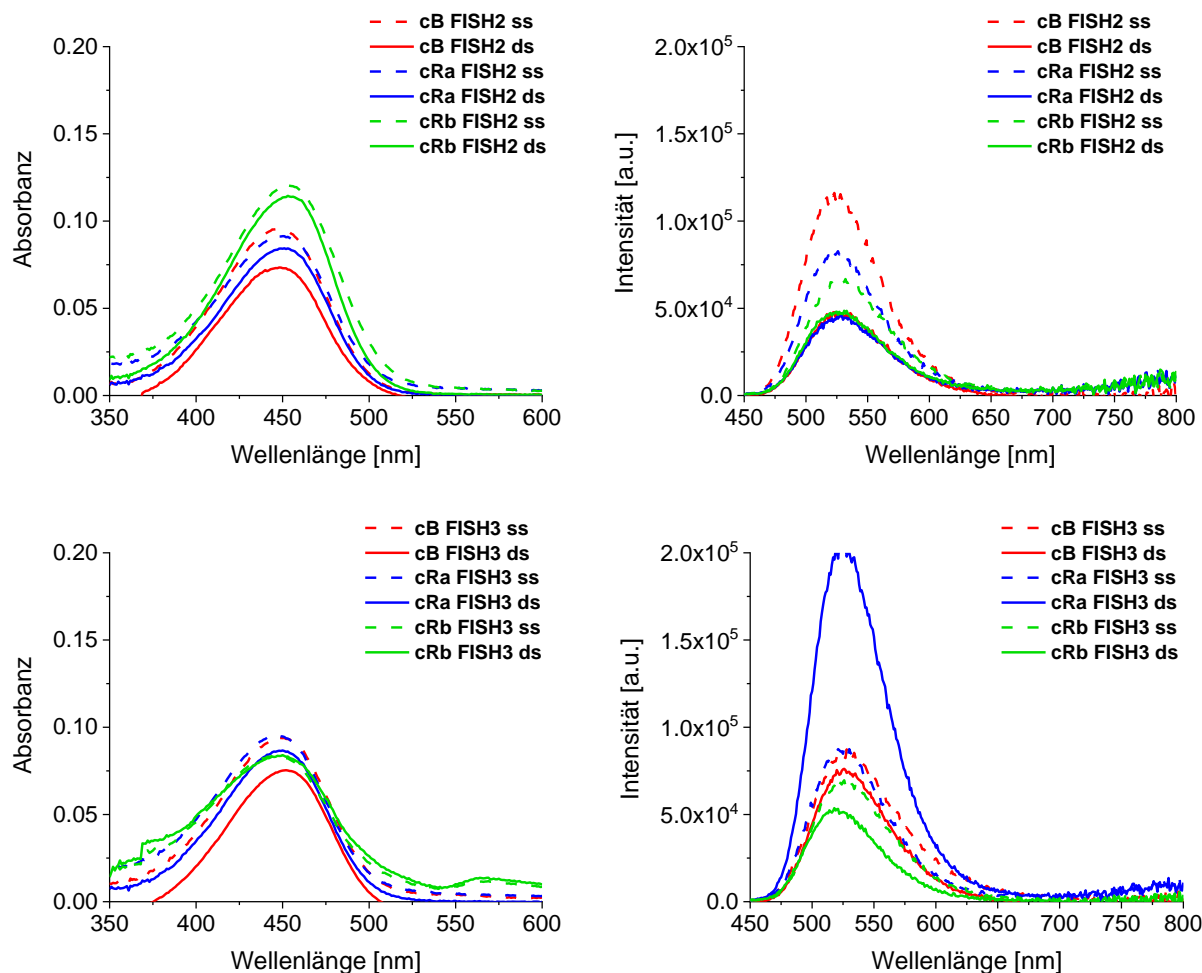
Bei Betrachtung der bisher durchgeführten Studien wird deutlich, dass die Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Cyanin-Farbstoffe stark von den umgebenden Nucleobasen beeinflusst werden. Dabei spielt nicht nur die  $\pi$ -Stapelung, sondern auch der

Ladungstransfer eine wichtige Rolle, wobei deren Einfluss wiederum von Farbstoff und Art der Anknüpfung abhängig zu sein scheint. Aus diesem Grund kann an dieser Stelle keine allgemeine Tendenz zur Sequenzabhängigkeit geäußert werden.

### **Einfluss des Click-Bausteins und Farbstoffes**

Um mögliche Aussagen über die Auswirkungen der Anknüpfung des Fluorophors zu treffen, wurden die Click-Linker **cB**, **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$** , eingebaut in die **CyIP** markierte Sequenz **FISH2** bzw. **FISH3**, miteinander verglichen.

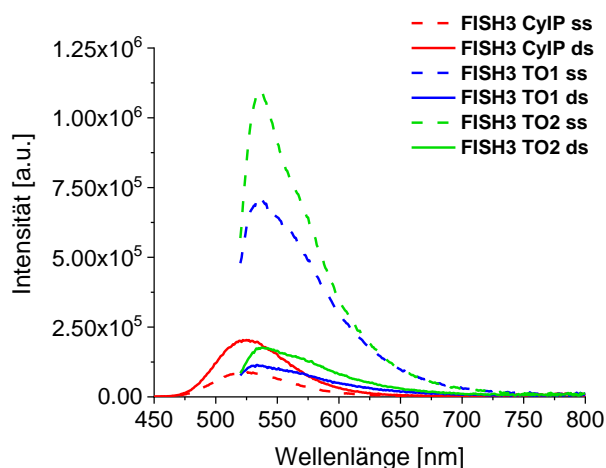
Hierbei ist eine deutliche Abnahme der Emission der **FISH2** Einzelstränge von **cB** über die Ribose-Anomere **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$**  zu erkennen. Dies ist womöglich der Flexibilität im azyklischen Linker **cB** und der Konfiguration des **cR $\alpha$** -Anomers geschuldet, wodurch es dem Chromophor ermöglicht wird, aus der ungeordneten Struktur des Einzelstranges herauszuragen. Dadurch geht weniger Energie verloren und die Emission ist erhöht. Im Doppelstrang hingegen verhalten sich alle Linker gleich und zeigen ebenso wie die **TO1/TO2** markierten Stränge eine gelöschte Fluoreszenz mit derselben Intensität. Da alle drei Click-Bausteine ein Interkalieren in den Basenstapel zulassen, ist es denkbar, dass auch bei diesem Farbstoff ein Teil interkaliert, während der andere frei rotieren kann. Vergleicht man allerdings die Spektren der **FISH2** mit den **FISH3** Strängen so wird ersichtlich, dass die benachbarten Nukleobasen einen gravierenden Einfluss auf das Emissionsverhalten im Doppelstrang haben. Die Fluoreszenz im Doppelstrang **cR $\alpha$  FISH3 ds** nimmt im Vergleich zu **cR $\alpha$  FISH3 ss** um das Doppelte zu, während **cB FISH3** und **cR $\beta$  FISH3** immer noch gelöscht werden. Allerdings fällt die Intensität der **cB**-Sequenz nur noch um 13 % anstelle von 59 % und die des **cR $\beta$** -Stranges um 23 % im Vergleich zu 31 % in **cR $\beta$  FISH2**. Dies deutet darauf hin, dass der Energieverlust der Cyanin-Farbstoffe auch aufgrund eines Ladungstransfers zustande kommen kann und nicht nur in einer cis-trans-Isomerisierung begründet liegt. Dennoch scheint auch hier der Trend einer höheren Emission mit größerer Flexibilität des Linkers einherzugehen. Eine Ausnahme davon bildet der Strang **cR $\alpha$  FISH3 CyIP**, denn ein solcher Fluoreszenzanstieg wird nur für diese eine spezielle Kombination aus Sequenz, Click-Baustein und Farbstoff beobachtet.



**Abbildung 42:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cB/cR $\alpha$ /cR $\beta$  FISH2** (oben) und **cB/cR $\alpha$ /cR $\beta$  FISH3** (unten) markiert mit **CyIP**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{\text{exc}}$ = 435 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit vermessenen Farbstoffe, beispielhaft gezeigt an **cR $\alpha$  FISH3** (Abbildung 43), lässt keine Aussage über deren Eignung in hybridisierungssensitiven FISH-Sonden zu. Denn neben den typischen Emissionsmaxima und unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten aufgrund ihrer unterschiedlichen, charakteristischen Extinktionskoeffizienten zeigen alle Cyanin-Farbstoffe eine Abnahme der Emission im Doppelstrang. Ursache dafür ist womöglich die kovalente Bindung via CuAAC, wobei das gebildet Triazol bereits mit den Nachbarbasen stapelt und folglich der Farbstoff nicht vollständig in die Doppelhelix interkalieren kann. Durch die daraus resultierende Rotation, kommt es zu einem Energieverlust. Dabei stellt, wie bereits beschrieben, **cR $\alpha$  FISH3 CyIP** eine Ausnahme dar.

Um die in diesem Kapitel getroffenen Aussagen über Flexibilität sowie Orientierung der Fluorophore zu stützen, wären molekulardynamische Simulationen notwendig. Weiterhin wäre der Vergleich eines Click-Bausteines mit einem direkten Einbau oder zur Literatur vergleichbaren Anknüpfung des Farbstoffes an DNA sinnvoll, um den Einfluss des Triazols auf die Umgebungssensitivität zu klären. Zudem sollten weitere Sequenzen synthetisiert werden, in welchen die benachbarten sowie gegenüberliegenden Nukleobasen variiert werden, um deren Einfluss genauer zu untersuchen.



**Abbildung 43:** Emissionsspektrum der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cR $\alpha$  FISH3** markiert mit **CyIP**, **TO1** und **TO2**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}$  (CyIP) = 435 nm,  $\lambda_{exc}$  (TO1/2) = 505 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

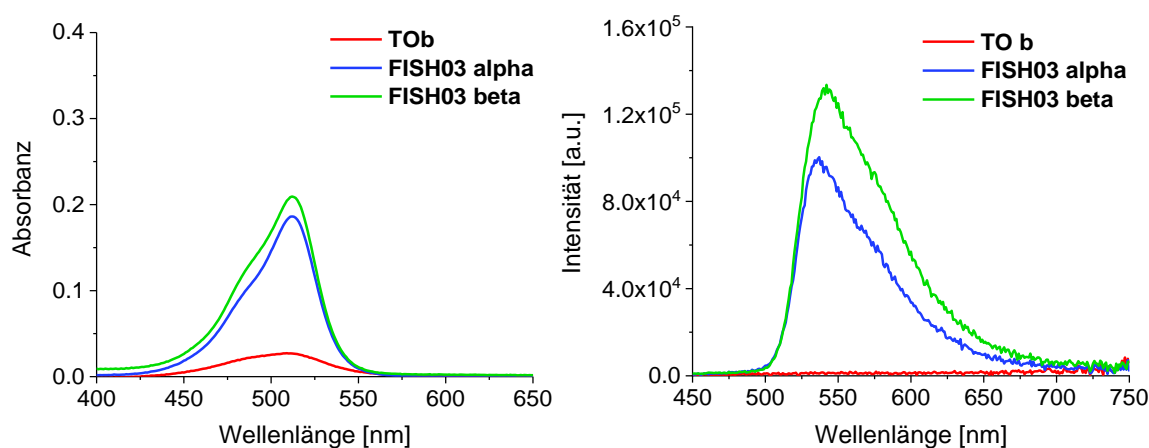
### 4.3.3 Analyse der Fluorogenität

Azide haben sich nicht nur aufgrund ihrer selektiven und schnellen Reaktion mit Alkinen, sondern auch aufgrund ihrer Eigenschaft, die Emission eines Fluoreszenzsystems, wie das eines Farbstoffes, zu löschen, für bioorthogonale Markierungen etabliert. Durch die kupferkatalysierte Reaktion wird der Ladungstransfer unterbunden und das freie Elektronenpaar des Azids über das Triazol delokalisiert, wodurch die Fluoreszenzintensität ansteigt.<sup>[256-258]</sup> Aufgründessen wurde das in dieser Arbeit verwendete Derivat des Thiazoloranges **TO2** ebenfalls auf seine fluorogene Wirkung untersucht.

Dafür wurden die optischen Eigenschaften des freien Farbstoffes sowie geklickt an **cR $\alpha$  FISH3** und **cR $\beta$  FISH3** analysiert. Während der Farbstoff selbst nahezu keine Emission aufweist, zeigen die Emissionsspektren nach Click-Reaktion mit dem alkinmodifizierten Strang einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abbildung 44). Diese

Beobachtung wird auch durch die Fluoreszenzquantenausbeuten, aufgelistet in Tabelle 5, unterstützt und bestätigt somit die Fluorogenität des Fluorophors.

Durch eine einfache *in-situ* Hybridisierung (ISH) der alkinmodifizierten Stränge mit der Ziel-mRNA und anschließende CuAAC mit **TO2** wäre es somit möglich, im lebenden Organismus eine FISH-Sonde zu generieren und das Zielmolekül mit hoher Sensitivität zu detektieren. CARELL et al. konnte bereits eine solche Post-Hybridisierungs-Click-Reaktion erfolgreich in lebenden eGFP-HEK293T-Zellen nachweisen.<sup>[259]</sup> Aus diesem Grund ist es notwendig, auch diese Sonden in lebenden Zellen und Gewebe zu untersuchen.



**Abbildung 44:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) des freien Chromophors **TO2** sowie nach Click-Reaktion mit den Strängen **cR $\alpha$  FISH3** und **cR $\beta$  FISH3**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{\text{exc}}$  = 505 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

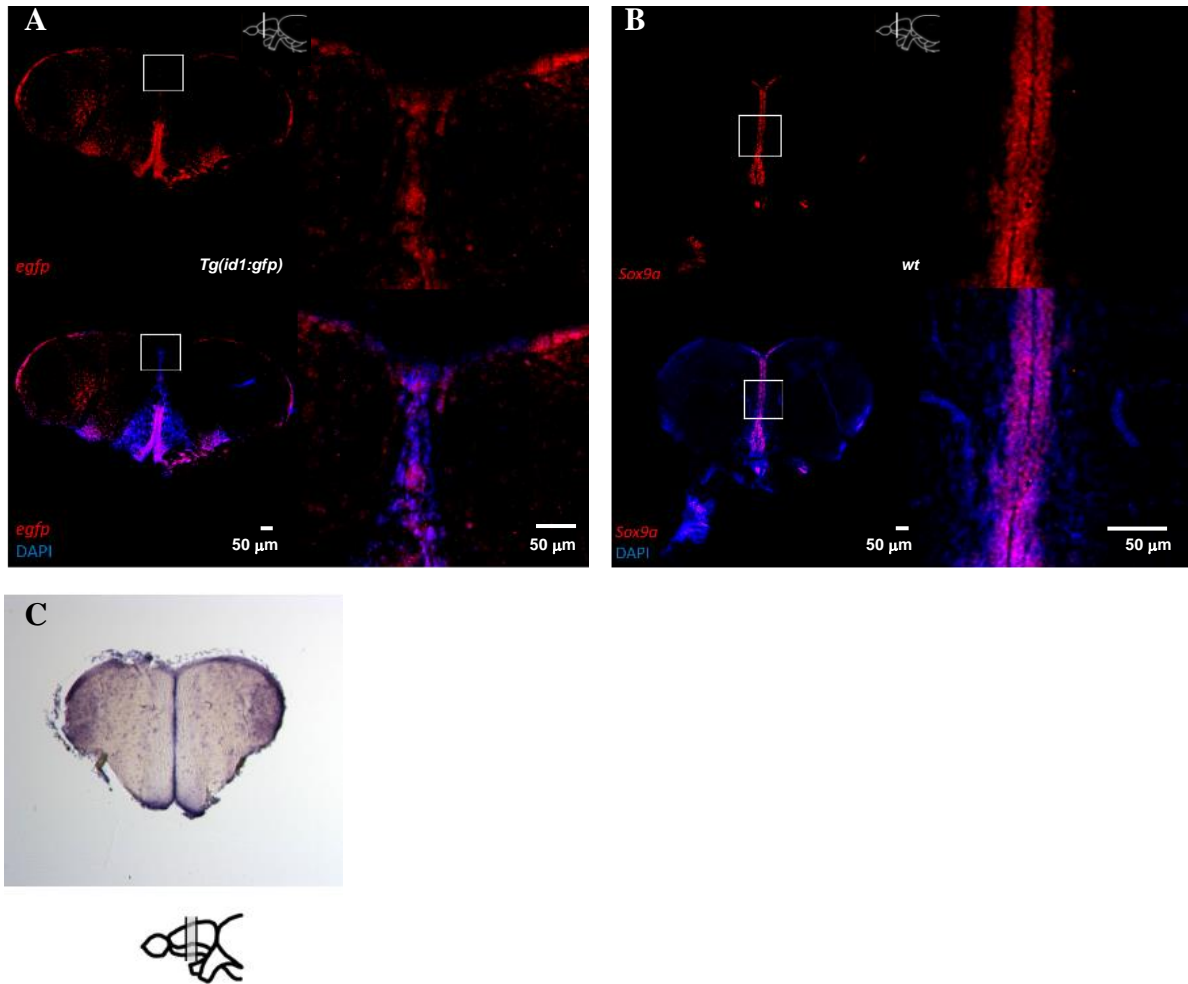
**Tabelle 5:** Fluoreszenzquantenausbeuten des freien Chromophors **TO2** sowie nach Click-Reaktion mit den Strängen **cR $\alpha$  FISH3** und **cR $\beta$  FISH3**.

$\Phi(\text{TO2})$	$\Phi(\text{FISH3}\alpha \text{ TO2})$	$\Phi(\text{FISH3}\beta \text{ TO2})$
0.01	0.13	0.24

#### 4.4 Hybridisierungsexperimente in Gewebe

Wie bereits beschrieben, wurden die synthetisierten, **Cy5** markierten **cU**-Proben für die Anwendung als FISH-Sonden im Gewebe untersucht. Diese biologischen Experimente wurden in Kooperation mit DR. VANESSA GERBER sowie LUISA LÜBKE aus dem Arbeitskreis STRÄHLE (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) durchgeführt. Hierfür wurde ein Zebrafisch-Gehirn einer transgenen Linie, welche *gfp* im Ventrikel des Telencephalons exprimiert, in mehrere Hirnschnitte sektioniert und mit den Sonden über Nacht bei Raumtemperatur hybridisiert. Erste Ergebnisse zeigten ein unselektives Binden der Stränge (Abbildung 35), woraufhin oben genannte Hybridisierungsstudien (Kapitel 4.3.1) durchgeführt wurden. Dabei ergaben sich relativ hohe Schmelztemperaturen (ca. 72°C), sodass die Temperatur für die Inkubation sowie die Waschschritte angepasst werden musste. Um die Übertragbarkeit des Konzepts auf andere Zielmoleküle darzustellen, wurde eine weitere Bibliothek an **Cy5-cU**-Strängen synthetisiert, die komplementär zur mRNA des Transkriptionsfaktors *sox9a* waren.

Die Visualisierung der Fluoreszenz erfolgte anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Nach Anregung des Chromophors bei  $\lambda_{exc} = 635 \text{ nm}$ , dargestellt in rot (Abbildung 45), konnte im Falle der GFP-FISH-Sonden eine periventrikuläre Fluoreszenz sowie eine Emission in der ventrikulären Zone beobachtet werden. Dieses Signal überlagert stark mit den angefärbten Zellkernen (DAPI, blau) und deutet somit auf eine erfolgreiche Anwendung dieser fluoreszenten Architektur im Hirngewebe hin. Bei Gegenüberstellung dieses Ergebnisses mit den Aufnahmen der *sox9a*-FISH-Sonden, kann auch hier eine starke Kolo-kalisation der Sonde (rot) mit den Zellkernen (blau) erfasst werden. Um zu verifizieren, dass diese Überlagerung durch das Anfärben der Ziel-mRNA und nicht aufgrund von unspezifischem Binden an DNA im Zellkern zustande kommt, wurden die Aufnahmen mit dem Expressionsmuster einer chromogenen *in-situ* Hybridisierung (ISH) verglichen. Dabei ist eine Expression des *sox9a* Gens um den Ventrikel herum sowie in der ventrikulären Zone zu erkennen, die mit der Fluoreszenzmarkierung übereinstimmt.



**Abbildung 45:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen der FISH in Zebrafisch-Hirnschnitten von Cy5-cU-modifizierten (A) GFP- und (B) *sox9a*-FISH-Sonden sowie die (C) ISH gegen *sox9a* mRNA zum Vergleich.

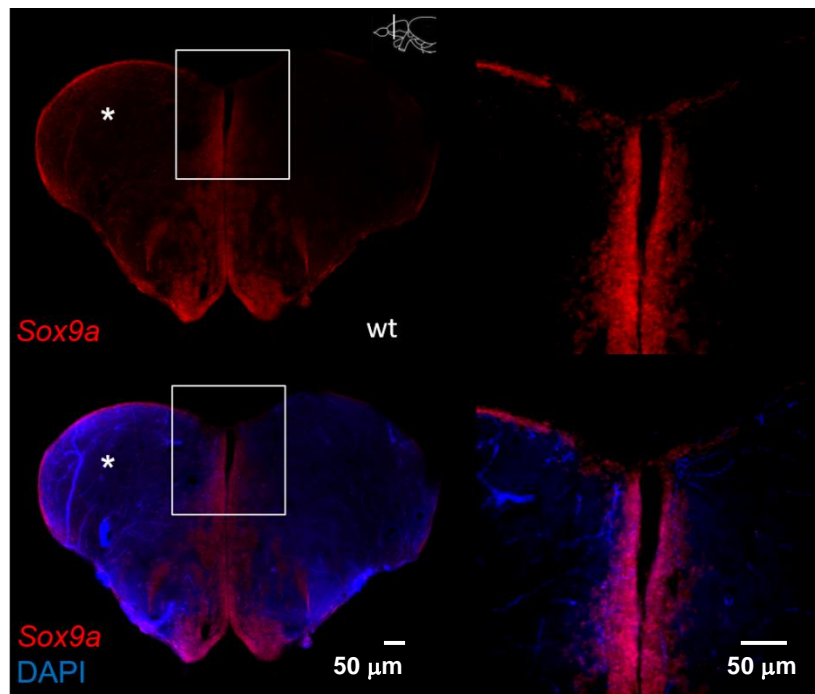
Da Zebrafische die Fähigkeit besitzen, neurodegenerative Erkrankungen durch Aktivierung bestimmter molekularer Signalwege zu regenerieren, sollte die entwickelte, fluoreszente Architektur zur Visualisierung eines an der Neurogenese beteiligten Gens eingesetzt werden. Dabei werden einige Gene, die an der adulten Neurogenese beteiligt sind, hochreguliert und führen z. B. zu einer Aktivierung von Stammzellen oder deren gezielte Differenzierung. Diese Hochregulierung der Gene äußert sich in einer erhöhten Expression des Gens im verletzten Gewebe gegenüber dem unverletzten. Dafür wurde die linke Hirnhälfte gezielt mit einer Kanüle verletzt, um eine erhöhte Expression herbeizuführen, und anschließend mit den *sox9a*-FISH-Sonden inkubiert. Die Mikroskopie-Aufnahmen zeigen ein deutlich stärkeres, rotes Signal in der linken, verletzten Hemisphäre gegenüber der rechten, unverletzten Hemisphäre, was auch bei Vergrößerung klar erkennbar wird (Abbildung 46). Damit zeigt die



*sox9a*-FISH-Sonde nicht nur das korrekte Expressionsmuster des endogenen Gens, sondern auch die Reaktion des Gens auf eine Verletzung des Hirngewebes.

Um die Tauglichkeit dieser fluoreszenten Architektur zusätzlich zu bekräftigen, könnten weitere Proben gegen andere Gene (z.B. *prdm12b*, *six6a* oder *pou3f3b*) synthetisiert werden, die ein anderes charakteristisches Expressionsmuster aufweisen. Des Weiteren wäre eine höhere Auflösung notwendig, um einzelne Moleküle detektieren zu können.

---



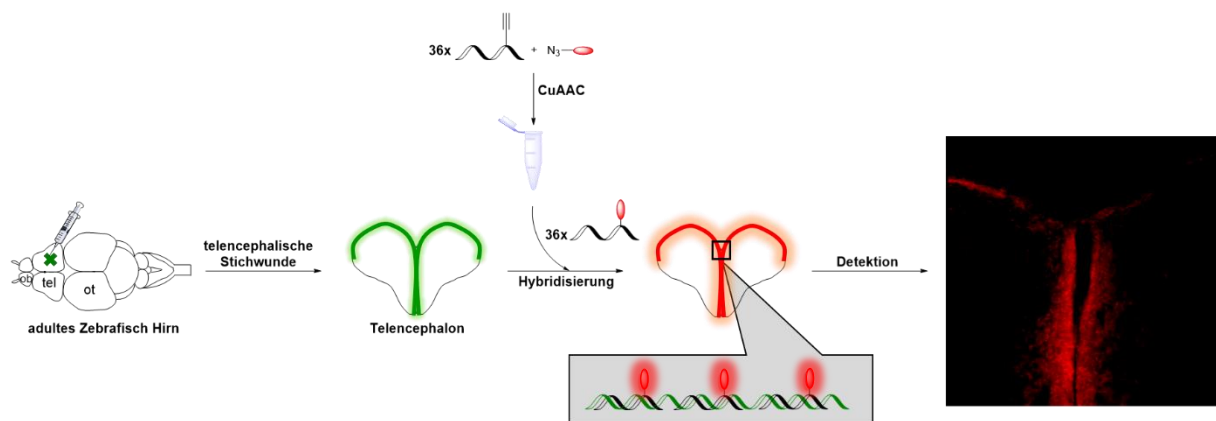
**Abbildung 46:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen der erhöhten Expression von *sox9a* nach Verletzung der linken Hirnhälfte, visualisiert durch Cy5-cU-modifizierte *sox9a*-FISH-Sonden.

---

#### 4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte eine optimierte Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungssonde entwickelt werden, die zur Detektion und Lokalisierung hoch regulierter Gene im Zebrafisch-Hirngewebe eingesetzt werden kann.

Hierfür wurde zunächst ein Verfahren erarbeitet, welches die Markierung von 36 modifizierten DNA-Sequenzen mit einem Farbstoff in nur einem Ansatz mittels CuAAC erlaubt. Diese Methode wurde verwendet, um **cU** sowie die synthetisierten, alkinmodifizierten Linker **cB**, **cR $\alpha$**  und **cR $\beta$** , in DNA eingebaut, erfolgreich mit verschiedenen Farbstoffen (**Cy5**, **CyIP**, **TO1**, **TO2**) zu klicken. Durch die Verwendung verschiedener Linker und Chromophore sollte die Sensitivität der FISH-Sonde verbessert werden, indem hybridisierungssensitive oder fluorogene Proben generiert werden sollten. Mithilfe der optischen Charakterisierung und Hybridisierungsstudien konnte jedoch festgestellt werden, dass die Kombination aus Click-Baustein, Sequenz und Farbstoff ein komplexes System darstellt und keine einfache Struktur-Reaktivitäts-Beziehung zulässt. Dennoch konnte eine fluorogene Eigenschaft für die Click-Reaktion des **TO2**-Fluorohors nachgewiesen werden, was eine *in-situ* Hybridisierung der alkinmodifizierten Stränge mit dem Zielgen und anschließende Markierung (FISH) im Lebenden erlauben würde.



**Abbildung 47:** Schematische Darstellung des Konzeptes der optimierten FISH in Zebrafisch durch 36 einfachmodifizierte Sequenzen.

Weiterhin konnte eine äußerst hohe Stabilität des Hybrids festgestellt werden, woraufhin die Bedingungen der biologischen Experimente angepasst wurden. Durch eine Temperaturerhöhung von 30 °C auf 72 °C für die Hybridisierung sowie das Waschen konnte die FISH-Sonde das Expressionsmuster des *gfp* bzw. *sox9a* Gens im Ventrikel des

Telencephalons widerspiegeln. Nach gezielter Verletzung einer Hemisphäre des Gehirns konnte zudem die erhöhte Expression des Gens visualisiert werden.

Um die Anwendbarkeit der fluoreszenten Architektur im Gewebe weiterhin zu bestätigen, wäre es sinnvoll, weitere Proben gegen Gene mit einem charakteristischen Expressionsmuster in einer anderen Region zu synthetisieren. Mögliche Zielgene hierfür wären *prdm12b*, *six6a* oder *pou3f3b*. Außerdem könnte diese Sonde für die Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt werden.

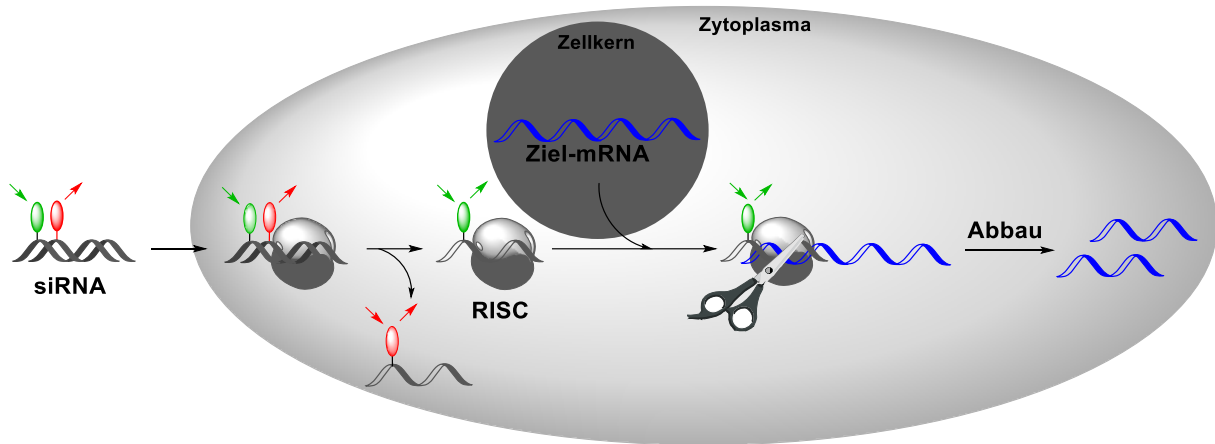
## 5 WELLENLÄNGENVERSCHIEBENDE siRNA-SONDEN

Seit jeher ist die Menschheit auf der Suche nach neuen Arzneimitteln, um Krankheiten zu behandeln oder gar heilen zu können. Viele Wirkstoffe zielen dabei auf bestimmte Proteine ab, die im jeweiligen Krankheitsverlauf eine entscheidende Rolle spielen. Doch damit werden nur die Symptome, nicht jedoch der Ursprung der Krankheit bekämpft.<sup>[260]</sup> Deshalb werden neue Wirkmechanismen genutzt, die bereits bei der Entstehung von Proteinen in den Prozess eingreifen. Die RNA-basierte Therapie stellt dabei einen äußerst effizienten Behandlungsansatz dar, denn damit kann die Herstellung von Proteinen gehemmt oder sogar komplett ausgeschaltet werden.<sup>[261]</sup> Die Unternehmen *Isis Pharmaceuticals* sowie *Alnylam Pharmaceuticals* haben sich auf die Entwicklung solcher Medikamente, die auf dem Prinzip des RNA Interferenz Mechanismus (s. Kapitel 5.1.1) beruhen, spezialisiert. Im August 2018 erhielt der erste *small interfering RNA* (siRNA) basierte Wirkstoff Patisiran (Onpattro®) von der US-Arzneimittelbehörde FDA die Zulassung zur Verwendung gegen die seltene Erbkrankheit Polyneuropathie, welche durch die hereditäre Transthyretin-vermittelte Amyloidose (hATTR) verursacht wird.<sup>[262]</sup> Ein ähnliches Medikament, Givosiran (Givlaari®), wurde bereits im darauffolgenden Jahr auf den Markt gebracht. Es dient der Behandlung von akuter hepatischer Porphyrie (AHP), bei welcher es zu starken Bauchschmerzen bis hin zu Nieren- oder Lebererkrankungen kommen kann.<sup>[263]</sup> Doch die Entwicklung solcher RNA-basierter Wirkstoffe steht vor großen Herausforderungen. Neben der Instabilität von RNA und deren unzureichende Aufnahme in die Zelle, können auch sogenannte *off-Target* Effekte auftreten, bei welchen eine Inaktivierung von RNAs durch Anknüpfen an nicht vollständig komplementäre Sequenzen ausgelöst wird.<sup>[264-265]</sup>

Um diese Mängel zu beheben, soll im Rahmen dieser Arbeit eine fluoreszente Architektur entwickelt werden, welche erlaubt, den Transport und die Prozessierung der siRNA innerhalb der Zelle genauer zu studieren. Hierzu wurde ein zur GFP mRNA komplementärer Doppelstrang synthetisiert, welcher postsynthetisch über kupferkatalysierte Click-Reaktion mit einem Donor-Akzeptor-Farbstoffpaar modifiziert werden kann. Dabei sollte der Doppelstrang derart optimiert werden, dass ein effizienter Förster-Resonanz-Energietransfer und damit ein optimaler Farbwechsel sowie eine eindeutige Änderung der Fluoreszenzlebenszeit zu beobachten ist. Mithilfe von GFP-Genregulierungs-Experimenten sollte anschließend eine möglichst intakte, biologische Aktivität nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen siRNA-Bildgebungs-Methoden bietet diese Architektur, aufgrund des

Fluoreszenz-Farbwechsels kombiniert mit Fluoreszenz-Lebenszeit-Bestimmungen, den Vorteil einer eindeutigen Auslesung. Mithilfe dieses Modells ist es möglich, nicht nur den Transport der siRNA in die Zelle sowie innerhalb der Zelle zu beobachten, sondern auch deren Prozessierung während des siRNA-Interferenzmechanismus zu studieren. Weiterhin ist es möglich, mit dieser Methode eine Aussage über die Effizienz des jeweilig verwendeten Transportreagenzes zu treffen. Dabei wird die Änderung der Fluoreszenzfarbe optimal durch die Lebenszeit-Messungen unterstützt.

---



**Abbildung 48:** Prinzip der siRNA “Traffic Lights” zur Visualisierung des Transports sowie des RNA Interferenz Mechanismus.

---

## 5.1 Einführung

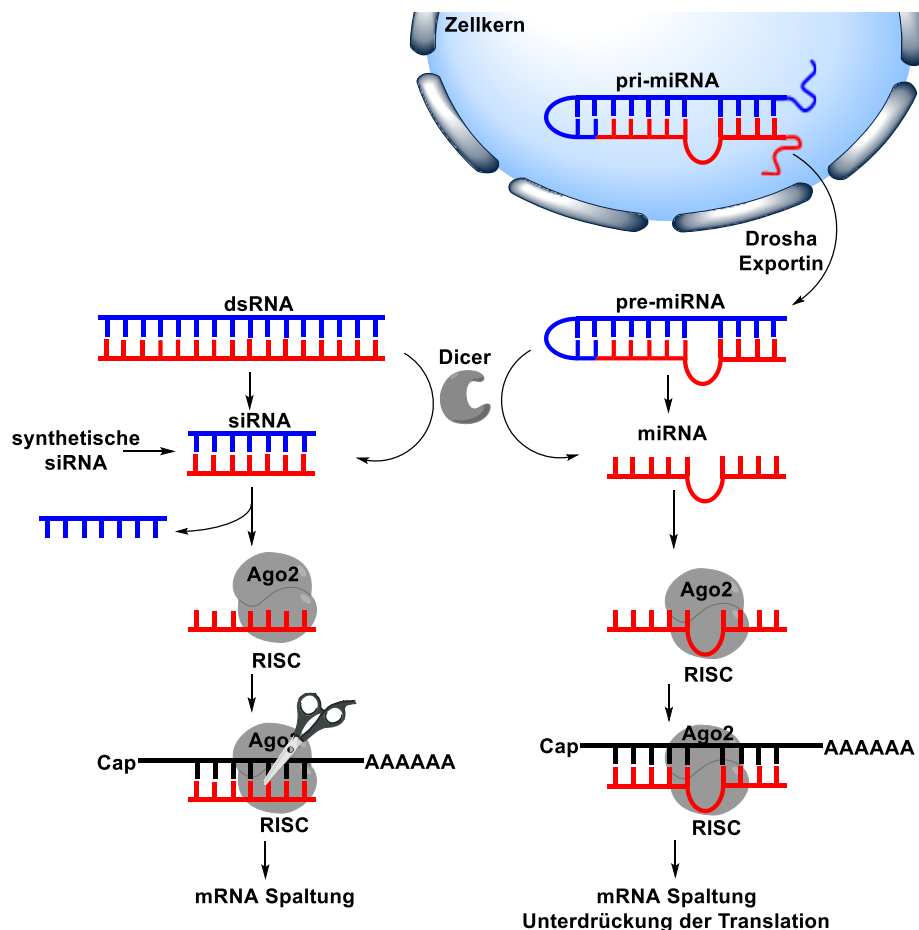
### 5.1.1 Mechanismus der Genregulierung – RNA Interferenz

Unter RNA Interferenz, kurz RNAi, versteht man den posttranskriptionalen Regulierungsmechanismus der Expression eines bestimmten Gens durch kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle.<sup>[266-267]</sup> Bereits 1990 wurde dieses Phänomen in Pflanzen beobachtet,<sup>[268]</sup> doch erst im Jahr 1998 gelang A. FIRE und C. C. MELLO<sup>[269]</sup> der Durchbruch mit der Beschreibung der gezielten Stilllegung eines Gens im Fadenwurm *C. elegans* durch doppelsträngige RNA. Die Wissenschaftler wurden 2006 für diese Forschung mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

Seitdem haben zahlreiche Untersuchungen zum heutigen Verständnis des Interferenz Mechanismus geführt (Abbildung 49). Demnach wird die lange, doppelsträngige RNA mithilfe der Endonuklease Dicer im Cytoplasma in kurze RNA-Moleküle, den sogenannten siRNAs, geschnitten.<sup>[270-271]</sup> Für gewöhnlich bestehen siRNAs aus einem *Sense*- und einem *Antisense*-Strang mit 21 - 23 Nukleotiden und jeweils einem Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende.<sup>[272]</sup> Der *Antisense*-Strang weist dabei die komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA auf. Die kurzen, nicht-codierenden RNAs werden anschließend an den induzierten RNA-Stilllegungs-Komplex (RNA induced silencing complex RISC) übergeben.<sup>[271]</sup> Dieser Enzym-Komplex besteht aus mehreren Komponenten, die zur Erkennung der Sequenz im RISC beitragen und wird in Kapitel 5.1.2, im Hinblick auf die Modifikationsmöglichkeiten von synthetischen siRNAs, näher beschrieben. Nach Erkennung der siRNA wird der *Sense*-Strang ausgeschleust, während der *Antisense*-Strang im RISC verbleibt. Dadurch findet eine Aktivierung statt, wobei die zum *Antisense*-Strang komplementäre Ziel-mRNA gebunden und von einer Untereinheit des RISC, der katalytischen Einheit Argonaut 2 (Ago2), zwischen den Nukleotiden 10 und 11 (gezählt vom 5'-Ende) gespalten wird. Infolgedessen besitzt die mRNA keinen Schutz mehr durch den 5'-Cap oder den PolyA-Schwanz und wird deshalb von RNasen abgebaut.<sup>[273]</sup> Somit ist die mRNA nicht mehr in der Lage, das darauf codierte Protein zu exprimieren. Aus diesem Grund werden siRNAs nicht nur für die Forschung genetischer Funktionen, sondern auch zur Validierung von neuen Medikamenten und zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt.<sup>[270]</sup> Durch die Rückgewinnung des RISC können weitere Ziel-mRNAs degradiert werden.

Ähnlich wie siRNAs sind auch *micro* RNAs (miRNAs) in der Lage, die Genexpression zu regulieren. Im Unterschied zur siRNA wird die miRNA jedoch aus einem langen,

einzelsträngigen Transkript generiert, welches eine nicht voll komplementäre Haarnadelstruktur aufweist.<sup>[270]</sup> Dieses Transkript (pri-miRNA) wird durch das Enzym Drosha in kurze, doppelsträngige RNA (pre-miRNA) degradiert, welche anschließend in das Cytoplasma ausgeschleust werden.<sup>[274]</sup> Dort schneidet Dicer diese Vorstufe in kurze Einzel- oder Doppelstränge,<sup>[271]</sup> die ebenfalls vom RISC gebunden werden. Aufgrund der fehlerhaften Basenpaarung ist die miRNA befähigt, nicht nur eine Ziel-mRNA, sondern viele verschiedene Sequenzen zu binden.<sup>[275]</sup> Zudem wird die Boten-RNA nicht zwingend durch das Enzym Ago2 geschnitten, sodass auch andere Wirkmechanismen ausgelöst werden. Dabei kann es zur Hemmung oder sogar Aktivierung der Genexpression anstelle einer vollständigen Ausschaltung kommen.<sup>[270-271]</sup>



**Abbildung 49:** Mechanismus der RNA Interferenz durch nicht-codierende RNA; siRNA und miRNA. <sup>[273, 275-276]</sup>

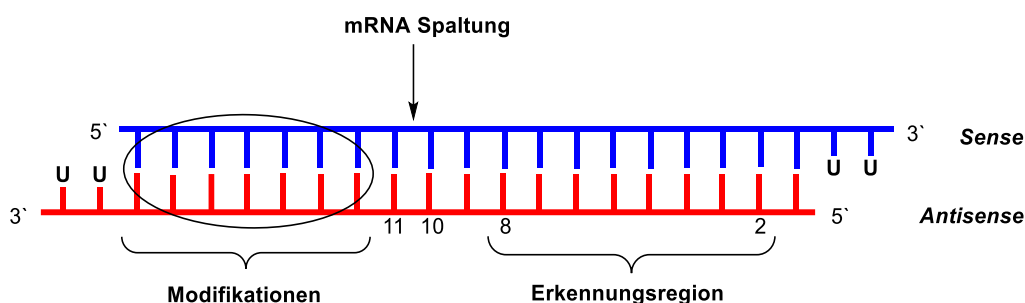
Im Rahmen dieser Forschung wurden synthetisch siRNA hergestellt und mit einem FRET-Paar zur Beobachtung des RNAi, beginnend mit der Erkennung durch den RISC, modifiziert.

Dabei muss darauf geachtet werden, an welcher Position der Sequenz die Farbstoffe angebracht werden, um die gewünschte genregulierende Wirkung aufrechtzuerhalten.

### 5.1.2 Modifikation von siRNA

Damit die siRNA ihre biologische Aktivität ausüben kann, muss sie vom RISC erkannt werden und diesen zur Ziel-mRNA führen. Modifikationen, wie das Anknüpfen von Farbstoffen, die die Struktur der siRNA beeinflussen, können deshalb den Genregulierungs-Mechanismus stark beeinträchtigen. Deshalb ist es wichtig, zu verstehen, welche Komponenten und Enzyme bei der Erkennung im RISC-Komplex beteiligt und daraus resultierend, welche strukturellen Informationen der siRNA von entscheidender Bedeutung sind.

Wie im voranstehenden Kapitel bereits beschrieben, besteht eine siRNA aus einem *Sense*- und einem *Antisense*-Strang, die aus 21 - 23 Nukleotiden aufgebaut sind und jeweils am 3'-Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden tragen.<sup>[266-267]</sup> Um die Expression des auf der mRNA codierten Proteins auszuschalten und nicht nur zu hemmen oder gar zu aktivieren, sollte der *Antisense*-Strang vollständig komplementär zur Ziel-Boten-RNA sein.<sup>[277]</sup> Dabei sind besonders die Nukleotide 2-8 (Erkennungsregion) am 5'-Ende des *Antisense*-Stranges für die Bindung der Ziel-mRNA wichtig, denn Ago2 spaltet das Zielgen zwischen Position 10 und 11 der siRNA-Sequenz.<sup>[278]</sup> Demnach sollte dieser Bereich der Sequenz unmodifiziert bleiben.

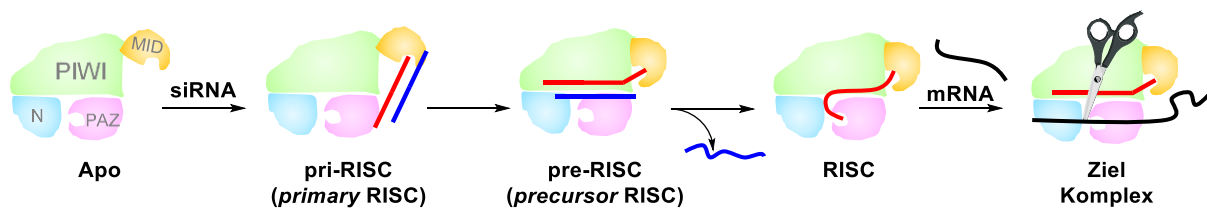


**Abbildung 50:** Aufbau einer nicht-codierenden siRNA, bestehend aus einem Sense- (blau) und einem Antisense-Strang (rot) mit 21 - 23 Nukleotiden und einem Überhang am jeweiligen 3'-Ende. Die Erkennungsregion durch den RISC sowie die Spaltungsstelle und der Bereich, der für Modifikationen zur Verfügung steht, sind markiert.<sup>[279]</sup>

Welche der beiden Sequenzen wird jedoch als *Antisense*-Strang im RISC erkannt? Potentiell kann die katalytische Einheit Ago2, der wichtigste Teil des RISC, mit beiden Strängen



beladen werden. Dies würde allerdings zu *off-Target* Effekten führen. Deshalb muss beim Design der siRNA darauf geachtet werden, welche strukturellen Merkmale für die Bindung im Ago2 wichtig sind.<sup>[275, 280]</sup> Dieses Enzym besteht aus den vier Domänen N-Terminus, MID, PIWI und PAZ, wie schematisch in Abbildung 51 dargestellt.<sup>[281-283]</sup> Solange die siRNA nicht gebunden ist, bleibt die MID-Domäne frei beweglich. Diese Form des RISC wird als Apo bezeichnet. Sobald die Monophosphatgruppe des ersten Nukleotids am 5'-Ende zwischen den Domänen MID und PIWI erkannt wurde, wird von einem primären RISC (pri-RISC) gesprochen.<sup>[282, 284-285]</sup> Dabei knüpft die MID-Domäne an das thermodynamisch instabilere Ende des Duplex an, welches A-U-reich ist.<sup>[270, 286-287]</sup> Folglich sollte das 5'-Ende des *Antisense*-Stranges ein A oder U tragen, wohingegen der *Sense*-Strang mit einem G oder C modifiziert sein sollte. Zudem sollte der Gesamtanteil an G/C-Paaren höchstens zwischen 30 % und 64 % liegen, damit die thermodynamische Stabilität des Doppelstrangs nicht zu hoch wird.<sup>[275]</sup> Mithilfe von Chaperonen wird der Rest des Stranges in die Nukleinsäure-Bindungs-Tasche eingebettet und der Vorstufen-RISC (pre-RISC) wird gebildet. Der *Sense*-Strang wird ausgeschleust und das 3'-Ende des *Antisense*-Stranges über das Zucker-Phosphat-Rückgrat in der PAZ Domäne gebunden.<sup>[283]</sup> Die Erkennungsregion des *Antisense*-Stranges ragt dabei etwas aus dem Komplex heraus, sodass sie frei zugänglich für die mRNA ist. Dieser RISC-Komplex wird nun zur Ziel-mRNA geleitet, die je nach Grad der Komplementarität geschnitten oder deren Translation lediglich unterdrückt wird.



**Abbildung 51:** Schematische Darstellung der siRNA-Erkennung im RISC und der Struktur von Ago2 mit den Domänen N-Terminus, MID, PIWI und PAZ.<sup>[281]</sup>

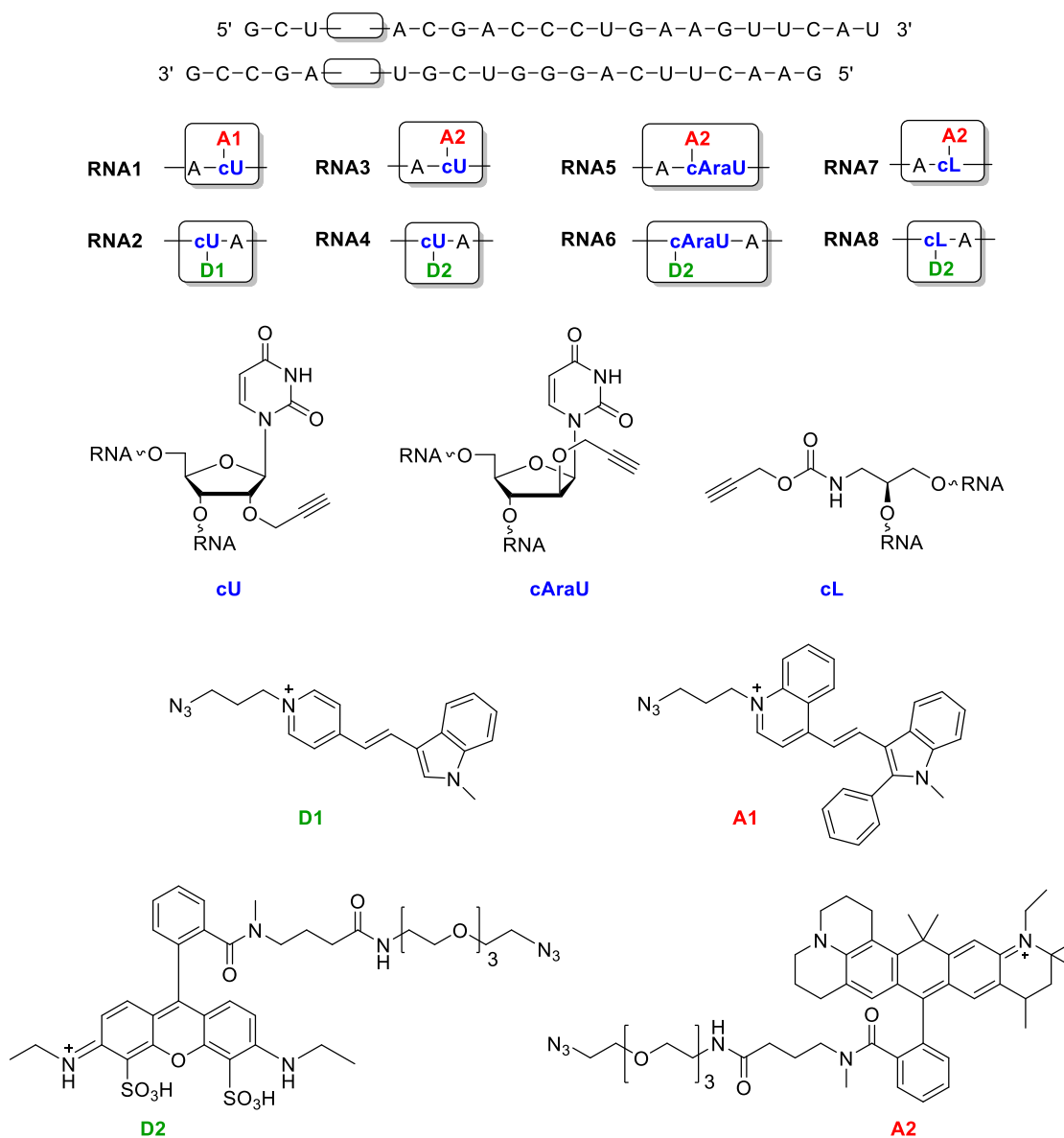
Aus diesen Anforderungen lässt sich erkennen, dass der Raum für Modifikationen stark eingeschränkt ist und sich auf den Bereich zwischen dem 3'-Ende und der Spaltungsstelle des *Antisense*-Stranges beschränkt. Um das Anbinden des *Sense*-Stranges im RISC zu verhindern, können die gegensätzlichen Kriterien angewandt und beispielsweise das 5'-Ende mit einem hohen G/C-Gehalt und das erste Nukleotid mit einem LNA-Baustein o.ä. modifiziert werden.

Zusätzlich könnte die Funktionalisierung (z.B. GalNAc) des 3'-Endes des *Sense*-Stranges dazu verwendet werden, um einen gezielten Transport in die Zelle zu ermöglichen.<sup>[288]</sup>

## 5.2 Synthese und optische Charakterisierung wellenlängenverschiebender siRNA Sonden

Die Forschung dieses Teils der Dissertation baut auf den Arbeiten von C. HOLZHAUSER<sup>[14-16, 181]</sup> und H.-K. WALTER<sup>[289]</sup> auf, die sich ebenfalls mit der Entwicklung wellenlängenverschiebender siRNA-Sonden befassten. Hierbei wurden erfolgreich drei strukturell verschiedene alkylsubstituierte Bausteine in siRNA eingebaut, postsynthetisch mittels Click-Reaktion mit Cyanin-Styryl-Farbstoffen modifiziert und durch unterschiedliche Kombination die Effizienz des Energietransfers erhöht. Über die Fluoreszenzänderung konnte eine genaue Aussage darüber getroffen werden, in welchem Stadium des Interferenz-Mechanismus sich die siRNA befindet. Um das Prinzip dieses Konzeptes evaluieren zu können, wurde als Sequenz diejenige der mRNA des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) gewählt. Dies ist nicht nur ein etabliertes System, sondern erlaubt auch die Beobachtung der Genregulierung über die Löschung der grünen Fluoreszenz des GFP. Während frühere Ergebnisse von C. HOLZHAUSER, die TO und TR als Basensurrogate in siRNA einbaute, einen erfolgreichen Knockdown zeigten und somit bestätigten, dass die Modifizierung mit einem Donor-Akzeptor-Paar die biologische Aktivität nicht beeinflusst,<sup>[14, 16]</sup> konnten für die Click-Variante von H.-K. WALTER bisher keine eindeutigen Resultate erhalten werden. Deshalb soll die Auslesung der Fluoreszenzfarbe zusätzlich durch die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit gestärkt werden. Allerdings zeigten die Cyanin-Styryl-Farbstoffe in jedem einzelnen Bindungsstadium, das heißt im FRET-Paar, im Einzelstrang oder im einfach modifizierten Doppelstrang, jeweils mehrere Fluoreszenz-lebenszeiten, was die Unterscheidung im lebenden Organismus unmöglich macht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit ATTO-Farbstoffe (der Firma ATTO-TEC) verwendet, die sich auch für die Einzelmolekül-Detektion und hochauflösende Mikroskopie eignen. Neben ihrer hohen thermischen und photochemischen Stabilität weisen sie hohe Fluoreszenzquanten-ausbeuten auf und lassen sich mit Wellenlängen über 500 nm anregen, wodurch Zellschäden minimiert werden.

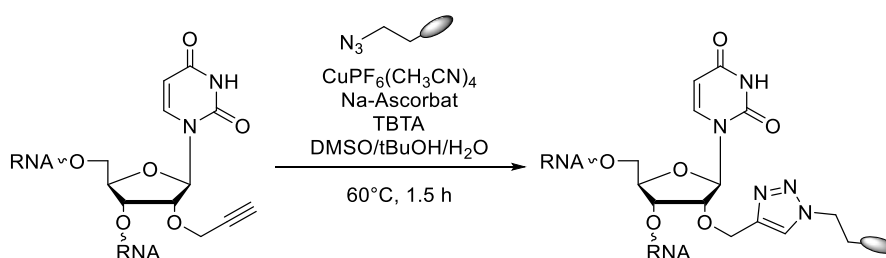
Um den Einfluss der Farbstoffe auf das System untersuchen und mit den früheren Ergebnissen von H.-K. WALTER vergleichen zu können, wurden zunächst dieselben Stränge synthetisiert.



**Abbildung 52:** Sequenzen der Stränge **RNA1 – RNA8** sowie Strukturen der verwendeten Click-Bausteine und Farbstoffe: 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**), Arabino-Analogon (**cAraU**), (*S*)-Amino-1,3-propanediol (**cL**), Cyanin-Styryl-Farbstoffe **D1** und **A1**, ATTO532 (**D2**) und ATTO647N (**A2**).

Dafür wurden das kommerziell erhältliche 2'-*O*-Propargyluridin (**cU**) sowie das, gemäß Literatur synthetisierte, Arabino-Analogon (**cAraU**)<sup>[168]</sup> und der azyklische Linker (*S*)-2-Amino-1,3-propanediol (**cL**)<sup>[77]</sup> mittels automatisierter Festphasensynthese in die siRNA Sequenzen **RNA1 - RNA8** eingebaut, wie in Abbildung 52 dargestellt. Für einen effizienten Einbau der Bausteine mussten die Kupplungszeiten im Vergleich zu den Standard-Phosphoramidit-Bausteinen erhöht werden. Als Gegenbase wurde Adenosin gewählt, um Fehlpaarungen auszuschließen. Nach Abspaltung von der festen Phase sowie der Entschützung der exozyklischen Aminschutzgruppen wurde der *Antisense*-Strang jeweils mit

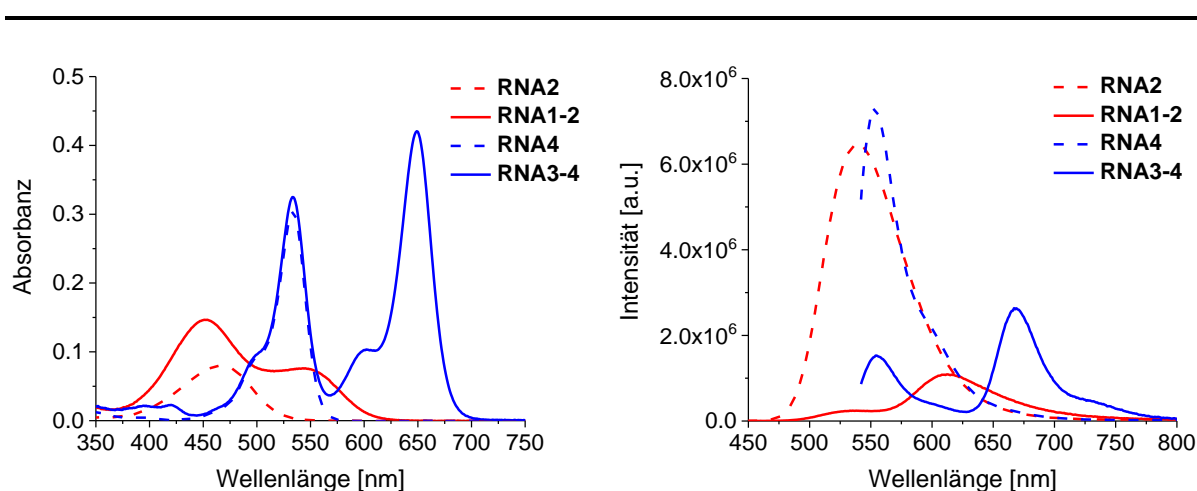
dem Donor-Farbstoff und der *Sense*-Strang entsprechend mit dem Akzeptor mittels CuAAC markiert. Dabei wurden an **RNA1** und **RNA2** die in früheren Arbeiten verwendeten Cyanin-Farbstoffe **D1** und **A1** geknüpft, während in **RNA3 - RNA8** ATTO532 (**D2**) als Donor und ATTO647N (**A2**) als Akzeptor zum Einsatz kamen. Die Reaktionsbedingungen der kupferkatalysierten Click-Reaktion sind in Schema 17 dargestellt. Erst im Anschluss erfolgte die Abspaltung der 2'-Silyl-Schutzgruppe, denn durch die freie Hydroxy-Funktion wird RNA angreifbar. Zum einen kann ein intramolekularer Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe an der Phosphodiesterbrücke stattfinden und zum anderen beruht die Instabilität darauf, dass die RNasen an der 2'-Position ansetzen und den RNA-Abbau katalysieren. Deshalb wurde auf den inversen Syntheseweg bzw. auf eine simultane Entschützung und Click-Modifizierung verzichtet. Weiterhin wurde, wie bereits in Kapitel 5.1.2 beschrieben, darauf geachtet, die Modifizierung außerhalb des Erkennungsbereiches für den RISC anzubringen, um die biologische Aktivität zu gewährleisten. Die Farbstoffe wurden dabei diagonal zueinander angeordnet, da frühere Ergebnisse dies als beste Orientierung für eine eindeutige Fluoreszenzauslesung identifiziert hatten.<sup>[172]</sup>



**Schema 17:** Kupferkatalysierte Click-Reaktion am Beispiel von **cU**-modifizierter RNA.

Im Anschluss an die erfolgreiche Synthese und Aufreinigung über HPLC wurde die optische Charakterisierung der Stränge durchgeführt. Die Absorptionsspektren (Abbildung 53, links) zeigen die typischen Absorptionsbanden der Cyanin-Styryl-Farbstoffe ( $\lambda_{D1} = 454$  nm,  $\lambda_{A1} = 545$  nm) sowie der ATTO-Farbstoffe ( $\lambda_{D2} = 532$  nm,  $\lambda_{A2} = 647$  nm) in **RNA1-2** und **RNA3-4** geknüpft an **cU**. Im Vergleich zu den bisher verwendeten Chromophoren überlappen die Absorptionsbanden des neuen FRET-Paares nur sehr wenig, was den Vorteil einer selektiveren Anregung des Donors birgt. Dadurch sollte es möglich sein, den Farbkontrast zu erhöhen, denn der Akzeptor absorbiert bei  $\lambda_{exc} = 532$  nm kaum. Infolgedessen verbleibt der Akzeptor im Grundzustand, der lediglich durch Energieübertragung vom Donor angeregt

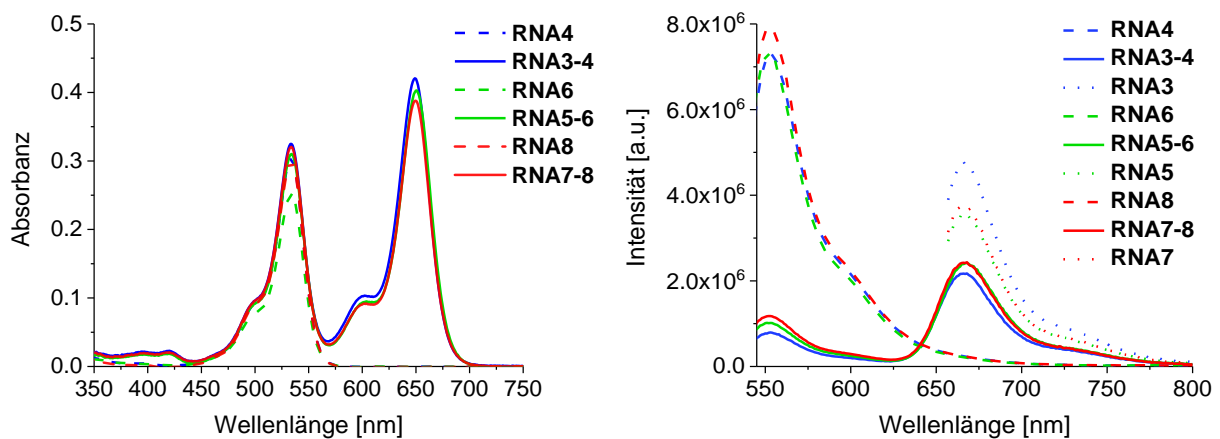
werden kann. Außerdem wird durch diese spektrale Unabhängigkeit erwartet, dass die Farbstoffe nur eine Fluoreszenzlebenszeit zeigen und keine Wechselwirkungen eingehen, wie das bei den Cyanin-Farbstoffen der Fall ist. Diese zeigen, geknüpft an **cU**, eine starke Reduktion der Akzeptor-Extinktion im Vergleich zum Donor, was auf Grundzustands-Dimere und infolgedessen auf exzitonische Wechselwirkungen hindeutet. Dadurch findet kein effizienter Energietransfer statt. Im Vergleich dazu bleiben die Extinktionskoeffizienten der ATTO-Farbstoffe annähernd unverändert im Doppelstrang, weshalb ein optimierter FRET erwartet wird. Zudem sollte das Fluoreszenzsignal intensiver sein, da die neuen Chromophore höhere Extinktionen zeigen. Dies kann mit den Emissionsspektren bewiesen werden. Allerdings ist der Energietransfer, wider erwartend, mit einem geringeren Kontrastverhältnis  $I_A/I_D$  für **RNA3-4** im Vergleich zu **RNA1-2** (Tabelle 6) schlechter.



**Abbildung 53:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Donor-Einzelstränge **RNA2**, **RNA4** (gestrichelt) sowie der FRET-Paare **RNA1-2** und **RNA3-4**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M Duplex in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{\text{exc}}(\text{D1}) = 435$  nm,  $\lambda_{\text{exc}}(\text{D2}) = 532$  nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Dies lässt darauf schließen, dass sich die Farbstoffe **D2** und **A2** nicht in einer für den FRET geeigneten Orientierung befinden. Diese kann durch die Art der Anknüpfung beeinflusst werden. Während **cU** die Farbstoffe in die kleine Furche zwingt, welche bei RNA sehr flach ist, dirigiert **cAraU** die Fluorophore in die große, enge und tiefe Furche. Im Fall des **cL** fehlt die Nukleobase, was eine Interkalation der Farbstoffe in die Doppelhelix ermöglichen soll. Betrachtet man die Absorptionsspektren (Abbildung 54) der verschiedenen Linker in **RNA3-4**, **RNA5-6** und **RNA7-8**, so kann, wie angenommen, kein Unterschied zwischen diesen Bausteinen festgestellt werden. Die Farbstoffe bleiben weiterhin deutlich spektral voneinander getrennt. Allerdings zeigt auch die Emission nur geringfügige Differenzen, was

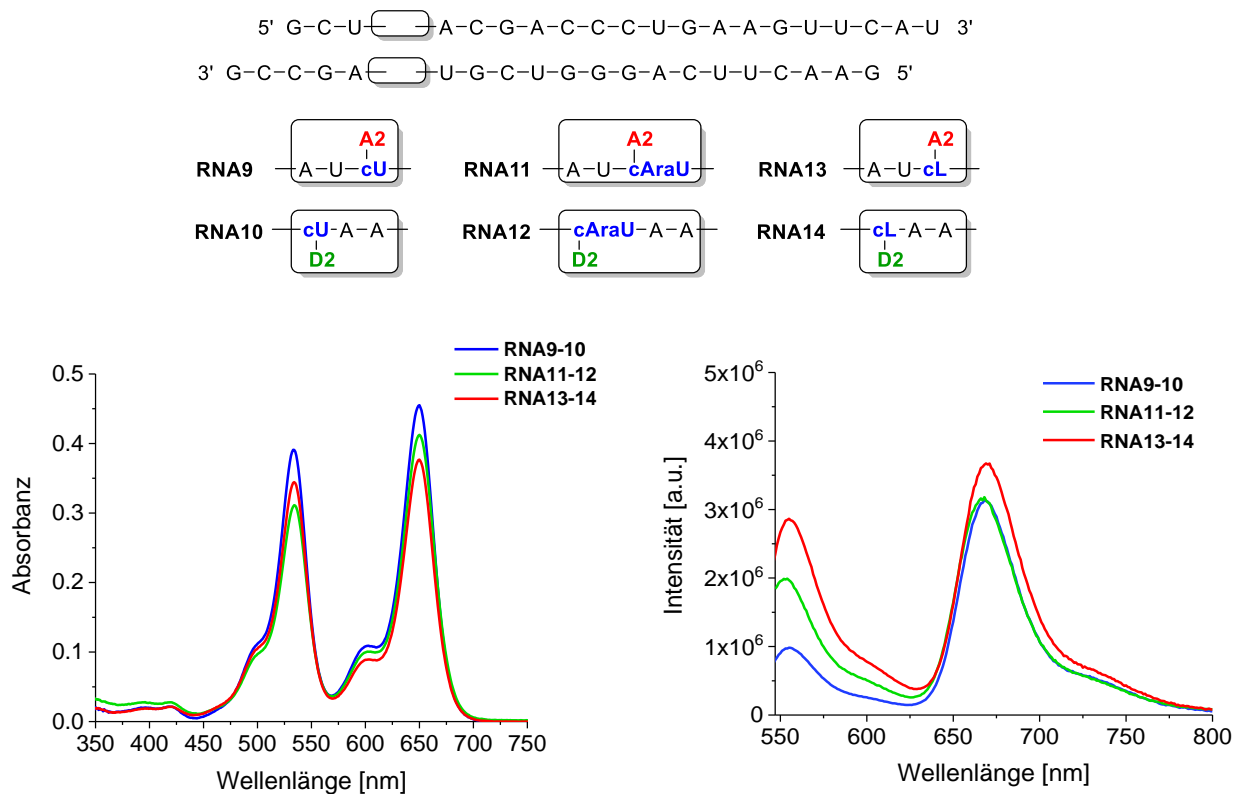
auf den langen PEG-Linker an den ATTO-Farbstoffen zurückzuführen ist. Dieser lässt den Chromophoren viel Spielraum, weshalb sie sich nicht in geeigneter Orientierung zueinander befinden. Der Click-Baustein spielt hier deshalb nur eine untergeordnete Rolle. Auffallend ist jedoch, dass bei allen Doppelsträngen die Akzeptorfluoreszenz deutlich gelöscht wird, was bedeutet, dass ein Energieverlust aufgrund von strahlungslosen Übergängen stattfinden muss. Da das Absorptionsspektrum ein autarkes Verhalten der Farbstoffe zeigt, ist es wahrscheinlicher, dass durch Wechselwirkung mit dem Rückgrat der RNA Energie verloren geht.



**Abbildung 54:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Donor-Einzelstränge **RNA4**, **RNA6**, **RNA8** (gestrichelt), der Akzeptor-Einzelstränge **RNA3**, **RNA5**, **RNA7** (gepunktet) sowie der FRET-Paare **RNA3-4**, **RNA5-6** und **RNA7-8**. Messparameter: 2.5  $\mu\text{M}$  Duplex in 10 mM  $\text{NaP}_i$ -Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20  $^\circ\text{C}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}(\text{D2}) = 532$  nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, ist ein Förster-Resonanz-Energietransfer von mehreren Faktoren abhängig. Dies schließt zum einen die Orientierung der Farbstoffe zueinander ein, zum anderen aber auch den Abstand des FRET-Paares. Da sich die neuen Farbstoffe strukturell deutlich von den Cyanin-Styryl-Farbstoffen unterscheiden und sich deshalb in der Architektur anders verhalten und wechselwirken, ist es notwendig, dieses Konzept auf die neuen Farbstoffe anzupassen. Um die Effizienz des Energietransfers trotz des langen PEG-Linkers weiter zu verbessern, wurde die Distanz zwischen den Chromophoren durch ein zusätzliches A-U-Basenpaar erweitert. Dafür wurde **cU** in **RNA9-10**, **cAraU** in **RNA11-12** und **cL** in **RNA13-14** eingebaut. Die unterschiedliche Anknüpfung der Fluorophore hat wiederum keine große Auswirkung auf das Absorptionsverhalten. Die Emissionsspektren zeigen jedoch deutliche Unterschiede im Kontrastverhältnis. Die

Donoremission in **RNA9-10** wird stärker gelöscht als die in **RNA11-12** oder **RNA13-14**, was zu einem Kontrastverhältnis von 3.2, im Vergleich zu 1.6 für **cAraU** oder 1.3 für **cL**, führt. Damit besitzen die Click-Bausteine mit zunehmendem Abstand einen größeren Einfluss. Dies spiegelt sich auch in der Energieeffizienz wider, die mit 0.76 für **cU** höher ist als für **cL** (0.56) und **cAraU** (0.62). Die schlechte Effizienz des FRET unter Verwendung des **cL**-Bausteins könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Farbstoffe zu groß und der PEG-Linker zu lang sind, sodass die Fluorophore nicht in die Helix interkalieren können.

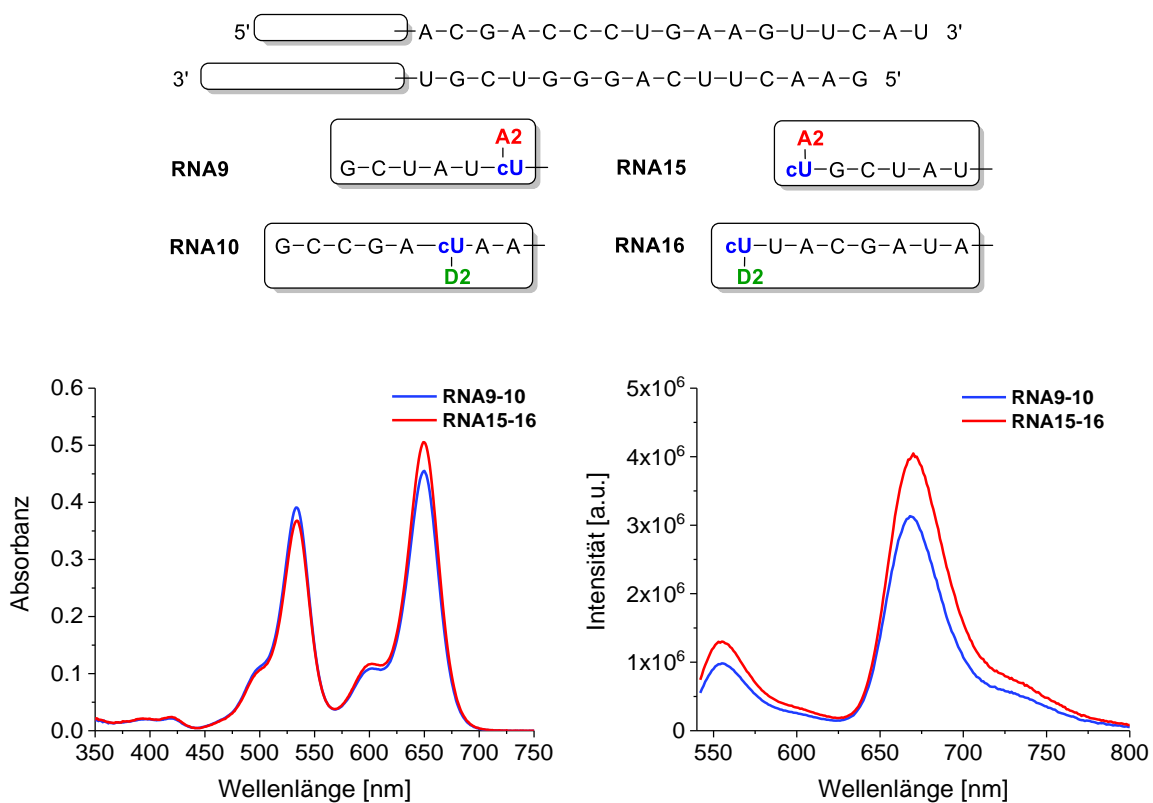


**Abbildung 55:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der FRET-Paare **RNA9-10**, **RNA11-12** und **RNA13-14**. Messparameter: 2.5 mM Duplex in 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{\text{exc}}(\text{D2}) = 532 \text{ nm}$ , Spaltbreite 2/2 nm.

Die Schmelztemperatur (s. Tabelle 6) unterstützt diese Aussage, denn der Doppelstrang ist weniger stark hybridisiert als die **cU**-siRNA, was darauf hindeutet, dass die fehlende Nukleobase nicht durch eine  $\pi$ -stabilisierende Wirkung der Farbstoffe ausgeglichen wird. Vergleicht man die Kontrastverhältnisse von **RNA3-4** mit **RNA9-10**, bei welchen das FRET-Paar durch ein Basenpaar getrennt wurde, so fällt auf, dass dieses um fast das Doppelte gestiegen ist. Mithilfe des **cU**-Bausteins und einer erweiterten Distanz kann somit die

Effizienz des Energietransfers erhöht werden. Folglich wurden alle weiteren Experimente lediglich mit **cU** durchgeführt.

Um den Einfluss des internen Einbaus auf die Effizienz des Energietransfers zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Sequenz mit terminalem FRET-Paar synthetisiert. In der Literatur werden Oligonukleotide für gewöhnlich terminal modifiziert, da dies synthetisch zugänglicher ist und zudem den Fluorophoren mehr Raum zur freien Orientierung bietet. Dadurch kann oftmals eine höhere FRET-Effizienz erzielt werden. Aufgründessen wurde **RNA15-16** synthetisiert, welche am 3'-Ende des *Antisense*-Stranges den Donor und am 5'-Ende des *Sense*-Stranges den Akzeptor trägt.



**Abbildung 56:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der FRET-Paare **RNA9-10** und **RNA15-16**. Messparameter: 2,5 mM Duplex in 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}(D2) = 532$  nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Im Vergleich zu **RNA9-10** zeigt **RNA15-16** insgesamt eine höhere Fluoreszenzintensität, allerdings keine Optimierung des Energietransfers. Die verminderte Emissionsintensität der **RNA9-10** könnte durch die Wechselwirkung der Fluorophore mit den umgebenden Nucleobasen sowie dem RNA-Rückgrat erklärt werden, wodurch strahlungslos Energie abgegeben wird. Diese Interaktion ist im Fall der terminalen Modifikation nur bedingt



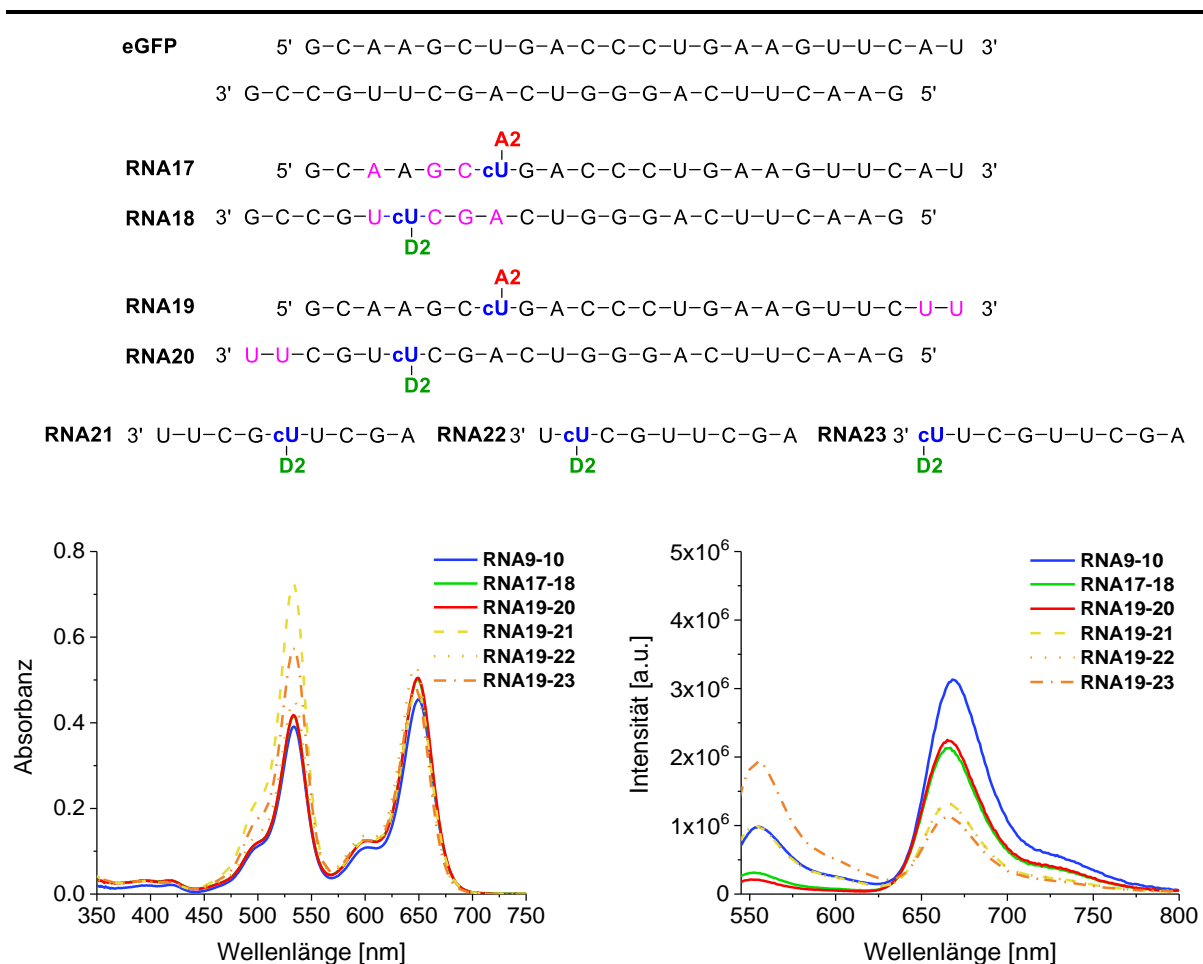
möglich, was zu einer leicht erhöhten Intensität führt. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die interne Modifizierung ebenso wie die terminale für eine Fluoreszenzmarkierung eignet. Dieses Konzept kann sogar gezielter Einfluss auf die Effizienz des Energietransfers nehmen, da die Fluorophore in eine bestimmte Richtung gezwängt werden und sich nicht komplett frei bewegen können.

**Tabelle 6:** Kontrastverhältnis, Energietransfer-Effizienz sowie Schmelztemperaturen von **RNA1-2** – **RNA15-16**.

<b>RNA</b>	<b>I<sub>A</sub>/I<sub>D</sub></b>	<b>E<sub>app</sub></b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>
<b>RNA1-2</b>	4.5	0.82	84
<b>RNA3-4</b>	2.7	0.73	82
<b>RNA5-6</b>	2.4	0.70	77
<b>RNA7-8</b>	2.1	0.67	77
<b>RNA9-10</b>	3.2	0.76	81
<b>RNA11-12</b>	1.6	0.62	
<b>RNA13-14</b>	1.3	0.56	79
<b>RNA15-16</b>	2.6	0.73	84

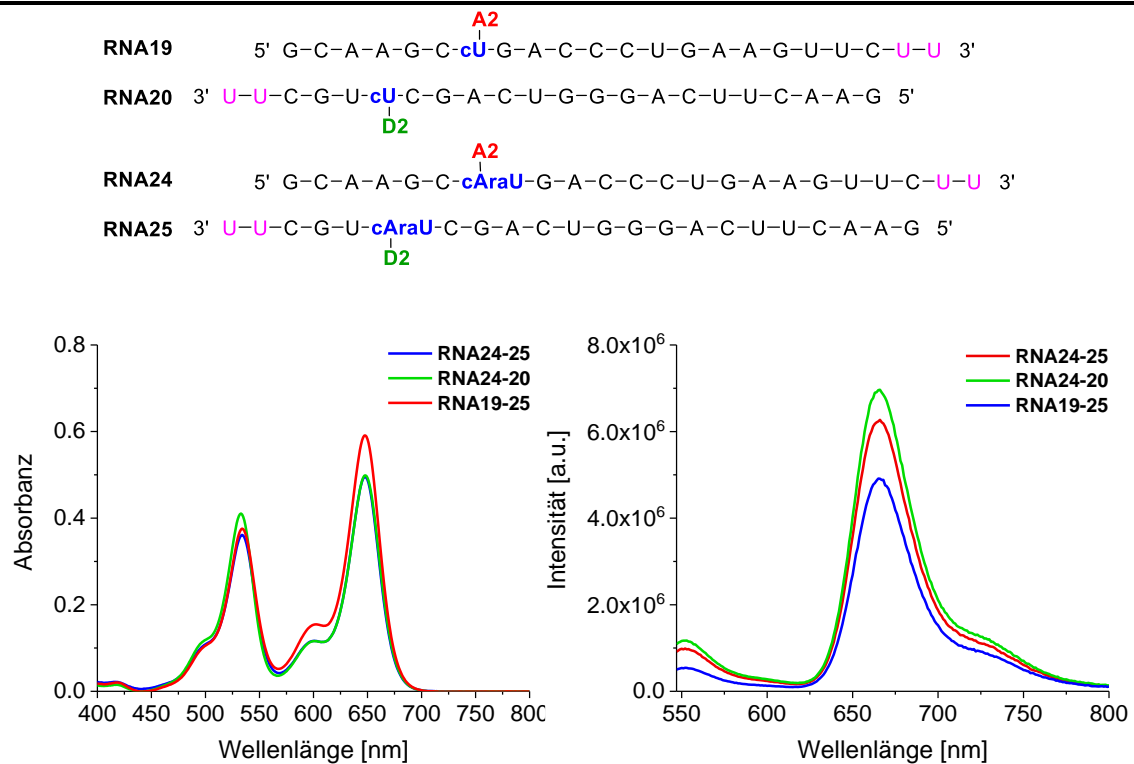
Dennoch konnte mit den ATTO-Farbstoffen bisher keine Verbesserung, hinsichtlich Kontrastverhältnis und Energietransfereffizienz, zu den Cyanin-Styryl-Farbstoffen erreicht werden. Eine erneute Erweiterung der Distanz scheint nicht mehr möglich, ohne dabei negative Konsequenzen auf die biologische Aktivität nach sich zu ziehen. Deshalb wurde die verwendete Sequenz genauer untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass diese nicht vollständig komplementär zur eGFP-Sequenz war. Um von Beginn an auszuschließen, dass die siRNA, aufgrund von Fehlpaarungen, nicht ihre volle biologische Wirkung zeigen kann, wurde die Abfolge der Basen an die Zielsequenz angepasst (**RNA17-18**). Diese Änderung resultierte in einer Distanzerweiterung um ein zusätzliches Basenpaar, da in der Sequenz lediglich jedes Uridin durch einen modifizierten Click-Baustein ersetzt wurde. Im selben Zuge wurde der gleiche Strang mit U-U-Überhängen versehen (**RNA19-20**), die zur Erhöhung der Stabilität von RNA in der Zelle beitragen sollen und zudem die Erkennung im RISC verbessern, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben wurde. Durch die Anpassung wurden außerdem weitere Sequenzen **RNA21** - **RNA23** ermöglicht, bei welchen durch die Kombination mit **RNA19** der Abstand zwischen den Fluorophoren stetig ausgedehnt werden konnte. In diesen neuen siRNAs wurden die Chromophore allerdings von G/C-Paaren anstelle von A/U-Basen umgeben, welche bekannt dafür sind, die Emission zu löschen.<sup>[217, 290-294]</sup> Dies kann durch die

Emissionsspektren sowie den Fluoreszenzquantenausbeuten bestätigt werden (Abbildung 57, Tabelle 7 und 8). Denn dabei zeigen nicht nur die FRET-Paare eine deutliche Reduktion, sondern auch die jeweiligen Donor- und Akzeptor-Einzelstränge. In direkter Verbindung dazu steht die Erhöhung der Schmelztemperatur, da Guanin besser Stapelwechselwirkungen zeigt und damit zur Stabilisierung beiträgt. Dennoch ist eine Steigerung der FRET-Effizienz zu beobachten. Während **RNA17-18** ein Kontrastverhältnis von 6.8 aufweist, erreicht dieses für **RNA19-20** sogar einen Wert von 10.6, was einer offensichtlichen Energietransfer-Effizienz von 91 % entspricht (Tabelle 7). Damit zeigt **RNA19-20** eine deutliche Verbesserung zu **RNA1-2** unter Verwendung der Cyanin-Styryl-Farbstoffe und kann auch durch eine Ausdehnung der Distanz nicht mehr optimiert werden.



**Abbildung 57:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der FRET-Paare **RNA9-10** bis **RNA19-23**. Messparameter: 2.5 mM Duplex in 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{\text{exc}}(\text{D2}) = 532 \text{ nm}$ , Spaltbreite 2/2 nm.

In vorherigen Arbeiten an DNA konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Ribose (**cU**) und Arabinose (**cAraU**) zu einem drastischen Anstieg des Kontrastverhältnisses führen kann.<sup>[289]</sup> Aus diesem Grund wurde in die beste Sequenz anstelle des **cU** ein **cAraU** eingebaut und die optischen Eigenschaften des Doppelstranges **RNA24-25** sowie der Kombinationen **RNA19-25** und **RNA24-20** untersucht.

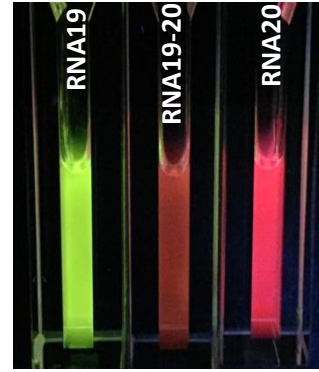


**Abbildung 58:** Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der FRET-Paare **RNA28-29**, **RNA28-20** und **RNA19-29**. Messparameter: 2.5 mM Duplex in 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}(D2) = 532$  nm, Spaltbreite 2/2 nm.

Im Gegensatz zu früheren Resultaten für die Kombination aus Ribose und Arabinose konnte hier keine Steigerung des Kontrastverhältnisses und der Energietransfer-Effizienz festgestellt werden (s. Abbildung 58 sowie Tabelle 7). Dies spricht wiederum dafür, dass sich die Fluorophore relativ unabhängig vom Click-Baustein ausrichten können, was sich in späteren Fluoreszenzlebenszeit-Messungen (Kapitel 5.4) positiv auswirkte. Dass die Fluorophore in **RNA19-20** in geeigneter Orientierung zueinanderstehen und deshalb den besten FRET zeigen, wird nicht nur aus den Schmelztemperaturen ersichtlich, sondern kann selbst mit dem bloßen Auge anhand der Fluoreszenzfarbe erkannt werden (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Schmelztemperaturen, Quantenausbeuten, Kontrastverhältnis sowie Energietransfer-Effizienz von **RNA28-29**, **RNA28-20** und **RNA19-29** im Vergleich zu **RNA19-20**.

	$T_m$ [°C]	$\Phi_F$ (Do)	$\Phi_F$ (Ak)	$I_{Ak}/I_{Do}$	$E_{app}$
RNA17-18	85	0.03	0.18	6.8	0.87
<b>RNA19-20</b>	<b>85</b>	<b>0.02</b>	<b>0.19</b>	<b>10.6</b>	<b>0.91</b>
RNA24-25	72	0.10	0.43	6.3	0.86
RNA24-20	75	0.10	0.42	5.9	0.86
RNA19-25	78	0.05	0.29	9.0	0.90



Interessant für die Anwendung in lebenden Organismen ist neben der Fluoreszenzfarbänderung auch die Änderung der Fluoreszenzquantenausbeuten. Dabei sollten sich ganz besonders der einfach modifizierte Einzel- und Doppelstrang voneinander unterscheiden, denn dies ist zur Verfolgung der Genregulierung mithilfe der siRNA äußerst hilfreich. Der RISC-Komplex bindet die siRNA, welche mit dem FRET-Paar modifiziert wurde, entwindet den Doppelstrang und schleust den akzeptormodifizierten *Sense*-Strang aus. Währenddessen verbleibt der donormodifizierte *Antisense*-Strang solange als Einzelstrang im RISC, bis die Ziel-mRNA mit diesem hybridisiert und ein einfachmodifizierter Doppelstrang vorliegt. Wie bereits beschrieben wurde, ist die Fluoreszenzquantenausbeute sowie Fluoreszenzintensität des Donors in **RNA19-20** ( $\Phi_D = 0.02$ ) durch einen Energietransfer im Vergleich zum Einzelstrang **RNA20** ( $\Phi_D = 0.49$ ) stark gelöscht (Tabelle 8). Durch die veränderte Basenumgebung und die geordnete Struktur nehmen diese beiden Parameter im einzelmodifizierten Donor-Doppelstrang weiter zu ( $\Phi_D = 0.69$ ).

**Tabelle 8:** Quantenausbeuten von **RNA17-18** und **RNA19-20** im Vergleich; \* im FRET-Paar.

RNA	$\Phi_D$ ds	$\Phi_D$ ss	$\Phi_D^*$	$\Phi_A^*$	$\Phi_A$ ss	$\Phi_A$ ds
<b>RNA17-18</b>	0.61	0.47	0.025	0.177	0.39	0.51
<b>RNA19-20</b>	0.69	0.49	0.020	0.185	0.46	0.52

So steigt die Fluoreszenzquantenausbeute von **RNA20** nach Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang (**RNA20 ds**) um 29 %. Diese Erhöhung bedeutet, dass weniger absorbierte Energie wieder strahlungslos abgegeben wird und steht damit in direktem Zusammenhang mit der Erhöhung der Fluoreszenzlebenszeit des Donors. Die Bestimmung der Lebenszeit wird in Kapitel 5.4 näher beschrieben.

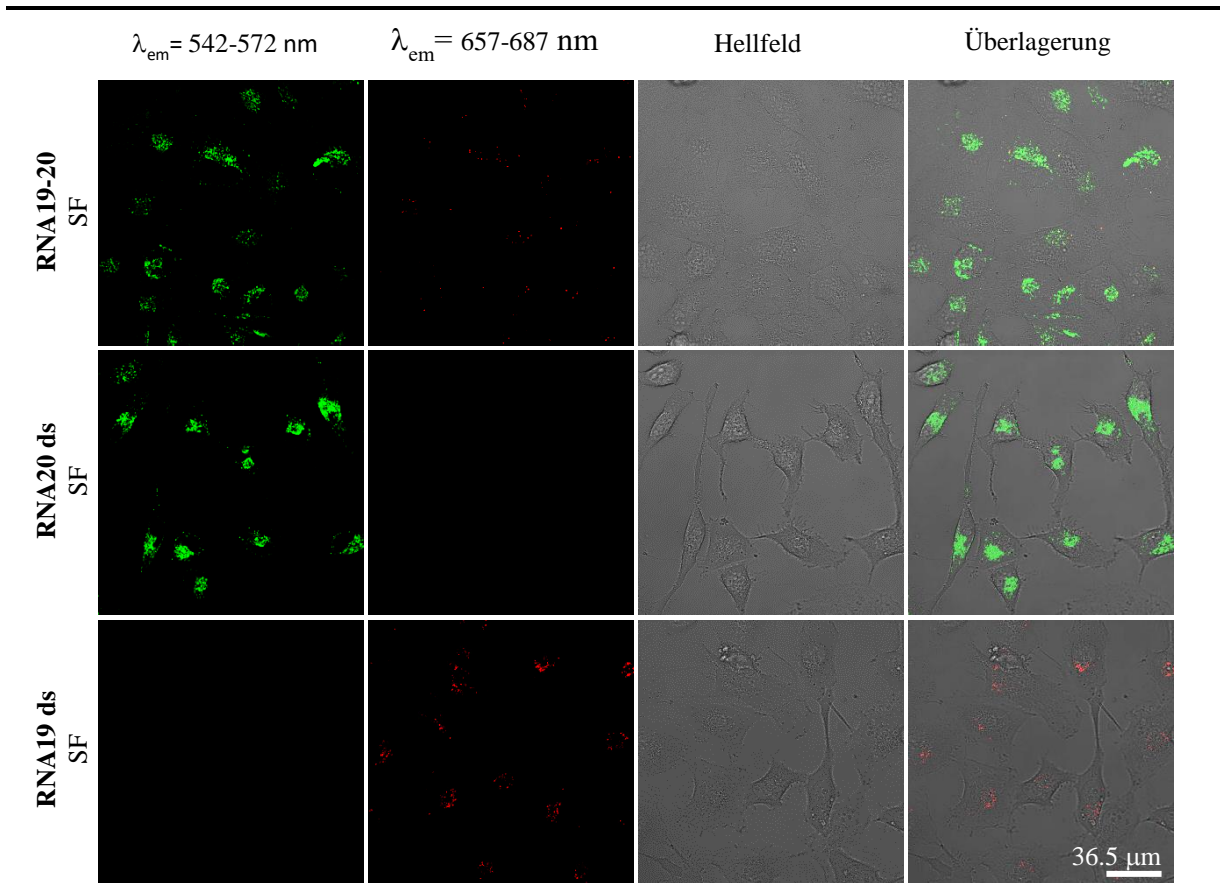
Zuvor sollen jedoch die Auswirkungen der Farbstoffmodifikation auf die genregulierende Wirkung über biologische Zellexperimente genauer untersucht werden.

### 5.3 Knockdown-Experimente

Nach erfolgreicher optischer Charakterisierung und Identifikation des siRNA-Stranges mit dem effizientesten Energietransfer wurde die Aufnahme in die Zelle sowie die biologische Aktivität, unter Anleitung von DR. FRANZISKA RÖNICKE, untersucht. Dabei sollte bestätigt werden, dass die artifiziellen Click-Bausteine, verknüpft mit den Farbstoffen, keinerlei negativen Einflüsse auf den Genregulierungs-mechanismus ausüben.

Die Transfektion von 10 pmol **RNA19-20**, **RNA19 ds** und **RNA20 ds** in humane Cervix-Karzinomzellen der Linie HeLa erfolgte mit ScreenFect<sup>®</sup>-siRNA als Transfektionsreagenz. Dieses Reagenz interagiert nicht mit Serum-Proteinen, sodass eine einfache und schnelle Transfektion möglich wird, ohne das Medium zu wechseln. Nach 24 Stunden wurde die fluoreszente Architektur mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert (Abbildung 59). Dabei wurde die siRNA mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{exc} = 532$  nm angeregt und die Emission des Donors ( $\lambda_{em} = 542 - 572$  nm) sowie des Akzeptors ( $\lambda_{em} = 657 - 687$  nm) detektiert. Neben den Zellen im Hellfeld wurde auch die Überlagerung der drei ersten Kanäle betrachtet. Alle Proben zeigen punktuell verteilte Fluoreszenzsignale, was darauf hindeutet, dass sich die siRNA in Endosomen befindet. Auffällig ist hierbei, dass **RNA19-20** eine starke Donoremission zeigt, die ähnlich intensiv ist wie bei **RNA20 ds**. Im Gegensatz dazu, kann nur ein schwaches, rotes Signal des Akzeptors in **RNA19-20** detektiert werden, welches im Vergleich zum akzeptormodifizierten Doppelstrang **RNA19 ds** kaum zu sehen ist. Dennoch ist auch die Intensität von **RNA19 ds** nicht vergleichbar mit der Emission des Donors. Dies kann durch die Anregungswellenlänge von  $\lambda = 635$  nm, die außerhalb des Absorptionsmaximums des Akzeptors liegt, erklärt werden. Der Donor hingegen wird in seinem Absorptionsmaximum angeregt, was in einem intensiven Signal resultiert. Die Überlagerung des Hellfeldes zusammen mit dem grünen bzw. roten Kanal zeigen, dass ScreenFect<sup>®</sup>-siRNA die fluoreszenze Architektur erfolgreich in die Zellen transportiert. Allerdings scheint der Energietransfer nicht mehr stattzufinden, was bedeutet, dass die Probe durch das Transfektionsreagenz dehybridisiert werden muss. Grund dafür könnte eine Absenkung des pH-Wertes durch ScreenFect<sup>®</sup>-siRNA sein, denn nach Zusammenpipettieren der Probe konnte

eine deutliche Farbänderung des Mediums beobachtet werden, welche für einen niedrigeren pH-Wert spricht.

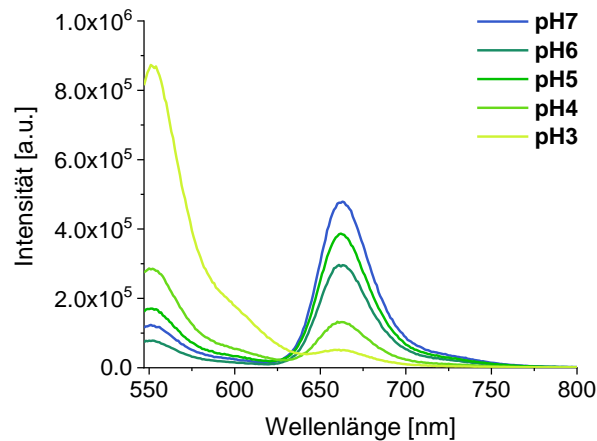


**Abbildung 59:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen der Transfektion von HeLa-Zellen mit 10 pmol **RNA19-20**, **RNA19 ds** und **RNA20 ds** mithilfe von ScreenFect®-siRNA. Parameter:  $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$  für **RNA19-20** und **RNA20 ds**,  $\lambda_{exc} = 635 \text{ nm}$  für **RNA19 ds**.

Um diese Behauptung zu stützen, wurden zusätzlich pH-abhängige, stationäre Emissionsspektren aufgezeichnet, die in Abbildung 60 dargestellt sind. Hierbei ist eine Abnahme der Akzeptorfluoreszenz bei gleichzeitigem Anstieg der Donoremission mit fallendem pH-Wert zu sehen. Während diese Änderung im Pufferbereich noch gut abgefangen werden kann, nimmt der Trend außerhalb des Pufferbereichs drastisch zu.

Um diese Abhängigkeit des pH-Wertes zu umgehen, wurde mithilfe des „Traffic-Light“-Konzeptes die Eignung eines Polyamidoamin-Dendrimers mit Triethanolamin-Kern (PAMAM; G<sub>5</sub>) als alternatives Transportreagenzien zu ScreenFect®-siRNA untersucht. Diese kationischen Moleküle gelten als äußerst effiziente Transportmoleküle, die zusätzlich die endosomale Freisetzung verbessern sollen.<sup>[295-298]</sup> Dabei wird die siRNA über elektrostatische Wechselwirkung in den Taschen des Dendrimeres gebunden, welches, nach Aufnahme in die

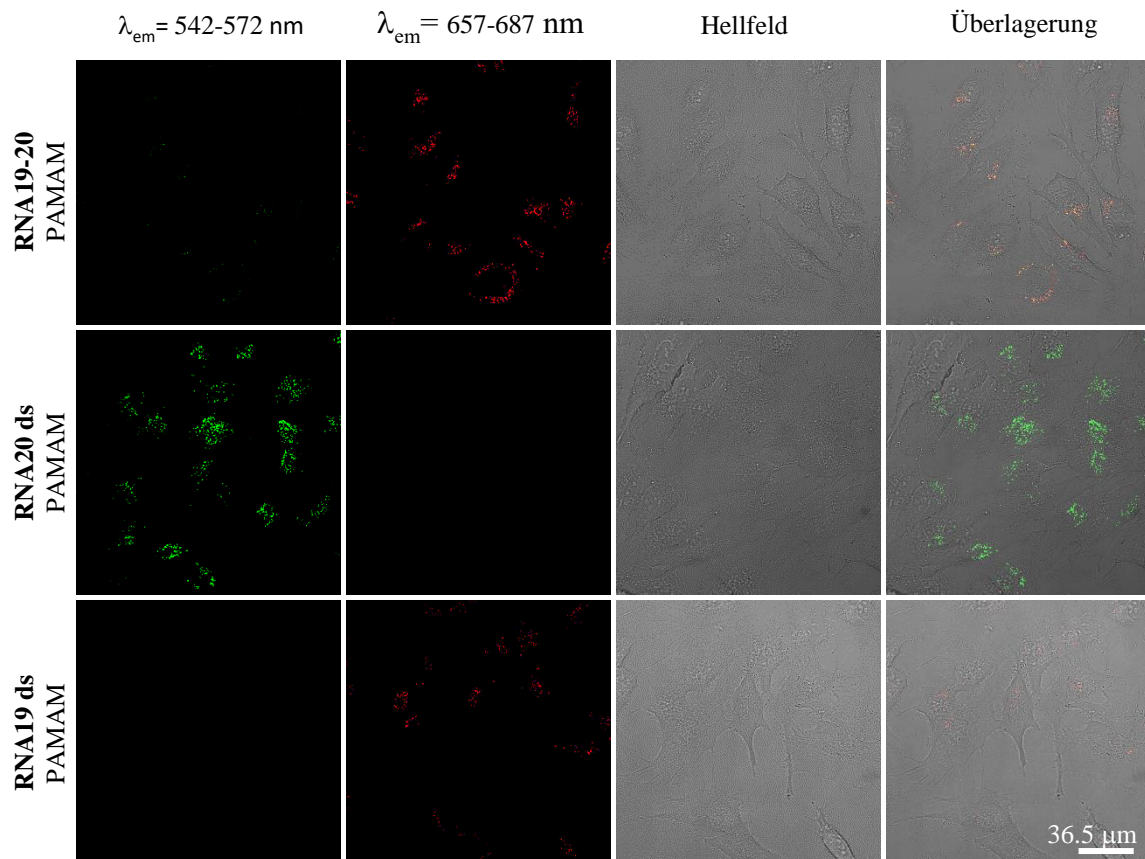
Zelle, die Endosomen durch Erhöhung des osmotischen Drucks zum Zerbersten bringt und die Sonden freisetzt.<sup>[295-297, 299-301]</sup>



**Abbildung 60:** pH-abhängige Emissionsmessung des FRET mit **RNA19-20**.

Die Transfektion von 50 pmol **RNA19-20**, dargestellt in Abbildung 61, fand zunächst für acht Stunden in serumfreiem Medium statt. Dadurch sollten unerwünschte elektrostatische Wechselwirkungen mit Proteinen im Serum umgangen und somit der Transport verbessert werden.<sup>[297]</sup> Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Probe wiederum mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie visualisiert. Im Unterschied zur Transfektion mit *ScreenFect*<sup>®</sup>-siRNA, können mit dem PAMAM-Dendrimer deutliche Signale im Akzeptorkanal und nur wenige im Donorkanal beobachtet werden. Dies stimmt gut mit den stationären Fluoreszenzmessungen und der berechneten, offensichtlichen Energietransfer-effizienz von 91 % ein. Auch der Vergleich des grünen Kanals von **RNA20 ds** mit dem FRET-Paar verdeutlicht die Löschung des Donors, ausgelöst durch den Energietransfer. Ebenso beweist die vergleichbare Intensität von **RNA19 ds** und **RNA19-20** im Akzeptorkanal die Effizienz des FRET. Die wenigen Signale im Donorkanal können durch eine unvollständig hybridisierte Probe erklärt werden. An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass die Intensitätsunterschiede zwischen den Transfektionsreagenzien auf verschiedene siRNA-Konzentrationen und, daraus resultierend, unterschiedliche Einstellungen der Messung zurückzuführen sind. Die Detektion der mit *ScreenFect*<sup>®</sup>-siRNA-transfizierten siRNA erforderte höhere Laserpower, um ein annehmbares Signal des Akzeptors zu erhalten. Infolgedessen wurde auch das Signal des Donors drastisch erhöht, weshalb die Intensitäten der verschiedenen Transfektionsreagenzien nicht zu vergleichen sind und hier lediglich

qualitative, jedoch keine quantitativen Aussagen getroffen werden können. Insgesamt lieferte das PAMAM-Dendrimer eindeutigere Ergebnisse und ein pH-abhängiger Abbau konnte umgangen werden.



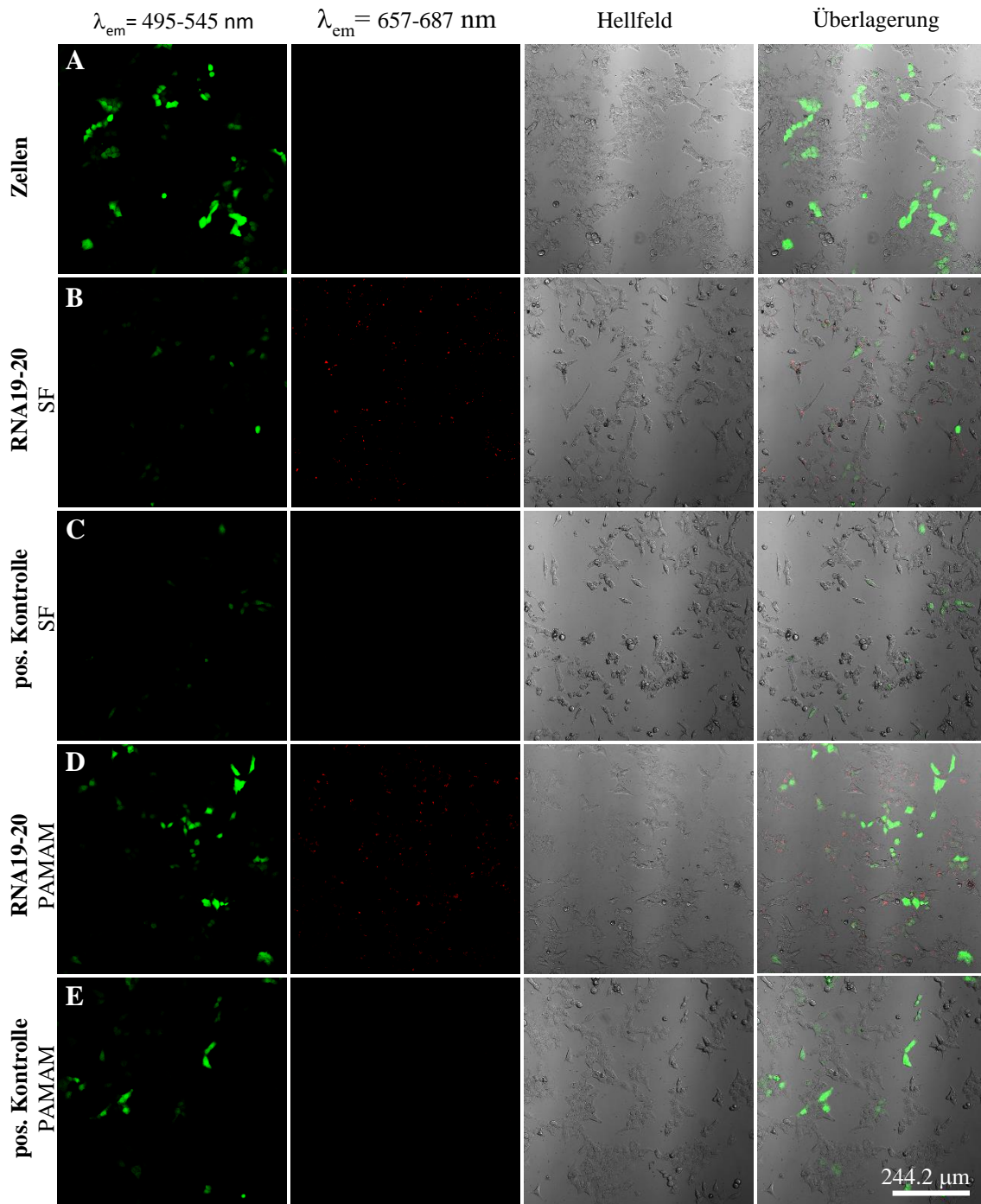
**Abbildung 61:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen der Transfektion von HeLa-Zellen mit 50 pmol **RNA19-20**, **RNA19 ds** und **RNA20 ds** mithilfe eines PAMAM-Dendrimers. Parameter:  $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$  für **RNA19-20** und **RNA20 ds**,  $\lambda_{exc} = 635 \text{ nm}$  für **RNA19 ds**.

Da der *Antisense*-Strang, der hier synthetisierten siRNA, komplementär zu Teilen der GFP-codierenden mRNA ist, kann dieser die Expression des GFP regulieren. Um die biologische Aktivität des farbstoffmodifizierten Stranges zu untersuchen, wurden deshalb GFP-transformierte HeLa-Zellen mit **RNA19-20** (0.01  $\mu\text{M}$  bzw. 0.05  $\mu\text{M}$ ) transfiziert und der Knockdown nach 48 Stunden sowie 72 Stunden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert (Abbildung 62). Auch bei diesen Experimenten wurden die Zellen wiederum mit ScreenFect<sup>®</sup>-siRNA sowie dem PAMAM-Dendrimer (G<sub>5</sub>) transfiziert und die Auswirkungen des Transfektionsreagenzes begutachtet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die weder mit siRNA noch mit einem Transfektionsreagenz behandelt wurden, während als Positivkontrolle eine siRNA verwendet wurde, die nachweislich eine regulierende Wirkung



aufweist (Ambion® *Silencer*® GFP). Im Gegensatz zu den Transfektions-Experimenten wurde hier das exprimierte GFP angeregt ( $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ) und dessen Änderung der Emissionsintensität im Bereich  $\lambda_{\text{em}} = 495 - 545 \text{ nm}$  betrachtet.

Die Negativkontrolle zeigt, wie erwartet, eine intensive grüne Emission des GFP. Bei genauer Betrachtung der Überlagerung des Hellfeldes mit dem grünen Kanal ist jedoch zu erkennen, dass nicht alle Zellen GFP exprimieren. Dies sollte bei der Analyse der Genregulierung beachtet werden. Aufgrund der annähernd gleichen Zellzahl kann bei der Transfektion mit *ScreenFect*®-siRNA, dennoch von einer Regulierung der Expression ausgegangen werden. Im grünen Kanal sind kaum GFP-Signale zu erkennen. Dies gleicht damit den Aufnahmen der Positivprobe. Im Vergleich dazu zeigen die Aufnahmen der PAMAM-Dendrimer-Transfektion keinen Knockdown. Um auszuschließen, dass die Probe ineffizient in die Zellen transfiziert wurde, wurde zusätzlich das Akzeptor-Signal aufgezeichnet. Dabei konnte in jeder Zelle auch ein rotes Akzeptorsignal detektiert werden. Da aufgrund der Ergebnisse mit *ScreenFect*®-siRNA davon ausgegangen wird, dass **RNA19-20** eine genregulierende Wirkung besitzt, würde dies bedeuten, dass die siRNA nicht richtig vom Dendrimer freigesetzt werden kann und sich immer noch in Endosomen befindet. Durch die kovalente Anbindung der siRNA über pH-labile Gruppen, wie beispielsweise Dirole oder Ester, an das Dendrimer könnte die endosomale Freisetzung gezielt gesteuert werden. Denn durch die pH-Absenkung in späten Endosomen, würde die kovalente Bindung brechen und die Probe freigesetzt werden. Trotz dieses Nachteils bietet der Einsatz von Dendrimeren auch einige Vorteile. Der Transport in die Zelle ist sehr effektiv und die erhaltenen Signale im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop eindeutig und intensiv. Zudem deutet die Vitalität der Zellen darauf hin, dass diese Art der Transfektion weniger zelltoxisch ist als unter Verwendung von *ScreenFect*®-siRNA.



**Abbildung 62:** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von (A) HeLa-GFP-Zellen 48 h nach der Transfektion mit (B) 10 pmol **RNA19-20** bzw. (C) einer kommerziell erhältlichen Positivkontrolle (Silencer siRNA) mit ScreenFect<sup>®</sup>-siRNA und (D) 50 pmol **RNA19-20** bzw. (E) Silencer siRNA mit einem PAMAM-Dendrimer. Parameter:  $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$  für GFP,  $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$  für FRET.

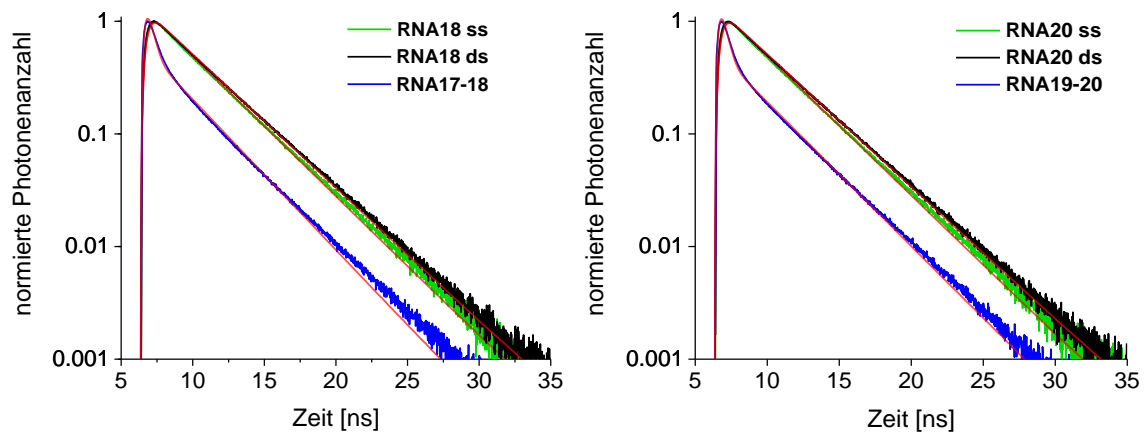
Mit diesen biologischen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass sich die fluoreszente siRNA-Architektur nicht nur für die Visualisierung des Transports in die Zelle, sondern auch für die Beobachtung der Genregulierung innerhalb der Zelle eignet. Um die

Ergebnisse weiter zu stützen und die Auslesung zu verbessern, sollte zudem die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit des Donors bestimmt werden. Die Lebenszeit lässt sich mit neuartigen Einzelmolekülspektroskopie-Methoden wie der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) direkt innerhalb der Zelle messen. Mithilfe dieser Methode wäre es also möglich, den genauen Bindungszustand des *Antisense*-Stranges während des RNAi über die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen. In Kooperation mit JENS LACKNER aus der Arbeitsgruppe NIENHAUS wurde die Eignung des FRET-modifizierten siRNA-Stranges für die Untersuchung in lebenden Zellen mittels FLIM-Messungen genauer untersucht.

## 5.4 Messung der Fluoreszenzlebenszeiten

Um eine erste Einschätzung über die Eignung der Duplexe **RNA17-18** und **RNA19-20** für die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie in lebenden Zellen zu erhalten, wurden zunächst mithilfe der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (*time correlated single photon counting* TCSPC) die Fluoreszenzlebenszeiten der donormodifizierten Einzel- und Doppelstränge sowie dem FRET-Paar in der Küvette bestimmt. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, wurde dafür die Probe mit einem gepulsten Laser angeregt und alle Photonen, die am Detektor ankommen, zu jedem Zeitpunkt gezählt. Aus der Formel 3 bzw. 4 ergibt sich anschließend eine logarithmische Auftragung der Anzahl der Photonen gegen die Zeit, wodurch die Probe je nach Bindungssituation ein unterschiedliches Abklingverhalten aufweist.

In Abbildung 63 sind die verschiedenen Abklingkurven für **RNA18** und **RNA20** aufgeführt. Während diejenigen der donormodifizierten Einzel- und Doppelstränge mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst werden können und somit nur eine Fluoreszenzlebenszeit aufweisen, ist für das FRET-Paar ein biexponentielles Verhalten zur Beschreibung der Fluoreszenzlebenszeit notwendig. Dabei wird eine sehr kurze Lebenszeit von ca. 0.2 ns erhalten, die dem gelöschten Donor zugeordnet werden kann. Dieser Zustand ist deutlich stärker populiert (89 % für **RNA18** und 92 % für **RNA20**, Tabelle 9) als derjenige der zweiten, wesentlich längeren Lebenszeit. Da die lange Lebenszeit einen ähnlichen Wert wie der freie Farbstoff aufweist, wird davon ausgegangen, dass sich womöglich ungebundener Farbstoff in der Probe befand. Dennoch stimmen die Ergebnisse sehr gut mit den zuvor beschriebenen Fluoreszenzquantenausbeuten überein und zeigen somit eine deutliche Steigerung der Donor-Fluoreszenzlebenszeit vom FRET-Paar **RNA17-18** bzw. **RNA19-20** zum Donor-Einzelstrang, die durch Hybridisieren mit dem unmodifizierten Gegenstrang noch weiter angehoben wird. Die Werte der verschiedenen Sequenzen unterschieden sich kaum, weshalb sich beide Proben für Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie in lebenden Zellen eignen würden. Vergleicht man allerdings die Energietransfereffizienz, so zeigt **RNA19-20** einen effizienteren Energietransfer, weshalb lediglich **RNA19-20** weiter untersucht wurde.



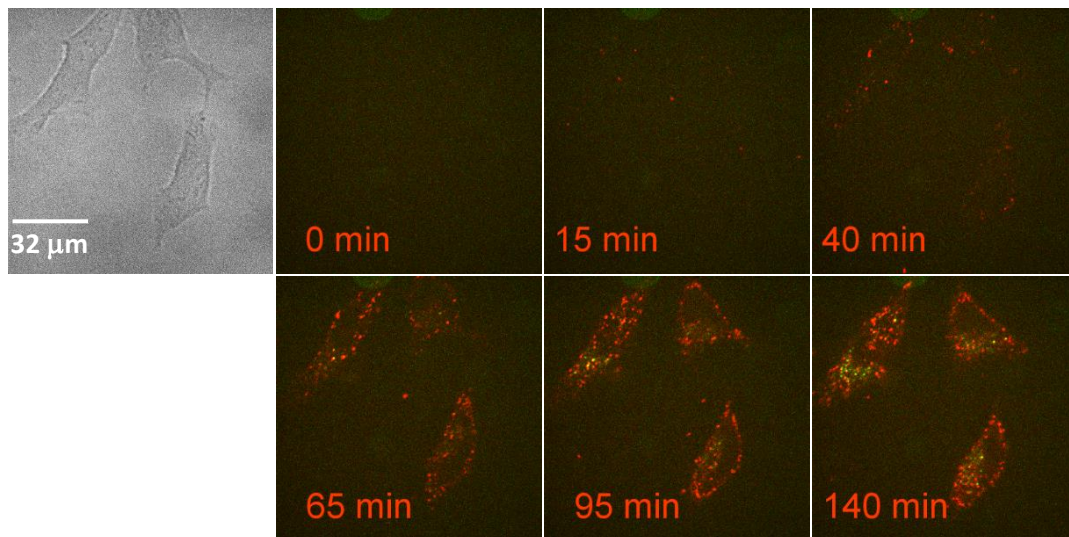
**Abbildung 63:** Normierte Fluoreszenzlebenszeit-Abklingkurven des Donorfarbstoffes in **RNA18 ss**, **RNA18 ds**, **RNA17-18** sowie **RNA20 ss**, **RNA20 ds**, **RNA19-20** gemessen mithilfe der TCSPC-Methode in 10 mM NaPi-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7).

**Tabelle 9:** Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau$  sowie die zugehörigen Populationen  $f$  der Stränge **RNA17-18** und **RNA19-20**.

	$\tau_1$ [ns]	$f_1$ [%]	$\tau_2$ [ns]	$f_2$ [%]
<b>RNA18 ss</b>	3.48	100		
<b>RNA18 ds</b>	3.65	100		
<b>RNA17-18</b>	0.23	89	3.48	11
<b>RNA20 ss</b>	3.51	100		
<b>RNA20 ds</b>	3.68	100		
<b>RNA19-20</b>	0.20	92	3.51	8

Hierbei wurde zunächst die Aufnahme von **RNA19-20** in die Zelle, abhängig von der Zeit, untersucht und anschließend die FLIM-Messungen in HeLa-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit der fluoreszenten Architektur und dem Transfektionsreagenz *Xfect<sup>TM</sup> RNA* transfiziert und die Aufnahme sowie Prozessierung über einen Zeitraum von drei Stunden mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet (s. Abbildung 64). Zur Auslesung der Daten wurde der Donor der siRNA mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 532$  nm angeregt und die Fluoreszenzintensität in zwei unterschiedlichen Kanälen, einem grünen für die Emission des Donors (Bandpassfilter 575/50 nm) und einem roten Kanal für die Emission des Akzeptors (685/40 nm), nach je fünf Minuten betrachtet. Zu Beginn der Transfektion können lediglich Signale im roten Kanal beobachtet werden, die dem Energietransfer-Paar zuzuordnen sind. Diese lagern sich als siRNA-*Xfect<sup>TM</sup>*-Polyplexe an die Zellmembran an und werden langsam

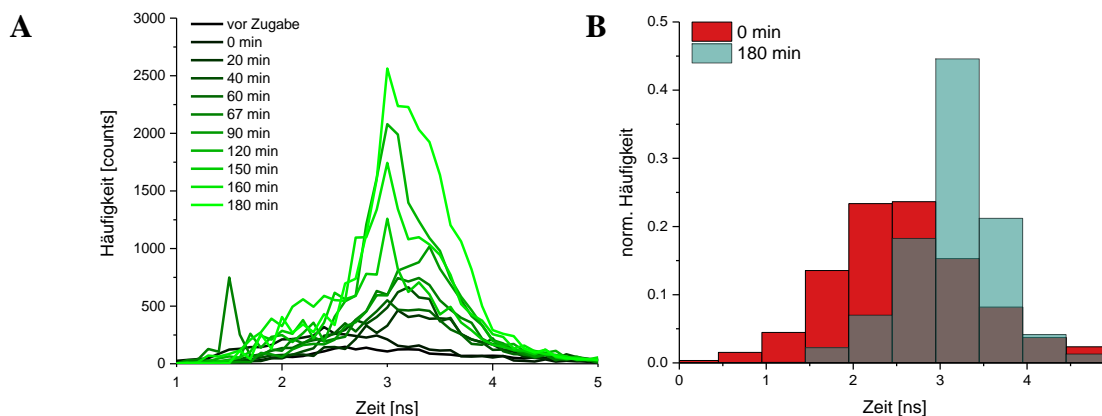
über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Nach ungefähr 65 Minuten können deutliche Signale im grünen Kanal beobachtet werden, die mit Signalen des roten Kanales überlagern. Der doppeltmodifizierte Doppelstrang wird demnach in der Zelle nach und nach dehybridisiert. Im zeitlichen Verlauf nimmt dieses grüne Signal immer stärker zu, sodass der donormodifizierte *Antisense*-Strang schließlich nach 140 Minuten deutlich separiert von dem Energietransfer-Paar vorliegt. Wie die Zellbilder zeigen, ist das grüne Signal nicht über die Zelle verteilt, sondern akkumuliert neben dem Zellkern. Verglichen mit den Zellbildern der Transfektion sowie dem Knockdown mithilfe von ScreenFect<sup>®</sup>-siRNA, kann aus diesen Aufnahmen geschlossen werden, dass die Probe hier bereits freigesetzt und prozessiert wurde. Die Akkumulation neben dem Zellkern könnte dadurch erklärt werden, dass die Konzentration an mRNA an dieser Stelle am höchsten ist. Denn DNA wird im Zellkern transkribiert, jedoch anschließend direkt in das Cytosol transportiert und dort translatiert.



**Abbildung 64:** Zeitabhängige Zweikanal-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Transfektion von 7 nM **RNA19-20** in HeLa-Zellen mithilfe von *Xfect*<sup>™</sup> RNA;  $\lambda_{\text{exc}}(\text{D2}) = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}(\text{D2}) = 575/50 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}(\text{A2}) = 685/40 \text{ nm}$ , 220nm/px.

Im nächsten Schritt wurden die Fluoreszenzlebenszeiten mittels Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie in lebenden Zellen bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass nicht die Änderung der Fluoreszenzfarbe, sondern die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors beobachtet wurde. Die Probe wurde demzufolge mit einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$  belichtet und deren Emissionsintensität nach 20 – 30 Minuten über einen Zeitraum von drei Stunden mit einem Bandpassfilter von 575/50 nm gemessen. Im Gegensatz zur zeitkorrelierten

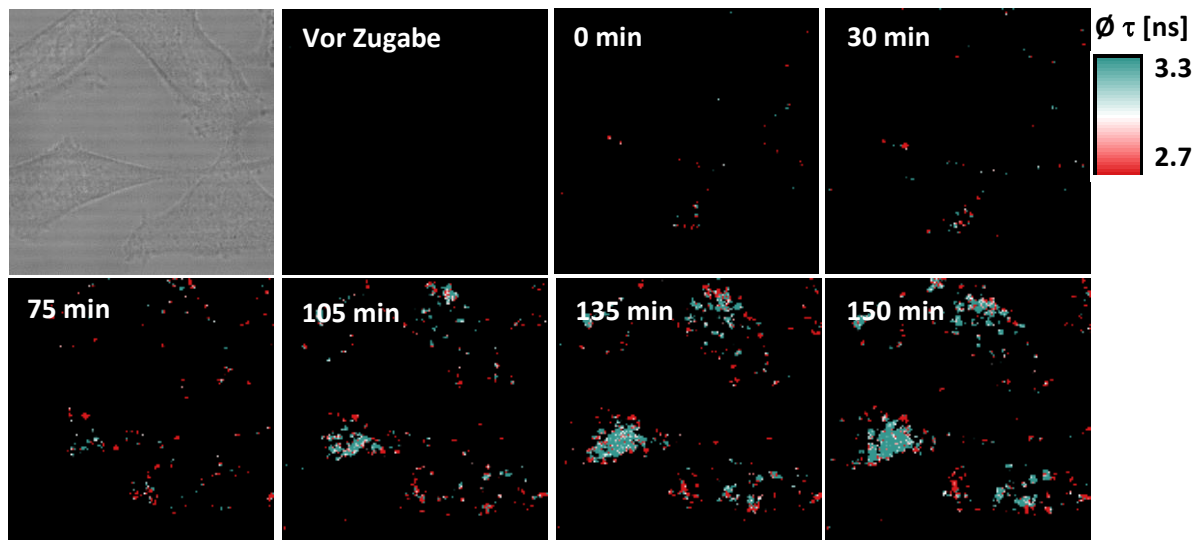
Einzelphotonenzählung der verschiedenen Bindungsstadien in Lösung kann innerhalb der lebenden Zelle keine deutlich ausgeprägte Fluoreszenzlebenszeit, sondern eher eine Verteilung der verschiedenen Lebenszeiten erfasst werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass in einer Aufnahme pro Pixel mehrere Bindungszustände vorliegen können. Während ein Teil immer noch als FRET-Paar zu sehen ist, ist der andere Teil bereits zum einzelmodifizierten *Antisense*-Strang dissoziiert. Dabei wird das Experiment zusätzlich durch die unterschiedliche Photonenzahl der verschiedenen Stadien erschwert. Denn der Donor emittiert deutlich mehr Photonen im Einzel- oder Doppelstrang als im FRET-Paar. Nach Normierung auf die Gesamtphotonenzahl konnten folgende Spektren und Histogramme erhalten werden:



**Abbildung 65:** Spektrum der zeitabhängigen Änderung der Donor-Fluoreszenzlebenszeit von 25 pmol **RNA19-20** (A) und dazugehöriges Histogramm, normiert auf die Gesamtphotonenzahl (B).

Wie die Zellbilder der Transfektion bereits gezeigt haben, lagern sich auch hier (Abbildung 66) zunächst die Polyplexe mit einer kurzen, gelöschten Fluoreszenzlebenszeit des Donors an die Zellmembran an. Dies wird durch eine rote Färbung dargestellt, die mit der Fluoreszenzfarbe korreliert, allerdings nicht damit zu verwechseln ist. Über die Zeit werden mehr und mehr siRNA-*Xfect*<sup>TM</sup>-Komplexe in die Zelle aufgenommen und eine Entwicklung von kurzen (rot) zu langen (grün) Fluoreszenzlebenszeiten ist zu beobachten, die nach 75 Minuten drastisch zunimmt. Auch hier kommt es zu einer Akkumulation der langen Lebenszeiten in Bereichen neben dem Zellkern. Somit stimmen die FLIM-Messungen sehr gut mit den Ergebnissen aus den zeitabhängigen Transfektions-Aufnahmen überein, weshalb diese fluoreszente Architektur eine sensitivere Methode zur Lokalisierung und Visualisierung von siRNA, im Vergleich zu einfachen siRNA-FRET-Systemen, darstellt. Eine Auflösung der Fluoreszenzlebenszeiten des einfachmodifizierten Einzel- und Doppelstranges ist im lebenden

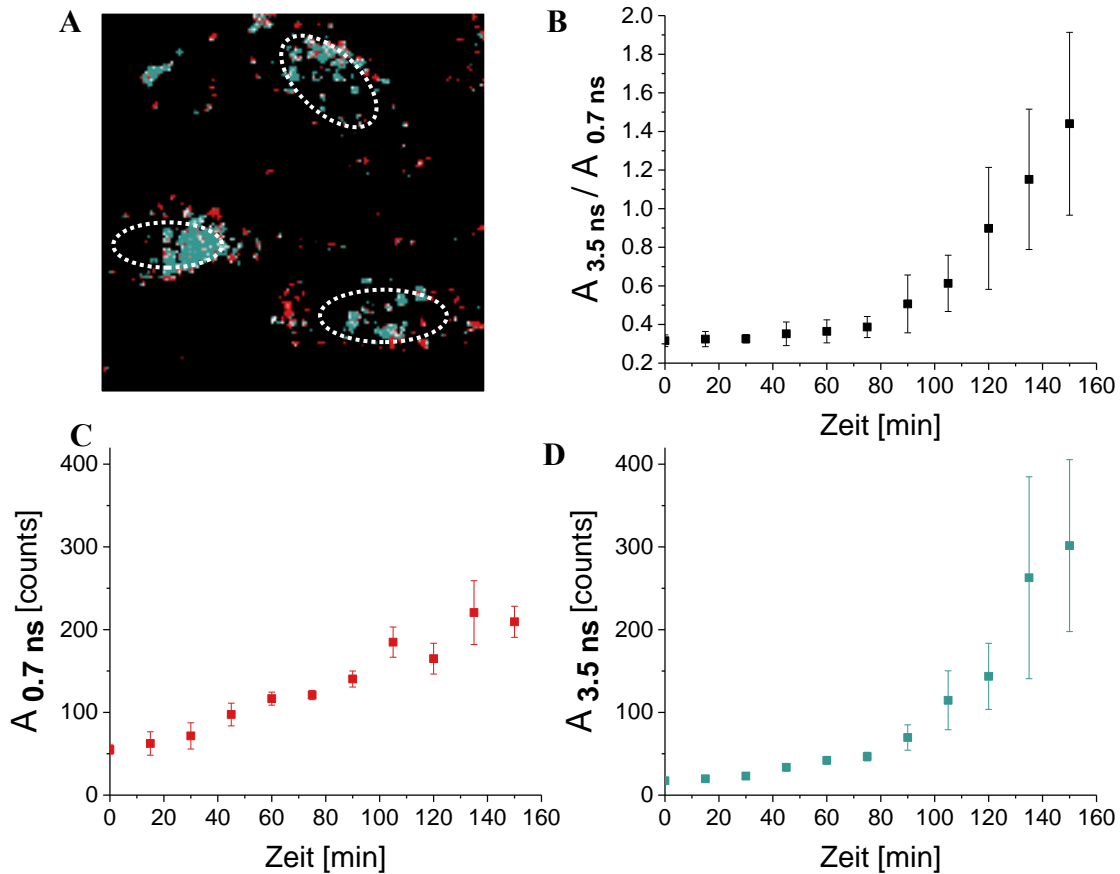
Organismus leider nicht möglich, da sich diese zu ähnlich sind. Hier wäre ein mindestens genauso großer Unterschied wie für **RNA20 ss** und **RNA19-20** notwendig.



**Abbildung 66:** Aufnahmen der zeitabhängigen FLIM-Messungen von **RNA19-20** in HeLa-Zellen. Die Änderung der Donor-Fluoreszenzlebenszeit ist entsprechend den Fluoreszenzfarben des FRET angepasst; kurze Lebenszeiten  $\leq 2.7$  ns (rot), lange Lebenszeiten  $\geq 3.3$  ns (grün), 533 nm/px.

Um dennoch die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit zu quantifizieren, wurden die Abklingkurven in einem bestimmten Bereich der Zelle mit einer biexponentiellen Funktion und einem fixen Wert für den Einzelstrang (3.5 ns) und das FRET-Paar (0.7 ns) gefittet. Dabei wurde die Änderung der Amplitude  $A$  (Population des Zustandes) gegen die Zeit aufgetragen. Für beide Bindungsstadien kann zunächst ein linearer Anstieg der Amplitude beobachtet werden, was durch die Aufnahme in die Zelle erklärt werden kann. Nach 75 Minuten nimmt die Amplitude der langen Fluoreszenzlebenszeit drastisch zu. Daraus resultiert für das Verhältnis dieser beiden Amplituden ( $A_{3.5 \text{ ns}}/A_{0.7 \text{ ns}}$ ) ebenfalls ein konstanter Anstieg, der nach 75 Minuten exponentiell zunimmt. Die siRNA-Probe benötigt somit eine gewisse Zeit, um in die Zelle transfiziert und freigesetzt zu werden, bis sie schließlich schlagartig prozessiert wird und ihre Wirkung entfalten kann.

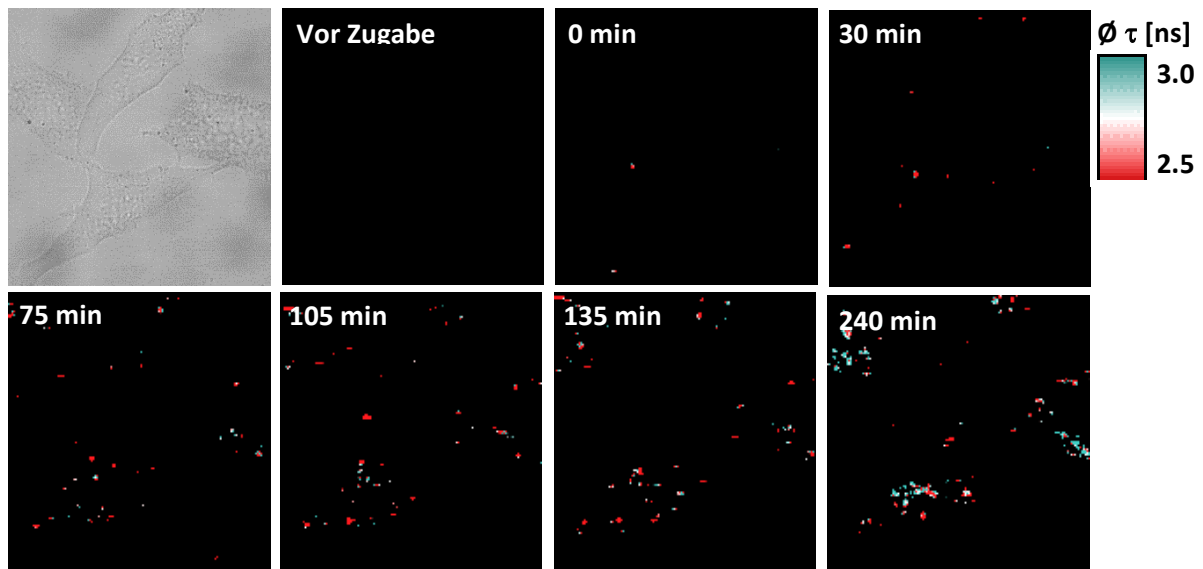




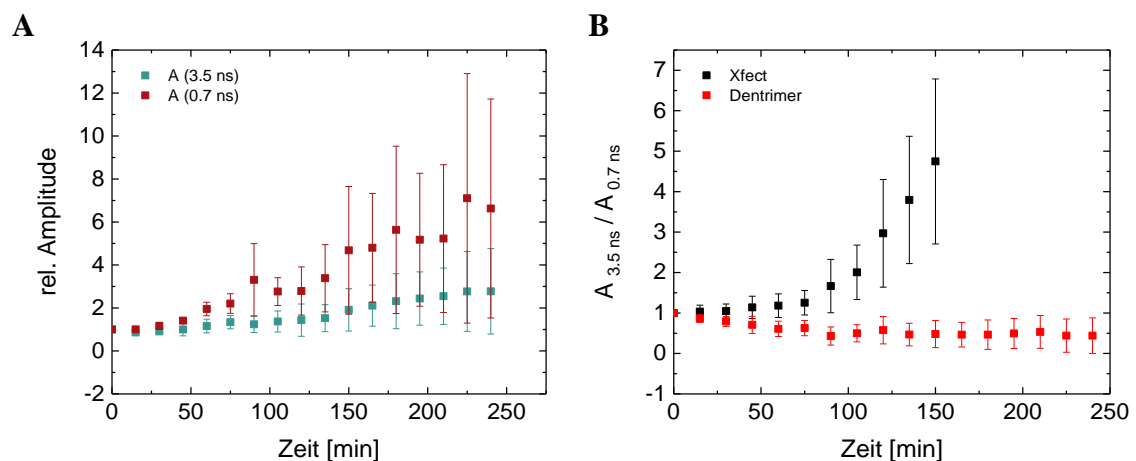
**Abbildung 67:** Quantifizierung der Aufnahme von **RNA19-20** in die Zelle sowie deren Prozessierung innerhalb der Zelle. **A** Zellbereiche, die zur Quantifizierung verwendet wurden, **B** Verhältnis der Amplituden von langer zu kurzer Lebenszeit mit Standardabweichung für die verschiedenen Zellbereiche, **C** Änderung der Amplitude kurzen Lebenszeit, **D** Änderung der Amplitude der langen Lebenszeit.

Das gleiche Experiment wurde anschließend mit dem PAMAM-Dendrimer als Transfektionsreagenz durchgeführt. Im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen zeigen diese Aufnahmen eine deutlich langsamere Aufnahme in die Zelle sowie Prozessierung innerhalb der Zelle. Erst nach ca. 75 Minuten kann eine Anlagerung um die Zellmembran und die Aufnahme der ersten Komplexe beobachtet werden, während **RNA19-20**, transfiziert mit *Xfect*<sup>TM</sup>, zu diesem Zeitpunkt bereits prozessiert wird. Deutliche grüne Signale, die für eine lange Lebenszeit sprechen, können erst nach 4 Stunden detektiert werden. Außerdem zeigen die FLIM-Aufnahmen zu diesem Zeitpunkt kaum eine Akkumulation der Sonde um den Zellkern. Aufgrund des langsamen Transports in die Zelle ist es wahrscheinlich, dass diese erst sehr viel später zu beobachten wäre. Dennoch stimmen die FLIM-Messungen gut mit den GFP-Knockdown-Experimenten überein. Hier konnte keine Genregulierung beobachtet werden, was mithilfe der FLIM-Messungen auf einen langsameren Transport sowie einer verzögerten Prozessierung zurückzuführen ist. Auch die Quantifizierung der Lebenszeiten bekräftigt diese

Beobachtungen. Denn die relative Amplitude der kurzen bzw. langen Lebenszeit steigt im zeitlichen Verlauf konstant an, was in einer konstanten Entwicklung für das Verhältnis der Amplituden von langer zu kurzer Lebenszeit resultiert. Im Gegensatz dazu zeigt **RNA19-20** mit *Xfect*<sup>TM</sup> einen exponentiellen Anstieg des Verhältnisses der Amplituden nach 75 Minuten.



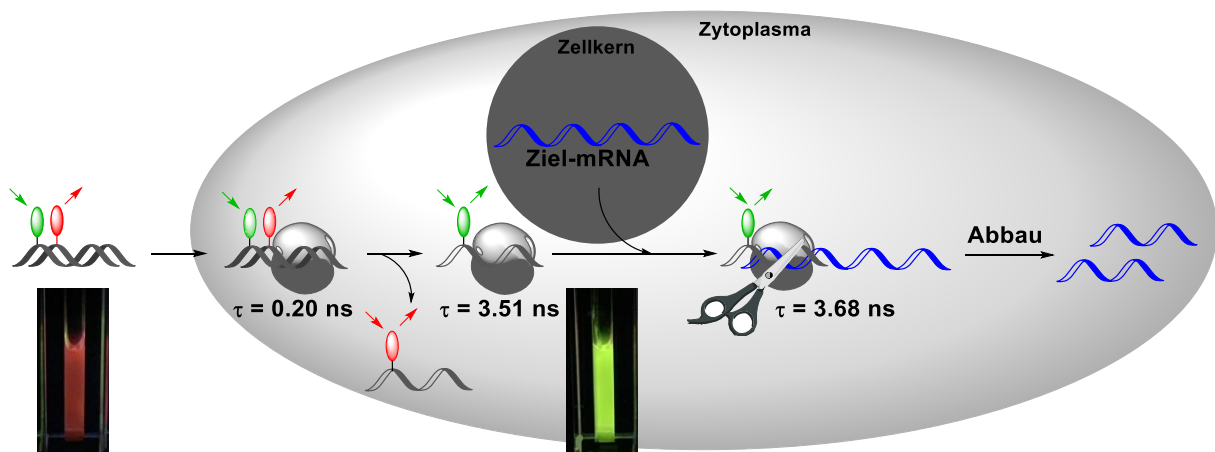
**Abbildung 68:** Aufnahmen der zeitabhängigen FLIM-Messungen von **RNA19-20** in HeLa-Zellen, transfiziert mit einem PAMAM-Dendrimer. Die Änderung der Donor-Fluoreszenzlebenszeit ist entsprechend den Fluoreszenzfarben des FRET angepasst; kurze Lebenszeiten  $\leq 2.5$  ns (rot), lange Lebenszeiten  $\geq 3.0$  ns (grün), 533 nm/px.



**Abbildung 69:** Quantifizierung der Aufnahme von **RNA19-20** in die Zelle mittels PAMAM-Dendrimer sowie deren Prozessierung innerhalb der Zelle. **A** Änderung der Amplitude der kurzen Lebenszeit (rot) und der langen Lebenszeit (grün). **B** Vergleich der Verhältnisse der Amplituden von langer zu kurzer Lebenszeit mit Standardabweichung für die Transfektion mit *Xfect*<sup>TM</sup> (schwarz) und dem PAMAM-Dendrimer (rot).

## 5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Das „siRNA-Traffic-Light“-Konzept konnte erfolgreich auf die Verwendung der photostabileren Farbstoffe ATTO532 und ATTO647N übertragen und optimiert werden. Dabei haben stationäre Emissionsmessungen sowie Fluoreszenzquantenausbeuten und Schmelztemperaturen **RNA19-20** als die siRNA mit dem höchsten Kontrastverhältnis  $I_{AK}/I_{D0}$  von 10.6 und dem effizientesten FRET mit 91 % identifiziert. Experimente in lebenden Zellen haben gezeigt, dass die siRNA-Sonde neben der Visualisierung des Transports in und innerhalb der Zelle auch zur Lokalisierung der mRNA eingesetzt werden kann. Mithilfe des Fluoreszenzfarbwechsels lassen sich zudem Aussagen über die Eignung verschiedener Transfektionsreagenzien in Bezug auf den Transport treffen. GFP-Knockdown-Experimente konnten zudem beweisen, dass trotz der Modifikation mit zwei Farbstoffen die siRNA biologische Aktivität aufweist und fähig ist, das GFP-Gen, welches auf der komplementären mRNA codiert ist, zu regulieren. Mithilfe der TCSPC-Methode konnte festgestellt werden, dass sich die verschiedenen Bindungsstadien des *Antisense*-Stranges während der RNA-Interferenz in ihren Fluoreszenzlebenszeiten differenzieren. Damit qualifizierte sich dieser Strang als fluoreszente siRNA-Architektur für die Anwendung in der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie in lebenden Zellen. Im Gegensatz zum TCSPC (*in vitro*) tritt hierbei eine Verteilung der Fluoreszenzlebenszeiten auf, weshalb eine Unterscheidung des donormodifizierten Einzel- und Doppelstranges erschwert wird.

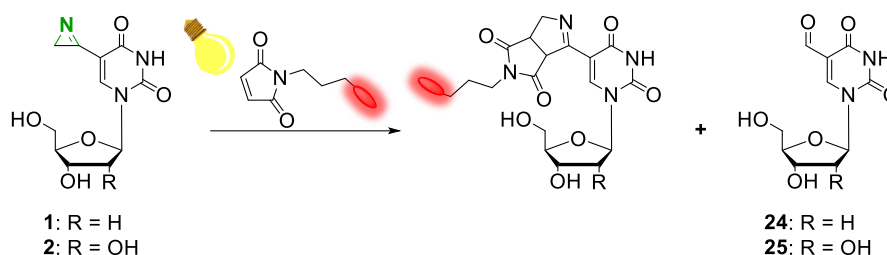


**Abbildung 70:** Schema des „siRNA Traffic Light“-Konzeptes, welches FRET mit FLIM verknüpft und damit die Auslesung der Ergebnisse deutlich verbessert.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass diese fluoreszente Architektur eine kombinierte FRET-FLIM-Analyse erlaubt und aufgrund dessen eindeutigere Ergebnisse liefert. Denn die Auslesung erfolgt neben der Änderung der Fluoreszenzfarbe/Emissionswellenlänge auch durch die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit. Mithilfe dieses Konzeptes könnten somit Herausforderungen wie der Transport, die endosomale Freisetzung oder *off-Target* Effekte von siRNAs gemeistert werden und infolgedessen Medikamente wie Patisiran und Givosiran für eine gezieltere Medikation weiter optimiert werden.

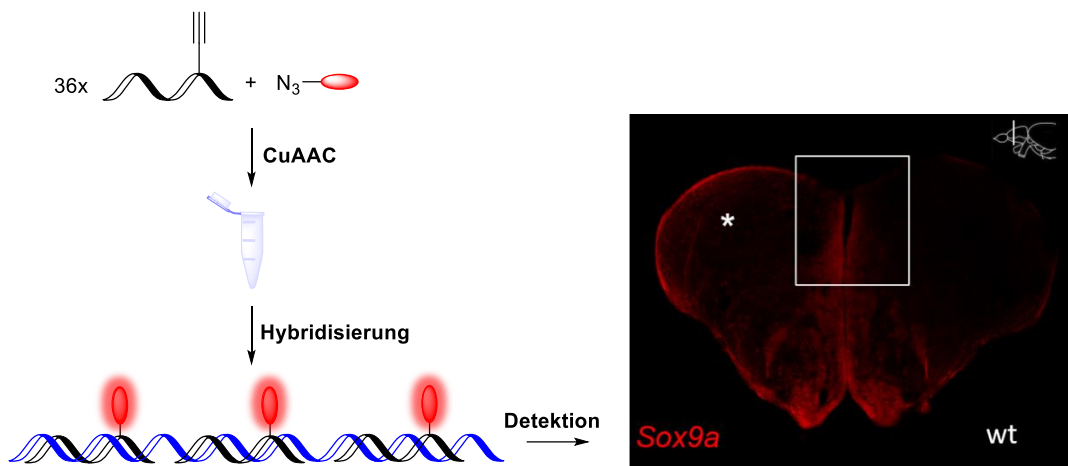
## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung verschiedener fluoreszenter Architekturen für die Visualisierung von Oligonukleotiden behandelt, welche auf unterschiedlichen Markierungsmethoden basieren. Darunter zählt die Optimierung der von KUMAR et al.<sup>[206]</sup> publizierten Synthese des 5-Azirinyl-2'-desoxyuridins **1** sowie deren Transfer auf das entsprechende Ribonukleosid **2**. Mithilfe dieser Bausteine konnte erstmals eine lichtinduzierte Azirin-Alken-Cycloaddition an Nucleosiden in wässrigem Medium durchgeführt werden. Damit wurde ein erster Beitrag zu einer möglichen Alternative zu den bereits etablierten Tetrazolen als kupferfreie, mit (UV-)Licht aktivierbare, bioorthogonale Reaktion zur Markierung von Oligonukleotiden geleistet.



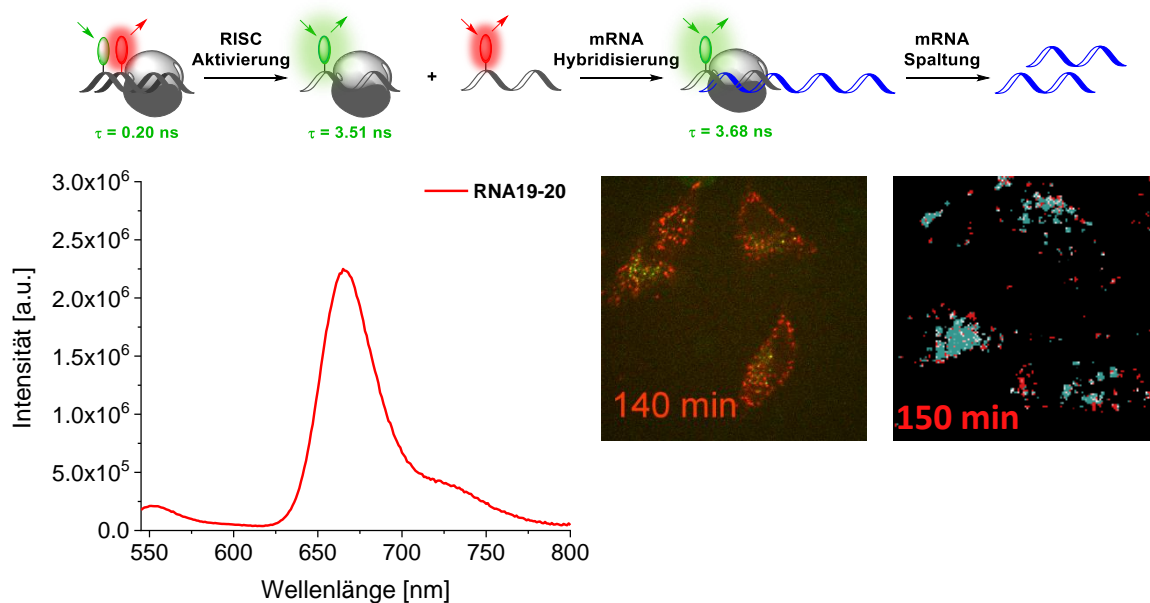
**Abbildung 71:** Schematische Darstellung der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition an Nucleosiden sowie und die ESI-Masse des gewünschten Cycloaddukts.

Desweiteren wurde eine optimierte Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungssonde entwickelt, die aufgrund der Hybridisierung von 36 einzelmodifizierten DNA-Sequenzen an die Ziel-mRNA ein verbessertes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zeigt. Diese FISH-Sonde diente nicht nur zur Detektion der mRNA von *gfp* und *sox9a*, sondern konnte auch zur Lokalisierung des, nach gezielter Verletzung, hoch regulierten *sox9a*-Gens im Zebrafisch-Hirngewebe eingesetzt werden. Versuche, diese Architektur durch andere Click-Bausteine und Farbstoffe weiter zu optimieren, wiesen eine fluorogene Eigenschaft für die Click-Reaktion des **TO2**-Fluorophors nach. Dies würde eine *in-situ* Hybridisierung (ISH) der alkinmodifizierten Stränge mit dem Zielgen und anschließende Markierung (FISH) erlauben.



**Abbildung 72:** Entwicklung einer FISH-Sonde, bestehend aus 36 einzelmodifizierten DNA-Sequenzen, zur Visualisierung einer hoch regulierten *sox9a* mRNA in Zebrafish-Hirngewebe.

Zuletzt konnte das Konzept der wellenlängenverschiebenden siRNA-Sonden durch die Verwendung eines ATTO-FRET-Paares auch für FLIM-Messungen in lebenden HeLa-Zellen zugänglich gemacht werden. Dadurch wird die Visualisierung des Transports in und innerhalb der Zelle sowie die Detektion und Lokalisierung der RNA sowohl über einen Fluoreszenzfarbwechsel, als auch eine Lebenszeitänderung ermöglicht. Zudem weist die siRNA trotz der Modifikation mit zwei Farbstoffen biologische Aktivität auf.



**Abbildung 73:** Schematische Darstellung der verschiedenen Bindungsstadien der RNA-Interferenz mit den zugehörigen Lebenszeiten des Donors, Emissionsspektrum des besten FRET-Paares **RNA19-20** sowie die Beobachtung der Sonde in lebenden HeLa-Zellen mittels Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie und FLIM.



## 7 EXPERIMENTELLER TEIL

### 7.1 Materialien und Methoden

#### Reagenzien und Lösungsmittel

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, ACROS ORGANICS, ALPHA AESAR, FISHER SCIENTIFIC, FLUKA, MERCK, SIGMA ALDRICH, ROTH, TCI sowie VWR kommerziell erworben. Diese wiesen mindestens eine Qualitätsstufe „zur Synthese“ auf. Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe *pro analysis* (p.a.). Trockene Lösungsmittel wurden dabei von ACROS ORGANICS bezogen und unter Argonatmosphäre sowie Molsieb gelagert. Für die Aufreinigung an der HPLC wurden hochreine organische Lösungsmittel (HPLC grade) von der Firma FISHER SCIENTIFIC und entionisiertes Wasser aus einer MERCK *Millipore-Q8*-Anlage verwendet. Deuterierte Lösungsmittel wurden von EURISOTOP bezogen.

#### Reaktionsführung

Für das Arbeiten unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden die verwendeten Glasapparaturen zunächst am Hochvakuum evakuiert, mit einem Heißluftföhn ausgeheizt und mehrfach mit Schutzgas (Argon 5.0, 99.999 % rein) geflutet.

Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurden mit folgenden Kältemischungen gekühlt:

-78 °C	Trockeneis in Isopropanol
-5-20 °C	NaCl in Eis
0 °C	Eis in Wasser

#### Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten der Firma MERCK verwendet (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.25 mm). Die Detektion der Substanzen erfolgte dabei durch Anregung mithilfe von UV-Lampen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254$  nm (Fluoreszenzlöschung) und  $\lambda = 366$  nm (Fluoreszenzanregung). Nucleoside bzw. Zucker wurden mit einer schwefelsauren Methanol-Lösung (3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) angefärbt. Die Visualisierung von Aziden erfolgte durch die Reduktion mit 10 % Triphenylphosphan in DCM und anschließendem Anfärben durch 0.5 % Ninhydrin in Butanol. Des Weiteren wurde eine Kaliumpermanganat-Lösung (450 mg KMnO<sub>4</sub>, 630 mg



K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 45.0 mL H<sub>2</sub>O, 750 µL 5 % NaOH-Lösung) zum Anfärben verwendet. Die DC-Platte wurde in die jeweilige Lösung eingetaucht und anschließend mit einem Heißluftföhn erhitzt.

### **Flash-Säulenchromatographie (FC)**

Für die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma SIGMA ALDRICH (Porengröße 60 Å, Partikelgröße 40 – 60 µm) in dem jeweiligen Laufmittel aufgeschlämmt und die Säule nass gepackt. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in wenig Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen und anschließend mit Seesand (reinst, mit HCl gereinigt) der Firma BERND KRAFT bedeckt. Der nötige Überdruck wurde mithilfe einer Handpumpe erzeugt.<sup>[302]</sup>

### **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die Auftrennung der Oligonukleotide sowie der Photoclick-Lösungen mittels Umkehrphase erfolgte an zwei SHIMADZU Systemen (Komponenten semipräparatives System: Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AT*, Entgaser *DGU-14A*, Säulenofen von *KNAUER*, Multidiodenarray *SPD-M10A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Software *Class-VP*, Komponenten analytisches System: Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AD*, Entgaser *DGU-14A*, Säulenofen *CTO-10AS*, Multidiodenarray *SPD-M20A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Software *Lab Solutions*) sowie einem THERMOSCIENTIFIC Gerät (*Dionex UltiMate3000* Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS Fluoreszenzdetektor, Fraktionssammler, Software *Chromeleon 7*). Zur analytischen Chromatographie wurden eine *reversed-phase Supelcosil™* LC-318-Säule (250 x 4.6 mm, 3 µm) oder eine *VDSpher OptiBio PUR 300 S18-SE*-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.0 mL/min verwendet. Die semipräparative Trennung erfolgte unter Verwendung einer *reversed-phase Supelco Discovery® BIO Wide Pore C18*-Säule (250 x 10 mm, 5 µm) oder einer *VDSpher OptiBio PUR 300 S18-SE*-Säule (250 x 10 mm, 5 µm) mit einer Flussrate von 2.5 mL/min. Als mobile Phase für die Aufreinigung von DNA diente ein 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6.5, Komponente A), während RNA mit einem 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (Komponente A, RNase frei, DEPC behandelt) getrennt wurde. Als Laufmittel für Triphosphate wurde ein 50 mM Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Puffer (pH = 7.5, Komponente A) und für die Chromatographie der Click-Produkte entionisiertes Wasser verwendet. Mit steigendem Acetonitril-Gradienten (Komponente B) konnte die jeweilige

Probe eluiert werden. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm und der jeweiligen Wellenlänge des verwendeten Farbstoffes.

### NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanz-Analysen wurden an einem BRUKER *Avance 300* (Messfrequenz:  $^1\text{H} = 300.17$  MHz), *Avance Neo 400* oder *Avance 500* (Messfrequenz:  $^1\text{H} = 500.13$  MHz,  $^{13}\text{C} = 125.77$  MHz,  $^{31}\text{P} = 202.45$  MHz) durchgeführt. Dafür wurden 5 - 10 mg Probe in 0.4 - 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel der Firma EURISOTOP gelöst und in ein Probenröhrchen ( $\varnothing_{\text{außen}} = 5$  mm) überführt. Die chemische Verschiebung  $\delta$ , bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als Standard, wurde in parts per million (ppm) angegeben. Mithilfe folgender Referenzwerte des unvollständig deuterierten Lösungsmittels wurde das Spektrum kalibriert:

<b>CDCl<sub>3</sub></b>	$^1\text{H-NMR}$ : d = 7.26 ppm	$^{13}\text{C-NMR}$ : d = 77.16 ppm
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	$^1\text{H-NMR}$ : d = 2.50 ppm	$^{13}\text{C-NMR}$ : d = 39.52 ppm
<b>D<sub>2</sub>O</b>	$^1\text{H-NMR}$ : d = 4.79 ppm	

Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben und die Multiplizitäten wie folgt abgekürzt: s (Singulett), bs (breites Signal), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), dt (Dublett vom Triplet), q (Quartett), m (Multiplett).

### Massenspektrometrie (MS)

Massenspektrometrische Messungen wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie, im Arbeitskreis *WEIS* und im Arbeitskreis *BARNER-KOWOLLIK* durchgeführt. Dafür wurde ein *Finnigan MAT 95* (THERMO ELECTRON CORP.) verwendet, wobei die Probe entweder durch Elektronenstoßionisation (EI) oder *Fast Atom Bombardment* (FAB) ionisiert wurde. Außerdem wurde eine *Q Exactive Orbitrap* oder *LTQ Orbitrap XL* von THERMOFISHERSCIENTIFIC zur Elektronensprayionisation (ESI) eingesetzt. Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) wurde mit einem *AXIMA Confidence* Spektrometer der Firma SHIMADZU durchgeführt. Nachfolgend sind die verwendeten Matrizen zu finden:

- **Oligonukleotide** 3-Hydroxypicolinsäure (ges. in Acetonitril/Wasser 1.1) / Diammoniumhydrogencitrat (0.44 M in Wasser) = 9:1 (HPA)
- **Triphosphate** 2,4,6-Trihydroxyactophenon (0.3 M in Ethanol, THAP)

➤ **Kleine Moleküle** 6-Aza-2-thiothymidin (ges. in Acetonitril, ATT)

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

### **Infrarotspektroskopie (IR)**

IR-Spektren wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie an einem BRUKER *Alpha T* gemessen. Dafür wurde die *Attenuated Total Reflection (ATR)* Technik verwendet und die Absorptionsbande in Wellenzahlen  $\nu$  mit einer Einheit von  $\text{cm}^{-1}$  angegeben.

### **Stationäre optische Spektroskopie**

Die optischen Charakterisierungen wurden entweder in Quarzglas-Küvetten von STARNA (Schichtdicke 1 cm, Probenvolumen 1 mL), Mikro-Küvetten (Schichtdicke 3 mm, Probenvolumen 150  $\mu\text{L}$ ) oder Makro-Küvetten der Firma HELIMA (Schichtdicke 10 mm, Probenvolumen 3 mL) bei einer Temperatur von 20 °C und an Sauerstoffatmosphäre durchgeführt. Dabei wurden die Spektren mithilfe des jeweiligen Lösungsmittels hintergrundkorrigiert.

### **UV/Vis Absorptionsmessungen**

Absorptionsspektren wurden an einem *Cary 100 Bio* Spektrometer der Firma VARIAN mit temperiertem Küvettenhalter (*Cary 100 temperature controller*) unter Verwendung der Software *Cary WinUVScan Application* gemessen. Dabei wurden folgende Parameter ausgewählt: Durchschnittszeit von 0.1 s, Datenintervall 1.0 nm, Scangeschwindigkeit 600 nm/min, Lampenwechsel bei 350 nm.

### **Schmelztemperaturen**

Für Schmelzpunktmessungen von DNA/RNA-Doppelsträngen wurde dasselbe Gerät wie für die UV/Vis-Spektren verwendet, wobei als Software hier das Programm *Thermal* diente. Dabei wurde die Absorptionsänderung der Oligonukleotide bei 260 nm in einem Temperaturbereich von 10-90 °C (Heiz- bzw. Kühlrate 0.7 °C/min, Aufzeichnung der Messdaten/0.5 °C) detektiert.

### **Fluoreszenzmessungen**

Alle Emissions- und Anregungsspektren wurden an einem *Fluoromax-3* von JOBIN-YVON mit Peltier Element (LFI-3751) vermessen. Es erfolgte eine Korrektur der Spektren durch die Raman Streuung des reinen Lösungsmittels. Folgende

Parameter wurden für die Messung verwendet: Schrittweite 1.0 nm, Inkrementzeit 0.2 s, Integrationszeit 0.1 s, Spaltbreite 2 nm.

### **Fluoreszenzquantenausbeuten**

Absolute Fluoreszenzquantenausbeuten wurden an einem *Quantaurus QY C11347* von HAMAMATSU in 5 mL Quarzglasküvetten bestimmt.

### **Sublimationstrocknung**

Wässrige Proben wurden nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff an einer CHRIST *Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage oder an einem CHRIST *Alpha RVC* Vakuumkonzentrator getrocknet.

### **DNA/RNA-Festphasensynthese**

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte unter Argon als Schutzgas zunächst an einem *PerSpective Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer System* von APPLIED BIOSYSTEMS sowie an einem *K&A H-6 DNA/RNA Synthesizer*. Es wurde *Controlled Pore Glass* (CPG) als feste Phase mit einer Belegung von 1  $\mu\text{mol}$  (500 Å) verwendet. Alle Reagenzien, Phosphoramidite und CPG-Säulchen wurden von GLEN RESEARCH, CHEMGENES, PROLIGO und SIGMA ALDRICH bezogen.

HPLC-gereinigte und lyophilisierte, unmodifizierte Oligonukleotide wurden von METABION bezogen. Diese wurden in einer definierten Menge entionisiertem bzw. RNase freiem Wasser gelöst und nachfolgend die Konzentration über die Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt.

### **RNase freies Arbeiten**

Für das Arbeiten mit RNA wurden ausgesprochen RNase-freie, zertifizierte Gebrauchsmaterialien (Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen, Falcons usw.) verwendet. Alle temperaturstabilen Glasgeräte wurden über Nacht in einem Ofen bei 200 °C ausgeheizt. Zur Desinfektion wurden die Arbeitsflächen sowie die Handschuhe zuvor mit Ethanol gereinigt. Zudem wurde RNase freies Wasser hergestellt. Dafür wurde entionisiertes Wasser mit 0.1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) für ca. 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 2 h zum Sieden erhitzt, um überschüssiges DEPC zu vernichten.

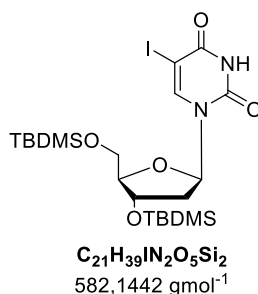
### **Belichtungsexperimente**

Belichtungsexperimente bei einer Wellenlänge von 300 nm (6 V, 450 mA) wurden an einem von der Arbeitsgruppe *Riedle* (LMU München) angefertigten *QY Determination Setup* (QYDS) durchgeführt. Für diese Experimente wurden Quarzglasküvetten (Schichtdicke 1 cm) von STARNA verwendet. Des Weiteren wurde mit einer 365 nm LED bei Raumtemperatur in einem Schlenkrohr oder einer Quarzglasküvette (Schichtdicke 1 cm) von STARNA unter starkem Rühren belichtet.

## 7.2 Synthesevorschriften

### 7.2.1 Azirin-modifiziertes 2'-Desoxyuridin 1

#### 3', 5'-Bis-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-iodo-2'-desoxyuridin (4)



Unter Argonatmosphäre wurden 3.00 g 5-Iodo-2'-desoxyuridin (8.48 mmol, 1.00 Äq.), 2.68 g tert-Butyldimethylsilylchlorid (1.80 mmol, 2.10 Äq.) und 2.31 g Imidazol (33.9 mmol, 4.00 Äq.) in 25 mL DMF gelöst und für ca. 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde drei Mal mit 20 mL Toluol koevaporiert. Dabei wurde das Produkt **4** in quantitativer Ausbeute (4.93 g, 8.48 mmol) als weißer Schaum erhalten.

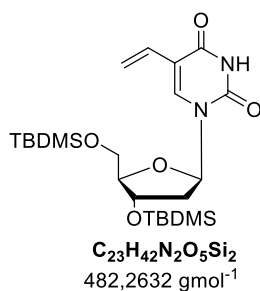
**DC** (Hexan/EE 4:1): R<sub>f</sub> = 0.4.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.73 (s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, H-6), 6.08 (t, J = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 4.35 (dt, J = 5.9, 2.9 Hz, 1H, H-3'), 3.83 (q, J = 3.3 Hz, 1H, H-4'), 3.75 (ddd, J = 40.7, 11.4, 3.5 Hz, 2H, H-5'), 2.16 (m, 2H, H-2'), 0.90 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (d, J = 2.0 Hz, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.08 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) = 160.5 (C-4), 150.1 (C-2), 144.1 (C-6), 87.1 (C-4'), 84.6 (C-1'), 72.0 (C-3'), 70.0 (C-5), 62.6 (C-5'), 39.8 (C-2'), 26.0 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.9 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 583.1515, gefunden: 583.1502.

**3', 5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-vinyl-2'-desoxyuridin (5)**



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 38.5 mg Palladiumacetat (0.172 mmol, 0.10 Äq.), 67.5 mg Triphenylphosphan (0.257 mmol, 0.15 Äq.) und 1.83 mL Triethylamin (1.34 g, 13.2 mmol, 7.70 Äq.) in 5 mL trockenem DMF bei 64 °C gerührt bis eine Rotfärbung zu beobachten war. Es wurden 1.00 g **4** (1.72 mmol, 1.00 Äq.) gelöst in 8.42 mL Vinylacetat (7.83 g, 91.0 mmol, 53.0 Äq.), hinzugefügt und die Temperatur auf 80 °C erhöht. Nach Reaktionsende wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Hex/EE 4:1) aufgereinigt. Es wurden 78 % (645 mg, 1.34 mmol) Produkt **5** als gelber Schaum erhalten.

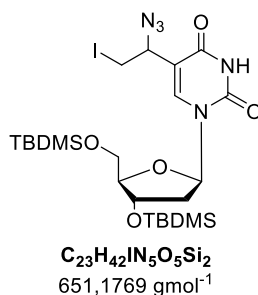
**DC** (Hexan/EE 4:1): R<sub>f</sub> = 0.29.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.47 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, H-6), 6.35 (dd, J = 17.6 Hz, 11.6 Hz, 1H, CH<sub>vinyl</sub>), 6.13 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 5.98 (dd, J = 17.7, 2.2 Hz, 1H, CH<sub>2,vinyl</sub>), 5.15 (dd, J = 11.6, 2.2 Hz, 1H, CH<sub>2,vinyl</sub>), 4.37 (m, 1H, H-3'), 3.81 (m, 1H, H-4'), 3.74 (m, 2H, H-5'), 2.28 (m, 1H, H-2'), 2.12 (ddd, J = 13.3, 6.2, 3.1 Hz, 1H, H-2'), 0.87 (s, 18H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.07 (s, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 162.0 (C-4), 149.5 (C-2), 137.8 (C-6), 128.9 (CH<sub>vinyl</sub>), 114.7 (CH<sub>2,vinyl</sub>), 111.0 (C-5), 87.0 (C-1'), 84.5 (C-4'), 72.0 (C-3'), 62.6 (C-5'), 39.8 (C-2'), 25.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.9 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI): m/z** berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 483.2705, gefunden 483.2705.

**3', 5'-Bis-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-(1-azido-2-iodoethyl)-2'-desoxyuridin (6)**



In einem Kolben wurden 500 mg **5** (1.04 mmol, 1.00 Äq.) in 3 mL MeOH gelöst. Unter Lichtausschluss wurden 269 mg NaN<sub>3</sub> (4.14 mmol, 4.00 Äq.) sowie 526 mg Iod (2.07 mmol, 2.00 Äq.) hinzugefügt und für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 %iger Natriumthiosulfatlösung beendet und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (Hexan:EE 4:1) gereinigt. Dabei wurden 97 % **6** (657 mg, 1.01 mmol) als gelber Schaum isoliert.

**DC** (Hexan/EE 4:1): R<sub>f</sub> = 0.21.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.68 (s, 1H, NH), 7.60 (s, 1H, H-6), 6.13 (t, 1H, J = 6.9 Hz, H-1'), 4.67 (m, 1H, H-3'), 4.36 (m, 1H, H<sub>Azid</sub>), 3.81 (m, 1H, H-4'), 3.72 (m, 2H, H-5'), 3.63 (m, 2H, H<sub>2, Iod</sub>), 2.18 (m, 2H, H-2'), 0.88 (s, 18H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.08 (s, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

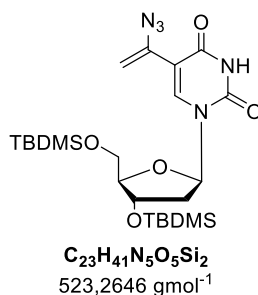
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 161.8 (C-4), 149.7 (C-2), 138.6 (C-6), 110.4 (C-5), 87.1 (C-4'), 84.7 (C-1'), 72.3 (C-3'), 63.0 (C-5'), 59.4 (C<sub>Azid</sub>), 39.8 (C-2'), 25.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 7.5 (C<sub>Iod</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 652.1842, gefunden 651.1769.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2106.1.



**3', 5'-Bis-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-(1-azidovinyl)-2'-desoxyuridin (7)**



Unter Lichtausschluss und Schutzgas wurden 585 mg **6** (0.898 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL THF gelöst und die Reaktionsmischung mit einem Eis-Salz-Bad auf -5°C gekühlt. Es wurden 202 mg Kaliumtertbutanolat (1.80 mmol, 2.00 Äq.) hinzugefügt und für 2 h bei -5 - 0°C gerührt. Das Eisbad wurde entfernt, die Reaktionsmischung mit Ethylacetat extrahiert und mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Hex/EE 4:1) gereinigt. Das Produkt **7** wurde in quantitativer Ausbeute (460 mg, 0.879 mmol) erhalten.

**DC** (Hexan/EE 3:1): R<sub>f</sub> = 0.39.

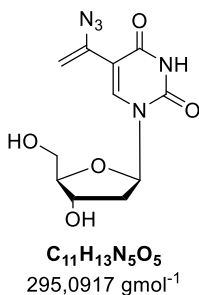
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.68 (bs, 1H, NH), 7.80 (s, 1H, H-6), 6.10 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.94 (d, J = 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CN<sub>3</sub>), 5.04 (d, J = 1.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CN<sub>3</sub>), 4.38 (td, J = 4.7, 3.0 Hz, 1H, H-3'), 3.86 (q, J = 3.5 Hz, 1H, H-4'), 3.75 (m, 2H, H-5'), 2.20 (dd, J = 6.7, 4.7 Hz, 2H, H-2'), 0.88 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.86 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.09 (s, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.06 (s, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 160.9 (C-4), 149.3 (CH<sub>2</sub>CN<sub>3</sub>), 138.3 (C-2), 136.9 (C-6), 107.0 (C-5), 101.6 (CH<sub>2</sub>CN<sub>3</sub>), 87.1 (C-4'), 84.9 (C-1'), 71.8 (C-3'), 62.4 (C-5'), 39.8 (C-2'), 25.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.0 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 546.2538, gefunden 546.2549.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2110.6.

**5-(1-azidovinyl)-2'-desoxyuridin (8)**



Zu einer Lösung aus 450 mg **7** (0.860 mmol, 1.00Äq.) in 10 mL trockenem THF wurden 1.10 mL 1M TBAF/THF hinzugegeben und das Gemisch ca. 24 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Zur Entfernung der TBAF-Salze wurden 1.29 g Dowex und 430 mg Calciumcarbonat hinzugegeben und für eine Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert, mit EtOH gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  5:1) aufgereinigt. Dabei wurden 78 % gelber Feststoff (198 mg, 0.671 mmol) isoliert.

**DC** (DCM/EtOH 5:1):  $R_f = 0.38$ .

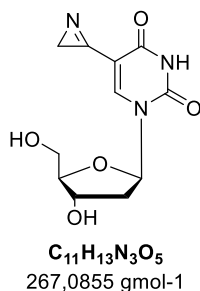
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.60 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H-6), 6.16 (t, 1H,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , H-1'), 5.91 (d,  $J = 1.5 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 5.27 (d,  $J = 4.2 \text{ Hz}$ , 1H, OH-3'), 5.10 (d,  $J = 4.6 \text{ Hz}$ , 1H, OH-5'), 5.00 (d,  $J = 1.5 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 4.25 (m, 1H, H-3'), 3.83 (q,  $J = 3.3 \text{ Hz}$ , 1H, H-4'), 3.60 (m, 2H, H-5'), 2.15 (m, 2H, H-2').

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 161.0 (C-4), 149.4 ( $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 139.4 (C-6), 137.3 (C-2), 107.1 (C-5), 101.2 ( $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 87.6 (C-4'), 84.8 (C-1'), 70.3 (C-3'), 61.0 (C-5'), 40.3 (C-2').

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 318.0809, gefunden 318.0805.

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2104.3.

**5-(2*H*-azirin-2-yl)-2'-desoxyuridin (1)**



In einem Schlenkrohr wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung aus 70.0 mg **8** (0.237 mmol, 1.00 Äq.) in Ethanol/Toluol 2:1 für ca. 2 h bei 365 nm (20°C) belichtet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie aufgereinigt (CHCl<sub>3</sub>/EtOH 5:1). Dabei konnte das Produkt **1** in quantitativer Ausbeute (57.0 mg, 213 μmol) erhalten werden.

**DC** (CHCl<sub>3</sub>/EtOH 5:1): R<sub>f</sub> = 0.33.

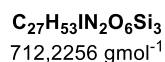
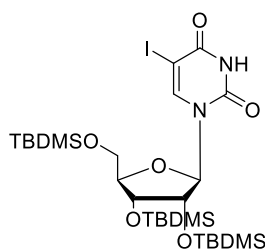
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.83 (s, 1H, NH), 8.81 (s, 1H, H-6), 6.12 (t, 1H, J = 6.0 Hz, H-1'), 5.29 (d, J = 4.5 Hz, 1H, OH-3'), 5.22 (t, J = 4.6 Hz, 1H, OH-5'), 4.27 (p, J = 4.7 Hz, 1H, H-3'), 3.84 (q, J = 3.4 Hz, 1H, H-4'), 3.64 (m, 2H, H-5'), 2.25 (m, 2H, H-2'), 1.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>,aziriny).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 159.5 (C-4), 158.0 (CH<sub>2</sub>CN), 149.4 (C-2), 148.4 (C-6), 101.1 (C-5), 87.7 (C-4'), 85.7 (C-1'), 69.2 (C-3'), 60.2 (C-5'), 40.6 (C-2'), 14.72 (CH<sub>2</sub>CN).

**HR-MS (ESI): m/z** berechnet für [M]: 267.0855, gefunden 267.1201.

## 7.2.2 Azirin-modifiziertes Uridin 2

### 3', 5'-Bis-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-iodo-uridin (**10**)



Unter Argonatmosphäre wurden 1.00 g 5-Iodo-uridin (2.70 mmol, 1.00 Äq.), 1.43 g tert-Butyldimethylsilylchlorid (9.46 mmol, 3.50 Äq.) und 1.10 g Imidazol (16.2 mmol, 6.00 Äq.) in 8 mL DMF gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde drei Mal mit 20 mL Toluol koevaporiert. Dabei wurde das Produkt **10** in quantitativer Ausbeute (1.90 g, 2.67 mmol) als weißer Schaum erhalten.

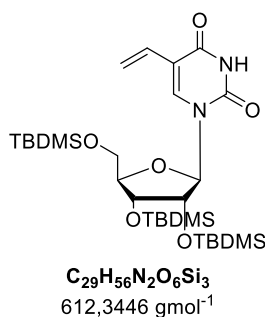
DC (Hexan/EE 4:1):  $R_f = 0.40$ .

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.84 (s, 1H, NH), 7.96 (s, 1H, H-6), 5.84 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-1'), 4.21 (dd,  $J = 6.9, 4.6$  Hz, 1H, H-2'), 4.04 (dd,  $J = 4.6, 1.8$  Hz, 1H, H-3'), 3.96 (m, 1H, H-4'), 3.80 (ddd,  $J = 53.7, 11.7, 3.0$  Hz, 2H, H-5'), 0.94 (s, 9H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.89 (s, 9H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.81 (s, 9H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.16 (d,  $J = 1.9$  Hz, 6H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.09 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.01 (s, 3H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -0.08 (s, 3H,  $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 162.3 (C-4), 160.2 (C-5), 150.4 (C-2), 143.6 (C-6), 86.3 (C-1'), 85.6 (C-4'), 74.4 (C-2'), 72.3 (C-3'), 62.9 (C-5'), 26.1 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 25.7 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 25.5 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 18.2 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 17.8 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 17.6 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -4.7 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -4.72 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -4.8 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -5.2 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -5.2 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -5.3 ( $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ).

HR-MS (ESI):  $m/z$  berechnet für  $[M]^+$ : 713.2329 gefunden: 713.2308.

**3', 5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-vinyl-uridin (**11**)**



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 65.2 mg Palladiumacetat (0.290 mmol, 0.10 Äq.), 114 mg Triphenylphosphan (0.435 mmol, 0.15 Äq.) und 3.10 mL Triethylamin (2.26 g, 22.3 mmol, 7.70 Äq.) in 10 mL trockenem DMF bei 64 °C gerührt bis eine Rotfärbung zu beobachten war. Es wurden 1.90 g **10** (2.67 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 14.2 mL Vinylacetat (13.2 g, 153 mmol, 53.0 Äq.), hinzugefügt und die Temperatur auf 80 °C erhöht. Nach Reaktionsende wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Hex/EE 5:1) aufgereinigt. Es wurden 53 % (943 mg, 1.54 mmol) Produkt **11** als gelber Schaum erhalten.

**DC** (Hexan/EE 4:1):  $R_f = 0.41$ .

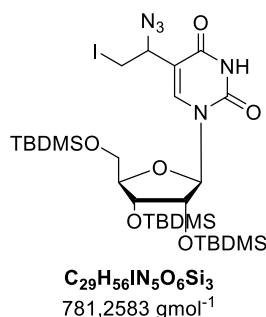
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 11.57 (s, 1H, NH), 7.64 (s, 1H, H-6), 6.34 (dd,  $J = 17.6$  Hz, 11.5 Hz, 1H, CH<sub>vinyl</sub>), 5.98 (dd,  $J = 17.6$ , 2.1 Hz, 1H, CH<sub>2,vinyl</sub>), 5.88 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H-1'), 5.19 (dd,  $J = 11.4$ , 2.1 Hz, 1H, CH<sub>2,vinyl</sub>), 4.30 (dd,  $J = 7.0$ , 4.6 Hz, 1H, H-2'), 4.06 (dd,  $J = 4.5$ , 1.9 Hz, 1H, H-3'), 3.94 (td,  $J = 3.9$ , 1.9 Hz, 1H, H-4'), 3.80 (ddd,  $J = 46.4$ , 11.5, 3.9 Hz, 2H, H-5'), 0.90 (d,  $J = 3.2$  Hz, 18H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (m, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.00 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0.09 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 161.8 (C-4), 149.8 (C-2), 137.4 (C-6), 128.5 (CH<sub>vinyl</sub>), 115.4 (CH<sub>2,vinyl</sub>), 111.7 (C-5), 86.7 (C-1'), 85.5 (C-4'), 73.9 (C-2'), 72.2 (C-3'), 62.9 (C-5'), 25.9 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.6 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7

(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  
-5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5. (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M]<sup>+</sup>: 613.3519, gefunden 613.3504.

**3', 5'-Bis-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-(1-azido-2-iodoethyl)-uridin (**12**)**



In einem Kolben wurden 900 mg **11** (1.47 mmol, 1.00 Äq.) in 4.41 mL MeOH gelöst. Unter Lichtausschluss wurden 382 mg  $\text{NaN}_3$  (5.88 mmol, 4.00 Äq.) sowie 746 mg Iod (2.94 mmol, 2.00 Äq.) hinzugefügt und für 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 %iger Natriumthiosulfatlösung beendet und mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (Hexan:EE 5:1) gereinigt. Dabei wurden 87 % **12** (1.00 g, 1.29 mmol) als gelber Schaum isoliert.

**DC** (Hexan/EE 4:1):  $R_f = 0.36$ .

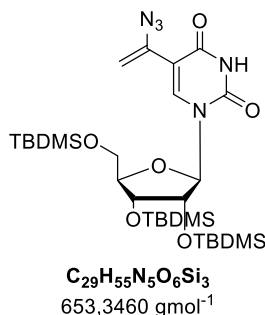
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.77 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, NH), 7.62 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-6), 5.85 (dd,  $J = 7.0, 2.4$  Hz, 1H, H-1'), 4.69 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Azid}}$ ), 4.29 (ddd,  $J = 9.4, 7.0, 4.6$  Hz, 1H, H-2'), 4.06 (td,  $J = 4.8, 1.9$  Hz, 1H, H-3'), 3.95 (tt,  $J = 4.3, 2.2$  Hz, 1H, H-4'), 3.78 (m, 2H, H-5'), 3.67 (ddd,  $J = 10.8, 8.4, 5.7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{2, \text{Iod}}$ ), 3.56 (dd,  $J = 10.3, 7.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_{2, \text{Iod}}$ ), 0.91 (d,  $J = 7.7$  Hz, 18H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.82 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.11 (m, 12H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.02 (s, 3H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -0.05 (d,  $J = 4.7$  Hz, 3H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 161.8 (C-4), 150.0 (C-2), 138.6 (C-6), 110.4 (C-5), 87.8 (C-1'), 84.8 (C-4'), 74.8 (C-2'), 73.8 (C-3'), 60.0 (C-5'), 59.4 ( $\text{C}_{\text{Azid}}$ ), 25.8 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 17.8 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 6.7 ( $\text{C}_{\text{Iod}}$ ), -3.2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 782.2656, gefunden 782.2637.

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2104.7.

**3', 5'-Bis-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-(1-azidovinyl)-uridin (13)**



Unter Lichtausschluss und Schutzgas wurden 1.00 g **12** (1.28 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL THF gelöst und die Reaktionsmischung mit einem Eis-Salz-Bad auf  $-5^\circ\text{C}$  gekühlt. Es wurden 287 mg Kaliumtertbutanolat (2.56 mmol, 2.00 Äq.) hinzugefügt und für 9 h bei  $-5 - 0^\circ\text{C}$  gerührt. Das Eisbad wurde entfernt, die Reaktionsmischung mit Ethylacetat extrahiert und mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **13** wurde, ohne weitere Aufreinigung, in quantitativer Ausbeute (820 mg, 1.26 mmol) erhalten.

**DC** (DCM/Ethanol 5:1):  $R_f = 0.78$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.81 (bs, 1H, NH), 7.78 (s, 1H, H-6), 5.90 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-1'), 5.78 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 5.06 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 4.20 (dd,  $J = 6.7, 4.5$  Hz, 1H, H-2'), 4.05 (m, 1H, H-3'), 3.99 (m, 1H, H-4'), 3.81 (ddd,  $J = 33.4, 11.7, 3.1$  Hz, 2H, H-5'), 0.90 (s, 18H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.82 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.10 (m, 12H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.04 (s, 3H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -0.08 (s, 3H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

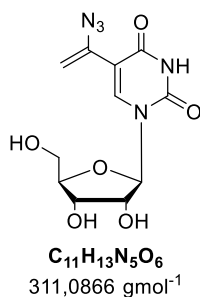
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 160.7 (C-4), 149.8 (C-2), 136.7 (C-6), 108.3 (C-5), 102.7 ( $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 86.4 (C-1'), 85.6 (C-4'), 74.6 (C-2'), 72.2 (C-3'), 63.0 (C-5'), 25.8 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.7 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.5 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 17.7 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 17.6 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.7 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.8 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -5.1 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -5.2 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -5.7 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -5.7 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}]^+$ : 654.3533, gefunden 654.3513.

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2107.6



**5-(1-azidovinyl)-uridin (14)**



Zu einer Lösung aus 820 mg **13** (1.26 mmol, 1.00Äq.) in 40 mL trockenem THF wurden 1.60 mL 1M TBAF/THF hinzugegeben und das Gemisch ca. 9.5 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Zur Entfernung der TBAF-Salze wurden 1.88 g Dowex und 628 mg Calciumcarbonat hinzugegeben und für eine Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert, mit Ethanol gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  5:1) aufgereinigt. Dabei wurden 53 % gelber Feststoff (205 mg, 0.659 mmol) isoliert.

**DC** (DCM/EtOH 5:1):  $R_f = 0.43$ .

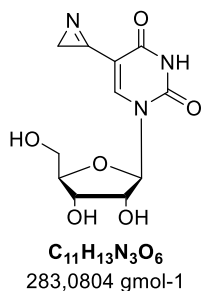
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.53 (s, 1H, NH), 8.34 (s, 1H, H-6), 5.89 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 5.80 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, H-1'), 5.42 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, OH-2'), 5.20 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H, OH-5'), 5.09 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, OH-3'), 5.01 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 4.06 (q,  $J = 4.9$  Hz, 1H, H-2'), 3.99 (q,  $J = 4.7$  Hz, 1H, H-3'), 3.89 (m, 1H, H-4'), 3.63 (m, 2H, H-5').

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 161.0 (C-4), 149.7 ( $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 139.6 (C-6), 137.3 (C-2), 107.2 (C-5), 101.4 ( $\text{CH}_2\text{CN}_3$ ), 88.4 (C-1'), 84.8 (C-4'), 74.1 (C-2'), 69.8 (C-3'), 60.4 (C-5').

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M-H}]^-$ : 310.0793, gefunden 310.07951.

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2108.5.

**5-(2*H*-azirin-2-yl)-uridin (**2**)**



In einem Schlenkrohr wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung aus 10.0 mg **14** (32.1 µmol, 1.00 Äq.) in 2 mL Ethanol für 2 h bei 365 nm (20°C) belichtet. Ohne weitere Aufreinigung konnte das Produkt **2** in quantitativer Ausbeute (9.00 mg, 31.8 µmol) als gelber Feststoff erhalten werden.

**DC** (CHCl<sub>3</sub>/EtOH 5:1): R<sub>f</sub> = 0.29.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.53 (s, 1H, NH), 8.99 (s, 1H, H-6), 5.76 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-1'), 5.54 (d, J = 4.8 Hz, 1H, OH-2'), 5.34 (t, J = 5.3 Hz, 1H, OH-5'), 5.08 (d, J = 5.3 Hz, 1H, OH-3'), 4.06 (q, J = 4.9 Hz, 1H, H-2'), 3.99 (q, J = 4.7 Hz, 1H, H-3'), 3.89 (m, 1H, H-4'), 3.63 (m, 2H, H-5'), 1.28 (m, 2H, CH<sub>2,aziriny</sub>l).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) = 161.0 (C-4), 158.0 (CH<sub>2</sub>CN), 139.6 (C-6), 137.3 (C-2), 107.2 (C-5), 88.4 (C-1'), 84.8 (C-4'), 74.1 (C-2'), 69.8 (C-3'), 60.4 (C-5'), 14.7 (CH<sub>2</sub>CN).

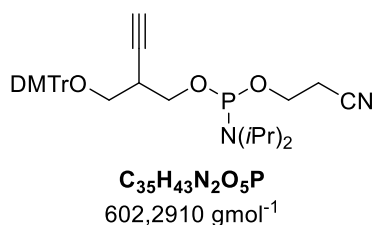
**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M<sup>+</sup>]: 284.0877, gefunden 284.0872.

### 7.2.3 Click Bausteine **cB** und **cR** für den Einbau in FISH Sonden

Die Alkin-modifizierte Bausteine **cB** und **cR** für die Anwendung in FISH-Sonden wurden nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.<sup>[240]</sup>



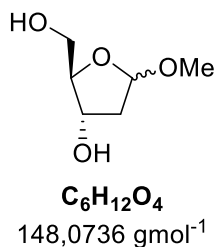
#### 2-((Dimethoxytrityl)methyl)but-3-yn-1-yl (2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidit (**cB**)



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 120 mg der, von JULIAN GEBHARD synthetisierten und bereitgestellten, Vorstufe **35** (298 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 182  $\mu\text{L}$  DIPEA (135 mg, 1.04 mmol, 3.50 Äq.) zugetropft und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 99.8  $\mu\text{L}$  2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (106 mg, 448 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt auf die Säule aufgetragen und schnell mittels Säulenchromatographie (DCM/Aceton 50:1 + 0.1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) gereinigt. Dabei wurden 63 % **cB** (113 mg, 187 mmol) als weißer Feststoff erhalten.

Der Baustein wurde, ohne Messung von analytischen Daten, als 0.1 M Lösung (DCM) in DNA-FISH-Sonden über die Festphasensynthese eingebaut.

**1'-Methoxy-2'-desoxyribose (38)**

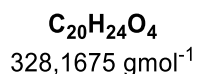
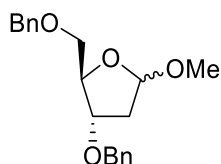


Zu einer Lösung aus 5.00 g 2'-Desoxyribose (37.3 mmol, 1.00 Äq.) in 60 mL trockenem MeOH wurden 173 µL Acetylchlorid (190 mg, 2.42 mmol, 0.07 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 2.00 g Natriumhydrogencarbonat (23.9 mmol, 0.64 Äq.) hinzugegeben und für weitere 5 Min gerührt. Die Feststoffe wurden über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Ohne jede weitere Aufreinigung konnte in quantitativer Ausbeute (5.52 g, 37.3 mmol) das Produkt **38** als gelbes Öl erhalten werden.

**DC** (DCM/MeOH 5:1):  $R_f = 0.43$ .

Die spektroskopischen Daten entsprechen den Literaturwerten.<sup>[240]</sup>

**5'-3'-Benzyl-1'-methoxy-2'-desoxyribose (39)**



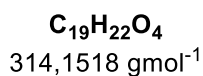
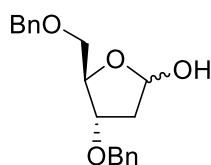
Zu einer Lösung aus 2.00 g **38** (13.5 mmol, 1.00 Äq.) in 13.5 mL THF wurden 3.41 g KOH (60.8 mmol, 4.50 Äq.) und 10.9 mL Benzylchlorid (12.0 g, 94.6 mmol, 7.00 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht zum Refluxieren erhitzt. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt, Feststoffe abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie aufgereinigt (Hexan → Hexan/EE 4:1). Dabei konnte eine Gesamtausbeute von 84 % (24 % α, 1.06 g, 3.24 mmol, 60 % β, 2.66 g, 8.10 mmol) an **39** als gelbes viskoses Öl erhalten werden.

**DC** (Hexan/EE 4:1): R<sub>f</sub> (α) = 0.25, R<sub>f</sub> (β) = 0.20.

**HR-MS (ESI): m/z** berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 351.1567, gefunden: 351.1563.

Die spektroskopischen Daten entsprechen den Literaturwerten.<sup>[240]</sup>

**5'-3'-Benzyl-2'-desoxyribose (40)**



Eine Lösung aus 1.80 g **39** (5.5 mmol, 1.00 Äq.) in 55 mL AcOH/H<sub>2</sub>O (80:20) wurde für 48 h auf 50 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol koevaporiert. Ohne weitere Aufreinigung wurde das Produkt **40** als gelbes viskoses Öl in quantitativer Ausbeute (1.69 g, 5.38 mmol) erhalten.

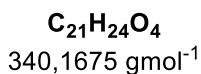
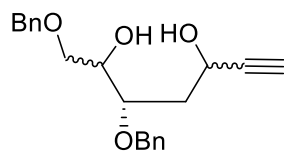
**DC** (Hexan/EE 2:1): R<sub>f</sub> = 0.19.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.32 (m, 20H, H<sub>arom</sub>), 5.55 (m, 1H, H-1'), 5.47 (dd, J = 3.8, 1.4 Hz, 1H, H-1'), 4.53 (m, 10H, CH<sub>2,Bn</sub> + H-4'), 4.27 (dd, J = 5.7, 3.9 Hz, 1H, H-3'), 4.11 (dt, J = 4.5, 1.7 Hz, 1H, H-3'), 3.60 (m, 2H, H-5'), 3.44 (m, 2H, H-5'), 2.22 (m, 2H, H-2'), 2.12 (m, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 138.1 (C<sub>Bn</sub>), 138.0 (C<sub>Bn</sub>), 137.5 (C<sub>Bn</sub>), 137.3 (C<sub>Bn</sub>), 128.7 (C<sub>Bn</sub>), 127.7 (C<sub>Bn</sub>), 99.5 (C-1'), 83.4 (C-3'), 82.6 (C-4'), 80.2 (C-3'), 79.9, 73.8, 73.6 (CH<sub>2,Bn</sub>), 71.6, 71.5, 71.4 (CH<sub>2,Bn</sub>), 70.5 (C-5'), 42.0 (C-2'), 39.3 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M]<sup>+</sup>: 314.1518, gefunden: 314.1751.

**(3S)-1,3-bis-benzyloxy-hept-6-yne-2,5-diol (41)**



Zu einer Lösung aus 1.00 g **40** (3.18 mmol, 1.00 Äq.) in 11.5 mL THF wurden bei 0 °C 12.7 mL einer Lösung aus Ethynylmagnesiumbromid (0.5M) in THF (823 mg, 6.37 mmol, 2.00 Äq) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und für weitere 20 h gerührt. Zum Beenden wurde die Reaktion mit ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung versetzt, mit DCM verdünnt und mit Wasser sowie ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie aufgetrennt (Hexan/EE 2:1). Dabei konnten 27 % (290 mg; 0.853 mmol) α- und 52 % (565 mg; 1.66 mmol) β-Anomer von **41** als gelbes, viskoses Öl erhalten werden.

**DC** (Hexan/EE 2:1): R<sub>f</sub> (α) = 0.23.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.34 (m, 10H, H<sub>arom</sub>), 4.64 (d, J = 3.6 Hz, 2H, CH<sub>2,Bn</sub>), 4.59 (ddd, J = 7.8, 3.1, 2.2 Hz, 1H, H-1'), 4.56 (d, J = 2.5 Hz, 2H, CH<sub>2,Bn</sub>), 4.00 (m, 2H, H-3' + H-4'), 3.58 (d, J = 5.0 Hz, 2H, H-5'), 2.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH), 2.00 (m, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 137.8 (C<sub>Bn</sub>), 137.7 (C<sub>Bn</sub>), 128.7 (C<sub>Bn</sub>), 128.6 (C<sub>Bn</sub>), 128.4 (C<sub>Bn</sub>), 128.2 (C<sub>Bn</sub>), 128.1 (C<sub>Bn</sub>), 128.0 (C<sub>Bn</sub>), 84.8 (CCH), 77.5 (C-4'), 73.7 (CH<sub>2, Bn</sub>), 73.1 (CH), 72.9 (CH<sub>2, Bn</sub>), 71.55 (C-3'), 70.7 (C-5'), 60.0 (C-1'), 37.4 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 363.1567, gefunden: 363.1563.

**DC** (Hexan/EE 2:1): R<sub>f</sub> (β) = 0.18

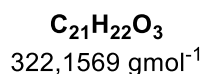
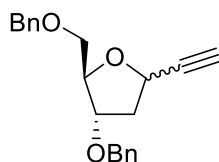
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.32 (m, 10H, H<sub>arom</sub>), 4.65 (ddd, J = 7.3, 5.3, 2.2 Hz, 1H, H-1'), 4.56 (m, 4H, CH<sub>2,Bn</sub>), 3.97 (td, J = 6.2, 3.8 Hz, 1H, H-4'), 3.80 (m, 1H, H-3'), 3.60 (m, 2H, H-5'), 2.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH), 2.09 (m, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 137.9 (C<sub>Bn</sub>), 137.8 (C<sub>Bn</sub>), 128.6 (C<sub>Bn</sub>), 128.1 (C<sub>Bn</sub>), 128.1 (C<sub>Bn</sub>), 128.0 (C<sub>Bn</sub>), 84.7 (CCH), 77.4 (C-3'), 73.6 (CH<sub>2</sub>, Bn), 73.2 (CH) 72.3 (CH<sub>2</sub>, Bn), 71.9 (C-4'), 70.9 (C-5'), 59.9 (C-1'), 38.5 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 363.1567, gefunden: 363.1563.



**(3S)-1,3-bis-benzyloxy-hept-6-yne-2,5-diol (42)**



Zu einer Lösung aus 290 mg **41α** (0.853 mmol, 1.00 Äq.) in 2.81 mL Aceton wurden nacheinander 279 mg Toluolsulfonsäurechlorid (0.938 mmol, 1.10 Äq) und 0.443 mL KOH 5 M in H<sub>2</sub>O (124 mg, 2.22 mmol, 2.60 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für ca. 13 – 48 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit Wasser verdünnt und mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (Hexan/EE 4:1) konnte das α-Anomer in einer Ausbeute von 83 % (228 mg, 0.708 mmol) und das β-Anomer, bei einer Eduktmenge von 565 mg (1.66 mmol), in einer Ausbeute von 84 % (449 mg, 1.39 mmol) isoliert werden.

**DC** (Hexan/EE 5:1): R<sub>f</sub> (α) = 0.68.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.32 (m, 10H, H<sub>arom</sub>), 4.74 (ddd, J = 9.8, 5.8, 2.1 Hz, 1H, H-1'), 4.58 (m, 2H, CH<sub>2,Bn</sub>), 4.51 (s, 2H, CH<sub>2,Bn</sub>), 4.16 (ddd, J = 5.7, 4.7, 2.5 Hz, 1H, H-4'), 4.12 (dt, J = 6.0, 2.2 Hz, 1H, H-3'), 3.62 (dd, J = 10.3, 4.7 Hz, 1H, H-5'), 3.50 (dd, J = 10.3, 5.8 Hz, 1H, H-5'), 2.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH), 2.32 (ddd, J = 13.1, 5.8, 1.9 Hz, 1H, H-2'), 2.11 (ddd, J = 13.1, 9.8, 6.0 Hz, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 138.3 (C<sub>Bn</sub>), 138.0 (C<sub>Bn</sub>), 128.6 (C<sub>Bn</sub>), 128.5 (C<sub>Bn</sub>), 127.9 (C<sub>Bn</sub>), 127.8 (C<sub>Bn</sub>), 127.8 (C<sub>Bn</sub>), 84.0 (C-4'), 82.8 (CCH), 80.9 (C-3'), 73.6 (CH<sub>2, Bn</sub>), 73.6 (CH), 71.3 (CH<sub>2, Bn</sub>), 70.8 (C-5'), 67.7 (C-1'), 39.7 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 345.1461, gefunden: 345.1459.

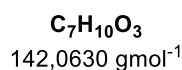
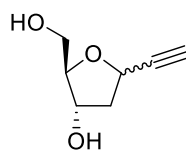
**DC** (Hexan/EE 4:1):  $R_f$  ( $\beta$ ) = 0.56.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.32 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 4.81 (ddd,  $J = 7.5, 5.0, 2.2$  Hz, 1H, H-1'), 4.54 (m, 4H,  $\text{CH}_{2,\text{Bn}}$ ), 4.29 (q,  $J = 4.1$  Hz, 1H, H-4'), 4.13 (dt,  $J = 7.1, 4.2$  Hz, 1H, H-3'), 3.57 (m, 2H, H-5'), 2.51 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, CH), 2.32 (m, 2H, H-2').

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 138.2 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 138.1 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 128.5 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 127.8 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 83.6 (CCH), 83.0 (C-4'), 79.8 (C-3'), 73.6 ( $\text{CH}_{2,\text{Bn}}$ ), 73.4 (CH) 71.7 ( $\text{CH}_{2,\text{Bn}}$ ), 70.3 (C-5'), 67.7 (C-1'), 39.4 (C-2').

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 345.1461, gefunden: 345.1458.

**5-Ethynyl-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol (43)**



Zu einer Lösung aus 129 mg **42α** (0.400 mmol, 1.00 Äq.) in 12.0 mL trockenem DCM wurden bei -78°C 1.60 mL einer 1M BCl<sub>3</sub>-Lösung in DCM (188 mg, 1.60 mmol, 4.00 Äq) über einen Zeitraum von 20 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1.5 h bei -78°C gerührt, mit MeOH gestoppt und mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde eingengt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie aufgereinigt (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 4:1). Dabei wurde das Produkt **43α** in quantitativer Ausbeute (55.1 mg, 0.388 mmol) erhalten. Bei einer Eduktmenge von 347 mg **42β** konnte **43β** ebenfalls in quantitativer Ausbeute (148 mg, 1.04 mmol) erhalten werden.

**DC** (Hexan/EE 2:1): R<sub>f</sub> (α) = 0.05.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 4.78 (td, J = 7.7, 2.0 Hz, 1H, H-1'), 4.41 (dq, J = 5.8, 2.7, 2.2 Hz, 1H, H-3'), 3.87 (q, J = 4.1 Hz, 1H, H-4'), 3.70 (m, 2H, H-5'), 2.73 (bs, 2H, OH), 2.54 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH), 2.21 (m, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 87.2 (C-4'), 82.8 (CCH), 74.2 (CH), 72.9 (C-3'), 67.5 (C-1'), 62.8 (C-5'), 42.7 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M-H]<sup>-</sup>: 141.0557, gefunden: 141.0548.

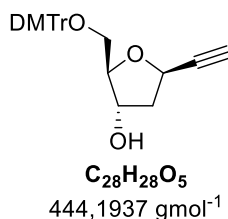
**DC** (Hexan/EE 2:1): R<sub>f</sub> (β) = 0.05.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 4.81 (m, 1H, H-1'), 4.31 (dtd, J = 7.2, 4.1, 1.0 Hz, 1H, H-3'), 4.07 (dd, J = 4.3, 2.5 Hz, 1H, H-4'), 3.78 (m, 1H, H-5'), 3.68 (dd, J = 11.9, 4.4 Hz, 1H, H-5'), 2.58 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH), 2.47 (m, 1H, H-2'), 2.29 (m, 2H, OH), 2.15 (m, 1H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 86.2 (C-4'), 83.7 (CCH), 74.3 (CH), 73.1 (C-3'), 67.5 (C-1'), 62.5 (C-5'), 42.4 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M-H]<sup>-</sup>: 141.0557, gefunden: 141.0547.

**(2R,3S,5R)-2-Dimethoxytrityl-5-ethynyltetrahydrofuran-3-ol (44)**



Unter Feuchtigkeitsausschluss wurden 150 mg **43α** bzw. **43β** (1.06 mmol, 1.00 Äq.), welche zuvor in Pyridin koevaporiert wurden, in 5 mL trockenem Pyridin gelöst und mit 429 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.27 mmol, 1.20 Äq.) versetzt. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mL MeOH beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL Ethylacetat aufgenommen, drei Mal mit 20 mL einer 1M 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 der Rückstand mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 99:1 + 0.1% NEt<sub>3</sub>) gereinigt. Dabei wurden 74 % **44α** (348 mg, 0.784 mmol) und 31 % **44β** (146 mg, 0.329 mmol) als weißer Schaum erhalten.

**DC** (DCM/MeOH 10:0.2 + 0.1 % NEt<sub>3</sub>): R<sub>f</sub> (α) = 0.53.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.37 (dd, J = 8.3, 1.4 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.26 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 4H, H<sub>arom.</sub>), 7.19 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.11 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 6.73 (d, J = 8.9 Hz, 4H, H<sub>arom.</sub>), 4.70 (ddd, J = 8.8, 6.4, 2.1 Hz, 1H, H-1'), 4.28 (dt, J = 5.7, 2.8, 1.0 Hz, 1H, H-3'), 3.84 (ddd, J = 6.0, 4.6, 2.8 Hz, 1H, H-4'), 3.69 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.12 (m, 2H, H-5'), 2.39 (d, J = 2.1 Hz, 1H, CH), 2.14 (m, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 158.5 (C<sub>arom.</sub>), 144.9 (C<sub>arom.</sub>), 136.1 (C<sub>arom.</sub>), 136.0 (C<sub>arom.</sub>), 130.2 (C<sub>arom.</sub>), 128.3 (C<sub>arom.</sub>), 128.0 (C<sub>arom.</sub>), 126.8 (C<sub>arom.</sub>), 113.2 (C<sub>arom.</sub>), 86.3 (C<sub>quart.</sub>), 86.1 (C-4'), 83.1 (CCH), 74.2 (C-3'), 73.5 (CH), 67.4 (C-1'), 64.5 (C-5'), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 42.1 (C-2').

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+Na]<sup>+</sup>: 467.1829, gefunden: 467.1827.

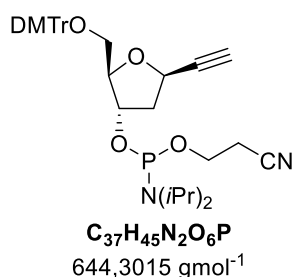
**DC** (DCM/MeOH 10:0.2 + 0.1 % NEt<sub>3</sub>): R<sub>f</sub> (β) = 0.54.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 7.39 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.28 (dd,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, 4H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.25 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 7.19 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 6.80 (d,  $J = 8.8$  Hz, 4H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ), 4.83 (ddd,  $J = 7.9, 3.9, 2.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.28 (dt,  $J = 6.7, 3.4, 1.0$  Hz, 1H, H-3'), 4.15 (dt,  $J = 5.2, 3.9$  Hz, 1H, H-4'), 3.76 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.18 (m, 1H, H-5'), 2.55 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, CH), 2.50 (ddd,  $J = 13.1, 8.0, 6.7$  Hz, 1H, H-2'), 2.11 (dt,  $J = 13.1, 3.7$  Hz, 1H, H-2').

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 158.6 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 144.8 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 136.0 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 135.9 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 130.13 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 128.0 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 126.9 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 113.3 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 86.4 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ), 85.5 (C-4'), 84.2 (CCH), 74.8 (C-3'), 74.0 (CH), 67.5 (C-1'), 64.2 (C-5'), 55.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 42.0 (C-2').

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 467.1829, gefunden: 467.1827.

**(2R,3S,5R)-2-Dimethoxytrityl-5-ethynyltetrahydrofuran-3-yl-(2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (cR)**



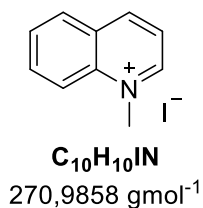
Unter Argonatmosphäre wurden 120 mg **44 $\alpha$**  bzw. **44 $\beta$**  (0.270 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL abs. DCM gelöst und mit 141  $\mu\text{L}$  DIPEA (104 mg, 0.811 mmol, 3.00 Äq.) und 90.4  $\mu\text{L}$  2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (95.9 mg, 0.405 mmol, 1.50 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend direkt, ohne Entfernung des Lösungsmittels, auf eine Säule aufgetragen (DCM/Aceton 5:1+0.1%  $\text{NEt}_3$ ). Es wurden 69 % **cR $\alpha$**  (120 mg, 0.186 mmol) bzw. 77 % **cR $\beta$**  (134 mg, 0.208 mmol) als weißer Schaum erhalten.

**DC** (DCM/Aceton 5:1 + 0.1 %  $\text{NEt}_3$ ):  $R_f$  ( $\alpha$  und  $\beta$ ) = 0.79.

Die Bausteine wurden als 0.1 M Lösung (DCM) in DNA-FISH-Sonden über die Festphasensynthese eingebaut.

## 7.2.4 Azidmodifizierte TO-Farbstoffe

### N-Methylchinoliniumiodid (**46**)



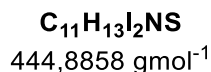
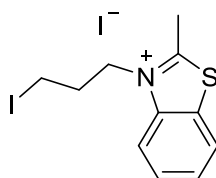
Unter Argonatmosphäre wurden 2.30 mL Chinolin (19.0 mmol, 1.00 Äq.) und 3.90 mL Iodmethan (62.0 mmol, 3.30 Äq.) in 50 mL Dioxan gelöst und für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mit kaltem Diethylether (5x10ml) gewaschen. Dabei wurden 96 % **46** (4.95 g, 18.3 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

**DC** (DCM/MeOH 4:1):  $R_f = 0.66$ .

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**:  $\delta$  (ppm) = 9.52 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H-4), 9.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-2), 8.51 (m, 2H, H-5 und H-8), 8.30 (ddd,  $J = 8.8, 7.0, 1.5$  Hz, 1H, H-3), 8.18 (dd,  $J = 8.4, 5.7$  Hz, 1H, H-7), 8.07 (ddd,  $J = 8.1, 7.0, 1.0$  Hz, 1H, H-6), 4.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**:  $\delta$  (ppm) = 150.2 (C-2), 147.0 (C-4), 138.3 (C-9), 135.4 (C-7), 130.3 (C-5), 129.9 (C-6), 129.2 (C-10), 122.0 (C-3), 119.2 (C-8), 45.4 (CH<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI)**:  $m/z$  berechnet für [M]<sup>+</sup>: 144.0808, gefunden: 144.0807.

**N-(3-Iodopropyl)-2-methylbenzothiazoliumiodid (48)**

In einem Kolben wurden unter Argonatmosphäre 8.16 mL 2-Methylbenzothiazol (9,57 g, 64.1 mmol, 1.00 Äq.) und 7.5 mL 1,3-Diiodpropan (19.3 g, 65.3 mmol, 1.00 Äq.) in 20 mL trockenem Acetonitril gelöst. Die Reaktionsmischung wurde unter Rückfluss für 48 h gerührt, auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit kaltem Diethylether (3x30 mL) gewaschen und getrocknet, wobei 25 % **48** (7.05 g, 15.8 mmol) als cremefarbener Feststoff erhalten wurde.

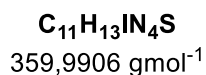
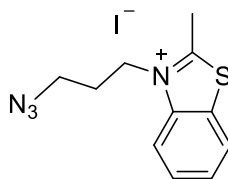
**DC** (DCM/MeOH 10:1):  $R_f = 0.30$ .

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.41 (m, 1H, H-4), 8.34 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-7), 7.91 (ddd,  $J = 8.5, 7.2, 1.2$  Hz, 1H, H-6), 7.81 (ddd,  $J = 8.3, 7.2, 1.0$  Hz, 1H, H-5), 4.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ ), (3.43 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ ), 3.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 177.8 (C-2), 140.9 (C-9), 129.4 (C-6), 129.3 (C-8), 128.1 (C-5), 124.7 (C-4), 116.6 (C-7), 49.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ ), 31.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ ), 17.1 ( $\text{CH}_3$ ), 21.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$ ).

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}]^+$ : 317.9808, gefunden: 317.9804.



**N-(3-Azidopropyl)-2-methylbenzothiazoliumiodid (49)**

Zu einer Suspension aus 3.00 g **48** (6.44 mmol, 1.00 Äq.) in 113 mL Acetonitril wurde tropfenweise eine Lösung aus 547 mg  $\text{NaN}_3$  (8.41 mmol, 1.25 Äq.) in 7.6 mL  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben und für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:0.1 – 10:1) gereinigt. Es wurden 89 % **49** (2.08 g, 5.76 mmol) als gelb-grüner Feststoff isoliert.

**DC** (DCM/MeOH 10:1):  $R_f = 0.20$

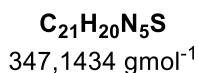
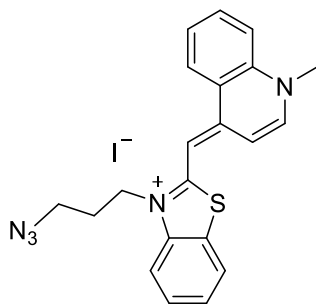
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 8.45 (dd,  $J = 8.3, 1.1$  Hz, 1H, H-7), 8.33 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-4), 7.91 (ddd,  $J = 8.5, 7.3, 1.3$  Hz, 1H, H-5), 7.81 (ddd,  $J = 8.2, 7.2, 1.0$  Hz, 1H, H-6), 4.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3.58 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.14 (dt,  $J = 14.3, 6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 177.7 (C-2), 140.8 (C-9), 129.4 (C-5), 129.1 (C-8), 128.1 (C-6), 124.7 (C-7), 116.7 (C-4), 47.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 46.69 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 26.9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 16.9 ( $\text{CH}_3$ ).

**HR-MS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $[\text{M}]^+$ : 233.0855, gefunden: 233.0856.

**IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2092.5.

**N-(3-Azidopropyl)thiazolorange (TO1)**



Unter Argonatmosphäre wurden 1.96 g Azid **49** (5.43 mmol, 1.00 eq.) und 1.77 g Chinolin **46** (6.53 mmol, 1.20 Äq.) in 32.5 mL trockenem DCM/MeOH (1:1) gelöst. Zum Reaktionsgemisch wurden 1.00 mL trockenes Et<sub>3</sub>N (13.6 mmol, 2.50 Äq.) hinzugegeben, worauf eine Rotfärbung beobachtet werden konnte. Nach 40 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt mit kaltem Diethylether gewaschen (3 x 50mL) und anschließend über Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:0.1 – 10:1) gereinigt. Dabei wurden 11 % **TO1** (300 mg, 0.600 mmol) als roter Feststoff erhalten.

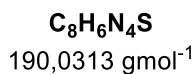
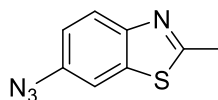
**DC** (DCM/MeOH 10:1): R<sub>f</sub> = 0.58.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 8.76 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8.65 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8.06 (m, 3H, H<sub>arom.</sub>), 7.79 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.61 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.41 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 6.95 (s, 1H, CH), 4.66 (t, J = 7.3 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>-), 4.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.60 (t, J = 6.5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.07 (p, J = 6.8 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 159.3 (C<sub>quart.</sub>), 148.8 (C<sub>quart.</sub>), 145.1 (C<sub>arom.</sub>), 139.9 (C<sub>quart.</sub>), 138.0 (C<sub>quart.</sub>), 133.3 (C<sub>arom.</sub>), 128.2 (C<sub>arom.</sub>), 127.0 (C<sub>arom.</sub>), 125.3 (C<sub>arom.</sub>), 124.5 (C<sub>quart.</sub>), 124.1 (C<sub>arom.</sub>), 123.9 (C<sub>quart.</sub>), 123.0 (C<sub>arom.</sub>), 118.4 (C<sub>arom.</sub>), 112.7 (C<sub>arom.</sub>), 108.1 (C<sub>arom.</sub>), 87.4 (CH), 48.0 (-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 43.1 (NCH<sub>2</sub>-), 42.5 (CH<sub>3</sub>), 26.1 (-CH<sub>2</sub>-).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M]<sup>+</sup>: 374.1434, gefunden: 374.1429.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2087.9.

**6-Azido-2-methyl-1,3-benzothiazol (51)**

Zu einer Lösung aus 1.76 g 6-Amino-2-methylbenzothiazol (10.7 mmol, 1.00 Äq.) in 25.7 mL 3M HCl wurde bei 0 °C eine Lösung aus 776 mg NaNO<sub>2</sub> (11.2 mmol, 1.05 Äq.) in 6.42 mL H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Nach 10 min Rühren bei 0 °C wurde eine Lösung aus 732 mg NaN<sub>3</sub> (11.2 mmol, 1.05 Äq.) in 8.56 mL NaOAc zugetropft und für 20 min bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether extrahiert, die vereinigten org. Phasen mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dabei wurden 73 % **51** (1.48 g, 7.80 mmol) als gelber Feststoff erhalten.<sup>[303]</sup>

**DC** (Hexan/EE 5:1): R<sub>f</sub> = 0.28.

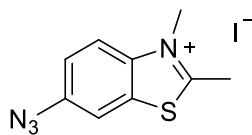
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 7.89 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-7), 7.85 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-4), 7.18 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H, H-5), 3.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 167.0 (C-2), 150.5 (C-9), 136.8 (C-8), 136.3 (C-6), 122.9 (C-7), 117.9 (C-5), 112.1 (C-4), 19.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M+H]<sup>+</sup>: 191.0386, gefunden: 191.0383.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2121.4.

**6-Azido-2,3-dimethylbenzothiazol-3-iumiodid (52)**



**C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>IN<sub>4</sub>S**  
331,9593 g mol<sup>-1</sup>

In einem Kolben wurden 1.00 g **51** (5.26 mmol, 1.00 Äq.) in 0.82 mL Methyljodid (1.87 g, 13.2 mmol, 2.50 Äq.) gelöst und für 24 h refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Feststoff abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Es wurden 57 % eines blauen Farbstoffes (1.00 g, 3.01 mmol) erhalten.<sup>[249]</sup>

**DC** (Hexan/EE 5:1): R<sub>f</sub> = 0.28.

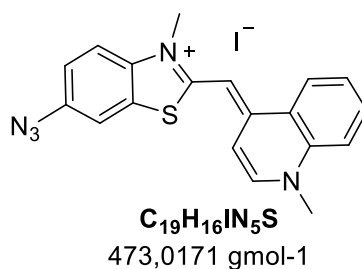
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 8.29 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-4), 8.26 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.62 (dd, J = 9.0, 2.3 Hz, 1H, H-5), 4.18 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 176.8 (C-2), 140.0 (C-8), 138.9 (C-6), 130.3 (C-9), 121.2 (C-5), 118.2 (C-4), 114.1 (C-7), 36.4 (NCH<sub>3</sub>), 17.2 (CH<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M]<sup>+</sup>: 205.0542, gefunden: 205.0541.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2103.5.

**Azidothiazolorange (TO2)**



In einem Kolben wurden 0.500 g Azid **52** (1.39 mmol, 1.00 Äq.), 1.24 g Chinolin **46** (4.48 mmol, 3.30 Äq.) und 312 mg KOH (5.56 mmol, 4.00 Äq.) in 94 mL MeOH für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde heiß abfiltriert und der Feststoff mit Aceton und Diethylether gewaschen. Ohne weitere Aufreinigung wurden 20 % **TO2** (141 mg, 0.298 mmol) als dunkelroter Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 8.78 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8.63 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 8.03 (m, 2H, H<sub>arom.</sub>), 7.88 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.78 (m, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.76 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.33 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 7.30 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H<sub>arom.</sub>), 6.88 (s, 1H, CH), 4.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

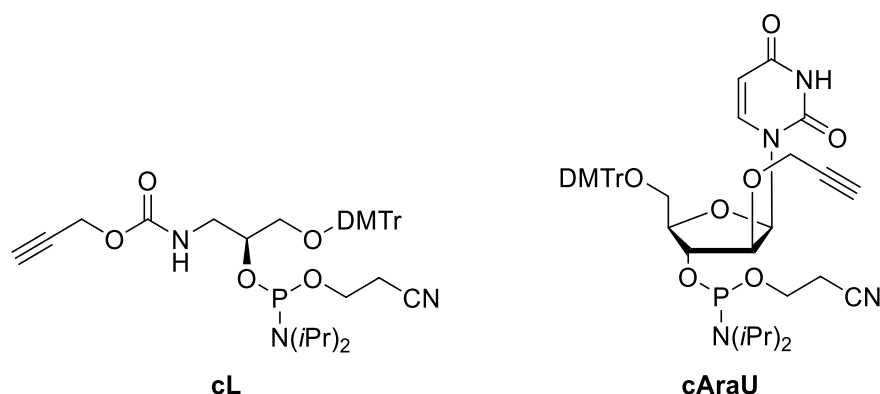
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) = 159.5 (C<sub>quart.</sub>), 148.5 (C<sub>quart.</sub>), 145.1 (C<sub>arom.</sub>), 138.0 (C<sub>quart.</sub>), 135.9 (C<sub>quart.</sub>), 133.3 (C<sub>arom.</sub>), 127.0 (C<sub>quart.</sub>), 125.6 (C<sub>arom.</sub>), 125.5 (C<sub>arom.</sub>), 124.0 (C<sub>quart.</sub>), 119.5 (C<sub>arom.</sub>), 118.3 (C<sub>arom.</sub>), 113.9 (C<sub>arom.</sub>), 113.3 (C<sub>arom.</sub>), 107.8 (C<sub>arom.</sub>), 88.1 (CH), 42.4 (CH<sub>3</sub>), 34.0 (CH<sub>3</sub>).

**HR-MS (ESI):** m/z berechnet für [M]<sup>+</sup>: 346.1121, gefunden: 346.1117.

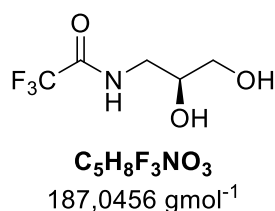
**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 2114.3.

### 7.2.5 Click-Bausteine cL und cAraU für den Einbau in siRNA Sonden

Die Alkin-modifizierten Bausteine **cL** und **cAraU** für die Anwendung in siRNA-Sonden wurden nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert und stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[77, 168]</sup>



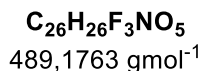
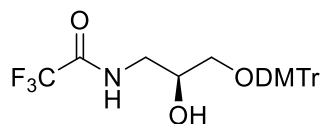
#### (S)-N-(2, 3-Dihydroxypropyl)-2,2,2-trifluoracetamid (53)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 2.00 g (S)-3-Aminopropan-1,2-diol (21.9 mmol, 1.00 Äq.) in 9.5 mL Trifluoressigsäuremethylester (12.2 g, 95.5 mmol, 4.35 Äq.) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockne eingeeengt und das Produkt dreimal mit 30 mL Toluol koevaporiert. Das Produkt wurde als orangenes Öl in einer Ausbeute von 84 % (3.43 g, 18.4 mmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 9.32 (s, 1H, NH), 4.89 (bs, 1H, OH), 4.64 (bs, 1H, OH), 3.58 (m, 1H, CHOH), 3.29 (m, 3H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>NH), 3.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH).

**(S)-N-3-Dimethoxytrityl-2-hydroxypropyl-2,2,2- trifluoracetamid (54)**

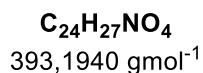
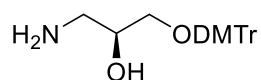


Unter Argonatmosphäre wurden 3.43 g **53** (18.3 mmol, 1.00 Äq.) in 60 mL THF und 5.80 mL Triethylamin (4.22 g, 41.7 mmol, 2.28 Äq.) gelöst. Unter Rühren wurden portionsweise 7.44 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (22.0 mmol, 1.18 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden 1.5 mL Methanol zugegeben und nochmals 1 h lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 100 mL Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 70 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde zweimal mit je 70 mL dest. Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt konnte in quantitativer Ausbeute (8.97 g, 18.3 mmol) als orangener Schaum erhalten werden.

**DC** (DCM/MeOH 50:1): R<sub>f</sub> = 0.33

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 9.31 (s, 1H, NH), 7.31 (m, 7H, H<sub>arom.</sub>), 6.88 (m, 6H, H<sub>arom.</sub>), 5.16 (d, 1H, OH), 3.82 (m, 1H, CHOH), 3.73 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 3.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 2.95 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 2.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O).

**(S)-1-Amino-3-dimethoxytrityl-propan-2-ol (55)**

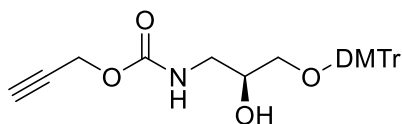


In einem Rundkolben wurden 8.97 g **54** (18.3 mmol, 1.00 Äq.) in einer Mischung aus 75 mL konz. Ammoniak-Lösung, 75 mL Methanol und 30 mL THF gelöst und für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und der wässrige Rückstand dreimal mit je 100 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Trocknen am Hochvakuum wurde das Produkt als leicht gelber Schaum in quantitativer Ausbeute (7.21 g, 18.3 mmol) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.30 (m, 7H, H<sub>arom.</sub>), 6.89 (m, 6H, H<sub>arom.</sub>), 4.71 (d, J = 5.4 Hz, 1H, OH), 3.91 (m, 1H, CHOH), 3.73 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 2.73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O).



**Prop-2-ynyl-(S)-3-dimethoxytrityl-2-hydroxypropyl-carbamat (56)**



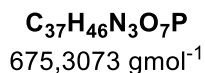
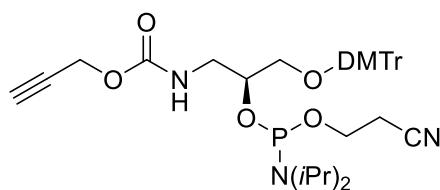
**C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>**  
475,1995 g/mol

In einem ausgeheizten 100 mL Rundkolben wurden 0.53 mL 2-Propin-1-ol (0.52 g, 9.25 mmol, 1.00 Äq.) in 40 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 1.80 g 1,1-Carbonyldiimidazol (11.1 mmol, 1.20 Äq.) wurde die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Anschließend wurden 4.00 g **55** (10.2 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben und für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (DCM/MeOH 100:1 + 0.1 % NEt<sub>3</sub>). Es wurden 16 % (703 mg, 1.48 mmol) eines gelben Feststoffes erhalten.

**DC** (Hexan/EE 2:1): R<sub>f</sub> = 0.30

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 7.28 (m, 10H, H<sub>arom.</sub>), 6.88 (m, 4H, H<sub>arom.</sub>), 4.95 (d, J = 5.4 Hz, 1H, OH), 4.58 (d, J = 2.5, 2H, CH<sub>2</sub>CCH), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H, CHOH), 3.48 (t, J = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CCH), 3.17 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 2.89 (m, 3H, CH<sub>2</sub>NH + CH<sub>2</sub>O).

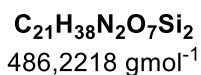
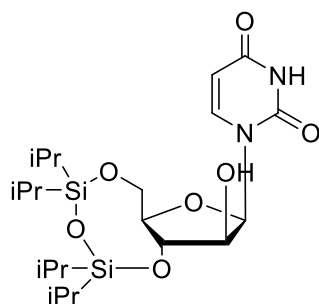
**Prop-2-ynyl-(S)-3-dimethoxytrityl-2-phosphoramidit-carbamat (cL)**



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Argonatmosphäre 0.703 g **56** (1.48 mmol, 1.00 Äq.) in 15 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 772 µL trockenes DIPEA (4.43 mmol, 3.00 Äq.) und 495 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2.22 mmol, 1.50 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde direkt auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und gereinigt (DCM/Aceton 45:1 + 0.1 % NEt<sub>3</sub>). Das Produkt wurde als rosafarbener Schaum in einer Ausbeute von 55% (0.550 g, 0.814 mmol) erhalten.

Das Phosphoramidit wurde ohne die Messung von analytischen Daten direkt in RNA eingebaut wurde.

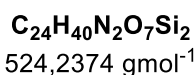
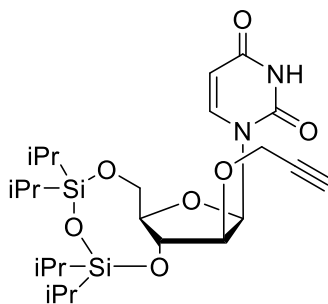
**3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)uracil-1-β-D-arabinofuranosid (57)**



In einem Schlenkkolben wurden 2.00 g 1-β-*D*-Arabinofuranosyluracil (8.19 mmol, 1.00 Äq.) über Nacht am Vakuum getrocknet. Der Zucker wurde in 10 mL trockenem Pyridin gelöst, auf 0°C gekühlt und langsam 2.87 mL TIPDSiCl<sub>2</sub> (2.84 g, 9.01 mmol, 1.10 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0°C gerührt, auf Raumtemperatur aufgewärmt und für weitere 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (0 - 50% EE in DCM). Es wurden 54 % (2.15 g, 4.42 mmol) eines weißen Schaumes als Produkt erhalten.

**DC** (DCM/EE 1:1): R<sub>f</sub> = 0.37.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.32 (s, 1H, NH), 7.45 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.01 (d, J = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 5.83 (d, J = 5.8 Hz, 1H, OH), 5.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-5), 4.32 (q, J = 6.5 Hz, 1H, H-2'), 4.08 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-3'), 3.95 (m, 2H, H-5'), 3.70 (dt, J = 8.2, 3.2 Hz, 1H, H-4'), 1.03 (m, 28H, 8x CH<sub>3</sub> & 4x CH).

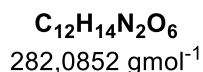
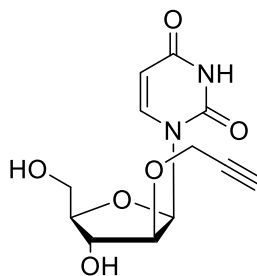
**3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (58)**


Unter Argonatmosphäre wurden 1.00 g **57** (2.05 mmol, 1.00 Äq.) in 20 mL abs. THF gelöst und mit einem Eisbad auf  $-12^\circ\text{C}$  gekühlt. Unter Feuchtigkeitsausschluss wurden 164 mg NaH (4.11 mmol, 2.00 Äq.; 60%ig in Paraffinöl) zugegeben und für 15 min gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt, über 30 min hinweg mit 0.94 mL Propargylbromid (978 mg, 8.22 mmol, 4.00 Äq.) versetzt und für weitere 18 h gerührt. Durch Zugabe von Wasser wurde die Reaktion beendet und mit zwei Mal 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (0 - 40% EE in Hexan). Es wurden 61 % des Produkts (661 mg, 1.25 mmol) als farbloser Schaum erhalten.

**DC** (Hexan/EE 1:1):  $R_f = 0.43$

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 11.44 (s, 1H, NH.), 7.45 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 6.16 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, H-1'), 5.59 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 4.44 (m, 1H, H-2'), 4.14 (m, 3H, H-3' &  $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 4.01 (m, 2H, H-5'), 3.76 (dt,  $J = 8.6, 2.9$  Hz, 1H, H-4'), 3.46 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H',  $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 1.03 (m, 28H, 8x  $\text{CH}_3$  & 4x CH).

**2'-*O*-Propargyl-uracil-1- $\beta$ -D-arabinofuranosid (59)**

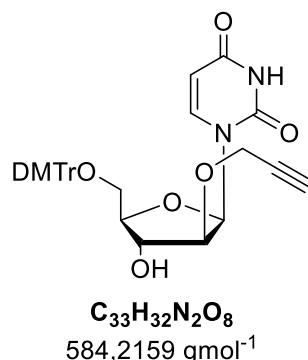


Zu einer Lösung aus 650 mg **58** (1.24 mmol, 1.00 Äq.) in 17 mL abs. THF wurden 3.10 mL 1M TBAF-Lösung in THF (810 mg, 3.10 mmol, 2.50 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Zum Entfernen der Fluoride wurde die Lösung auf eine Kieselgel-Säule gegeben und mit DCM/MeOH 5:1 eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 10:1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 97 % (340 mg, 1.20 mmol) erhalten.

**DC** (DCM/MeOH 9:1): R<sub>f</sub> = 0.12

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 11.35 (s, 1H, NH.), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.13 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H-1'), 5.64 (d, J = 4.9 Hz, 1H, OH-3'), 5.60 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.04 (t, J = 5.4 Hz, 1H, OH-5'), 4.16 (d, J = 2.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CCH), 4.11 (t, J = 5.1 Hz, 1H, H-2'), 4.06 (q, J = 5.1 Hz, 1H, H-3'), 3.62 (m, 3H, H-4' & H-5'), 3.45 (t, J = 2.4 Hz, 1H', OCH<sub>2</sub>CCH).

**5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2'-O-Propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (60)**

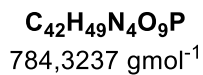
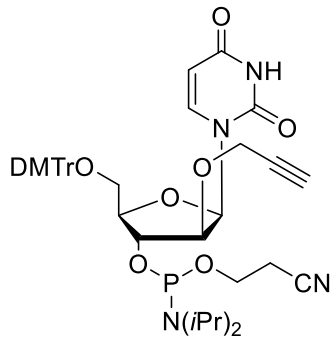


Unter Feuchtigkeitsausschluss wurden 340 mg **59** (1.20 mmol, 1.00 Äq.) in 14 mL abs. Pyridin gelöst und mit 490 mg 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1.45 mmol, 1.20 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden 5 mL MeOH zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL Ethylacetat aufgenommen, drei Mal mit 20 mL einer 1M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels Säulen-chromatographie (DCM/MeOH 99:1+0.1% NEt<sub>3</sub>) gereinigt. Es wurden 77 % (544 mg, 0.924 mmol) Produkt erhalten.

**DC** (DCM/MeOH 5:1 + 0.1 % NEt<sub>3</sub>): R<sub>f</sub> = 0.73.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 11.36 (s, 1H, NH), 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.36 (s, 5H, DMTr), 7.25 (d, J = 7.7 Hz, 4H, DMTr), 6.90 (d, J = 8.0 Hz, 4H, DMTr), 6.17 (d, J = 5.0 Hz, 1H, H-1'), 5.72 (d, J = 4.9 Hz, 1H, OH-3'), 5.33 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5), 4.12 (dd, J = 5.2, 3.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CCH), 3.86 (q, J = 4.7 Hz, 1H, H-4'), 3.74 (s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3.43 (t, J = 2.3 Hz, 1H', OCH<sub>2</sub>CCH), 3.25 (m, 2H, H-5').

**5'-O-4,4'-Dimethoxytrityl-2'-O-Propargyl-uracil-1-β-D-arabinofuranosid (cAraU)**



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 60 mg **60** (0.103 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL trockenem DCM gelöst und mit 54 µL DIPEA (39.8 mg, 0.308 mmol, 3.00 Äq.) und 34 µL 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (36.6 mg, 0.155 mmol, 1.50 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend direkt, ohne Entfernung des Lösungsmittels, mittels Säulenchromatographie (DCM/Aceton 5:1+0.1% NEt<sub>3</sub>) gereinigt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 82 % (66 mg, 0.084 mmol) erhalten.

**DC** (DCM/Aceton 5:1 + 0.1% NEt<sub>3</sub>): R<sub>f</sub> = 0.49.

Das Produkt wurde direkt als 0.1 M Lösung in Acetonitril für den Einbau in RNA verwendet.

## 7.3 Oligonukleotide

### 7.3.1 Synthese modifizierter DNA

#### Allgemein

Die zuvor synthetisierten artifiziellen Nukleoside wurden unter Verwendung der Standard-Phosphoramidit-Methode über einen *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A in die Oligonukleotide eingebaut. Alle Phosphoramidite wurden in Acetonitril oder Dichlormethan gelöst (0.067 M natürliche Phosphoramidite von SIGMA ALDRICH, 0.083 M käuflich erhältliches cU-Phosphoramidit CHEMGENES, 0.1 M artifizielle Bausteine) in den Synthesizer eingesetzt. Als feste Phase dienten CPG-Säulchen von SIGMA ALDRICH mit einer Belegungsdichte von 1  $\mu$ M.

#### Syntheseprotokoll

Im Syntheseprotokoll können die einzelnen Teilschritte des Synthesesyklus festgelegt und bei Bedarf angepasst werden. Für den Einbau der modifizierten Phosphoramidite ist es essentiell die Kupplungsdauer sowie die Menge an Reagenz im Kupplungsprotokoll zu ändern. Zum Vergleich sind in Tabelle 7 das Standardsyntheseprotokoll und in Tabelle 8 die angepassten Kupplungsprotokolle für die Bausteine **cU**, **cB** und **cR** zu sehen.

*Tabelle 10:* Standardsyntheseprotokoll.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>ENTSCHÜTZUNG</b>							
<b>1</b>	4	TCA		COL			
<b>2</b>	20	TCA		TRM	ON		
<b>3</b>					ON		
<b>4</b>						15	
<b>5</b>	15	TCA		TRM	ON		
<b>6</b>					ON		
<b>7</b>						15	
<b>8</b>	15	TCA		TRM	ON		
<b>9</b>					ON		
<b>10</b>						15	
<b>11</b>	15	TCA		TRM	ON		
<b>12</b>					ON		



Experimenteller Teil

<b>13</b>						15
<b>14</b>	15	TCA		TRM	ON	
<b>15</b>					ON	
<b>16</b>						15
<b>17</b>	30	GAS		TRM		
<b>18</b>	10	ACN		M_W		
<b>19</b>	20	ACN		COL	ON	
<b>20</b>					ON	
<b>21</b>						4
<b>22</b>	30	GAS		COL		
<b>23</b>	2	ACN		M_W		
<b>24</b>	20	ACN		COL	ON	
<b>25</b>					ON	
<b>KUPPLUNG</b>						
<b>1</b>	15	GAS		COL		2
<b>2</b>	2	TET		COL	ON	
<b>3</b>					ON	
<b>4</b>						2 1
<b>BRANCH</b>						
<b>1</b>	4	TET		COL	ON	
<b>2</b>	8	AMD	TET	COL		
<b>3</b>					ON	
<b>4</b>						8
<b>5</b>	4	AMD	TET	COL	ON	
<b>6</b>					ON	
<b>7</b>	10	ACN		M_W		
<b>8</b>	10	GAS		M_W		
<b>KUPPLUNG</b>						
<b>1</b>	10	ACN		M_W		50
<b>2</b>		WMO				90
<b>3</b>		WMO				90
<b>4</b>	10	ACN		COL	ON	
<b>5</b>					ON	
<b>6</b>	35	GAS		COL		
<b>7</b>	20	GAS		M_W		

Experimenteller Teil

<b>CAPPING</b>						
<b>1</b>	20	CP_A	CP_B	COL	ON	
<b>2</b>					ON	
<b>3</b>						15
<b>4</b>	3	CP_A	CP_B	COL	ON	
<b>5</b>					ON	
<b>6</b>						15
<b>7</b>	20	GAS		COL		
<b>8</b>	2	ACN		M_W		
<b>9</b>	12	ACN		COL	ON	
<b>10</b>					ON	
<b>11</b>	10	GAS		M_W		2
<b>12</b>	30	GAS		COL		
<b>OXIDATION</b>						
<b>1</b>	20	OXI		COL	ON	
<b>2</b>					ON	
<b>3</b>	10	ACN		M_W		9
<b>4</b>						9
<b>5</b>		WTH				150
<b>6</b>		WTH				150
<b>7</b>	30	GAS		COL		
<b>8</b>	2	ACN		M_W		
<b>9</b>	16	ACN		COL	ON	
<b>10</b>					ON	
<b>11</b>	20					
<b>12</b>	30	GAS		COL		
<b>13</b>	2	ACN		M_W		
<b>14</b>	15	ACN		COL	ON	
<b>15</b>					ON	
<b>16</b>	40					
<b>17</b>	15	ACN		COL	ON	
<b>18</b>					ON	
<b>19</b>	50					
<b>20</b>	10	GAS		M_W		
<b>21</b>	30	GAS		COL		

## Experimenteller Teil

Wie bereits beschrieben wurde für den Einbau der Linker **cU**, **cB** sowie **cR** das Kupplungsprotokoll modifiziert.

*Tabelle 11:* Kupplungsprotokoll für **cU** bzw. **cB**.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>BRANCH</b>							
<b>1</b>	4	TET		COL	ON		
<b>2</b>	4	AMD	TET	COL			
<b>3</b>					ON		
<b>4</b>						60	
<b>5</b>						60	
<b>6</b>	4	AMD	TET	COL			
<b>7</b>					ON		
<b>8</b>						60	
<b>9</b>						60	
<b>10</b>	4	TET		COL	ON		
<b>11</b>					ON		
<b>12</b>	20	ACN		M_W			
<b>13</b>	20	GAS		M_W			

*Tabelle 12:* Kupplungsprotokoll für **cR**.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>BRANCH</b>							
<b>1</b>	20	_O_		COL	ON		
<b>2</b>	4	TET	_O_	COL	ON		
<b>3</b>	4	AMD	TET	COL			
<b>4</b>					ON		
<b>5</b>						90	
<b>6</b>						90	
<b>7</b>						90	
<b>8</b>						90	
<b>9</b>	4	AMD	TET	COL	ON		
<b>10</b>					ON		
<b>11</b>						90	

## Experimenteller Teil

---

<b>12</b>				90
<b>13</b>				90
<b>14</b>				90
<b>15</b>	20	_O_	COL	ON
<b>16</b>	20	ACN	COL	ON
<b>17</b>	20	ACN	M_W	
<b>18</b>	20	GAS	M_W	

---

### Aufarbeitung

Nach erfolgreicher Synthese wurden die CPG-Säulchen im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Granulat in Eppendorf-Gefäße überführt und mit 700  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydroxid-Lösung (>25 %, *trace select*, FLUKA) versetzt, um die Stränge von der festen Phase abzuspalten sowie Schutzgruppen zu entfernen. Diese Suspension wurde über Nacht bei 55 °C im Heizblock erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und im Vakuumkonzentrator von Ammoniak (60 min, 35 °C, 100 mbar) befreit. Die überstehende Lösung wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß filtriert und das Granulat zweimal mit je 200  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden lyophilisiert (25 °C, 0.1 mbar).

### Postsynthetische Click-Reaktion an Alkin-modifizierten Oligonukleotiden

Zur Anknüpfung der Farbstoffe an die Alkin-modifizierten Bausteine wurde eine „Click“-Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die Proben in 50  $\mu\text{L}$  Wasser gelöst und nacheinander mit 114  $\mu\text{L}$  (1.14  $\mu\text{mol}$ , 1.14 Äq.) Farbstoff-Lösung (10 mM in DMSO/t-BuOH 3:1), einem Gemisch aus 34  $\mu\text{L}$  (3.40  $\mu\text{mol}$ , 3.40 Äq.) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/t-BuOH 3:1) und 17  $\mu\text{L}$  (1.70  $\mu\text{mol}$ , 1.70 Äq.) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung sowie 25  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}$ , 10.0eq.) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser) versetzt und bei 60 °C ca. 1.5 Stunden erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde regelmäßig durchmischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung in ein Falcon überführt und zum Ausfällen der DNA 150  $\mu\text{L}$  Na<sub>2</sub>EDTA (40 mM in Wasser) und 450  $\mu\text{L}$  Natriumacetat (0.3 M in Wasser) zugeben. Das Eppendorf-Gefäß wurde zweimal mit 1 mL Ethanol gewaschen, anschließend das Falcon auf 10 mL mit Ethanol aufgefüllt und über Nacht bei -32 °C aufbewahrt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm), zweimal mit 80 %-igem Ethanol gewaschen und das Pellet im Hochvakuum getrocknet.

### Reinigung modifizierter DNA mittels semi-präparativer HPLC

Die Trennung der markierten DNA von unmarkierten Sequenzen, Abbruchsträngen sowie überschüssigem Farbstoff wurde an einer semipräparative *reversed-phase* HPLC (SUPELCO *Discovery*<sup>®</sup> *BIO Wide Pore* C18-Säule 250 x 10 mm, 5 µm) durchgeführt. Dazu wurde die unreine Probe, in ca. 300 µL HPLC-Wasser aufgenommen, injiziert. Das Produkt konnte über die jeweilige Wellenlänge des angeknüpften Farbstoffes sowie der charakteristischen Absorptionswellenlänge von Oligonukleotiden detektiert und fraktionsweise aufgesammelt werden. Die verwendeten Gradienten sind in Kapitel 7.3.3 aufgelistet.

### Charakterisierung durch Massenspektrometrie

Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels MALDI-TOF verifiziert. Die Massenspektren wurden wie in Kapitel 7.1 beschrieben vermessen. Alle reinen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

### Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der DNA-Proben nach dem Lambert-Beer-Gesetz zu berechnen, wurde an einem *ND-1000 Spektrophotometer* von NANODROP (im Nukleinsäure-Modus) die optische Dichte bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{260}$  eines unmodifizierten Oligonukleotides bei 260 nm in Wasser ergibt sich dabei aus der Formel:

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

$$\epsilon_{dA} = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad \epsilon_{dG} = 11.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{dC} = 7.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad \epsilon_{dT} = 8.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

dX	Anzahl der Nukleoside
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 260$ nm
Faktor 0.9	berücksichtigt Hypochromizität

Der molare Extinktionskoeffizient der artifiziellen Bausteine wurde zuvor über konzentrationsabhängige Absorptionsmessungen bestimmt und anschließend zum Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Oligonukleotids addiert. Die molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{260}$  der einzelnen Oligonukleotide sind in Kapitel 7.3.4 aufgeführt.

**Tabelle 13:** Molare Extinktionskoeffizienten der modifizierten Nukleoside und Farbstoffe.

<b>Modifikation</b>	<b><math>\epsilon_{260}</math> [mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]</b>
<b>cU</b>	10.1
<b>Az-dU/Az-U</b>	5.1
<b>cB</b>	0
<b>cR</b>	0
<b>Cy5</b>	7.5
<b>CyIP</b>	18.9
<b>TO1</b>	9.4
<b>TO2</b>	9.4

### Hybridisierung

Die Hybridisierung der modifizierten Einzelstränge mit 1.0 eq. des komplementären Gegenstranges erfolgte in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP<sub>i</sub>; pH 7.0) und 250 mM Natriumchlorid-Lösung für 10 Minuten bei 90 °C. Anschließend wurde langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten.

### Spektroskopie

Soweit nicht anders angegeben, wurden Absorptions- und Emissionsmessungen einer 2.5 µM DNA-Lösung in 250 mM NaCl und 10 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7.0) bei 20 °C durchgeführt.

### 7.3.2 Synthese modifizierter RNA

#### Allgemein

Die Synthese der modifizierten RNA erfolgte zunächst an einem *PerSpective Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma APPLIED BIOSYSTEMS (ABI) und anschließend an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A, wobei die natürlichen Phosphoramidite sowie CPG-Säulchen von GLEN RESEARCH verwendet wurden. Um eine effektivere Kupplung, trotz sterisch anspruchsvollen 2'-OTBDMS-Gruppen, zu ermöglichen, wurde der Activator (0.45 M Tetrazol in MeCN) gegen den reaktiveren Activator 42<sup>®</sup> ausgetauscht. Zudem wurden alle Schläuche vor dem Austauschen der Reagenzien nacheinander mit Acetonitril, Ethanol und wiederum Acetonitril gespült, um ein RNase freies Arbeiten zu gewährleisten.

### Syntheseprotokoll

Im Vergleich zur DNA-Synthese müssen aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe die Kupplungszeiten erhöht werden. In Tabelle 11 ist beispielhaft ein Standardkupplungsprotokoll dargestellt, wobei die Vergleichswerte für DNA in rot angegeben sind.

*Tabelle 14:* Standardkupplungsprotokoll für RNA.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>KUPPLUNG</b>							
1	15	GAS		COL		2	
2	4 (2)	TET		COL	ON		
3					ON		
4						2	1
<b>BRANCH</b>							
1	4	TET		COL	ON		
2	5 (8)	AMD	TET	COL			
3					ON		
4						60 (8)	
5						60 (0)	
6						60 (0)	
7						60 (0)	
8	5 (4)	AMD	TET	COL	ON		
9					ON		
10						60 (0)	
11						60 (0)	
12						60 (0)	
13						60 (0)	
14	5	TET		COL	ON		
15					ON		
16	20 (10)	ACN		M_W			
17	20 (10)	GAS		M_W			
<b>KUPPLUNG</b>							
5						90 (0)	
6	10	ACN		M_W		90 (50)	
7		WMO				90	

## Experimenteller Teil

<b>8</b>		WMO			90
<b>9</b>	10	ACN	COL	ON	
<b>10</b>				ON	
<b>11</b>	35	GAS	COL		
<b>12</b>	20	GAS	M_W		

Für einen möglichst effizienten Einbau der Linker **cU**, **cL** sowie **cAraU** wurden die Kupplungszeiten weiter erhöht. Die veränderten Zeiten sind in Tabelle 12 rot dargestellt.

*Tabelle 15:* Kupplungsprotokoll für **cU**, **cL** und **cAraU**.

	Zeit [0.1 s]	Reagenz 1	Reagenz 2	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>BRANCH</b>							
<b>1</b>	4	TET		COL	ON		
<b>2</b>	5	AMD	TET	COL			
<b>3</b>					ON		
<b>4</b>						60	
<b>5</b>						60	
<b>6</b>						60	
<b>7</b>						60	
<b>8</b>						60	
<b>9</b>	5	AMD	TET	COL	ON		
<b>10</b>					ON		
<b>11</b>						60	
<b>12</b>						60	
<b>13</b>						60	
<b>14</b>						60	
<b>15</b>						60	
<b>16</b>	5	TET		COL	ON		
<b>17</b>					ON		
<b>18</b>	20	ACN		M_W			
<b>19</b>	20	GAS		M_W			



### **Aufarbeitung**

Im Anschluss an die Synthese, wurden die CPG-Säulchen am Hochvakuum getrocknet und anschließend die RNA direkt auf dem Säulchen abgespalten. Dazu wurde eine 1 mL-Spritze auf das eine Ende des Säulchens und eine zweite Spritze, mit 1 mL einer 1:1 Mischung aus Methylamin (in Ethanol) und konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (>25 %, *trace select*, FLUKA) gefüllt, in das zweite Ende gesteckt. Die Lösung wurde vorsichtig 3-4 Mal hin und her gespült und für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Abspaltlösung wurde in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt, das Säulchen mit 0.5 mL Lösung nachgespült und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Ammoniak im Vakuumkonzentrator entfernt (60 min, 34 °C, 100 mbar) und die Probe lyophilisiert (25 °C, 0.1 mbar).

### **Postsynthetische Click-Reaktion an Alkin-modifizierten Oligonukleotiden**

Die Click-Reaktion wurde analog zu den DNA-Click-Versuchen durchgeführt. Allerdings wurde die Probe, aufgrund der schlechteren Löslichkeit, in 100 µL Wasser gelöst und alle wässrigen Lösungen mit RNase freiem (DEPC behandelten) Wasser vorbereitet.

### **Entfernung der 2'-O-TBDMS-Schutzgruppe**

Um die 2'-Silylschutzgruppen zu entfernen, wurden die RNA-Pellets in 300 µL DMSO suspendiert, 300 µL Triethylamin-Trihydrofluorid zugegeben und für 2.5 Stunden bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 600 µL Isopropyltrimethylsilylether durchmischt, um die Fluoridionen zu entfernen, und die RNA mithilfe von Diethylether über Nacht bei -32 °C ausgefällt. Diese wurde abzentrifugiert, mit 80 %-igem Diethylether gewaschen und getrocknet.

### **Reinigung modifizierter RNA mittels semi-präparativer HPLC**

Vor der semipräparativen Reinigung (Kapitel 7.3.1) der RNA-Stränge wurde das Gerät mit Ethanol gespült, um ein RNase freies Arbeiten zu gewährleisten. Als Laufmittel wurde ein 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer in DEPC behandeltem Wasser hergestellt und die Sequenzen mit steigendem Acetonitril-Gehalt eluiert. Die verwendeten Gradienten und Detektionswellenlängen sind in Kapitel 7.3.3 aufgelistet.

### **Charakterisierung durch Massenspektrometrie**

Wie bereits für die Massenbestimmung von DNA beschrieben, wurde auch die Analyse der RNA durchgeführt. Hierbei wurde allerdings eine RNase freie Matrix (3-HPA) verwendet.

### **Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte analog zur DNA (Kapitel 7.3.1). Nachfolgend sind die verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten aufgelistet:

$$\varepsilon_{260} = (r_A \cdot \varepsilon_{rA} + r_C \cdot \varepsilon_{rC} + r_G \cdot \varepsilon_{rG} + r_U \cdot \varepsilon_{rU}) \cdot 0.9$$

$$\varepsilon_{rA} = 15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad \varepsilon_{rG} = 11.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{rC} = 7.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad \varepsilon_{rU} = 9.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

### 7.3.3 HPLC-Methoden

**Tabelle 16:** HPLC-Methode zur Aufreinigung der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloadditionen.

<b>Modifikation</b>	<b>Gradient</b> [% B in A]	<b>Laufzeit</b> [min]	<b>Temperatur</b> [°C]	<b>λ [nm]</b>
Az-dU, Az-U	0-15	20	25	230, 260, 290

**Tabelle 17:** HPLC-Methoden der modifizierten DNA-Sequenzen.

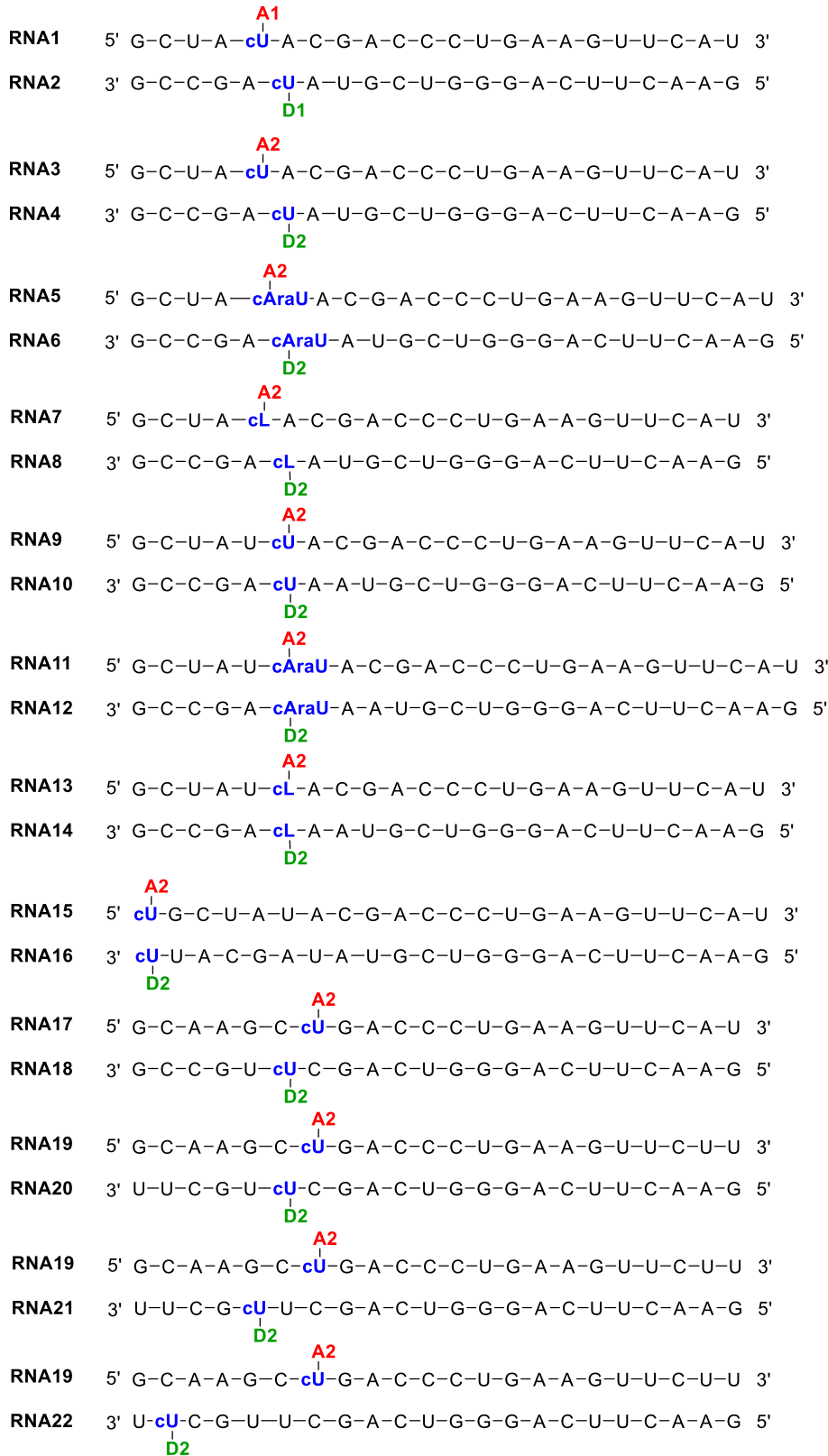
<b>DNA</b>	<b>Modifikation</b>	<b>Gradient</b> [% B in A]	<b>Laufzeit</b> [min]	<b>Temperatur</b> [°C]	<b>λ [nm]</b>
<i>gfp</i> FISH	cU ATTO532	0-15	45	40	260, 532
<i>gfp</i> FISH	cU/cR Cy5	0-60	30	40	260, 649
<i>gfp</i> FISH	cB/cR CyIP	0-15	30	40	260, 435
<i>gfp</i> FISH	cR TO1/TO2	0-15	30	40	260, 512
<i>sox9a</i> FISH	cU	0-15	30	40	260, 290
<i>sox9a</i> FISH	cU Cy5	0-60	30	40	260, 649

**Tabelle 18:** HPLC-Methoden der synthetisierten RNA-Sequenzen..

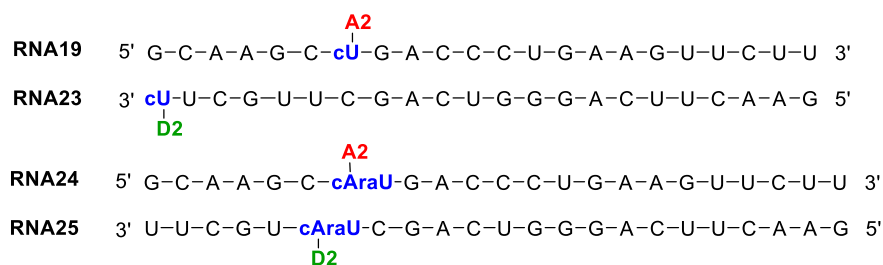
<b>RNA</b>	<b>Modifikation</b>	<b>Gradient</b> [% B in A]	<b>Laufzeit</b> [min]	<b>Temperatur</b> [°C]	<b>λ [nm]</b>
RNA1	cU A1	0-17	45	60	550
RNA2	cU D1	0-15	45	60	462
RNA3-RNA13	cU/cL/cAraU A2	0-30	40	60	647
RNA4-RNA18	cU/cL/cAraU D2	0-25	40	60	532
RNA15, RNA17	cU A2	0-30	20	60	647

### 7.3.4 Sequenzen und Charakterisierung der Oligonukleotide

#### siRNA



## Experimenteller Teil



**Tabelle 19:** Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der siRNA Stränge **RNA1-RNA21** aus Kapitel 5.

	$\epsilon_{260}$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	berechnete Masse [gmol <sup>-1</sup> ]	gefundene Masse [gmol <sup>-1</sup> ]
<b>RNA1</b>	231.2	7441.2	7448.8
<b>RNA2</b>	230.0	7410.2	7419.8
<b>RNA3</b>	232.2	7843.0	7848.1
<b>RNA4</b>	251.0	7938.0	7946.0
<b>RNA5</b>	232.2	7844.3	7844.8
<b>RNA6</b>	251.0	7939.0	7934.9
<b>RNA7</b>	214.0	7735.0	7739.3
<b>RNA8</b>	232.8	7830,0	7852.5
<b>RNA9</b>	241.1	8149.0	8167.4
<b>RNA10</b>	264.8	8267.0	8286.4
<b>RNA11</b>	241.1	8150.3	8150.2
<b>RNA12</b>	264.8	8268.2	8286.1
<b>RNA13</b>	222.9	8041.1	8051.7
<b>RNA14</b>	246.7	8159.1	8162.0
<b>RNA15</b>	241.1	8149.0	8180.2
<b>RNA16</b>	265.8	8229.0	8232.3
<b>RNA17</b>	233.6	7882.0	7884.9
<b>RNA18</b>	243.6	7914.0	7919.3
<b>RNA19</b>	228.7	7859.0	7884.9
<b>RNA20</b>	244.6	7875.9	7879.4
<b>RNA21</b>	244.6	7875.9	3938.1
<b>RNA22</b>	244.6	7875.9	3941.9
<b>RNA23</b>	244.6	7875.9	3939.4
<b>RNA24</b>	228.7	7860.3	7860.4
<b>RNA25</b>	244.6	7877.1	7884.4

**gfp FISH-Sonden**

cU FISH1	3' C-cU-A-C-C-A-C-T-C-G-T-T-C-C-C-G-C	5'
cU FISH2	3' T-C-G-A-C-A-A-G-cU-G-G-C-C-C-C-A-C	5'
cU FISH3	3' G-G-G-cU-A-G-G-A-C-C-A-G-C-T-C-G-A	5'
cU FISH4	3' G-C-C-G-C-cU-G-C-A-T-T-T-G-C-C-G-C	5'
cU FISH5	3' cU-C-A-A-G-T-C-G-C-A-C-A-G-G-C-C-G	5'
cU FISH6	3' C-C-G-C-cU-C-C-C-G-C-T-A-C-G-G-T-G	5'
cU FISH7	3' G-C-C-G-cU-T-C-G-A-C-T-G-G-G-A-C-T	5'
cU FISH8	3' A-G-cU-A-G-A-C-G-T-G-G-T-G-G-C-C-G	5'
cU FISH9	3' G-A-C-G-G-G-C-A-C-G-G-G-A-C-C-G-G	5'
cU FISH10	3' G-G-A-G-C-A-C-cU-G-G-T-G-G-G-A-C-T	5'
cU FISH11	3' cU-G-C-C-G-C-A-C-G-T-C-A-C-G-A-A-G	5'
cU FISH12	3' G-C-G-A-cU-G-G-G-G-C-T-G-G-T-G-T-A	5'
cU FISH13	3' C-G-cU-C-G-T-G-C-T-G-A-A-G-A-A-G-T	5'
cU FISH14	3' G-G-C-G-G-cU-A-C-G-G-G-C-T-T-C-C-G	5'
cU FISH15	3' C-A-G-G-cU-C-C-T-C-G-C-G-T-G-G-T-A	5'
cU FISH16	3' G-A-A-G-cU-T-C-C-T-G-C-T-G-C-C-G-T	5'
cU FISH17	3' cU-G-T-T-C-T-G-G-G-C-G-C-G-G-C-T-C	5'
cU FISH18	3' T-cU-C-A-A-G-C-T-C-C-C-G-C-T-G-T-G	5'
cU FISH19	3' C-C-A-C-cU-T-G-G-C-G-T-A-G-C-T-C-G	5'
cU FISH20	3' cU-C-C-C-G-T-A-G-C-T-G-A-A-G-T-T-C	5'
cU FISH21	3' C-cU-G-C-C-G-T-T-G-T-A-G-G-A-C-C-C	5'
cU FISH22	3' G-T-cU-C-G-A-C-C-T-C-A-T-G-T-T-G-A	5'
cU FISH23	3' T-G-cU-C-G-G-T-G-T-T-G-C-A-G-A-T-A	5'
cU FISH24	3' cU-A-C-C-G-G-C-T-G-T-T-C-G-T-C-T-T	5'
cU FISH25	3' G-C-C-G-cU-A-G-T-T-C-C-A-C-T-T-G-A	5'
cU FISH26	3' T-C-cU-A-G-G-C-G-G-T-G-T-T-G-T-A-G	5'
cU FISH27	3' C-cU-G-C-C-G-T-C-G-C-A-C-G-T-C-G-A	5'
cU FISH28	3' G-C-cU-G-G-T-G-A-T-G-G-T-C-G-T-C-T	5'
cU FISH29	3' G-G-G-G-G-cU-A-G-C-C-G-C-T-G-C-C-G	5'
cU FISH30	3' C-A-C-G-A-C-G-A-C-G-G-G-C-cU-G-T-T	5'
cU FISH31	3' G-A-cU-G-G-A-C-T-C-G-T-G-G-G-T-C-A	5'
cU FISH32	3' G-G-G-A-C-cU-C-G-T-T-T-C-T-G-G-G-G	5'
cU FISH33	3' C-cU-C-T-T-C-G-C-G-C-T-A-G-T-G-T-A	5'
cU FISH34	3' G-G-A-C-G-A-C-C-cU-C-A-A-G-C-A-C-T	5'
cU FISH35	3' G-G-C-G-G-C-C-C-cU-A-G-T-G-A-G-A-G	5'
cU FISH36	3' cUA-C-C-T-G-C-T-C-G-A-C-A-T-G-T-T	5'

## Experimenteller Teil

**Tabelle 20:** Extinktionskoeffizient und MALDI-MS-Analytik der cU-modifizierten *gfp*-FISH-Sequenzen **FISH1-36** aus Kapitel 4 sowie die durchschnittlichen Werte der ATTO532 und Cy5-geclickten Stränge.

	$\epsilon_{260}$	berechnete Masse	gefundene Masse
	[mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	[gmol <sup>-1</sup> ]	[gmol <sup>-1</sup> ]
<b>cU FISH1</b>	149.9	5079.8	5088.7
<b>cU FISH2</b>	169.7	5177.9	5173.2
<b>cU FISH3</b>	181.5	5297.9	5297.7
<b>cU FISH4</b>	158.4	5215.8	5220.9
<b>cU FISH5</b>	173.6	5217.9	5215.1
<b>cU FISH6</b>	153.1	5160.8	5161.1
<b>cU FISH7</b>	165.7	5239.9	5251.2
<b>cU FISH8</b>	179.6	5328.9	5341.3
<b>cU FISH9</b>	169.2	5283.9	5281.1
<b>cU FISH10</b>	179.6	5328.9	5327.5
<b>cU FISH11</b>	173.6	5217.9	5209.9
<b>cU FISH12</b>	177.6	5359.9	5396.5
<b>cU FISH13</b>	180.3	5287.9	5293.4
<b>cU FISH14</b>	165.0	5280.9	5287.9
<b>cU FISH15</b>	165.7	5239.9	5233.6
<b>cU FISH16</b>	163.1	5214.8	5213.0
<b>cU FISH17</b>	156.4	5246.8	5245.7
<b>cU FISH18</b>	159.1	5174.8	5206.0
<b>cU FISH19</b>	161.7	5199.8	5196.4
<b>cU FISH20</b>	166.4	5198.9	5203.6
<b>cU FISH21</b>	161.7	5199.8	5201.7
<b>cU FISH22</b>	167.8	5213.9	5216.8
<b>cU FISH23</b>	175.7	5293.9	5305.7
<b>cU FISH24</b>	154.5	5180.8	5184.9
<b>cU FISH25</b>	166.4	5198.9	5206.0
<b>cU FISH26</b>	172.4	5309.9	5329.3
<b>cU FISH27</b>	160.4	5184.8	5190.2
<b>cU FISH28</b>	165.1	5285.8	5286.9
<b>cU FISH29</b>	167.6	5305.9	5310.6
<b>cU FISH30</b>	171.6	5248.9	5251.0
<b>cU FISH31</b>	176.9	5303.9	5306.5
<b>cU FISH32</b>	167.7	5310.9	5315.0

## Experimenteller Teil

<b>cU FISH33</b>	160.5	5189.8	5193.1
<b>cU FISH34</b>	176.9	5201.9	5205.9
<b>cU FISH35</b>	178.2	5313.9	5314.7
<b>cU FISH36</b>	163.8	5173.8	5184.1
<b>FISH1-FISH36 ATTO532</b>	190.7	6063.3	6062.3
<b>FISH1-FISH36 Cy5</b>	175.2	5790.5	5797.2

<b>cU FISH1</b>	3' C- <b>cU</b> -A-C-C-A-C-T-C-G-T-T-C-C-C-G-C	5'
<b>cU FISH2</b>	3' T-C-G-A-C-A-A-G- <b>cU</b> -G-G-C-C-C-C-A-C	5'
<b>cU FISH3</b>	3' G-G-G- <b>cU</b> -A-G-G-A-C-C-A-G-C-T-C-G-A	5'

**Tabelle 21:** Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der **cU-Cy5**-modifizierten *gfp*-FISH-Sequenzen aus Kapitel 4.3.1.

	$\epsilon_{260}$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	berechnete Masse [gmol <sup>-1</sup> ]	gefundene Masse [gmol <sup>-1</sup> ]
<b>cU FISH1 Cy5</b>	157.4	5645.2	5645.6
<b>cU FISH2 Cy5</b>	177.2	5743.3	5743.4
<b>cU FISH3 Cy5</b>	189.0	5863.3	5866.2

<b>cB FISH1</b>	3' C- <b>cB</b> -A-C-C-A-C-T-C-G-T-T-C-C-C-G-C	5'
<b>cB FISH2</b>	3' T-C-G-A-C-A-A-G- <b>cB</b> -G-G-C-C-C-C-A-C	5'
<b>cB FISH3</b>	3' G-G-G- <b>cB</b> -A-G-G-A-C-C-A-G-C-T-C-G-A	5'

**Tabelle 22:** Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der **cB-CyIP**-modifizierten *gfp*-FISH-Sequenzen aus Kapitel 4.3.2.

	$\epsilon_{260}$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	berechnete Masse [gmol <sup>-1</sup> ]	gefundene Masse [gmol <sup>-1</sup> ]
<b>cB FISH1 CyIP</b>	150.5	5229.3	5229.0
<b>cB FISH2 CyIP</b>	170.3	5327.3	5328.0
<b>cB FISH3 CyIP</b>	182.2	5447.4	5448.0



## Experimenteller Teil

<b>cR FISH1</b>	3' C- <b>cR</b> -A-C-C-A-C-T-C-G-T-T-C-C-C-G-C	5'
<b>cR FISH2</b>	3' T-C-G-A-C-A-A-G- <b>cR</b> -G-G-C-C-C-C-A-C	5'
<b>cR FISH3</b>	3' G-G-G- <b>cR</b> -A-G-G-A-C-C-A-G-C-T-C-G-A	5'

**Tabelle 23:** Extinktionskoeffizienten und MALDI-MS-Analytik der **cR $\alpha$ /cR $\beta$** -modifizierten *gfp*-FISH-Sequenzen aus Kapitel 4.3.2.

	$\emptyset\epsilon_{260}$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	berechnete Masse [gmol <sup>-1</sup> ]	gefundene Masse cR $\alpha$ [gmol <sup>-1</sup> ]	gefundene Masse cR $\beta$ [gmol <sup>-1</sup> ]
<b>cR FISH1 Cy5</b>	139.2	5505.7	-	-
<b>cR FISH2 Cy5</b>	159.0	5603.8	-	5610.4
<b>cR FISH3 Cy5</b>	170.9	5723.8	-	5726.8
<b>cR FISH1 CyIP</b>	150.5	5283.4	5274.7	-
<b>cR FISH2 CyIP</b>	170.3	5381.4	5372.3	5375.6
<b>cR FISH3 CyIP</b>	182.2	5501.4	5499.9	5502.9
<b>cR FISH1 TO1</b>	141.1	5316.4	5316.5	5407.9
<b>cR FISH2 TO1</b>	160.9	5414.5	5415.3	5417.4
<b>cR FISH3 TO1</b>	172.8	5534.5	5541.0	5540.1
<b>cR FISH1 TO2</b>	141.1	5286.4	5289.0	-
<b>cR FISH2 TO2</b>	160.9	5384.4	5389.4	5381.8
<b>cR FISH3 TO2</b>	172.8	5504.4	5506.7	5502.6

**sox9a FISH-Sonden**

<b>soxFISH1</b>	3'	G-cU-A-C-T-T-A-G-A-G-G-A-G-C-T-G-G-G-G-A	5'
<b>soxFISH2</b>	3'	C-cU-G-C-C-T-A-C-T-C-G-T-T-C-T-C-T-T-C-A	5'
<b>soxFISH3</b>	3'	A-C-G-cU-G-G-G-T-C-A-G-G-C-T-C-G-T-A-C-A	5'
<b>soxFISH4</b>	3'	G-A-G-cU-C-T-G-T-G-A-C-T-C-T-T-G-T-G-C-G	5'
<b>soxFISH5</b>	3'	C-cU-T-G-T-C-G-G-A-G-G-A-C-C-G-A-C-G-T-C	5'
<b>soxFISH6</b>	3'	G-C-C-cU-C-T-G-A-A-G-T-T-C-T-T-C-C-T-G-C	5'
<b>soxFISH7</b>	3'	C-A-A-G-G-G-C-C-A-C-A-C-G-cU-A-G-G-C-T-C	5'
<b>soxFISH8</b>	3'	G-G-cU-C-C-A-C-G-A-C-T-T-C-C-C-A-A-T-G-C	5'
<b>soxFISH9</b>	3'	C-C-A-C-G-G-G-cU-A-C-G-G-C-C-A-C-T-C-C-C	5'
<b>soxFISH10</b>	3'	G-cU-C-G-T-T-T-T-G-T-T-C-G-G-C-G-T-G-C	5'
<b>soxFISH11</b>	3'	C-cU-A-C-T-T-G-C-G-C-A-A-A-T-A-C-C-A-C-A	5'
<b>soxFISH12</b>	3'	C-C-G-C-G-C-G-cU-C-C-T-T-T-G-A-C-C-G-G-C	5'
<b>soxFISH13</b>	3'	C-G-cU-G-G-A-G-G-T-G-T-T-G-C-G-C-C-T-C-G	5'
<b>soxFISH14</b>	3'	A-G-A-C-C-C-cU-T-T-T-G-A-A-A-C-C-T-C-T-A	5'
<b>soxFISH15</b>	3'	C-C-A-C-C-cU-T-T-T-C-G-C-A-G-G-G-A-A-G-C	5'
<b>soxFISH16</b>	3'	cU-C-T-C-G-C-G-G-A-A-G-C-C-C-A-C-G-T-C-G	5'
<b>soxFISH17</b>	3'	A-G-cU-G-G-G-G-C-T-G-A-T-A-T-T-C-A-T-G-G	5'
<b>soxFISH18</b>	3'	C-cU-C-C-T-T-C-A-G-C-C-A-C-T-T-C-T-T-G-C	5'
<b>soxFISH19</b>	3'	cU-A-G-A-C-T-T-C-T-G-C-C-G-T-C-G-C-T-T-G	5'
<b>soxFISH20</b>	3'	G-A-G-C-G-G-G-cU-T-G-C-G-G-T-A-G-A-A-G-T	5'
<b>soxFISH21</b>	3'	C-G-cU-C-C-G-C-C-T-G-A-G-C-G-G-G-C-G-C-A	5'
<b>soxFISH22</b>	3'	cU-C-T-T-C-A-C-G-T-G-A-G-C-G-G-G-T-C-G-C	5'
<b>soxFISH23</b>	3'	G-G-cU-C-A-G-G-G-T-C-C-C-C-G-G-C-G-G-G-T	5'
<b>soxFISH24</b>	3'	G-cU-G-G-G-G-C-T-T-T-T-G-A-C-T-G-T-G-T-G	5'
<b>soxFISH25</b>	3'	cU-C-G-C-C-T-A-G-A-C-T-T-T-G-C-T-C-T-C-C	5'
<b>soxFISH26</b>	3'	A-G-cU-C-C-T-T-T-T-G-T-G-G-C-C-T-G-C-A-G	5'
<b>soxFISH27</b>	3'	G-cU-T-G-A-A-G-G-T-C-C-T-G-C-A-C-C-T-A-T	5'
<b>soxFISH28</b>	3'	C-cU-C-G-T-C-G-C-T-A-C-A-A-T-A-G-C-T-T-T	5'
<b>soxFISH29</b>	3'	G-cU-T-A-C-T-C-A-A-A-C-T-G-G-T-T-A-T-G-G	5'
<b>soxFISH30</b>	3'	G-C-C-A-G-cU-G-G-T-C-T-T-G-C-G-T-G-G-G-A	5'
<b>soxFISH31</b>	3'	cU-A-T-G-C-G-G-C-G-G-A-C-C-T-A-C-T-G-G-T	5'
<b>soxFISH32</b>	3'	G-C-C-G-cU-C-G-G-G-A-G-T-T-T-C-G-T-C-G-G	5'
<b>soxFISH33</b>	3'	C-G-A-C-cU-T-G-G-G-G-C-G-T-C-T-T-G-G-G-C	5'
<b>soxFISH34</b>	3'	cU-T-G-C-T-G-C-G-T-A-T-A-A-T-T-T-T-G-G-C	5'
<b>soxFISH35</b>	3'	G-G-G-C-cU-C-G-G-T-A-A-T-G-T-T-G-C-T-C-G	5'
<b>soxFISH36</b>	3'	A-G-G-C-G-cU-C-G-T-G-T-A-G-T-C-G-A-T-G-C	5'

## Experimenteller Teil

**Tabelle 24:** Extinktionskoeffizient und MALDI-MS-Analytik der **cU**-modifizierten *sox9a*-FISH-Sequenzen **FISH1-36** aus Kapitel 4 sowie die durchschnittlichen Werte der **Cy5**-geclickten Stränge.

	$\epsilon_{260}$	berechnete Masse	gefundene Masse
	[mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	[gmol <sup>-1</sup> ]	[gmol <sup>-1</sup> ]
<b>cU FISH1</b>	219.2	6299.1	6303.0
<b>cU FISH2</b>	175.0	6007.0	6007.0
<b>cU FISH3</b>	203.9	6195.1	6201.0
<b>cU FISH4</b>	193.4	6192.0	6194.0
<b>cU FISH5</b>	196.7	6171.0	6173.0
<b>cU FISH6</b>	181.5	6072.0	6078.0
<b>cU FISH7</b>	204.6	6149.1	6154.0
<b>cU FISH8</b>	192.1	6075.0	6081.0
<b>cU FISH9</b>	186.0	6061.0	6061.0
<b>cU FISH10</b>	181.5	6174.0	6178.0
<b>cU FISH11</b>	206.0	6067.1	6069.0
<b>cU FISH12</b>	178.1	6083.0	6087.0
<b>cU FISH13</b>	191.3	6218.0	6220.0
<b>cU FISH14</b>	201.4	6073.0	6074.0
<b>cU FISH15</b>	196.0	6115.0	6116.0
<b>cU FISH16</b>	191.3	6116.0	6122.0
<b>cU FISH17</b>	210.6	6265.1	6271.0
<b>cU FISH18</b>	173.6	5992.0	5995.0
<b>cU FISH19</b>	185.5	6112.0	6118.0
<b>cU FISH20</b>	215.8	6315.1	6320.0
<b>cU FISH21</b>	190.6	6157.0	6161.0
<b>cU FISH22</b>	190.7	6162.0	6171.0
<b>cU FISH23</b>	192.6	6228.0	6231.0
<b>cU FISH24</b>	195.4	6263.0	6269.0
<b>cU FISH25</b>	177.6	6032.0	6037.0
<b>cU FISH26</b>	189.5	6152.0	6157.0
<b>cU FISH27</b>	198.7	6145.0	6152.0
<b>cU FISH28</b>	192.2	6080.0	6087.0
<b>cU FISH29</b>	207.4	6184.1	6186.0
<b>cU FISH30</b>	198.6	6242.0	6248.0
<b>cU FISH31</b>	198.0	6186.0	6188.0
<b>cU FISH32</b>	191.3	6218.0	6223.0

## Experimenteller Teil

---

<b>cU FISH33</b>	191.3	6218.0	6222.0
<b>cU FISH34</b>	195.5	6166.0	6168.0
<b>cU FISH35</b>	196.0	6217.0	6217.0
<b>cU FISH36</b>	202.0	6226.1	6228.0
<b>FISH1-FISH36 Cy5</b>	201.7	6721.7	6790.5

---

### 7.4 Regulierung der GFP Expression mittels siRNA

Die Probenvorbereitung wurde unter Anleitung von DR. F. RÖNICKE (Institut für Organische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie KIT) im Arbeitskreis von PROF. DR. UTE SCHEPERS (Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie) eigenständig durchgeführt.

#### 7.4.1 Zellkultur

##### **HeLa-Zellen:**

Humane Cervix-Karzinomzellen (HeLa wt) wurden unter sterilen Bedingungen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM Medium) unter Zusatz von 60 µg/mL Penicilin, 100 µg/mL Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FKS, SIGMA ALDRICH) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz adhärent kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (10 mL 0.25 %-ige Trypsinlösung, 10 mL 5 mM EDTA, 30 mL PBS) benetzt und nach dem vollständigen Ablösen die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen. Mithilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und für die Fluoreszenzmikroskopie die entsprechende Menge Zellen in 8-well Zellkultur Objektträger (IBIDI® µ-Slide 8 well) ausgesät.

##### **HeLa-GFP Zellen:**

Humane Cervix-Karzinomzellen, welche GFP exprimieren, wurden aus dem Arbeitskreis von DR. GARY DAVIDSON (Institut für Toxikologie und Genetik am Karlsruher Institut für Technologie KIT) bereitgestellt und zur Selektion mit Blasticidin behandelt. Die weitere Behandlung der HeLa-GFP Zellen erfolgte gemäß der Beschreibung für nicht-transformierte HeLa Zellen.

#### 7.4.2 Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden 24 h vor der Transfektion  $8 \times 10^4$  HeLa Zellen pro Kammer in einem 8-well-Zellkultur-Objektträger (ibidi®  $\mu$ -Slide 8 well) in 200  $\mu$ L Medium ausgesät. Diese wurden anschließend mit 10 pmol bzw. 50 pmol (für das PAMAM Dendrimer) siRNA-Duplex behandelt. Dabei wurden die PAMAM-siRNA-Polyplexe aus einer 5  $\mu$ M siRNA Stammlösung (10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer und 250 mM NaCl, pH 7) und 2.5 eq. PAMAM-Dendrimer hergestellt, mit *ScreenFect*®-*Dilution Buffer* auf eine Endkonzentration von 1  $\mu$ M verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion mit *ScreenFect*® wurde die Probe mit *ScreenFect*®-*Dilution Buffer* auf eine Konzentration von 0.5  $\mu$ M verdünnt, in einem Verhältnis von 1:1 mit einer *ScreenFect*®-Verdünnung (1:14 *ScreenFect*®/*ScreenFect*®-*Dilution Buffer*) vermischt und für 20 min inkubiert. Die Transfektion der PAMAM-siRNA-Polyplexe erfolgte in Serum-freiem Medium, welches nach 8 h durch Serum-haltiges Medium gewechselt wurde.

Nach 24 h, 48 h bzw. 72 h wurden konfokale Laser-Scan-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen an einem LEICA TCS SPE Mikroskop (DMi8) mit ACS APO 63x/1.30 Öl-Objektiv und einer Auflösung von 1024x1024 aufgezeichnet. Hierbei wurde der Donorfarbstoff bei einer Wellenlänge von 532 nm und der Akzeptorfarbstoff bei 635 nm mit einem Argon-Ionen-Laser angeregt. Die jeweiligen Detektionsbereiche sind in den Bildunterschriften der zugehörigen Mikroskopie-Aufnahmen angegeben. Zur Auswertung und Bearbeitung der Zellbilder wurde die Software *Leica Application Suite X* verwendet.

#### 7.5 FLIM Experimente

Die Fluoreszenzlebenszeit-Messungen sowie die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie wurden von DR. MATHILDE BICHELBERGER sowie JENS LACKNER aus dem Arbeitskreis von PROF. DR. ULRICH NIENHAUS (Institut für Angewandte Physik am Karlsruher Institut für Technologie KIT) an einem zeitaufgelösten Konfokalmikroskop (MicroTime 200, PicoQuant, Berlin, Deutschland) vermessen. Der Aufbau basiert auf einem invertierten Mikroskop (IX71, Olympus, Hamburg, Deutschland), wobei der 532 nm gepulste Diodenlaser (LDH-P-FA-530, PicoQuant) durch ein Objektiv (UPlanSApo 60x/1.2W, Olympus) auf die Probe fokussiert wird. Das Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv aufgenommen, durch ein Loch (100  $\mu$ M) geleitet und auf eine Lawinenphotodiode (APD, PD1CTC, Micro Photon Devices, Bozarno, Italien) fokussiert. Ein Emissionsfilter von 575/50 nm (Mitte/Breite) (Chroma,

Bellows Falls, VT, USA) wird verwendet, um möglicherweise verbleibendes Anregungslicht zu trennen. Ankommende Photonen werden mit Pikosekundenzeitauflösung detektiert und ihre Ankunftszeit mit einer einzigen Photonenzählkarte aufgezeichnet (HydraHarp 400 Pikosekundenereignis-Timer und TCSPC-Modul, PicoQuant). Die Datenerfassung erfolgt mit der SymPhoTime-Software (PicoQuant).

### 7.5.1 Messung der Fluoreszenzlebenszeit mittels TCSPC

Zwei Borosilikat-Objektträger (25x40 mm<sup>2</sup> und 20x20 mm<sup>2</sup>, VWR, Radnor, PA) wurden durch kurzzeitige Verbrennung von Verunreinigungen in einer Flamme gereinigt und mit doppelseitigem Klebeband so zusammengeklebt, dass ein 3 mm breiter Kanal in der Mitte gebildet wurde. Der Kanal wurde mit 20 µl einer 250 nM RNA-Lösung (Donor-Einzelstrang, Donor-Doppelstrang oder FRET-Paar) gefüllt. Die Abklingkurven der Lebenszeit wurden in einer 2 min-Punktmessung mit einer Laserpulsfrequenz von 26 MHz und einer Laserleistung von 5 µW erfasst. Die Instrument Antwort Funktion (IRF) wurde unter den gleichen Messbedingungen mit Rose Bengal (Sigma. Aldrich, St. Louis, MO) als Referenz bestimmt. Alle Fluoreszenzzerfallskurven wurden mit einem selbst geschriebenen Matlab-Skript (MathWorks, Natick, MA) analysiert. Die gemessenen Zerfallskurven wurden mit dem IRF referenziert und mit einer monoexponentiellen Funktion (einzelmodifizierter RNA Strang) oder einer biexponentiellen Funktion (doppeltmarkierter RNA Strang) angepasst.

### 7.5.2 Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM)

Einen Tag vor der Bildgebung wurden HeLa-Zellen in eine 8-Well-Kammer (Lab-Tek-Borosilikat Chambered Coverglass, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) mit einer Konfluenz zwischen 50-70% ausgesät. Für die Messung wurde die 8-Well-Kammer in einen am Mikroskop angebrachten Inkubator (H301 Electric Top Stage Incubation System, Okolab S. r. l., Pozzuoli, Italien) mit Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Kontrolle (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Um die Aufnahme der doppelt markierten siRNA-Stränge in HeLa-Zellen zu gewährleisten, wurde ein Transfektionsreagenz Xfect RNA (Takara, Shiga, Japan) nach Herstellerprotokoll mit einer siRNA-Menge von 6.25 pmol eingesetzt. Die Zellen wurden für 2.5 h in jeweils 15-minütigen Schritten direkt nach Beginn der Transfektion aufgezeichnet. Eine Fläche von 80x80 µm<sup>2</sup>, aufgeteilt in 150x150 px, wurde mit einer Scangeschwindigkeit von 1.2 ms/px gescannt. Die Probe wurde mit 532 nm bei einer Laserpulsfrequenz von 26 MHz belichtet.

Die Laserleistung wurde so eingestellt, dass die Detektorzählrate unter 5% der Laserpulsfrequenz gehalten wurde, um einen Pile-up-Effekt zu vermeiden. Typische Laserleistungen lagen im Bereich von 5  $\mu$ W.

Als alternative Möglichkeit des siRNA-Transports in die Zellen wurde ein Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimer der 5. Generation mit einem Triethanolamin (TEA)-Kern verwendet, um siRNA-Dendrimer-Konjugate zu bilden. Vor dem Experiment wurden das PAMAM-Dendrimer und die siRNA in einem molaren Verhältnis von 2.5: 1 (Dendrimer: siRNA) gemischt und für 30 min inkubiert. Dabei wurden wiederum 6.25 pmol siRNA verwendet, um die HeLa-Zellen zu transfizieren. Die Zellen wurden für 4 h in Schritten von 15 min direkt nach Beginn der Transfektion aufgenommen. Alle Bilder wurden mit der SymPhoTime-Software (PicoQuant) visualisiert. Farbschwellenwerte der FLIM-Bilder wurden basierend auf den Lebensdauerhistogrammen festgelegt.

### **7.6 *In-vivo* Experimente**

Die Hybridisierung der FISH-Sonden in Zebrafisch-Hirnschnitten wurde von DR. VANESSA GERBER sowie LUISA LÜBCKE aus der Arbeitsgruppe von PROF. DR. UWE STRÄHLE (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT) durchgeführt.

Hierfür wurde jeweils eine Hirnschnitte in einem 1.5 mL EPPENDORF-Gefäß mit einer Hybridisierungslösung (10 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0.02 % RNase freie BSA, 50  $\mu$ g tRNA, 2x SSC in Wasser) für 3 – 4 Stunden bei 72 °C vorhybridisiert. Der Überstand wurde entfernt, 500  $\mu$ L frische Hybridisierungslösung, versetzt mit 5 – 50 ng FISH-Sonde, hinzugegeben und über Nacht bei 72 °C hybridisiert. Die Lösung wurde vorsichtig entfernt und die Hirnschnitte 3x bei 72 °C gewaschen (10 % Formamid, 2x SSC, 0.1 % Tween-20 in Wasser). Anschließend erfolgte ein DAPI-Staining, wobei die Hirnschnitte für 20 min bei Raumtemperatur mit 300  $\mu$ L Waschlösung mit 5  $\mu$ g/mL DAPI im Dunkeln inkubiert wurden. Es wurde 3x mit oben genannter Waschlösung gewaschen, bevor konfokale Laser-Scan-Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen an einem LEICA TCS SP5 Mikroskop mit 10x- sowie 63x-Objektiv aufgezeichnet wurden. Hierbei wurde Cy5 bei einer Wellenlänge von 635 nm und DAPI bei 405 nm angeregt.

## 7.7 Belichtungsexperimente

### Ringschluss zum Azirin

Das entsprechende Vinylazid-Analogon (**8** oder **14**) wurde entweder als Feststoff in Ethanol/Toluol oder als Stammlösung in Wasser oder Puffer (10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer und 250 mM NaCl, pH 7) verwendet. Dieses wurde in einem Schlenkrohr oder in 1 mL Quarzglasküvetten für ein definiertes Zeitintervall bei 365 nm belichtet und im Anschluss dessen Reaktionsverlauf über Absorptionsspektren und/oder HPLC-Läufe verfolgt.

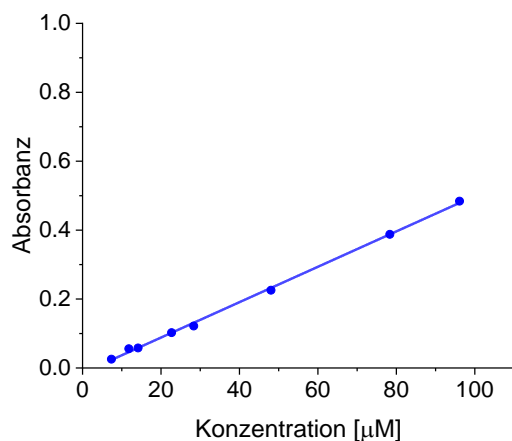
### Photoclick-Reaktion

Für die photoinduzierte Cycloaddition wurde entweder 500 µM Vinylazid, welches zunächst bei 365 nm zum Azirin belichtet wurde, oder 500 µM des jeweiligen Azirins eingesetzt und mit verschiedenen Äquivalenten (1, 5, 10, 20) des Reaktionspartners versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur bei 300 nm belichtet und nach definierten Zeitintervallen die Reaktion mittels UV/Vis, HPLC, NMR oder LC-MS verfolgt.

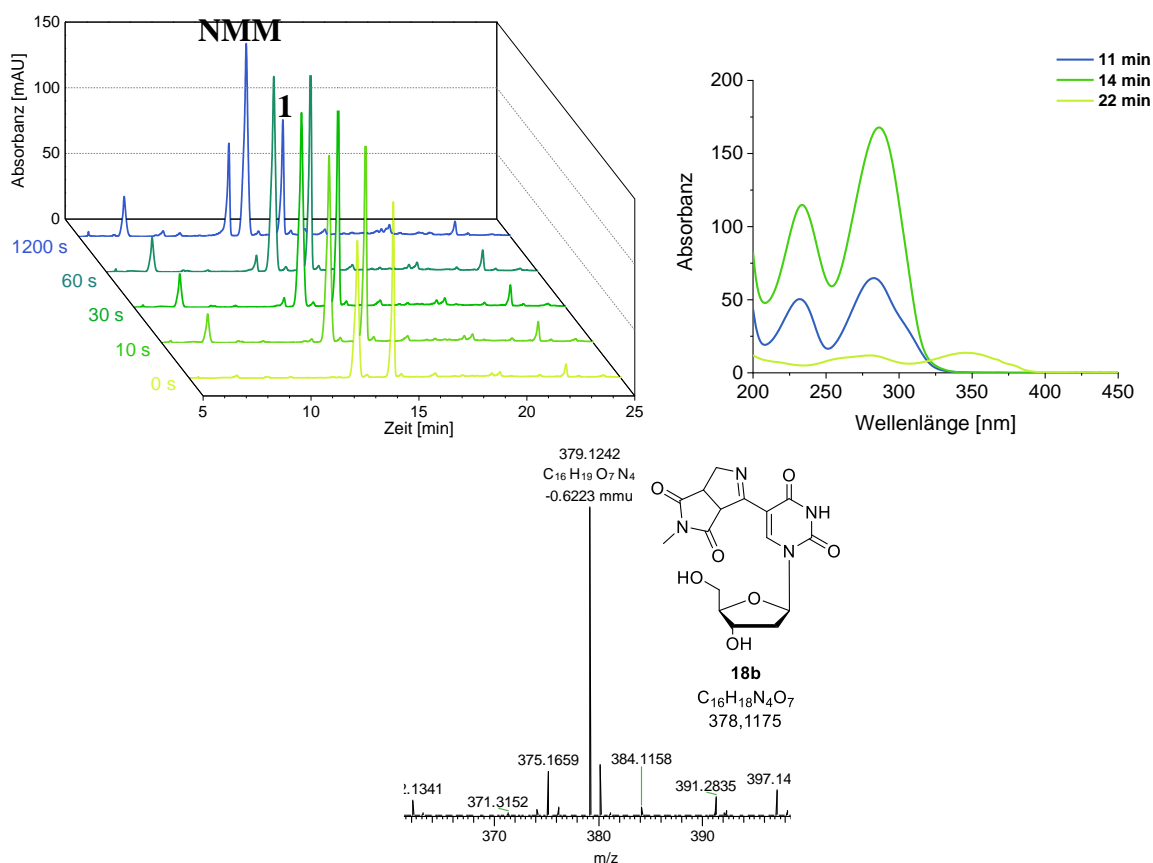


## 7.8 Zusätzliche Spektren und Daten

### 7.8.1 Photoclick-Reaktion mit 2H-Azirinen

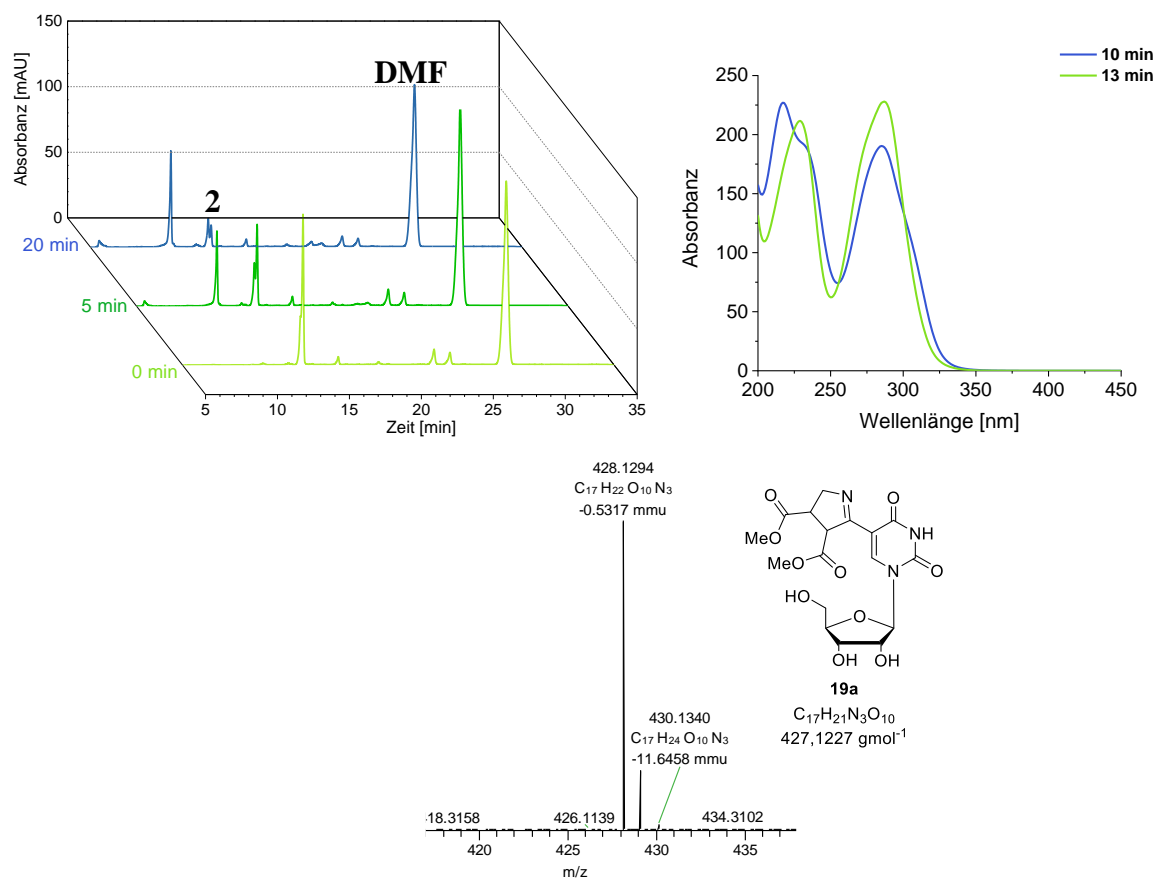


**Abbildung 74:** Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von **1**. Messparameter: 80 µM in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C.



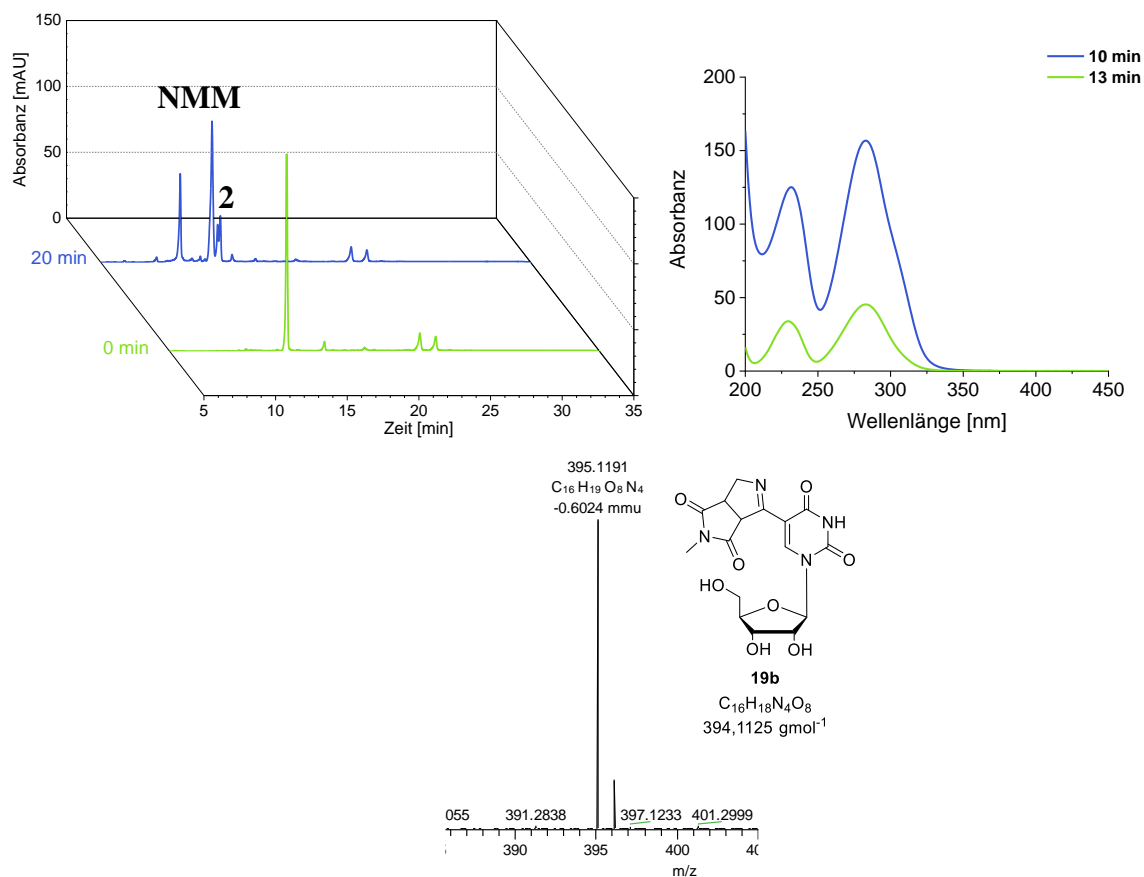
**Abbildung 75:** HPLC-Chromatogramme der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition zwischen **1** und NMM in Wasser nach 0 s, 10 s, 30 s, 60 s, 120 s und 300 s Belichtungsdauer sowie die zugehörigen Absorptionsspektren und die Masse des Clickproduktes **18b**. Parameter: [**1**] = 500 µM, [NMM] = 5000 µM, λ<sub>exc</sub> = 300 nm, Trennmethode s. Kapitel 7.3.3 Tabelle 16.

## Experimenteller Teil

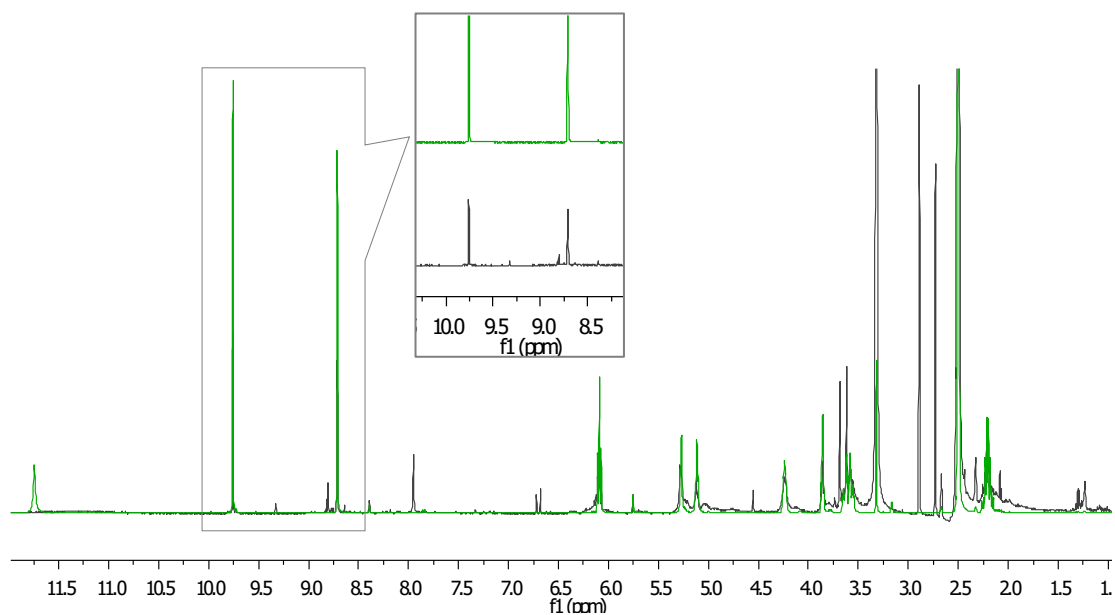


**Abbildung 76:** HPLC-Chromatogramme der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition zwischen **2** und DMF in Wasser nach 0 min, 5 min und 20 min Belichtungsdauer sowie die zugehörigen Absorptionsspektren und die Masse des Clickproduktes **19a**. Parameter: [**2**] = 500  $\mu$ M, [DMF] = 10000  $\mu$ M,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 300 nm, Trennmethode s. Kapitel 7.3.3 Tabelle 16.

## Experimenteller Teil



**Abbildung 77:** HPLC-Chromatogramme der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition zwischen **2** und NMM in Wasser nach 0 min, 5 min und 20 min Belichtungsdauer sowie die zugehörigen Absorptionsspektren und die Masse des Clickproduktes **19b**. Parameter: [**2**] = 500  $\mu\text{M}$ , [NMM] = 10000  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 300 nm, Trennmethode s. Kapitel 7.3.3 Tabelle 16.



**Abbildung 78:** Überlagerung der NMR-Spektren der lichtinduzierten Azirin-Alken-Cycloaddition (grau) mit 5-Formyl-2'-desoxyuridin **24** (grün).

## 7.8.2 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungs sonden

ATGGTGAGCAAGGGCG AGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCT GGA CGGCG  
**CcU**ACCACCTCGTTCCCGC **cU**CGACAAGTGGCCCCAC GGG**eU**AGGACCAGCTCGA GCCGC

ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA  
**cU**GCATTGCCGG **cU**CAAGTCGCACAGGCCG CCG**CcU**CCCGCTACGGTG GCC**GcU**TCGACT

CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGC AAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCACCTGACC  
GGGACT AG**cU**AGACGTGGTGGCCG GACGGGCACGGGACCGG GGAGCAC**cU**GGTGGGACT

TACGGCGTGCACTGCTTCAAGCCGCTACCCCGACCACAT GAA GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA  
**cU**GCCGCACGTACGAAG GCGA**cU**GGGGCTGGTGA CG**cU**CGTGTGAAGAAGT GGC**GcU**

TGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC  
ACGGGCTCCG CAG**GcU**CCTCGCGTGGTA GAAG**cU**TCTCTGCTGCCGT **cU**GTTCTGGGCGCG

CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG GA  
GCTC T**cU**CAAGCTCCCGCTGTG CCAC**cU**TGGCGTAGCTCG **cU**CCCGTAGCTGAAGTTC

GGACGGCAACATCTGGG GCA CAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTAT ATC ATGGCC  
**CcU**GCCGTTGTAGGACCC GT**cU**CGACCTCATGTTGA TG**cU**CGGTGTTGCAGATA **cU**ACCGG

GACAAGCAGAAGAA CGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC GAC GACGGCAGCGTG  
CTGTTCTGCTT GCC**GcU**AGTTCACCTGA TC**cU**AGGGCGGTGTTGTAG **CcU**GCCGTCGCAC

CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCGGTGCTGCTGCCGACAACC  
GTCGA GC**cU**GGTGATGGTCTCT GGGGG**cU**AGCCGCTGCCG CACGACGACGGGG**cU**GTT

ACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTCTGCT  
GA**cU**GGACTCGTGGTCA GGGAC**cU**CGTTTCTGGGG **CcU**CTTCGCGCTAGTGTA GGACGA

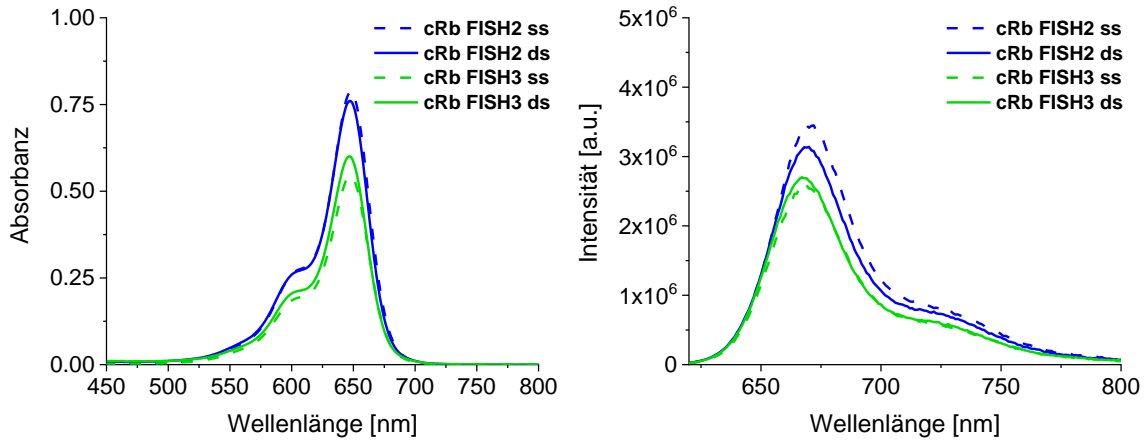
GGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA  
CC**cU**CAAGCACT GCGGGCC**cU**AGTGAGAG **cU**ACCTGCTCGACATGTT

**Abbildung 79:** Schematische Darstellung des DNA-RNA-Duplexes aus 36 einzelmodifizierten **cU**-FISH-Sonden und *gfp* mRNA.

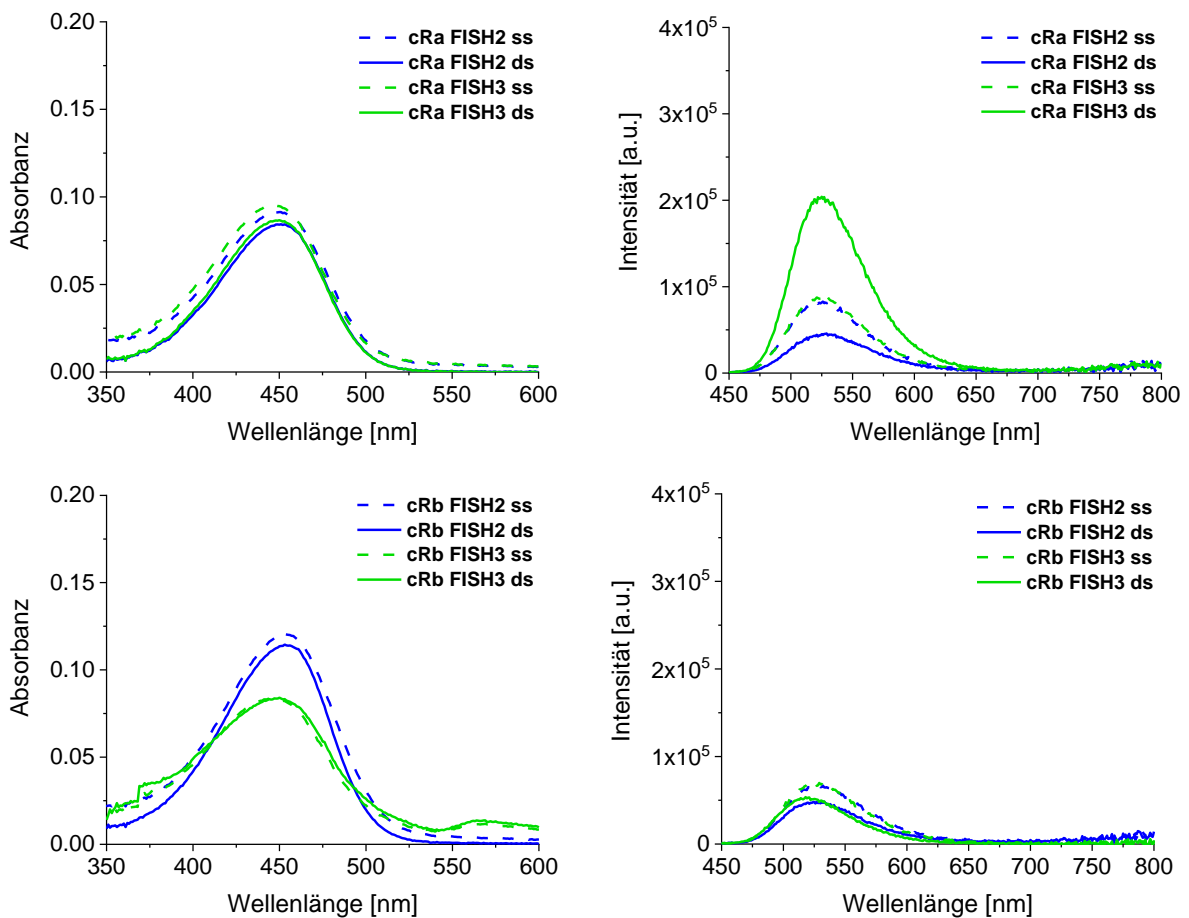
**Tabelle 25:** Schmelztemperaturen und Fluoreszenzquantenausbeuten der Sequenzen **cB FISH1-3** nach sequentieller Hybridisierung mit der *gfp* DNA-Teilsequenz.

	$T_m$ [°C]		$\Phi_F$
<b>cB FISH1</b>	57	74	0.06
<b>cB FISH2</b>	46	74	0.03
<b>cB FISH3</b>		72	0.02

## Experimenteller Teil

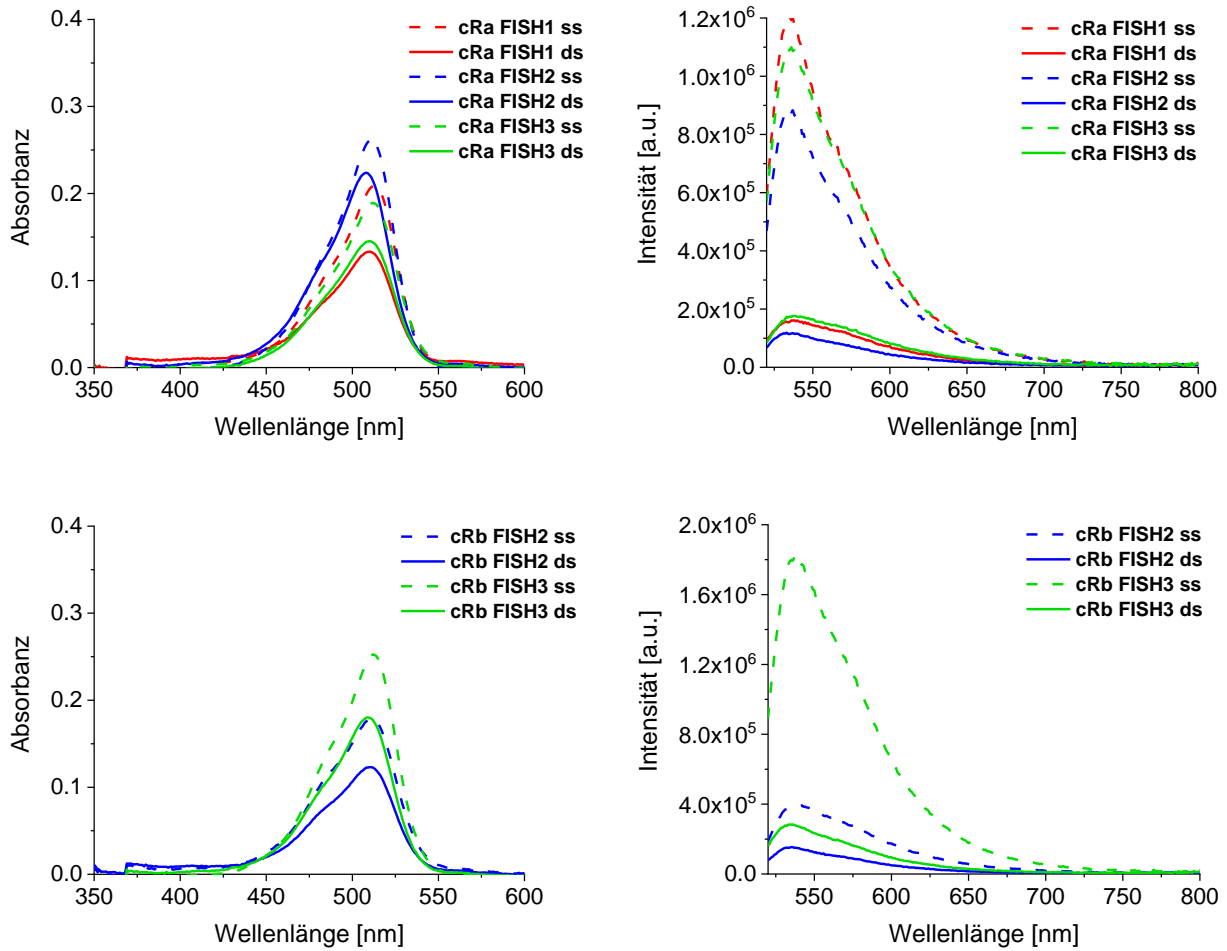


**Abbildung 80:** Absorption (links) und Emission (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cR $\beta$  FISH2** und **cR $\beta$  FISH3** markiert mit **Cy5**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}$ = 600 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

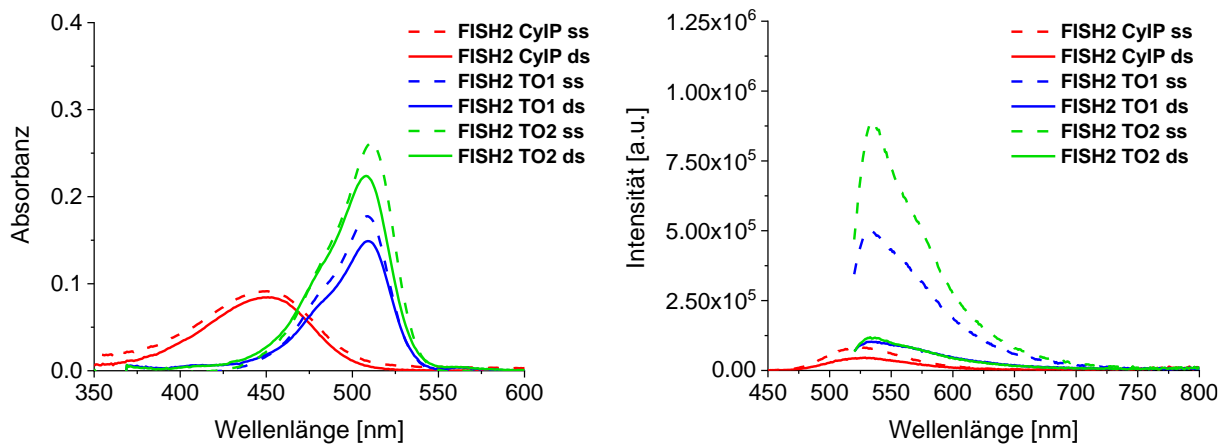


**Abbildung 81:** Absorption (links) und Emission (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cR $\alpha$  FISH2** und **FISH3** (oben) sowie **cR $\beta$  FISH2** und **FISH3** (unten) markiert mit **CyIP**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}$ = 435 nm, Spaltbreite 2/2 nm.

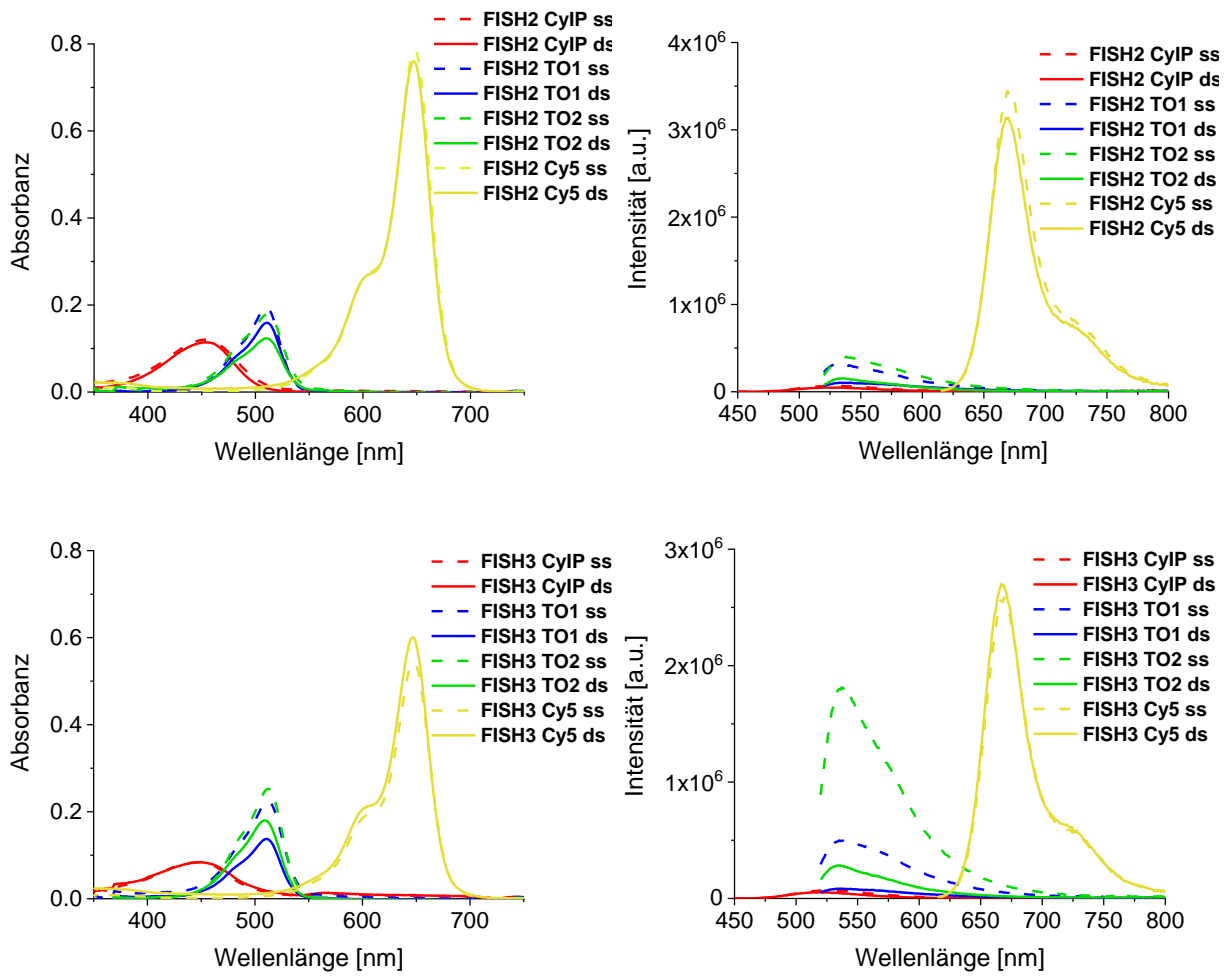
## Experimenteller Teil



**Abbildung 82:** Emission der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cR $\alpha$  FISH1-3** (links) sowie **cR $\beta$  FISH2** und **FISH3** (rechts) markiert mit **TO2**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>1</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}$ = 505 nm, Spaltbreite 2/2 nm.



**Abbildung 83:** Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cR $\alpha$  FISH2** markiert mit **CyIP**, **TO1** und **TO2**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>1</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{exc}$  (CyIP)= 435 nm,  $\lambda_{exc}$  (TO1/2)= 505 nm, Spaltbreite 2/2 nm.



**Abbildung 84:** Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) der Einzelstränge (gestrichelt) und Doppelstränge von **cR $\beta$  FISH2** (oben) und **cR $\beta$  FISH3** (unten) markiert mit **CyIP**, **TO1**, **TO2** und **Cy5**. Messparameter: 2.5  $\mu$ M DNA in 10 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer, 250 mM NaCl, pH 7, 20 °C;  $\lambda_{\text{exc}}$ (CyIP) = 435 nm,  $\lambda_{\text{exc}}$ (TO1/2) = 505 nm,  $\lambda_{\text{exc}}$ (Cy5) = 635 nm Spaltbreite 2/2 nm.

---

**8 LITERATURVERZEICHNIS**

- [1] P. Jöstingmeyer, in *Im Fokus: Strategien der Evolution: Geniale Anpassungen und folgenreiche Fehlritte*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**, pp. 127-136.
- [2] F. Bagusche, *Das blaue Wunder: Warum das Meer leuchtet, Fische singen und unsere Beziehung zum Meer so besonders ist – Erstaunliche Einblicke in eine geheimnisvolle Welt*, Ludwig Buchverlag, München, **2019**.
- [3] E. H. White, M. G. Steinmetz, J. D. Miano, P. D. Wildes, R. Morland, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3199-3208.
- [4] M. P. Barros, E. J. Bechara, *Free Radic. Biol. Med* **1998**, *24*, 767-777.
- [5] O. Shimomura, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5698-5710.
- [6] M. Chalfie, *PNAS* **2009**, *106*, 10073-10080.
- [7] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802-805.
- [8] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 444-456.
- [9] W. Zeng, H. E. Seward, A. Málnási-Csizmadia, S. Wakelin, R. J. Woolley, G. S. Cheema, J. Basran, T. R. Patel, A. J. Rowe, C. R. Bagshaw, *Biochemistry* **2006**, *45*, 10482-10491.
- [10] T. Chishima, Y. Miyagi, X. Wang, H. Yamaoka, H. Shimada, A. R. Moossa, R. M. Hoffman, *Cancer Res* **1997**, *57*, 2042-2047.
- [11] B. A. Armitage, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 806-812.
- [12] A. S. Boutorine, D. S. Novopashina, O. A. Krasheninina, K. Nozeret, A. G. Venyaminova, *Molecules* **2013**, *18*, 15357-15397.
- [13] R. W. Dirks, H. J. Tanke, *Biotechniques* **2006**, *40*, 489-496.
- [14] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 890-894.
- [15] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.
- [16] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7373-7379.
- [17] J. Steinmeyer, H.-K. Walter, M. A. Bichelberger, V. Schneider, T. Kubar, F. Ronicke, B. Olshausen, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, U. Schepers, M. Elstner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2018**.
- [18] M. W. T. D. Wöhrle, W.-D. Stohrer, *Photochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [19] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.



- [20] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition ed., Springer, Boston, MA, **1999**.
- [21] M. Kasha, *Discuss Faraday Soc* **1950**, 9, 14-19.
- [22] J. W. P. Klán, *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, Wiley-VCH, Chichester, **2009**.
- [23] B. Reiß, *Dissertation "Photoredoxkatalyse - Eine neue Dimension in Reaktionsquantenausbeuten, Mechanismen und anpassbare, organische Katalysatoren"*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2017**.
- [24] R. Plessow, *Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie, Vol. A. Auflage*, Cuvillier Verlag Göttingen, Göttingen, **2004**.
- [25] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, 33, 166-175.
- [26] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 437, 55-75.
- [27] B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*, Wiley-VCH Weinheim, **2001**.
- [28] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 103-110.
- [29] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, 14, 187-191.
- [30] I. L. Medintz, N. Hildebrandt, *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications*, Wiley, Weinheim, **2013**.
- [31] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G. P. C. Drummen, *Molecules* **2012**, 17, 4047-4132.
- [32] L. Stryer, R. P. Haugland, *PNAS* **1967**, 58, 719-726.
- [33] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem* **1978**, 47, 819-846.
- [34] R. Plessow, *Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie*, Cuvillier, Göttingen, **2004**.
- [35] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2641-2684.
- [36] T. W. J. Gadella, *FRET and FLIM Techniques*, Elsevier Science, Amsterdam, **2011**.
- [37] R. Weissleder, *Molecular Imaging: Principles and Practice*, People's Medical Publishing House, Shelton, Connecticut, **2010**.
- [38] K. Wang, J. Huang, X. Yang, X. He, J. Liu, *Analyst* **2013**, 138, 62-71.
- [39] G. Cox, *Fundamentals of Fluorescence Imaging*, Jenny Stanford Singapur, **2019**.

- 
- [40] S. Shashkova, Mark C. Leake, *Biosci. Rep.* **2017**, 37.
- [41] V. Ntziachristos, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, 8, 1-33.
- [42] L. J. Kricka, P. Fortina, *Clin. Chem.* **2009**, 55, 670-683.
- [43] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1589-1600.
- [44] T. Carell, M. Vrabel, M. Yang, Y. Yang, P. R. Chen, J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, A. Herner, Q. Lin, H. Wu, N. K. Devaraj, S. Kath-Schorr, *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374, 15.
- [45] G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl Fluoresc* **2015**, 3, 042001.
- [46] M. F. Debets, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6439-6455.
- [47] Craig S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1075-1101.
- [48] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 16-20.
- [49] H.-W. Shih, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 103-111.
- [50] Y. Tian, Q. Lin, *ACS Chem. Biol.* **2019**, 14, 2489-2496.
- [51] M. Zheng, L. Zheng, P. Zhang, J. Li, Y. Zhang, *Molecules* **2015**, 20, 3190.
- [52] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Sci. China Chem.* **2010**, 53, 61-70.
- [53] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974-6998.
- [54] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8968-8989.
- [55] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895-4950.
- [56] W. Tang, M. L. Becker, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 7013-7039.
- [57] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 1128-1137.
- [58] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
- [59] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494-2507.
- [60] R. Huisgen, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 403-419.
- [61] R. Huisgen, in *Pure Appl. Chem.*, Vol. 61, **1989**, p. 613.
- [62] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [63] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [64] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

- 
- [65] 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.
- [66] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152.
- [67] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [68] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570-14576.
- [69] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852-5856.
- [70] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [71] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [72] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [73] J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486-9494.
- [74] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388-1405.
- [75] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodivers.* **2006**, *3*, 509-514.
- [76] F. Seela, H. Xiong, P. Leonard, S. Budow, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1374-1387.
- [77] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [78] A. Varizhuk, A. Chizhov, V. Florentiev, *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 127-131.
- [79] R. K. Anilkumar, C. Irudaya, *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 2164-2191.
- [80] A. M. Jawalekar, N. Meeuwenoord, J. G. O. Cremers, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 287-290.
- [81] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2230-2231.
- [82] M. Aigner, M. Hartl, K. Fauster, J. Steger, K. Bister, R. Micura, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47-51.
- [83] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 581-589.
- [84] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1541-1553.

- 
- [85] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538.
- [86] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153-2154.
- [87] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [88] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [89] J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb Sci* **2007**, *26*, 1211-1219.
- [90] 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, *PNAS* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [91] F. Schoenebeck, D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121-8133.
- [92] I. S. Marks, J. S. Kang, B. T. Jones, K. J. Landmark, A. J. Cleland, T. A. Taton, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1259-1263.
- [93] G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443-2447.
- [94] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.
- [95] M. A. Tasdelen, Y. Yagci, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6044-6053.
- [96] A. A. Poloukhine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.
- [97] S. V. Orski, A. A. Poloukhine, S. Arumugam, L. Mao, V. V. Popik, J. Locklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024-11026.
- [98] T. Gruending, K. K. Oehlenschlaeger, E. Frick, M. Glassner, C. Schmid, C. Barner-Kowollik, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 807-812.
- [99] T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1071-1074.
- [100] D. M. Bauer, A. Rogge, L. Stolzer, C. Barner-Kowollik, L. Fruk, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8626-8628.
- [101] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60-70.
- [102] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155-4158.
- [103] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832-2835.
- [104] Y. Wang, W. J. Hu, W. Song, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3725-3728.

- 
- [105] Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330-5333.
- [106] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828-839.
- [107] Z. Yu, L. Y. Ho, Z. Wang, Q. Lin, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5033-5036.
- [108] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9920-9922.
- [109] C. P. Ramil, Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 89-95.
- [110] P. Lederhose, Z. Chen, R. Müller, J. P. Blinco, S. Wu, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12195-12199.
- [111] S.-L. Zheng, Y. Wang, Z. Yu, Q. Lin, P. Coppens, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18036-18037.
- [112] Y. Zhang, W. Liu, Z. K. Zhao, *Molecules* **2014**, *19*, 306-315.
- [113] W. Feng, L. Li, C. Yang, A. Welle, O. Trapp, P. A. Levkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8732-8735.
- [114] Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J.-S. Lee, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2002-2006.
- [115] S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang, T. Luo, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702-4705.
- [116] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600-10604.
- [117] Z. Yu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4153-4156.
- [118] Z. Yu, L. Y. Ho, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11912-11915.
- [119] S. Arndt, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14580-14582.
- [120] B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7579-7582.
- [121] J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1362-1369.
- [122] Y. Wu, G. Guo, J. Zheng, D. Xing, T. Zhang, *ACS Sens.* **2019**, *4*, 44-51.
- [123] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7993-7995.
- [124] J. G. Gall, M. L. Pardue, *PNAS* **1969**, *63*, 378-383.
- [125] J. M. Levsky, R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833-2838.
- [126] P. R. Langer-Safer, M. Levine, D. C. Ward, *PNAS* **1982**, *79*, 4381-4385.
- [127] G. T. Rudkin, B. D. Stollar, *Nature* **1977**, *265*, 472-473.
- [128] J. G. J. Bauman, J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn, *Exp. Cell Res.* **1980**, *128*, 485-490.
- [129] J. Bayani, J. A. Squire, *Curr Protoc Cell Biol* **2004**, *23*, 22.24.21-22.24.52.

- [130] A. N. Silahatoglu, D. Nolting, L. Dyrskjøt, E. Berezikov, M. Møller, N. Tommerup, S. Kauppinen, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2520.
- [131] P. M. Nederlof, D. Robinson, R. Abuknesha, J. Wiegant, A. H. N. Hopman, H. J. Tanke, A. K. Raap, *Cytometry* **1989**, *10*, 20-27.
- [132] P. M. Nederlof, S. van der Flier, J. Wiegant, A. K. Raap, H. J. Tanke, J. S. Ploem, M. van der Ploeg, *Cytometry* **1990**, *11*, 126-131.
- [133] A. Gozzetti, M. M. Le Beau, *Semin. Hematol.* **2000**, *37*, 320-333.
- [134] E. V. Volpi, J. M. Bridger, *Biotechniques* **2008**, *45*, 385-409.
- [135] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
- [136] A. M. Femino, K. Fogarty, L. M. Lifshitz, W. Carrington, R. H. Singer, in *Methods Enzymol., Vol. 361*, Academic Press, **2003**, pp. 245-304.
- [137] A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 877.
- [138] A. Raj, S. Tyagi, in *Methods Enzymol., Vol. 472* (Ed.: N. G. Walter), Academic Press, **2010**, pp. 365-386.
- [139] A. Orjalo, H. E. Johansson, J. L. Ruth, *Nat. Methods* **2011**, *8*, i-ii.
- [140] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.
- [141] F. Hövelmann, O. Seitz, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 714-723.
- [142] F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19025-19032.
- [143] D. Jarikote, *Dissertation "Solid phase synthesis of thiazole orange labeled peptide nucleic acids for homogeneous detection of single base mutation in DNA"*, Humboldt Universität Berlin, Berlin, **2007**.
- [144] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [145] M. P. Lillo, J. M. Beechem, B. K. Szpikowska, M. A. Sherman, M. T. Mas, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11261-11272.
- [146] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *PNAS* **2000**, *97*, 8206-8210.
- [147] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [148] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.
- [149] D. S. Seferos, D. A. Giljohann, H. D. Hill, A. E. Prigodich, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15477-15479.
- [150] H. H. Chen, K. W. Leong, *Nanomedicine* **2006**, *1*, 119-122.

- 
- [151] Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1044-1056.
- [152] C. E. Rowland, C. W. Brown, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, *Methods Appl Fluoresc* **2015**, *3*, 042006.
- [153] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4589.
- [154] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
- [155] S. Preus, L. M. Wilhelmsson, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1990-2001.
- [156] V. V. Didenko, *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, **2006**.
- [157] V. V. Didenko, *Biotechniques* **2001**, *31*, 1106-1121.
- [158] D. M. Kolpashchikov, *Scientifica* **2012**, *2012*, 17.
- [159] X. Fang, J. J. Li, J. Perlette, W. Tan, K. Wang, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 747 A-753 A.
- [160] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.
- [161] D.-S. Xiang, G.-H. Zhou, M. Luo, X.-H. Ji, Z.-K. He, *Analyst* **2012**, *137*, 3787-3793.
- [162] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746-2748.
- [163] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402-405.
- [164] S. Jockusch, A. A. Martí, N. J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 493-498.
- [165] A. A. Martí, S. Jockusch, Z. Li, J. Ju, N. J. Turro, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e50-e50.
- [166] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [167] M. E. Østergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771-5788.
- [168] N. N. Dioubankova, A. D. Malakhov, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, P. E. Volynsky, R. G. Efremov, V. A. Korshun, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 841-847.
- [169] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.
- [170] Y. J. Seo, G. T. Hwang, B. H. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4037-4039.
- [171] T. Umemoto, P. J. Hrdlicka, B. R. Babu, J. Wengel, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2240-2248.
- [172] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.

- 
- [173] S. Berndl, M. Breunig, A. Gopferich, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 997-999.
- [174] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307-9310.
- [175] S. Sezi, R. Varghese, T. Vilaiwan, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 173-176.
- [176] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865-868.
- [177] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.
- [178] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526-528.
- [179] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1239-1248.
- [180] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.
- [181] C. Holzhauser, M. M. Rubner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 722-724.
- [182] S. Barrois, S. Wörner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1126-1129.
- [183] T. Wang, J. Ray, *Protein Cell* **2012**, *3*, 739-754.
- [184] D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656-665.
- [185] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850-852.
- [186] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.
- [187] M. Hirsch, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 4650-4660.
- [188] M. Hirsch, D. Strand, M. Helm, in *Biol. Chem., Vol. 393*, **2012**, p. 23.
- [189] A. Järve, J. Müller, I.-H. Kim, K. Rohr, C. MacLean, G. Fricker, U. Massing, F. Eberle, A. Dalpke, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e124-e124.
- [190] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [191] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7547-7551.
- [192] C. Schwechheimer, F. Rönicke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 6557-6563.
- [193] H.-K. Walter, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- [194] P. R. Bohländer, M. L. Abba, F. Bestvater, H. Allgayer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5001-5006.



- 
- [195] H.-K. Walter, J. Bauer, J. Steinmeyer, A. Kuzuya, C. M. Niemeyer, H.-A. Wagenknecht, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 2467-2472.
- [196] J. Steinmeyer, F. Röncke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 514-518.
- [197] H.-K. Walter, B. Olshausen, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 127-137.
- [198] R. Kopf, *Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente - Die Grundlagen des Immunsystems und unserer Gesundheit: Ein naturheilkundlicher Ratgeber*, BookRix, München, **2018**.
- [199] T. Brandenburger, T. Bajorat, *Fallbuch Biochemie*, Thieme, Stuttgart, **2006**.
- [200] H. Dunkelberg, T. Gebel, A. Hartwig, *Vitamine und Spurenelemente: Bedarf, Mangel, Hypervitaminosen und Nahrungsergänzung*, Wiley, Weinheim, **2013**.
- [201] W. Siems, *Oxidativer Stress und Pharmaka*, Govi-Verlag, Eschborn, **2005**.
- [202] M. P. Cervantes-Cervantes, J. V. Calderón-Salinas, A. Albores, J. L. Muñoz-Sánchez, *Biol. Trace Elem. Res.* **2005**, *103*, 229-248.
- [203] G. Crisponi, V. M. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 876-889.
- [204] M. C. Linder, *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* **2012**, *733*, 83-91.
- [205] B. C. Gilbert, S. Silvester, P. H. Walton, A. C. Whitwood, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1999**, 1891-1895.
- [206] R. Kumar, L. I. Wiebe, E. E. Knaus, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 1609-1615.
- [207] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [208] A. Hottin, A. Marx, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418-427.
- [209] A. Hassner, *Small Ring Heterocycles, Part 1: Aziridines, Azirines, Thiiranes, Thiirenes*, Wiley, New York, **2009**.
- [210] W. Ando, U. Bergsträßer, D. Black, H. Heydt, B. König, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 9: Fully Unsaturated Small-Ring Heterocycles and Monocyclic Five-Membered Heteroarenes with One Heteroatom*, Thieme, Stuttgart, **2014**.
- [211] S. A. Lawrence, *Amines: Synthesis, Properties and Applications*, Cambridge University Press, **2004**.
- [212] B. Halton, *Advances in Strained and Interesting Organic Molecules*, Elsevier Science, Stamford, Connecticut, **1999**.

- 
- [213] P. N. D. Singh, C. L. Carter, A. D. Gudmundsdóttir, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6763-6765.
- [214] A. Khlebnikov, M. Novikov, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3363–3401.
- [215] A. F. Khlebnikov, M. S. Novikov, N. V. Rostovskii, *Tetrahedron* **2019**, *75*, 2555-2624.
- [216] P. W. Neber, A. V. Friedolsheim, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1926**, *449*, 109-134.
- [217] F. Palacios, A. M. O. de Retana, E. Martínez de Marigorta, J. Manuel de los Santos, *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, *34*, 219-269.
- [218] S. E. Denmark, *Organic Reactions, Volume 78, Vol. 78*, Wiley, Weinheim, **2012**.
- [219] F. Palacios, Ana María O. de Retana, Eduardo M. de Marigorta, Jesús M. de los Santos, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 2401-2414.
- [220] I. Hiroshi, M. Shigeru, *Chem. Lett.* **2001**, *30*, 832-833.
- [221] H. Inui, S. Murata, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2628-2636.
- [222] Y. Liu, P. Guan, Y. Wang, L. Liu, J. Cao, *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 67-78.
- [223] X. Zhang, S. K. Sarkar, G. K. Weragoda, S. Rajam, B. S. Ault, A. D. Gudmundsdottir, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 653-663.
- [224] G. K. Weragoda, A. Das, S. K. Sarkar, H. D. M. Sriyathne, X. Zhang, B. S. Ault, A. D. Gudmundsdottir, *Aust. J. Chem.* **2017**, *70*, 413-420.
- [225] E. Albrecht, J. Mattay, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11605-11610.
- [226] M. D. A. Padwa, J. Smolanoff, S. I. Wetmore *Pure Appl. Chem.* **1973**, *33*, 269-284.
- [227] A. Padwa, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 371-378.
- [228] A. Padwa, *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 37-68.
- [229] A. Padwa, M. Dharan, J. Smolanoff, S. I. Wetmore, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1954-1961.
- [230] A. Herner, Q. Lin, *Top. Curr. Chem.* **2015**, *374*, 1.
- [231] J. O. Mueller, F. G. Schmidt, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10284-10288.
- [232] R. Kumar, M. Nath, D. L. J. Tyrrell, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2032-2040.
- [233] S. Nakamura, S. Ogasawara, S. Matuda, I. Saito, K. Fujimoto, *Molecules* **2012**, *17*.
- [234] P. V. Chouthaiwale, P. U. Karabal, G. Suryavanshi, A. Sudalai, *Synthesis* **2010**, *2010*, 3879-3882.
- [235] D. Ploschik, F. Röncke, H. Beike, R. Strasser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1949-1953.

- 
- [236] K. Sato, W. Hirose, A. Matsuda, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **2008**, 35, 1.21.21-21.21.19.
- [237] M. März, R. Schmidt, S. Rastegar, U. Strähle, *Dev. Dyn.* **2011**, 240, 2221-2231.
- [238] C. Marcello, M. Vittoria, R. Nicla, *Rev Neurosci.* **2018**, 30, 45-66.
- [239] H. A. Bates, J. Farina, M. Tong, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2637-2641.
- [240] M. F. A. Adamo, R. Pergoli, *Org. Lett.* **2007**, 9, 4443-4446.
- [241] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2439-2448.
- [242] F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, 13, 2072-2081.
- [243] F. Hövelmann, I. Gaspar, J. Chamiolo, M. Kasper, J. Steffen, A. Ephrussi, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 128-135.
- [244] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, 46, 39-51.
- [245] V. Karunakaran, J. L. Pérez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2954-2962.
- [246] M. Liang, X. Liu, K. Nakamura, X. Chen, D. Cheng, G. Liu, S. Dou, Y. Wang, M. Rusckowski, D. J. Hnatowich, *Mol Imaging Biol* **2009**, 11, 439-445.
- [247] H. Maged, P. Shirish, A. O. Eric, *Heterocycl. Commun.* **2013**, 19, 1-11.
- [248] E. E. Rastede, M. Tanha, D. Yaron, S. C. Watkins, A. S. Waggoner, B. A. Armitage, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, 14, 1703-1712.
- [249] N. J. Clecak, R. J. Cox, *Patent P 2314868.7 "Photolackzusammensetzung"*, Amerika, **1972**.
- [250] J. Qiu, A. Wilson, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44, e138-e138.
- [251] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1931-1934.
- [252] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 2051-2060.
- [253] N. Kretschy, M. M. Somoza, *PLOS ONE* **2014**, 9, e85605.
- [254] B. G. Moreira, Y. You, R. Owczarzy, *Biophys. Chem.* **2015**, 198, 36-44.
- [255] N. Kretschy, M. Sack, M. M. Somoza, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 840-848.
- [256] A. Herner, G. Estrada Girona, I. Nikić, M. Kállay, E. A. Lemke, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1370-1374.
- [257] P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 9307-9320.

- [258] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.
- [259] N. Raddaoui, S. Croce, F. Geiger, A. Borodavka, L. Möckl, S. Stazzoni, B. Viverge, C. Bräuchle, T. Frischmuth, H. Engelke, T. Carell, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1-6.
- [260] T. Dingermann, *Pharmazeutische Zeitung* **2010**, *15*, 1397-1407.
- [261] GDCh,  
[https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Service\\_und\\_Informationen/Presse\\_Oeffentlichkeitsarbeit/PDF/PM2015/GDCh-PM\\_2015\\_10.pdf](https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Service_und_Informationen/Presse_Oeffentlichkeitsarbeit/PDF/PM2015/GDCh-PM_2015_10.pdf) (03.06.20).
- [262] P. Grätzel von Grätz, *Dtsch Arztebl International* **2017**, *114*, A-1714.
- [263] D. Einecke, *Gastro-News* **2019**, *6*, 48-48.
- [264] X. Chi, P. Gatti, T. Papoian, *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 823-833.
- [265] D. M. Dykxhoorn, J. Lieberman, *Cell* **2006**, *126*, 231-235.
- [266] S. M. Hammond, A. A. Caudy, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 110-119.
- [267] G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244-251.
- [268] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell* **1990**, *2*, 279-289.
- [269] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [270] E. J. Sontheimer, R. W. Carthew, *Cell*, *122*, 9-12.
- [271] G. Tang, *Trends Biochem. Sci.*, *30*, 106-114.
- [272] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [273] J. Houseley, D. Tollervy, *Cell* **2009**, *136*, 763-776.
- [274] W. Filipowicz, L. Jaskiewicz, F. A. Kolb, R. S. Pillai, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 331-341.
- [275] J. K. W. Lam, M. Y. T. Chow, Y. Zhang, S. W. S. Leung, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e252.
- [276] M. Dominska, D. M. Dykxhoorn, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1183.
- [277] R. W. Carthew, E. J. Sontheimer, *Cell* **2009**, *136*, 642-655.
- [278] D. H. Kim, J. J. Rossi, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 173.
- [279] J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.
- [280] T. Hardcastle, I. Novosjolova, V. Kotikam, S. K. Cheruiyot, D. Mutisya, S. D. Kennedy, M. Egli, M. L. Kelley, A. v. B. Smith, E. Rozners, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 533-536.

- [281] K. Nakanishi, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2016**, 7, 637-660.
- [282] Y. Ma, S. Liu, Y. Wang, Y. Zhao, Y. Huang, L. Zhong, Z. Guan, L. Zhang, Z. Yang, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 5161-5170.
- [283] R. A. P. Valenzuela, K. Onizuka, A. A. Ball-Jones, T. Hu, S. R. Suter, P. A. Beal, *ChemBioChem* **2016**, 17, 2340-2345.
- [284] J.-N. Tants, S. Fesser, T. Kern, R. Stehle, A. Geerlof, C. Wunderlich, M. Juen, C. Hartlmüller, R. Böttcher, S. Kunzelmann, O. Lange, C. Kreutz, K. Förstemann, M. Sattler, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 12536-12550.
- [285] D. M. Dayeh, B. C. Kruithoff, K. Nakanishi, *J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 6308-6325.
- [286] A. P. A., C. R. J., A.-B. Kwasi, W. S. Patrick, *Nucleic Acid Ther.* **2016**, 26, 309-317.
- [287] L. Aagaard, J. J. Rossi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59, 75-86.
- [288] R. G. Parmar, C. R. Brown, S. Matsuda, J. L. S. Willoughby, C. S. Theile, K. Charissé, D. J. Foster, I. Zlatev, V. Jadhav, M. A. Maier, M. Egli, M. Manoharan, K. G. Rajeev, *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 734-744.
- [289] H.-K. Walter, *Dissertation "DNA/RNA Traffic lights 2.0° - Entwicklung von wellenlängenverschiebenden DNA- und RNA-Sonden unter Verwendung von "Click"-Modifikationen*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2016**.
- [290] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane, *Anal. Sci.* **2001**, 17, 155-160.
- [291] E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba, M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1057-1075.
- [292] S. Doose, H. Neuweiler, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2009**, 10, 1389-1398.
- [293] T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, O. Piestert, M. Sauer, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7957-7964.
- [294] A. Gust, A. Zander, A. Gietl, P. Holzmeister, S. Schulz, B. Lalkens, P. Tinnefeld, D. Grohmann, *Molecules* **2014**, 19, 15824-15865.
- [295] X. Liu, J. Wu, M. Yammine, J. Zhou, P. Posocco, S. Viel, C. Liu, F. Ziarelli, M. Fermeiglia, S. Pricl, G. Victorero, C. Nguyen, P. Erbacher, J.-P. Behr, L. Peng, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2461-2473.
- [296] J. Zhou, J. Wu, N. Hafdi, J.-P. Behr, P. Erbacher, L. Peng, *Chem. Commun.* **2006**, 2362-2364.
- [297] X.-x. Liu, P. Rocchi, F.-q. Qu, S.-q. Zheng, Z.-c. Liang, M. Gleave, J. Iovanna, L. Peng, *ChemMedChem* **2009**, 4, 1302-1310.

- [298] P. Posocco, X. Liu, E. Laurini, D. Marson, C. Chen, C. Liu, M. Fermeglia, P. Rocchi, S. Pricl, L. Peng, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3262-3273.
- [299] J. Wu, J. Zhou, F. Qu, P. Bao, Y. Zhang, L. Peng, *Chem. Commun.* **2005**, 313-315.
- [300] X.-C. Shen, J. Zhou, X. Liu, J. Wu, F. Qu, Z.-L. Zhang, D.-W. Pang, G. Quééléver, C.-C. Zhang, L. Peng, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3674-3681.
- [301] Y. Cao, X. Liu, L. Peng, *Front. Chem. Sci. Eng.* **2017**, *11*, 663-675.
- [302] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [303] O. Demeter, A. Kormos, C. Koehler, G. Mező, K. Németh, E. Kozma, L. B. Takács, E. A. Lemke, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1552-1559.

---

## 9 APPENDIX

### 9.1 Publikationen

C. Schwechheimer, L. Doll, H.-A. Wagenknecht, „Synthesis of Dye-Modified Oligonucleotides via Copper(I)-Catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition Using On- and Off-Bead Approaches”, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2018**, 72, 4.80.1 – 4.80.13.

K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll, H.-A. Wagenknecht, “Postsynthetic Modifications of DNA and RNA by Means of Copper-Free Cycloadditions as Bioorthogonal Reactions”, *Bioconjugate Chem.* **2020**, 31, 4, 990 – 1011.

### 9.2 Konferenzen und Posterbeiträge

- 09/2017 VIII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Mainz, **2017**  
*Synthesis and Characterization of Wavelength-shifting siRNA-Probes using different Fluorescent Dyes* (Poster)
- 10/2017 Symposium on molecular architectures for fluorescent imaging of cells, Karlsruhe, **2017**  
*Synthesis and Characterization of Wavelength-shifting siRNA-Probes using different Fluorescent Dyes* (Poster)
- 08/2018 XXIII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, San Diego (CA, USA)  
*Imaging of siRNA transport and processing using FRET and FLIM microscopy* (Poster)
- 07/2019 Summer School 2019 - Nucleic acid chemistry and synthetic biology, Würzburg, **2019**  
*Synthesis of 5-(2H-Azirinyl)-2'-desoxyuridine and its application in photoclick reaction* (Poster)
- 09/2019 IX. Nukleinsäurechemie-Treffen, Saarbrücken, **2019**  
*Synthesis of 5-(2H-Azirinyl)-2'-desoxyuridine and its application in photoclick reaction* (Poster)

### 9.3 Stipendien

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.

### 9.4 Lehre

WS2016/17 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT

05/2017 – 08/2017 Betreuung der Auszubildenden Katharina Gress im zweiten Ausbildungsjahr zur Chemielaborantin

SS2017 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, chemischen Biologie und Lebensmittelchemie am KIT

10/2017 – 12/2017 Betreuung des Vertieferpraktikums von Sarah Al-Muthafer  
*Wellenlängenverschiebende Fluoreszenzmarkierung von siRNA-Sonden*

WS2017/18 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT

09/2018 – 11/2018 Betreuung des Vertieferpraktikums von Lena Pilz  
*Optimierung der Synthese von 5-2H-Azirinyl-2'-desoxyuridin und Studien zur Anwendung in einer Photoclick-Reaktion*

WS2018/19 Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, chemischen Biologie und Lebensmittelchemie am KIT

WS2018/19 Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie, Studiengang A am KIT

02/2019 – 04/2019 Betreuung der Hilfwissenschaftlerin Karen Möbius



## Appendix

---

SS2019	Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie, Studiengang A am KIT
08/2019 – 11/2019	Betreuung der Bachelorarbeit von Roman Graf <i>Synthesis of a 1-Alkynyl-2'-deoxyribose building block and studies on application as a hybridization sensitive FISH probe</i>
WS2019/20	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Biologie, der Angewandten Biologie, der Geoökologie und des Lehramts Chemie am KIT
WS2019/20	Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie, Studiengang A am KIT

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Karlsruhe, den 08. Juni 2020

-----  
Larissa Doll