

Korrelation der Effizienz metabolischer Markierung von DNA *via* iEDDA-Reaktion mit der Reaktivität von modifizierten 2'-Desoxyuridinen

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. Dorothee Corinna Ganz

Karlsruhe, 2022

1. Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

2. Referent: Prof. Dr. Frank Breitling

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2022

MEINEN ELTERN

„Du kannst etwas verändern – jeden Tag und zu jeder Zeit!“

- JANE GOODALL -

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2019 bis November 2022 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 Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit meine Doktorarbeit an diesem interdisziplinären Thema durchführen zu können. Vielen Dank für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die stets offene Tür sowie die wissenschaftlichen Diskussionen, welche es mir ermöglicht haben meine eigenen Ideen zu entwickeln, diese umzusetzen und auf diese Weise über mich hinauszuwachsen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen für die tolle Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft und die unvergessliche Zeit im AKW bedanken: Desirée Steuernagel, Philipp Geng, Lara Hirsch, Dr. Franziska Rönicke, Kerstin Müller, Sebastian Häcker, Dr. Dennis Harijan, Dr. Daniel Sack, Eileen List, Lisa Rieger, Bastian Pfeuffer, Nicola Seul, Maren Schrödter, Rita Michenfelder, Madeleine Giraud, Sven Klehenz, Andreas Schmidt, Charlotte Waldhelm, Fabian Weick, Dr. Julian Gebhard, Dr. Hülya Ucar, Dr. Fabian Lang, Dr. Sarah Müller, Dr. Samantha Wörner, Dr. Katja Krell, Dr. Larissa Doll, Arthur Kuhlman.

Bedanken möchte ich mich bei dem Graduierten Kolleg 2039 für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion, die zahlreichen Weiterbildungsmöglichkeiten und die tolle Organisation, aber auch für die Zusammenführung von interessanten Menschen, was eine wissenschaftliche, interdisziplinäre Vielfalt hervorrief.

Im Speziellen möchte ich mich auch bedanken bei:

- Claudia Sommer für die herzliche Art und die Unterstützung bei allen organisatorischen und formellen Angelegenheiten.
- Annette Hochgesand für die Hilfsbereitschaft in jeder Angelegenheit und die netten Gespräche.
- Lara Hirsch für die Geduld beim Messen meiner Masseproben und für die lustigen Momente in unserem Labor
- Insbesondere Desirée für die gemeinsame Laborzeit und die Unterstützung auf die ich mich immer verlassen konnte. Ich schätze sehr deine direkte und ehrliche Art, auch wenn ich sie manchmal nicht hören wollte.

- Philipp Geng für deine tatkräftige Unterstützung als HiWi, womit alles begonnen hat. Dein Humor und die frappante Wortwahl haben mich immer zum Lachen gebracht.
- Franzl dafür, dass ich mit dir alles im biologischen Bereich besprechen und diskutieren konnte. Danke für deine stets offene Tür, auch wenn es mal nicht um die Arbeit ging und die unvergessliche Zeit in den USA und Mexiko.
- Eileen List und Jasmin Muuß dafür, dass ihr die besten Studentinnen überhaupt wart die ich betreuen durfte. Es hat so viel Spaß gemacht mit euch gemeinsam zu arbeiten und euch auf eurem weiteren Weg zu sehen.
- Allen aus dem Erdgeschoss für die gemeinsamen Mittagspausen und den Kaffeeklatsch.
- Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des *GRK 2039* für die tolle Zeit und lustigen Momente während unserer Treffen.
- Meine ehemaligen Kommilitonen Sarah, Hannes und Xenia für die gemeinsame Zeit vom ersten Semester bis zum Ende der Promotion.
- Meiner Freundin Johanna für deine bedingungslose Freundschaft, die unvergessliche Zeit und Aktionen die wir miteinander erlebt haben. Danke für deine Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen kann und die gemeinsamen Werte die wir teilen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Mann Abdou bedanken. Danke für die gemeinsame Zeit mit dir, dafür, dass wir in guten und schlechten Zeiten uns aufeinander verlassen können und zusammenhalten. Du bringst mich zum Lachen und auch manchmal zum Verzweifeln, aber du zeigst mir, dass es sich lohnt für seine Ziele einzustehen.

Abschließend gilt mein größter Dank meinen Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen, das Aushalten so mancher Launen und den stetigen Rückhalt, ohne den das alles nicht möglich gewesen wäre. Danke das ihr immer an mich glaubt und für eure selbstlose Liebe.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Zielsetzung.....	3
3. Theoretische Grundlagen.....	4
3.1 Metabolische Markierung von Nukleinsäuren	4
3.2 Bioorthogonale Reaktionen.....	9
3.3 Bioorthogonale „Click“-Chemie.....	11
3.4 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf	14
3.4.1 Tetrazine für iEDDA-Reaktion.....	16
3.4.2 Dienophile für die iEDDA-Reaktion	22
3.5 Nukleosid-Analoga für metabolische Markierung und Detektion über iEDDA-Reaktion	23
4. Ergebnisse und Diskussion	27
4.1 Dienophilmodifizierte Nukleoside zur metabolischen Markierung von DNA	27
4.1.1 Synthese der linkermodifizierten 2'-Desoxyuridin-Bausteine 1, 8 und 11.....	28
4.1.2 Synthese der „Vinyl“-modifizierten Nukleoside.....	30
4.1.3 Synthese der cyclopropen- und norbornenmodifizierten Nukleoside.....	32
4.2 iEDDA-Reaktion der modifizierten Nukleoside mit Tetrazinen	34
4.2.1 Analyse der iEDDA-Reaktion mittels HPLC	34
4.2.2 Analyse der iEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	39
4.3 Inkorporation der modifizierten Nukleoside in naszierende DNA	45
4.3.1 Viabilitätstest.....	46
4.3.2 Optimierung des Zellkulturmediums.....	47
4.3.3 Isolation genomischer DNA	48
4.3.4 Nachweis modifizierter Nukleoside in genomischer DNA.....	49
4.4 Fluoreszenzmikroskopie	53
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	61
6. Experimententeil.....	65

6.1	Präparatives Arbeiten.....	65
	Reagenzien und Lösungsmittel.....	65
	Allgemeine chemische Synthese	65
6.2	Analytische Methoden und Geräte	66
6.2.1	<i>In vitro</i> „Click“-Experimente	68
6.3	Zellkultur.....	71
6.3.1	Zelllinien	71
6.3.2	Chemikalien und Reagenzien	71
6.3.3	Zusammengesetzte Medien/Lösungen	72
6.3.4	Geräte.....	73
6.3.5	Verbrauchsmaterialien	74
6.3.6	Methoden der Zellkultur	74
6.4	Synthesevorschriften.....	82
7.	Anhang	93
8.	Literaturverzeichnis.....	97
9.	Appendix	102
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
abs.	absolut
Äq	Äquivalente
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
d	Dublett
DA	Diels-Alder-Cycloaddition
dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
dG	2'-Desoxyguanosin
dT	2'-Desoxythymidin
dU	2'-Desoxyuridin
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Zellmedium (<i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
dq	Dublett vom Quartett
dt	Dublett vom Triplett
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FC	Flash-Chromatographie
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
g	Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde
HeLa	Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie (<i>Henrietta Lacks</i>)
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Hz	Hertz
I	Intensität
IdU	5-Iodo-2'-Desoxyuridin
iEDDA	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (<i>inverse electron demand Diels-Alder reaction</i>)
k	Geschwindigkeitskonstante
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
M	Molarität
m	Multipllett
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
nm	Nanometer

Abkürzungsverzeichnis

NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
norm.	normiert
NT	Nukleosidtriphosphats
NTP	Ribonukleosidtriphosphats
OH	Hydroxid
p	Pentett
PBS ^{-/-}	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>) ohne Calcium und Magnesium
pH	pH-Wert
ppm	<i>parts per million</i>
pyTz	3,6-Di-2-pyridyl-1,2,4,5-tetrazine
q	Quartett
quant.	quantitativ
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverse-Phase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	Singulett
SPAAC	Ringspannungsgesteuerte Azid-Alkin-Cycloaddition (<i>strain promoted azide alkyne cycloaddition</i>)
t	Zeit
t	Triplett
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBET	Bindungsenergieübertragung (<i>Trough Bond Energy Transfer</i>)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCO	trans-Cycloocten
TFA	Trifluoracetat
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
wt%	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungsverzeichnis

No/No-Medium	Zellmedium (<i>Minimum Essential Medium</i>) ohne L-Glutamin, ohne Nukleoside
P/S	Penicillin/Streptomycin
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
rcf	Relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>)
VdU	5-Vinyl-2'-Desoxyuridin

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

¹ *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

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

1. Einleitung

Der Nobelpreis für Chemie geht in diesem Jahr 2022 an Carolyn Bertozzi, Morten Meldal sowie an Berry Sharpless. Die drei Wissenschaftler wurden damit für die Entwicklung der sogenannten „Click“-Chemie geehrt, wodurch deren wichtigen Bedeutung sowie das enorme Potential dieser Methode verdeutlicht wird. Der Begriff, unter dem verschiedene Reaktionen gesammelt werden, beschreibt dabei sehr anschaulich das zielgerichtete Zusammenfügen von molekularen Bausteinen.

Die dazu, von Meldal^[1] und Sharpless^[2] unabhängig voneinander entwickelte Reaktion ist aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von Kupfer nur bedingt für die Anwendung in biologischen Systemen geeignet. Carolyn Bertozzi erkannte das Potential hinter dieser Chemie und nutzte sie zur Bildgebung in lebenden Zellen jenseits des Proteoms. Ihr Nachweis von Glykanen auf der Zelloberfläche lebender Zellen^[3] machte die „Click“-Chemie zur Schlüsselkomponente in einer Vielzahl von bioorthogonalen Anwendungen. Dieses breite Spektrum hat sich positiv auf verschiedenste Wissenschaftsbereiche ausgedehnt, darunter Protein-Engineering^[4-5], die Entwicklung von Immunoassays^[6] bis hin zur Materialentwicklung.^[7-8] Bertozzi sagte, es gebe so viele potenzielle Einsatzmöglichkeiten für die „Click“-Chemie, dass sie diese gar nicht aufzählen könne.

Diese Methode erlaubt durch das Einbringen von Fluoreszenzsonden die Visualisierung und Lokalisierung von Zielmolekülen innerhalb lebender Zellen. Solch eine gezielte Visualisierung *in vivo* wurde häufig durch das grünfluoreszierende Protein (GFP) erreicht.^[9] Die von ROGER TSIEN entwickelte und mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Methode^[10] beschränkt sich jedoch ausschließlich auf Proteine, deren DNA-Sequenz mit dem GFP-Gen fusioniert wurde. Durch die „Click“-Chemie kann diese posttranslationale Limitierung aufgehoben werden, da kleine chemische Modifikationen an prinzipiell allen Zielmolekülen angebracht werden können, sodass diese in ihrer biologischen Umgebung kaum beeinflusst werden und mit einem Fluoreszenzreporter zur Visualisierung umsetzbar sind. Aber auch potenzielle Wirkstoffe können dadurch in lebenden Zellen verfolgt werden, sodass diese gezielt optimiert werden können.^[11-12]

Die „Click“-Chemie bietet dabei nicht nur die Möglichkeit zelluläre Prozesse zu visualisieren, sondern sie kann auch aktiv für die zielgerichtete Behandlung von Krebserkrankungen genutzt werden, um damit die Nebenwirkungen von Chemotherapeutika zu minimieren.^[13] Viele Wirkstoffe zielen dabei auf die Inhibierung der Nukleinsäuresynthese ab, um das Tumorgewebe in seinem Wachstum zu hemmen.^[14] Damit rückt auch die DNA-Replikation der Zellen, als Voraussetzung eines Organismus um zu wachsen und sich zu regenerieren, in den Fokus der Wissenschaft. Die Markierung, der Nachweis und die Quantifizierung von Zellen, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befinden, sind nicht nur für die Charakterisierung der biologischen Grundlagen wichtig, sondern auch für die Bestimmung

der zellulären Reaktionen auf medikamentöse Behandlungen. Die „Click“-Chemie wurde daher auch zunehmend für Nukleinsäuren angepasst, wodurch neue Markierungsstrategien für die Visualisierung von Nukleinsäuren entstanden (**Abbildung 1**).^[15-18]

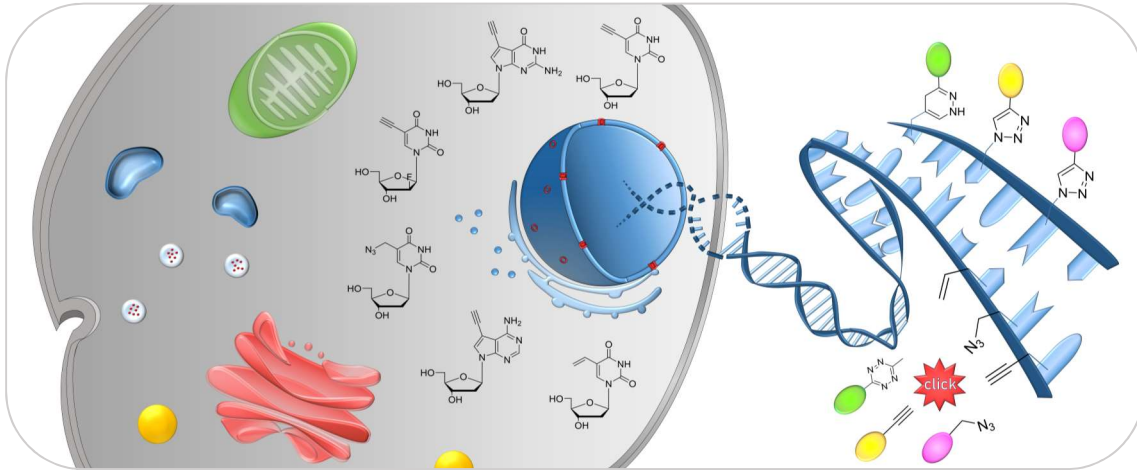


Abbildung 1: Anwendung der „Click“-Chemie zur Visualisierung von DNA in Zellen.

Die Kombination von Chemie und Biologie wurde in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt, wodurch zahlreiche leistungsfähige Methoden hervorgingen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von chemisch modifizierten Nucleosiden, welche zu einer verbesserten Visualisierung von DNA *in vivo* genutzt werden können.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten 2'-Desoxyuridine mit Dienophilen unterschiedlicher Reaktivität und sterischer Hinderung modifiziert werden, um diese über metabolische Markierung *in vivo* in die zelluläre DNA zu inkorporieren. Diese sollten postsynthetisch über eine Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) mit einem tetrazinmodifizierten Fluorogen in der nativen Chromatinstruktur der DNA visualisiert werden (**Abbildung 2**).

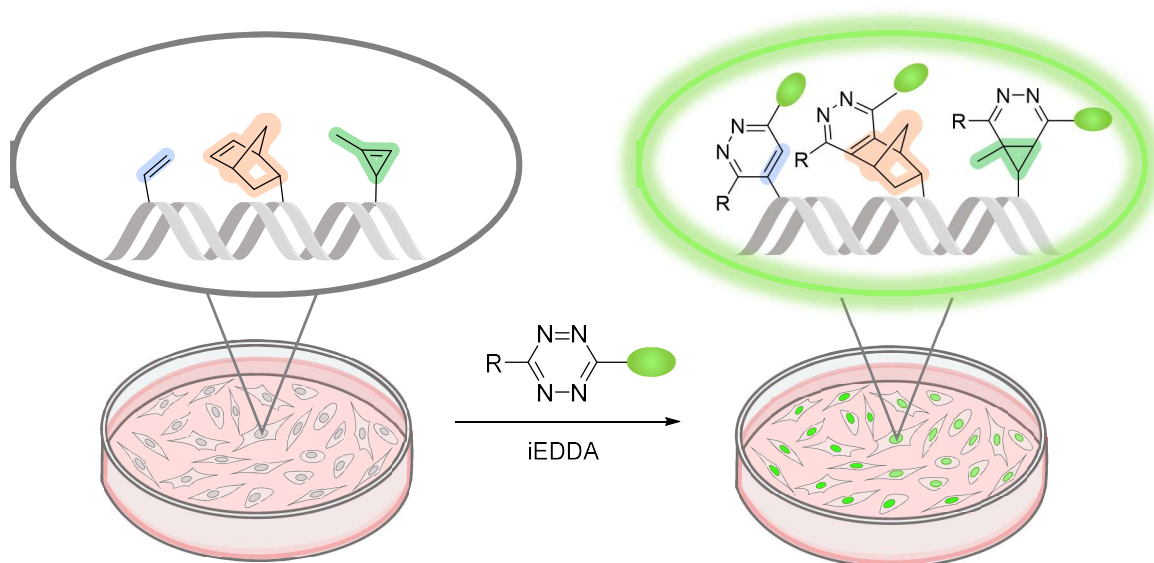


Abbildung 2: Metabolische Markierung zellulärer DNA mit dienophilmodifizierten Nucleosiden. Die anschließende Visualisierung erfolgt über eine iEDDA-Reaktion mit einem tetrazinmodifizierten Farbstoff.

Die Synthese der modifizierten Nucleoside sollte dabei über einen modularen Aufbau erfolgen, indem die Dienophile über ein Linker-System an das 2'-Desoxyuridin angebracht werden. Durch Variation des Linker-Moduls sollte somit auch dessen Einfluss auf die Reaktivität analysiert werden. Untersucht werden sollten dabei Dienophile mit endständigen Doppelbindungen wie der Vinylgruppe als kleinste Modifikation sowie Cyclopropen- und Norbornenmodifikationen, die besonders aufgrund ihrer Ringspannung von Interesse sind. Hierdurch sollten hohe Geschwindigkeitskonstanten in einer iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen erreicht werden. Allerdings fanden entsprechend modifizierte Nucleoside aufgrund ihrer sterischen Hinderung bisher keine Anwendung in lebenden Zellen. Demnach sollte untersucht werden, ob solche Dienophile von dem zellulären Nucleosidstoffwechselweg als Substrat akzeptiert und damit modifizierte Nucleoside in die DNA inkorporiert werden können. Somit könnten diese zur Visualisierung hochdynamischer Prozesse in der Zelle angewendet werden.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Metabolische Markierung von Nukleinsäuren

Die metabolische Markierung umfasst in der Biochemie verschiedene Methoden wie die Nuklidmarkierung, Rekombinante- oder die bioorthogonale Markierung um eine Nachweis- oder Affinitätsmarkierung in Biomolekülen einzubauen. Dafür wird ein natürlicher, molekularer Baustein der Zielstruktur chemisch so modifiziert, dass er weiterhin von den zelleigenen Stoffwechselwegen mit ihren Synthese- und Modifizierungsschritten toleriert wird. Das durch die chemische Modifikation markierte Analogon wird somit anstelle des natürlichen Bausteins von der Zelle eingebaut und kann anschließend über die selektive Markierung in der Zielstruktur nachgewiesen werden. Die Anwendung erfolgt meistens über die Anreicherung des Nährmediums von Zellkulturen mit dem modifizierten Analogon oder dessen Vorstufen. Auf diese Weise können mittels der metabolischen Markierung effizient dynamische Stoffwechselprozesse *in vivo* beobachtet und weitere wechselwirkende Moleküle identifiziert werden.^[19-21]

Ursprünglich konzentrierte sich die metabolische Markierung nur auf Proteine und Kohlenhydrate.^[3, 22-24] Um jedoch ein ganzheitliches Verständnis zellulärer Prozesse zu erhalten, ist es essenziell, alle Biomoleküle und deren Zusammenspiel in der Zelle zu untersuchen. Insbesondere Nukleinsäuren spielen in der Zellbiologie eine zentrale Rolle. Ihre Untersuchung sowie das Verständnis aller Aspekte ihrer Funktion und Dynamik sind nicht nur im Bereich der Grundlagenforschung, sondern auch in der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung und weiteren Forschungsfeldern von wesentlicher Bedeutung.^[25-27]

Durch die Markierung der DNA als Träger der Erbinformation können Mechanismen, wie die der DNA-Synthese und -Replikation besser untersucht werden.^[28] Dies dient dem Verständnis um die Dynamik des Zellzyklus sowie die Entwicklung und Regeneration von Gewebe.^[29] Zur Untersuchung von RNA hat sich die metabolische Markierung zu einem essentiellen Verfahren entwickelt. Sie bietet verschiedene Methoden zur Analyse in Bezug auf RNA-Synthese, Lebensdauer und Lokalisierung. Auch die Transkriptionsdynamik kann untersucht werden, wobei die Zahl der identifizierten, nicht-kodierenden RNA-Subtypen (siRNA, miRNA, lncRNA, piRNA) stetig zunimmt. Deren Erforschung in Bezug auf ihre regulatorischen Eigenschaften gerät immer mehr in den Fokus der Wissenschaft.^[30-32]

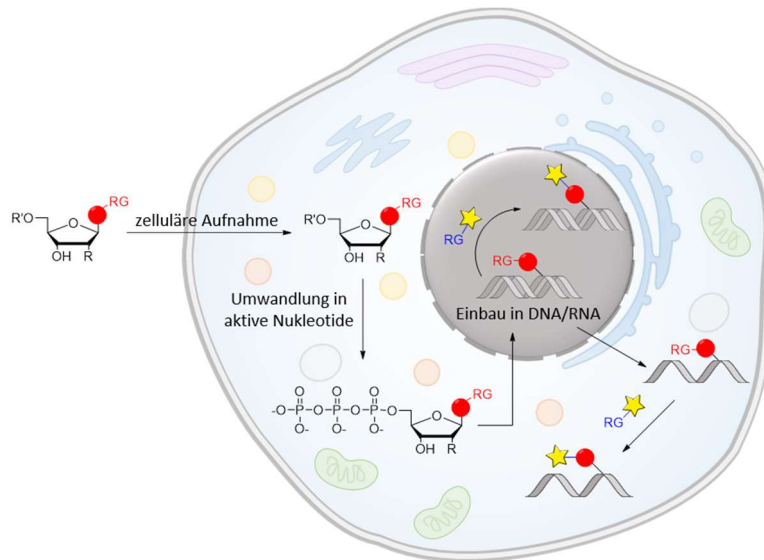


Abbildung 3: Schematische Darstellung der metabolischen Markierung von Nucleinsäuren mit einem chemisch modifizierten Baustein (RG, rot). Die Detektion erfolgt nach Umwandlung in ein aktives Nucleotid und dem Einbau in DNA oder RNA über eine zweite kompatible Reaktionsgruppe (RG, blau) welche an ein Fluorophor (gelb) gebunden ist. R = H für dNTP, OH für NTP.

Die Bausteine der DNA sind die 2'-Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPe) und die der RNA die Ribonucleotidtriphosphate (NTPe). Diese Strukturen sind die Substrate für die DNA- bzw. RNA-Polymerasen, welche die Synthese der entsprechenden Nucleinsäuren katalysieren. Zur metabolischen Markierung von Nucleinsäuren wird ein chemisch modifiziertes Analogon des natürlichen Bausteins benötigt (**Abbildung 3**). Die Einbringung eines modifizierten 2'-Desoxy- bzw. Ribonucleotidtriphosphats (NTs) in die Zelle stellt somit den direktesten Weg zur metabolischen Markierung dar. Jedoch ist die zelluläre Aufnahme von NTen über die Zellmembran eine große Herausforderung. Aufgrund ihres anionischen Charakters können sie die Zellmembran nicht ohne geeignetes Transportsystem durchqueren. Daher basieren die meisten Ansätze für die Verwendung von NTen auf der physikalischen und mechanischen Permeabilisierung der Membran^[33] oder der Aufnahme von Nanopartikeln.^[34] Im Jahr 2018 publizierte KRAUS *et al.*^[35] einen synthetischen Nucleosidtriphosphat-Transporter. Der Transporter besteht aus einem Rezeptor, der einen nicht-kovalenten Komplex mit einem Triphosphat-Anion bildet, und einem zelldurchdringenden Wirkstoff, der den Komplex durch die Zellmembran transloziert. Das NT wird dann aus dem Komplex in das intrazelluläre Milieu freigesetzt und schließlich in naszierende Nucleinsäuren eingebaut. Aufgrund des hohen Aufwands für die Synthese des Transporters und der NTPe, wird bevorzugt auf die Vorläufer Bausteine für die metabolische Markierung zurückgegriffen. Hierfür werden vor allem Nucleoside herangezogen, weniger gebräuchlich ist die Verwendung der Nucleobasen^[36] aufgrund der erweiterten Metabolisierung. Nucleoside sind synthetisch zugänglich und können chemisch sowohl an den

Nukleobasen als auch an der Ribose modifiziert werden. Das bietet eine große Möglichkeit an Diversität, um verschiedene Markierungen an die Bausteine des Biomoleküls anzubringen.

Die zelluläre Aufnahme von Nucleosiden über die Zellmembran erfolgt dabei im Gegensatz zu den NTeN aktiv über Nucleosid-Transporter ohne die Notwendigkeit eines Transportsystems.^[37-38] Innerhalb einer endogenen Enzymkaskade werden sie über drei Nucleosid-Kinasen phosphoryliert, um anschließend von DNA- oder RNA-Polymerasen durch aufeinanderfolgende Replikations- bzw. Transkriptionsrunden in neu entstehende Nucleinsäuren eingebaut zu werden (**Abbildung 4**).

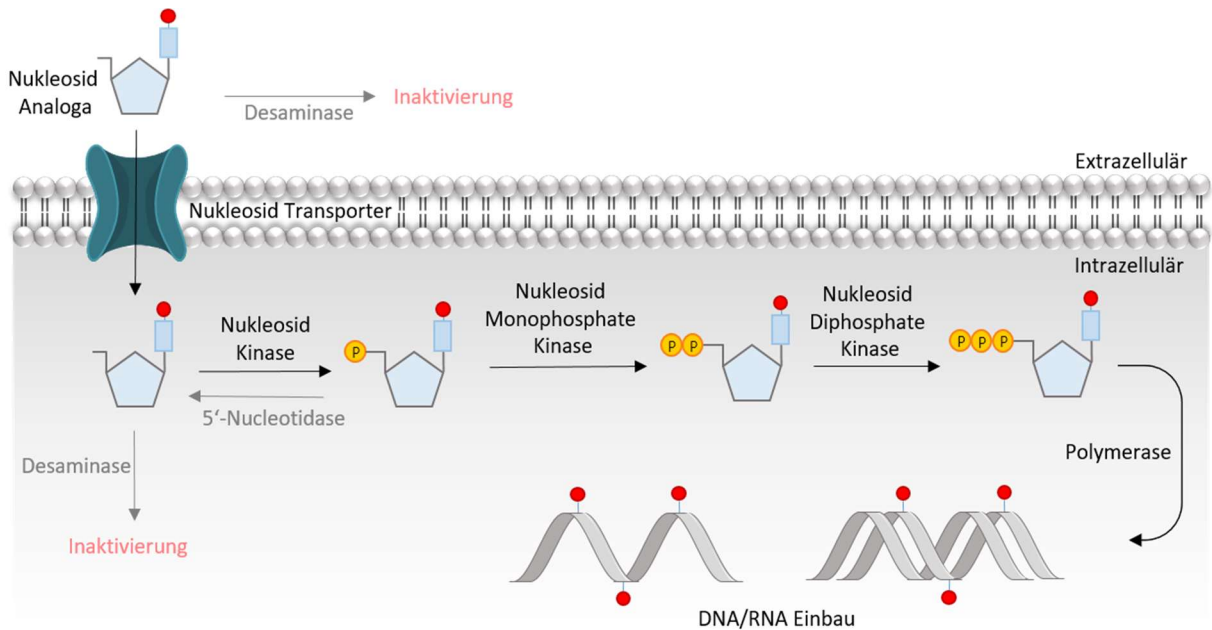


Abbildung 4: Aktive Aufnahme und enzymatische Phosphorylierungskaskade eines Nucleosid- bzw. 2'-Desoxynucleosid-Analogons.

Da Enzyme häufig eine Substratspezifität aufweisen, stellt dieser Stoffwechselweg den limitierenden Prozess für die metabolische Markierung von Nucleinsäuren dar. Diese ergibt sich aus der spezifischen Struktur des aktiven Zentrums mit seinen Substratbindungsstellen. Besonders der initiierende Phosphorylierungsschritt durch die Nucleosidmonophosphat (NMP) -Kinase weist dabei eine äußerst hohe Substratspezifität auf.^[39-40] Über die dreidimensionale Analyse der Kristallstrukturen dieser substratgebundenen Kinasen konnte SPITALE *et al.*^[41] mögliche Positionen für die Einbringung von chemischen Modifikationen identifizieren. Dabei zeigte die Uridin-Cytidin-Kinase eine offene Tasche an der C5-Position der Base. Modifikationen an dieser Position sollten daher von der Kinase besser toleriert werden, als an anderen Stellen des Moleküls. Die Adenosin-Kinase besitzt ebenfalls Freiräume welche sich an den Positionen C2, N6 und N7 der Nucleobase befinden (**Abbildung 5**). Allerdings sind diese Freiräume nicht unbegrenzt, weswegen vor allem kleine Modifikationen toleriert werden.^[21]

Eine Möglichkeit, um die hohe Substratspezifität der NMP-Kinase zu umgehen, besteht darin mit genetisch veränderten Zellen zu arbeiten. So besitzen virale Kinasen häufig eine verringerte

Substratspezifität, wodurch eine gesteigerte Akzeptanz für modifizierte Nucleoside vorliegt. Durch transiente oder stabile Transfektion kann beispielsweise die Kinase des Herpes-Simplex-Virus in eine Zelllinie eingebracht werden, um die Phosphorylierung der modifizierten Nucleoside zu steigern.^[42]

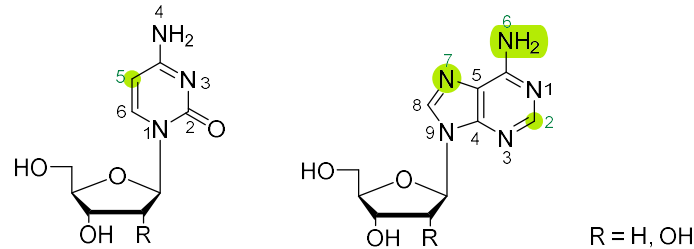


Abbildung 5: Strukturen von 2'-Desoxy- bzw. -Cytidin und -Adenosin. In grün sind die geeigneten Positionen zur Modifikation markiert.

Um den streng limitierenden Prozess der ersten Phosphorylierung zu umgehen, wurde im Bereich der *Prodrug* (inaktiver Arzneistoff) Technologie eine Methode entwickelt, bei der Nucleotidmonophosphate (NMP) erfolgreich in die Zelle eingebracht werden konnten. Bei diesen NTP-Vorläufern den "*Protides*", wird die negative Ladung des Phosphats mit Hilfe von zwei chemischen Gruppen maskiert. Dadurch können diese Verbindungen über passive Diffusion in die Zelle eindringen. Im Zytosol wird das NMP über enzymatische Abspaltung der Maskierung in seine aktive Form umgesetzt. Die Maskierung des Phosphonats des NMPs wurde in zahlreichen Anwendungen über eine Phosphoester-Bindung eingebracht. Bekannte Gruppen sind dabei 5'-Bisphivaloyloxymethyl (POM),^[43] sowie 5'-Bis-(4-acetoxybenzyl) (AB)^[44], wie sie in **Abbildung 6** zu sehen sind. Die Aktivierung des NMPs in der Zelle erfolgt dabei durch Esterasen. Am meisten wird jedoch die von MCGUIAN *et al.*^[45] entwickelte "*ProTide*"- Strategie zur Maskierung verwendet.^[46] Dabei erfolgt die Maskierung über Phosphoramidate^[47], welche anschließend in der Zelle enzymatisch über Phosphoramidasen gespalten werden.

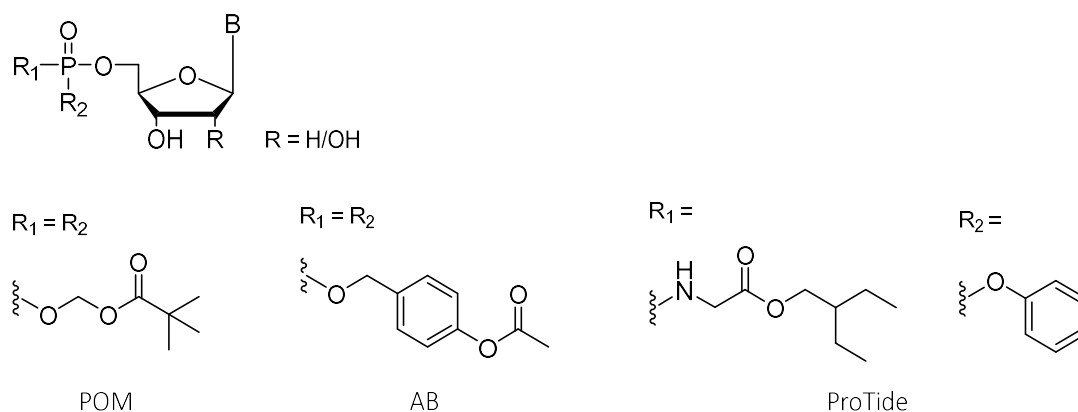


Abbildung 6: Häufig verwendete *Protides*, bei denen die Phosphatgruppe des NMPs durch verschiedene Reste maskiert wird.

Einen ebenfalls limitierenden Faktor stellt die Substratspezifität der DNA- und RNA-Polymerasen dar, welche aber hauptsächlich für Anwendungen *in vitro* erforscht werden. Hierbei werden im Bereich des Polymerase-*Engineering*s optimierte Polymerasen durch das Design, *Screening* und gezielte Evolution entwickelt mit dem Hauptziel, modifizierte Nucleoside in Nucleinsäuren einzubauen, zu verlängern und zu replizieren.^[48-50]

Um das Potential der metabolischen Markierung von Nucleinsäuren voll ausschöpfen zu können, muss das modifizierte Analogon so gewählt werden, dass es als Substrat von den verschiedenen Enzymen des beteiligten Stoffwechselweges akzeptiert wird. Die hierfür benötigten Eigenschaften können durch die Analyse struktureller Merkmale optimiert werden. Dennoch kann es aufgrund der Komplexität des biologischen Systems zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen kommen. Dabei stellt vor allem die Zelltoxizität einen wichtigen Faktor dar. Diese kann sich in einer verminderten Zellviabilität bis hin zum Zelltod äußern. In Bezug auf den Nucleosid-Stoffwechselweg können zelluläre Prozesse durch die Hemmung der beteiligten Enzyme durch die zugeführten, modifizierten Nucleoside oder deren metabolischen Produkte beeinträchtigt werden.^[51] Auch eine verminderte Replikations- und Translationsrate kann eine Folge sein. Die eingebauten Analoga können in den Nucleinsäuren zu destabilisierenden Effekten führen und dadurch Strangbrüche verursachen.^[52-53] Bei RNA-Strängen können die postsynthetischen Modifikationen und die Translation der Proteinbiosynthese gestört werden.^[54-55] Aufgrund dieser Nebenwirkungen und der Frage, inwieweit sie toleriert werden können, muss die Wahl eines chemisch modifizierten Analogons von den Zielen des Experiments abhängig gemacht werden. Es ist entscheidend die Wechselwirkungen mit dem biologischen System zu verstehen, nachzuweisen und zu entscheiden, ob sie die Ergebnisse einer Studie beeinflussen können.

Eine häufig angewandte Methode zur Markierung von DNA ist die Verwendung des radioaktiv markierten ³H-Thymidins oder 5-Brom-2'-desoxyuridins (BrdU). Der radioaktive Nachweis erfolgt über die Autoradiographie. Die Visualisierung von BrdU erfordert die Fixierung der Zellen und eine anschließende DNA-Denaturierung, um den Zugang der fluoreszierenden Antikörper an BrdU zu ermöglichen.^[56-57] Dadurch ergeben sich stark limitierende Faktoren. Neben den erheblichen zytotoxischen und mutagenen Eigenschaften führt der Einbau von BrdU zur Destabilisierung der DNA. Die harsche chemische Denaturierung spaltet und depurinert die DNA, um BrdU als Epitop für die Antikörper freizulegen, führt jedoch ebenso zur Zerstörung von weiteren Zellbestandteilen.^[58] Weiterhin ist die Anwendung durch die beschränkte Gewebedurchlässigkeit der Anti-BrdU-Antikörper nur auf bestimmte Zelltypen und die äußerste Zellschicht von Gewebeproben beschränkt.^[59]

Seit der Veröffentlichung von SALIC und MITCHISON^[60] im Jahr 2008, die ein alkinmodifiziertes Nucleosid für den Nachweis verwenden, werden neue Strategien zur postsynthetischen metabolischen Markierung von DNA immer weiter vorangetrieben. Dabei wird die bioorthogonale Reaktion von

chemisch funktionellen Gruppen in den Fokus gebracht, deren Anwendung in biologischen Systemen einen enormen Vorteil bietet und im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

3.2 Bioorthogonale Reaktionen

Die chemische Markierung von Biomolekülen ist eine der wichtigsten Methoden, um biologische Prozesse *in vitro*, sowie *in vivo* zu beobachten und zu untersuchen. Sie tragen dazu bei, die Grundlagen der enormen Komplexität und Vielfalt des Lebens zu erforschen. Die Herausforderung besteht darin, die chemische Markierung selektiv in der hochkomplexen Umgebung zellulärer Systeme zu detektieren, ohne dabei parallel ablaufende biologische Prozesse zu beeinflussen.^[22, 61-62]

Für diese Anforderungen stehen der chemischen Biologie eine Reihe von Reaktionen zur Verfügung, die sich als bioorthogonal erweisen. Unter bioorthogonalen Reaktionen versteht man chemische Reaktionen zwischen zwei, nicht nativen funktionellen Gruppen, die selektiv miteinander eine Reaktion eingehen und gleichzeitig mit keiner anderen Komponente des biologischen Systems reagieren.^[63] Die bioorthogonalen Reaktionen sind äußerst selektiv und gehen keine Nebenreaktionen ein, sie sind dazu gedacht Synthese im lebenden Organismen und Zellen durchzuführen. Der Begriff der bioorthogonalen Markierung wurde in den frühen 2000er Jahren durch die US-amerikanische Biochemikerin CAROLYN BERTOZZI geprägt. Sie legte mit der Staudinger-Ligation den Grundstein für diesen Forschungsbereich.^[3]

Im Allgemeinen handelt es sich bei bioorthogonalen Reaktionen um einen zweistufigen Markierungsprozess, der in der folgenden **Abbildung 7** dargestellt ist. Im ersten Schritt erfolgt der Einbau eines chemischen Reporters in das zu untersuchende Biomolekül. Ein chemischer Reporter ist hierbei meist eine nicht-natürliche funktionelle Gruppe, die orthogonal zu den in biologischen Systemen vorhandenen Funktionalitäten reagiert. Dazu werden die entsprechenden Monomere der Biomoleküle zunächst chemisch mit einem Reporter-molekül verknüpft und anschließend chemisch, enzymatisch, metabolisch oder durch *Protein-Engineering* in das gewünschte Biomolekül inkorporiert.^[64-65] Nach erfolgreicher Inkorporation in das Biomolekül kann das bioorthogonalisierte System postsynthetisch mit einem exogen eingeführten Kupplungspartner selektiv zur Reaktion gebracht werden.^[66-67]

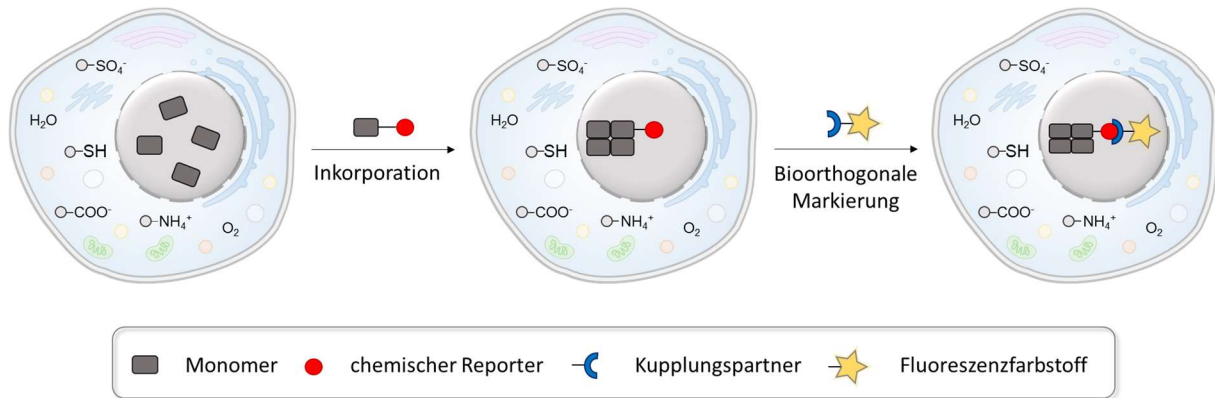


Abbildung 7: Schematische Darstellung des zweistufigen Markierungsprozess der bioorthogonalen Markierung. Im ersten Schritt wird ein Monomer des Biomoleküls mit einem chemischen Reporter modifiziert und in die Zelle eingebracht. Anschließend folgt ein Kupplungspartner, der meistens mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist und in einer bioorthogonalen Reaktion mit dem Reporter reagiert.

Der Reaktionspartner ist dabei ein Molekül, welches eine komplementäre bioorthogonale funktionelle Gruppe enthält. Zusätzlich ist er meist an eine fluoreszierende Struktur gebunden, was mehrere Vorteile bietet. Dadurch können zeitliche und räumliche Prozesse mittels Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* beobachtet werden.^[68] Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Regel sehr sensitiv und können über ihre Intensität und Lebenszeit quantifiziert werden. Auch, dass Farbstoffe mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen über das gesamte Spektrum verfügbar sind, macht sie für die bioorthogonale Chemie unerlässlich. Daneben können auch Affinitätsmarker und Wirkstoffe gebunden sein.^[69-70]

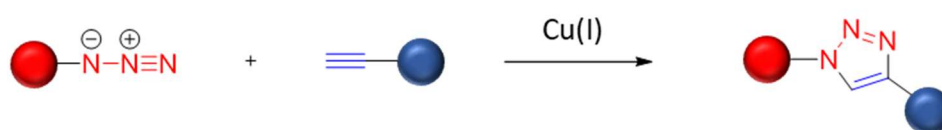
Bioorthogonale Reaktionen müssen neben den bereits genannten Anforderungen der Chemo Selektivität und Biokompatibilität noch weitere Kriterien erfüllen. Sie müssen unter physiologischen Bedingungen von Temperatur, Normaldruck, neutralem pH-Wert und einer aeroben Umgebung ablaufen. Die Reaktion darf nicht durch Wasser oder endogene Elektrophile, Nucleophile sowie Reduktions- und Oxidationsmittel gestört werden. Sie soll schnell und selektiv ohne die Bildung störender Nebenprodukte ablaufen. Die Reaktion mit dem Kupplungspartner darf zu keiner wesentlichen Strukturänderung des Biomoleküls führen, da es sonst zu einem Verlust der biologischen Aktivität kommen kann. Die verwendeten funktionellen Gruppen sollten im biologischen System nicht natürlich vorkommen. Zusätzlich sind die metabolische Stabilität der Edukte, Intermediate und Produkte sowie eine geringe Zytotoxizität wichtige Kriterien.^[22, 65, 71]

Eine letzte wichtige Anforderung an bioorthogonale Reaktionen stellt die Reaktionsgeschwindigkeit dar. Da die zu untersuchenden zellulären Prozesse sich sehr schnell auf einer Zeitskala im Bereich bis Mikrosekunden bewegen, ist eine entsprechend hohe Reaktionsgeschwindigkeit notwendig.^[72] In der Regel weisen bioorthogonale Reaktionen eine Reaktionskinetik 2. Ordnung auf. Damit sind sie von der

Geschwindigkeitskonstante k_2 sowie von den Konzentrationen der Edukte abhängig. Da ein Überschuss an Edukten im Zellsystem aufgrund der oftmals zytotoxischen Wirkung nicht zielführend ist, sollte für eine effektive Markierung die Geschwindigkeitskonstante in einem Bereich von $0,001 - 1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ liegen.^[73-75] Trotz der hohen Anforderungen, die an eine bioorthogonale Reaktion gestellt werden, gelang es in den letzten Jahren, zahlreiche Strategien zu entwickeln, so dass für diese spezifische Reaktionsklasse unter BARRY SHARPLESS der Begriff der „Click“-Chemie geprägt wurde.^[2]

3.3 Bioorthogonale „Click“-Chemie

Seit mit der Staudinger-Ligation von SAXON und BERTOZZI^[3] die erste „Click“-Reaktion veröffentlicht wurde, folgten zahlreiche weitere Ansätze, die sich mit den stetig wachsenden Anforderungen der chemischen Biologie weiterentwickelt haben. Die wohl bekannteste und meist angewandte Reaktion stellt die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC, *copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) dar. Sie basiert auf der von HUISGEN entdeckten 1,3-dipolaren Cycloaddition, bei der Azide mit terminalen Alkinen zu 1,2,3-Triazolen reagieren.^[76] Da diese Reaktion durch hohe Temperaturen und Drücke aktiviert werden muss, war sie zunächst jedoch nicht für Anwendungen auf Zellebene geeignet.^[22] Erst durch die unabhängige Entdeckung im Jahr 2002 von SHARPLESS^[77] und MELDAL^[1], dass durch die Zugabe von Kupfer(I) zur Aktivierung der Alkine die hohen Temperaturen umgangen werden können, konnte sich die Methode in der „Click“-Chemie etablieren.^[78-79] Doch nicht nur die Reaktionsführung unter physiologischen Bedingungen war nun möglich, auch die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Regio- und Chemoselektivität konnten deutlich verbessert werden.^[80-81] Die allgemeine Darstellung dieser Reaktion wird in **Schema 1** gezeigt.



Schema 1: Allgemeine Darstellung der CuAAC eines Azids mit einem terminalen Alkin zu einem 1,2,3-Triazol.

Im Kontext der postsynthetischen Markierung von Nucleinsäuren, wurden einige alkin- und azid-modifizierte Nucleoside entwickelt. Die wichtigsten zur *in vivo* Markierung von DNA sind in **Abbildung 8** aufgeführt. Diese weisen aufgrund der kleinen Alkyl- und Azidmodifizierung eine besonders gute Durchdringung der zellulären Umgebung auf. Das meist angewandte Nucleosid ist hierbei 5-Ethyl-2'-desoxyuridin (**EdU**), welches von SALIC und MITCHISON^[60] publiziert wurde. Durch metabolische Markierung wird **EdU** in zelluläre DNA eingebaut und anschließend über CuAAC mit einem Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Diese Methode wurde später von der Firma INVITROGEN kommerzialisiert und wird seither in einem breiten Spektrum in der Nucleinsäureforschung

eingesetzt.^[82] Aufgrund der hoch toxischen Eigenschaften von **EdU** als modifiziertes Nukleosid, das den Stillstand des Zellzyklus sowie DNA-Strangschäden verursacht, wurden weitere alkinmodifizierte Nucleoside hervorgebracht.^[83-85] Dabei zeigte vor allem ein fluoriertes Arabinosyl-Derivat (**F-ara-EdU**) von LUEDTKE *et al.* eine deutlich geringere Zytotoxizität und war somit auch für Langzeituntersuchungen besser geeignet.^[86] Auch 5-Ethyl-2'-desoxycytidin (**EdC**) erwies sich im Vergleich zu **EdU** als geringer zytotoxisch wenn es mit Thymidin zugegeben wird.^[87-88] Mit 7-Deaza-7-ethyl-2'-desoxyadenosin (**EdA**) wurde ebenfalls gezeigt, dass auch alkinmodifizierte Purinbasen zur Markierung von DNA genutzt werden können.^[89] Im Gegenzug wurden ebenfalls azidmodifizierte Nucleoside angewandt, von denen 5-(Azidomethyl)-2'-desoxyuridin (**AmdU**) die besten chemischen Eigenschaften in Bezug auf die Stabilität aufwies und ebenfalls zur Markierung von DNA verwendet wurde.^[42] Auch entsprechende Nucleosid-Derivate wurden erfolgreich synthetisiert und zur *in vivo* Markierung von RNA angewandt.^[90]

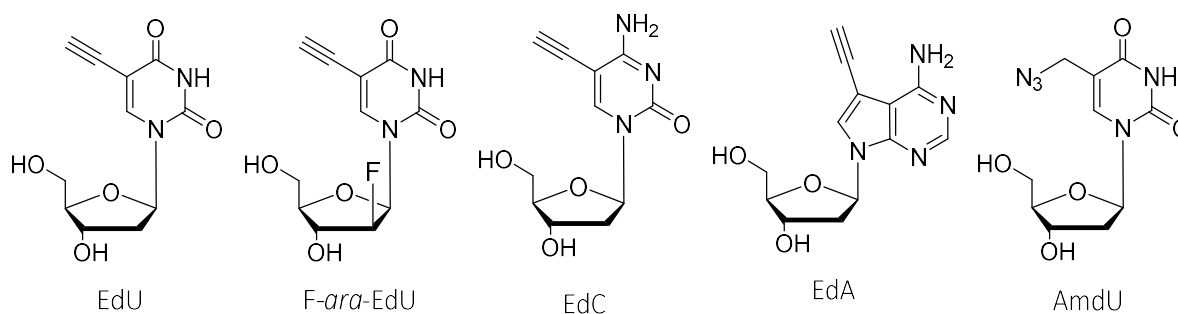


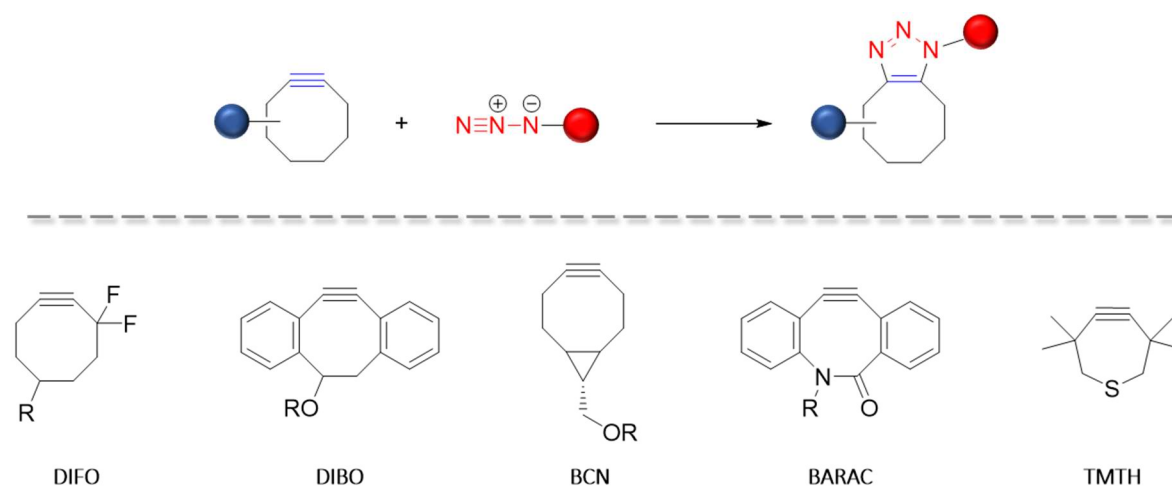
Abbildung 8: Alkin- und azidmodifizierte 2'-Desoxynucleoside zur *in vivo* Markierung von DNA mittels CuAAC.

Trotz der verbesserten biologischen Anwendung dieser Reaktion bleibt die Verwendung von Kupfer(I)-Salzen grundsätzlich zelltoxisch. Diese katalysieren die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und verursachen dadurch oxidativen Stress^[91] sowie DNA-Schäden, wodurch die Darstellung von Nucleinsäuren in gut erhaltenen zellulären Strukturen verhindert wird.^[92]

Aufgrund dieser Limitierung rückten kupferfreie Alternativen immer mehr in den Fokus der bioorthogonalen Markierungsstrategien. Eine davon stellt die spannungsgesteuerte Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC, *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) von BERTOZZI *et al.* dar.^[93] Anstelle des Kupferkatalysators wird hier die Ringspannung von cyclischen Alkinen, in der Regel eines Cyclooctins, für eine [3+2]-dipolare Cycloaddition ausgenutzt. Bereits in den 1960er Jahren beobachteten WITTIG und KREBS die starke Reaktivität zwischen Aziden und gespannten Alkinen bei milden Reaktionsbedingungen sowie deren selektive Reaktion ausschließlich zum Triazol, analog zur CuAAC.^[94] Das Cyclooctin bietet im Vergleich zu Cycloheptin und Cyclononin dabei den besten Kompromiss zwischen der Reaktivität mit Aziden und einer ausreichenden Stabilität in wässriger Umgebung. Durch die Synthese verschiedener Cyclooctin-Derivate (**Schema 2**) konnte die Reaktivität weiter optimiert werden. Dies wurde durch Substitution mit Fluoriden (**DIFO**), über zusätzliche

Ringspannung durch Anellierung von Phenyl- (**DIBO**) oder Cyclopropyl-Ringen (**BCN**) erreicht. Auch das Einbringen von Heteroatomen in den Cyclooctin-Ring (**BARAC**, **TMTH**) kann die Reaktivität weiter erhöhen.^[95]

Dennoch steht diese Reaktion im Vergleich zur CuAAC bezogen auf Reaktionsgeschwindigkeit weit zurück. So können bis heute nicht ansatzweise ähnliche Geschwindigkeitskonstanten erreicht werden ($k_{2\text{CuAAC}} = 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs. $k_{2\text{SPAAC}} = 10^{-2} - 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[64] Ebenso weisen einige Derivate eine erhöhte Hydrophobizität auf, was sie für die Anwendung in zellulärer, wässriger Umgebung ausschließt. Auch die Insertion in die Zellmembran oder die unspezifische Anbindung an Biomolekülen konnten bei Dibenzocyclooctin (**DIBO**) und Biarylazacyclooctinon (**BARAC**) bereits beobachtet werden.^[63]



Schema 2: Oben: schematische Darstellung einer SPAAC zwischen einem Cyclooctin und einem Azid. Unten: Strukturen bekannter Cyclooctin-Derivate: Difluorocyclooctin (**DIFO**), Dibenzocyclooctin (**DIBO**), Bicyclo[6.1.0]nonin (**BCN**), Biarylazacyclooctinon (**BARAC**), und Tetramethylthiocycloheptin (**TMTH**).

Im Hinblick auf die metabolische Markierung von Nucleinsäuren stellen die sterisch anspruchsvollen Modifikationen ein großes Hindernis bei der Akzeptanz der Kinasen dar. Die verfügbaren Freiräume in den enzymatischen Strukturen sind begrenzt und verhindern somit den Einsatz cyclooctin-modifizierter Nucleoside. Auch als Reaktionspartner für azidmodifizierte Nucleoside konnte aufgrund der schlechten zellulären Aufnahme der Reaktanden nur Experimente *in vitro* durchgeführt werden. Dennoch gelang LUEDTKE *et al.* mit einer Dreikomponenten-"Doppelklick"-Strategie die erstmalige Verwendung von SPAAC für die metabolische Markierung von Nucleinsäuren *in vivo*.^[96] Dabei wird ein kationisches Sondenheimer-Diin-Derivat zur nicht-kovalenten Interkalation in doppelsträngige DNA verwendet.^[97] Dadurch schafft er eine räumliche Nähe zu den zuvor inkorporierten Azid-Nucleosiden, welche in einer SPAAC miteinander reagieren. Das entstandene hoch gespannte Alkinprodukt reagiert nachfolgend mit einem azidmodifizierten Fluoreszenzfarbstoff in einer zweiten SPAAC und ermöglicht dadurch die Detektion.

Die beiden erläuterten Reaktionen CuAAC und SPAAC zeigen nur begrenztes Potential zur metabolischen Markierung von Nukleinsäuren und deren Nachweis im lebenden Zellsystem. Ihre Anwendung erfordert daher häufig die Fixierung von Zellen. Aus diesen bildgebenden Informationen kann allerdings nur eine Momentaufnahme gewonnen werden, welche zudem durch Fixierungsartefakte beeinträchtigt wird.^[98] Da nur die Bildgebung in lebenden Zellen Erkenntnisse über dynamische intrazelluläre Prozesse sowie deren Kinetiken und räumliche Anordnungen liefern können, müssen weitere Markierungsstrategien untersucht werden.^[99-100]

3.4 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

Eine weitere Reaktion aus dem stetig wachsenden Repertoire der „Click“-Chemie ist die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA, *inverse electron demand Diels-Alder reaction*). Sie ist dabei von besonderem Interesse in der chemischen Biologie, da sie von den bereits genannten Kriterien für eine bioorthogonale Reaktion die meisten erfüllt. Sie zeichnet sich neben ihrer Biokompatibilität und Selektivität durch hohe Reaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten aus und läuft zudem ohne Zugabe eines Katalysators ab.

Die Diels-Alder-Reaktion (DA) wurde bereits 1928 von OTTO DIELS und seinem damaligen Schüler KURT ALDER entwickelt, wofür beide im Jahr 1950 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurden.^[101]

Die iEDDA-Reaktion wurde nachfolgend von CARBONI *et al.* und LINDSEY *et al.* veröffentlicht.^[75]

Im Allgemeinen beschreibt die klassische DA eine [4+2]-Cycloaddition zwischen Dienophilen und Dienen, in der Regel Alkene oder Alkine zu einem Cyclohexen. Formal kommt es während der Reaktion zu einer konzertierten Umlagerung der π -Elektronen der Reaktionspartner, wodurch zwei neue σ -Bindungen entstehen, um den Ring und eine Doppelbindung zu bilden. Die Umwandlung dieser beiden π -Bindungen in zwei σ -Bindungen ist thermodynamisch begünstigt und stabilisiert somit die Produkte. Auch der aromatische Charakter des Übergangszustands wirkt stabilisierend und begünstigt die Reaktion. Der konzertierte Mechanismus, in dem die Edukte parallel zueinander durch primäre Orbitalwechselwirkungen unter Beibehaltung ihrer relativen Konfiguration ausgerichtet werden, führt zu einer hohen Regio- und Stereoselektivität.

Die für die Reaktion entscheidende Energiedifferenz zwischen Dien und Dienophil kann über die Molekülorbitaltheorie beschreibbaren Grenzorbitale der Edukte veranschaulicht werden. Entscheidend für die Reaktion ist die Energiedifferenz zwischen dem höchst besetzten Molekülorbital (HOMO, *highest occupied molecular orbital*) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*). Je geringer die Energiedifferenz zwischen HOMO und LUMO, desto besser ist die Wechselwirkung der Orbitale, woraus sich eine schnellere Cyclisierung und eine erhöhte Reaktionsrate ableiten. Betrachtet man nun die Grenzorbitale in **Abbildung 9** wird ersichtlich,

dass sich die klassische DA-Reaktion durch die energetische Lage der beteiligten Molekülorbitale von der iEDDA-Reaktion unterscheidet. Bei der klassischen DA-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf wechselwirken das HOMO eines elektronenreichen Diens mit dem LUMO eines elektronenarmen Dienophils. Bei der iEDDA-Reaktion hingegen sind die elektronischen Verhältnisse umgekehrt. Daraus folgt die Wechselwirkung zwischen dem LUMO eines elektronenarmen Diens mit dem HOMO eines elektronenreichen Dienophils. Um die Cyclisierung zu beschleunigen, kann die Energiedifferenz ΔE zwischen den Grenzorbitalen durch passende Substituenten an den Reaktionspartnern weiter verringert werden.^[102-103] Auch die Wahl des Lösungsmittels nimmt Einfluss auf die Bildung des Übergangszustands. Sind diese protisch, wie beispielsweise Wasser, so kann der aktivierte Komplex während der Reaktion durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden, und stabilisiert somit den Übergangszustand.^[104]

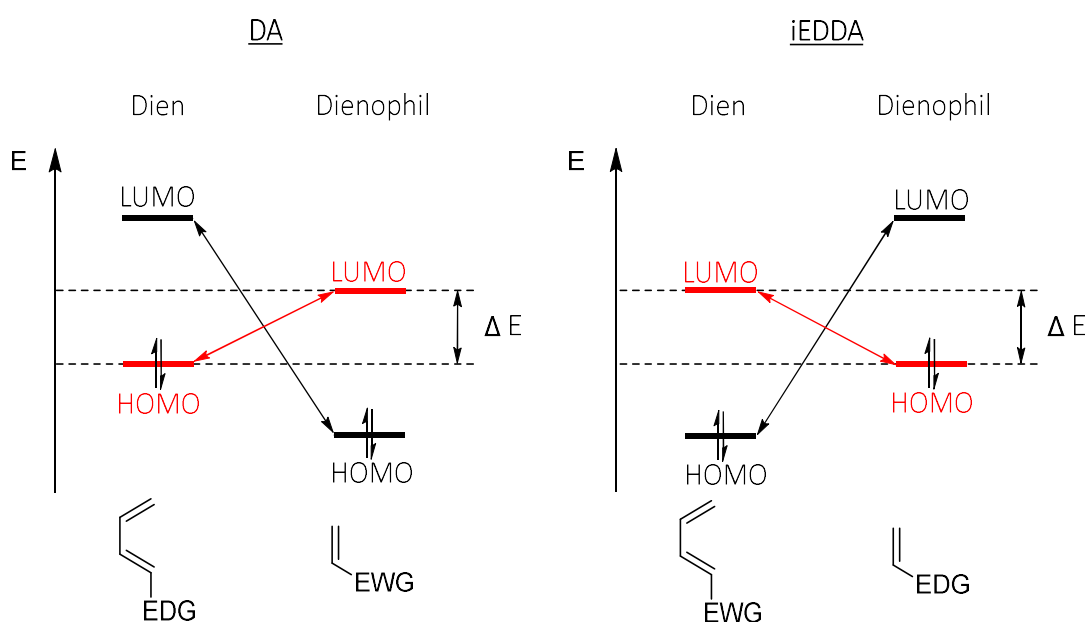
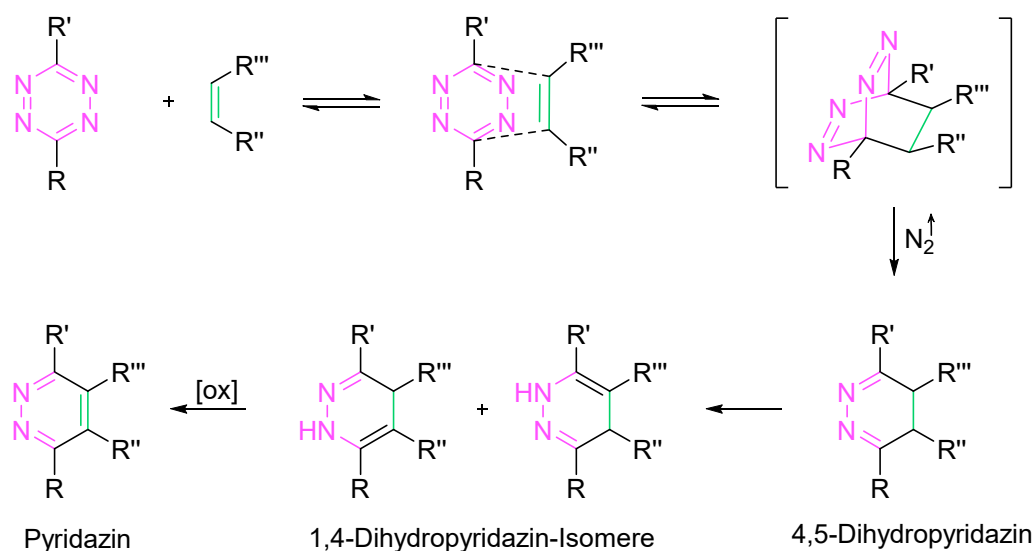


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Grenzorbitale einer klassischen DA-Reaktion und einer iEDDA-Reaktion. Die wechselwirkenden Orbitale sind in Rot dargestellt. Elektronenschiebende Substituenten (EDG, electron-donating group); elektronenziehende Substituenten (EWG, electron-withdrawing group).

Die wohl größte Wirkung, um die Energiedifferenz abzusenken, erzielen Heteroatome im π -System des Diens. Da die sp^2 -Hybridorbitale von Heteroatomen energetisch niedriger sind als die der Kohlenstoffatome, wird durch deren Einbringung das $LUMO_{\text{Dien}}$ herabgesenkt. Dieser Effekt steigert sich mit der Anzahl der beteiligten Heteroatome. Aus diesem Grund eignen sich besonders 1,2,4,5-Tetrazine, die vier Stickstoffatome im Heterocyclen enthalten. Deren Reaktion mit elektronenreichen Dienophilen in einer iEDDA-Reaktion wurde erstmals durch LINDESY *et al.*^[75] beschrieben und wird in der Literatur auch als Tetrazin-Ligation bezeichnet. Das **Schema 3** zeigt den allgemeinen Mechanismus der iEDDA-Reaktion mit 1,2,4,5-Tetrazinen und Dienophilen. Dabei bildet

sich zunächst durch eine [4+2]-Cycloaddition der aktivierte Komplex, ein hochgespanntes bicyklisches Intermediat. Durch die Freisetzung von elementarem Stickstoff in der darauffolgenden Retro-Diels-Alder-Reaktion wird das 4,5-Dihydropyridazin gebildet. Durch diesen Schritt wird die Reaktion irreversibel. Das Produkt isomerisiert weiter zum 1,4-Dihydropyridazin, welches in einer finalen Oxidation zum Pyridazin umgesetzt wird. Bei der Reaktion mit Alkinen als Dienophil entsteht nach dem Übergangszustand direkt das oxidierte Pyridazin.



Schema 3: Allgemeiner Mechanismus der iEDDA-Reaktion von 1,2,4,5-Tetrazinen mit Dienophilen.

Da Stickstoff das einzige Nebenprodukt dieser Reaktion darstellt, sind alle bioorthogonalen Kriterien erfüllt, was die die iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen und Dienophilen zu einem der bedeutendsten „Click“-Reaktionen zur Markierung von Biomolekülen macht. In den vergangenen Jahrzehnten haben SAUER *et al.*^[105] und viele weitere Arbeitsgruppen zur Erforschung der iEDDA-Reaktion beigetragen, wodurch ein breites Spektrum an Edukten sowie deren Anwendung hervorgehen konnten. Im Jahr 2008 veröffentlichten unabhängig voneinander die beiden Arbeitsgruppen um FOX und HILDERBRAND, dass es sich dabei um die bisher schnellste bioorthogonale Reaktion handelt, welche *in vitro*^[106] und *in vivo*^[107] durchgeführt wurde. Um das Potential dieser Reaktion weiter auszuschöpfen, fanden zahlreiche Untersuchungen statt, um die Reaktivität der Edukte noch weiter zu steigern, was in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert werden soll.

3.4.1 Tetrazine für iEDDA-Reaktion

Trotz einer großen Vielfalt elektronenarmer Dienen, wie Diazine und Triazine dominiert die Stoffklasse der Tetrazine in der derzeitigen Anwendung von iEDDA-Reaktionen.^[108-109] Strukturell handelt es sich bei Tetrazinen um einen sechsgliedrigen Heteroaromaten, der vier Stickstoffatome enthält. Es existieren drei Isomere Strukturen, welche in **Abbildung 10** dargestellt sind. Dabei finden überwiegend

die 1,2,4,5-Tetrazine (s-Tetrazine) eine breite Anwendung in Markierungsexperimenten. Durch Funktionalisierung können diese über Linker-Strukturen mit den gewünschten Substraten für eine Markierungsstrategie, wie etwa Farbstoffe oder Biomoleküle, verbunden werden.^[110-111] Sie sind bereits mit vielfältigen Substituenten, wie beispielsweise Phenyllessigsäure, als NHS-Ester oder mit Polyethylenglykol-Linker kommerziell erhältlich und somit leicht zugänglich. Tetrazine besitzen eine charakteristische Farbe, typischerweise Pink, Orange, Rot oder Violett und zeigen eine Absorptionsbande zwischen 510 und 550 nm. Dies kann zur Reaktionsverfolgung genutzt werden, da im Reaktionsverlauf die Tetrazinstruktur aufgelöst wird und dieser somit spektroskopisch beobachtet werden kann.^[112-113]

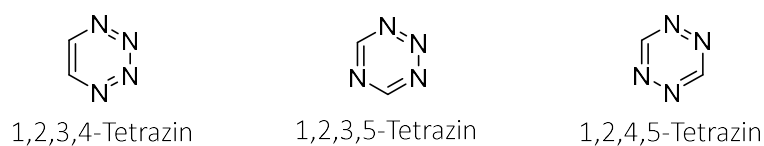


Abbildung 10: Stoffklasse der Tetrazine mit den drei Isomeren.

Um die Reaktivität der Tetrazine weiter zu steigern, können sie mit elektronenziehenden Substituenten am aromatischen System an den Kohlenstoffatomen modifiziert werden, wodurch die Energie des LUMO herabgesenkt wird. Allerdings sinkt mit steigender Reaktivität die Stabilität des Tetrazingerüsts, was in **Abbildung 11** schematisch dargestellt ist. Das bisher bekannte reaktivste Tetrazin-Derivat, welches zwei symmetrische Trifluormethylgruppen in 3-6 Position enthält, ist so instabil, dass es nicht für Anwendungen *in vivo* verwendet werden kann. Daher dürfen nicht nur induktive Effekte bei der Modifikation von Tetrazinen berücksichtigt werden.

Neben elektronenziehenden Eigenschaften können auch sterische Effekte der Substituenten eine aktivierende Wirkung erzielen. Dabei zeigt sich, dass kleinere Substituenten aufgrund ihres geringen sterischen Anspruches die Reaktivität des Tetrazins positiv beeinflussen können. Infolgedessen konnte gezeigt werden, dass monosubstituierte Tetrazine (H-Tetrazine), wie beispielsweise 3-Phenyl-1,2,4,5-Tetrazine, um eine bis zu 70-fach gesteigerte Reaktivität gegenüber disubstituierten Tetrazinen wie dem 3,6-Methyl- oder 3,6-Phenyl-1,2,4,5-Tetrazin aufzeigen.^[114]

Eine aktuelle Publikation von SVATUNEK und MIKULA^[115] aus dem Jahr 2022 liefert neue Erkenntnisse zur Reaktionssteigerung von Tetrazinen, ohne die Stabilität des Moleküls zu verringern. So wurde bisher angenommen, dass die hohe Reaktivität des 3,6-substituierten 2-Pyridyl-Tetrazins (**pyTz**) auf induktive Eigenschaften des Heteroaryls zurückzuführen ist. Als zugrundeliegender Effekt wurde jedoch die Verzerrung des Tetrazins durch die intramolekularen abstoßenden N-N-Wechselwirkungen durch SVATUNEK und MIKULA bekannt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die limitierte Stabilität in wässrigem Medium im Zusammenhang mit elektronenziehenden Wechselwirkungen steht, wohingegen die intramolekulare Abstoßung zur Erhöhung der Reaktivität führt, ohne die Stabilität zu

verringern. Derivate von **pyTz** vereinen hohe Geschwindigkeitskonstanten mit einer ausreichenden Stabilität in zellulärer Umgebung. Damit stellen sie den Stand der Technik für kinetische Messungen dar und wurden darüber hinaus bereits in Zellexperimenten erfolgreich eingesetzt.^[116-117]

Dennoch sind auch die methylsubstituierten Tetrazine von großer Bedeutung, da sie einen guten Kompromiss zwischen Reaktivität und Stabilität aufweisen. Daher werden sie bevorzugt für die Anwendung *in vivo* verwendet, weil ihre erhöhte Stabilität in der zellulären Umgebung eine wichtige Rolle spielt.^[118]

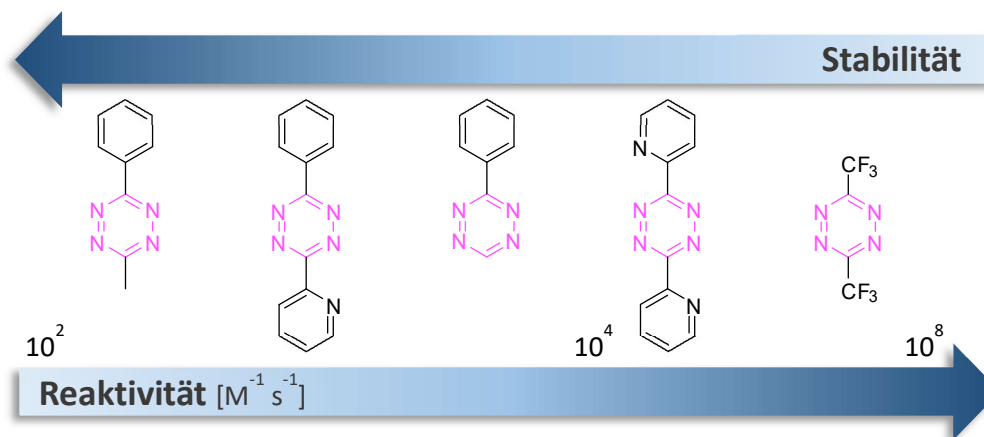


Abbildung 11: Verschiedene Grundstrukturen bekannter Tetrazine, geordnet nach ihrer Reaktivität mit TCO.

Zur biologischen Anwendung werden Tetrazine modifiziert, um dadurch das Einbringen von Reporter-molekülen zu ermöglichen. Bei der Modifizierung werden oftmals Phenyle, die mit funktionellen Gruppen substituiert sind, herangezogen. Über einen Linker kann so ein geeignetes Reporter-molekül installiert werden, welches wiederum Einfluss auf die Reaktivität nimmt.^[119]

In den meisten Fällen handelt es sich bei diesem Reporter-molekül um einen Fluoreszenzfarbstoff. Dabei zeigt sich eine besondere Eigenschaft der Tetrazine, welche in der bildgebenden Detektion von großem Nutzen ist. Tetrazine besitzen eine fluoreszenzlöschende (engl.: *quenching*) Wirkung und werden daher als fluorogene Sonden eingesetzt. Diese Beobachtung wurde zuerst von WEISSELEDER *et al.*^[120] beschrieben. Sie demonstrierten die Fluoreszenzlöschung, indem sie Tetrazine an Fluorophore koppelten. Durch eine anschließende iEDDA-Reaktion wurde das Tetrazinsystem als *Quencher* durch Abspaltung von elementarem Stickstoff aufgelöst, wodurch die Fluoreszenz wiederhergestellt werden konnte. Dieser, als Verstärkungsfaktor (engl.: *Turn-On*) beschriebene Anstieg der Fluoreszenz gilt als eines der wichtigsten Merkmale fluorogener Sonden. Der *Turn-On* beschreibt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität oder der Quantenausbeute des „Click“-Produkts zu dessen Edukt bei einer definierten Wellenlänge. In den vergangenen Jahren entwickelten WEISSELEDER und WOMBACHER unabhängig voneinander eine Reihe von tetrazinmodifizierten Fluorophore, die sich in ihren Löschmechanismen unterscheiden. So konnten 4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen

(BODIPY), Oregon-Green- und Cumarin-Farbstoffe durch Amidkupplung mit dem Tetrazin modifiziert und gelöscht werden. Durch die Reaktion mit TCO konnte ein *Turn-On* von bis zu 20 erreicht werden. Dieser Ansatz von WEISSLEDER^[120] basiert auf der Fluoreszenzlöschung durch Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET). Dabei wird die Energie des angeregten Donor-Fluorophors durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen strahlungslos auf das Tetrazin (Akzeptor) übertragen, wie es in **Abbildung 12** dargestellt ist.

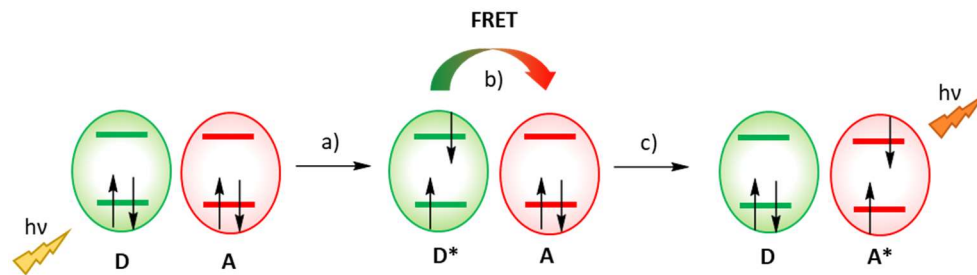


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET): a) Anregung des Donors (D); b) Strahlungsfreier Energietransfer auf den Akzeptor (A); c) Rückkehr des Donors in den Grundzustand und Anregung des Akzeptors.

Die Effizienz der FRET-Strategie hängt unter anderem von der spektralen Überlappung des Donor- und Akzeptor-Fluorophors und somit vom Abstand zueinander ab. Der Abstand R_0 , bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt, liegt bei den meisten Systemen im Bereich von 1 - 8 nm. Darüber ist zu erklären, dass grün emittierende Farbstoffe ($\lambda_{em} = 490-570$ nm) einen höheren *Turn-On* als rot emittierende Farbstoffe ($\lambda_{em} = 640-780$ nm) aufweisen. Da das Absorptionsmaximum von Tetrazinen bei etwa 530 nm liegt, verringert sich der Überlappungsbereich und damit die Fluoreszenzlöschung bei einer Rotverschiebung, wie es schematisch in **Abbildung 13** dargestellt ist.

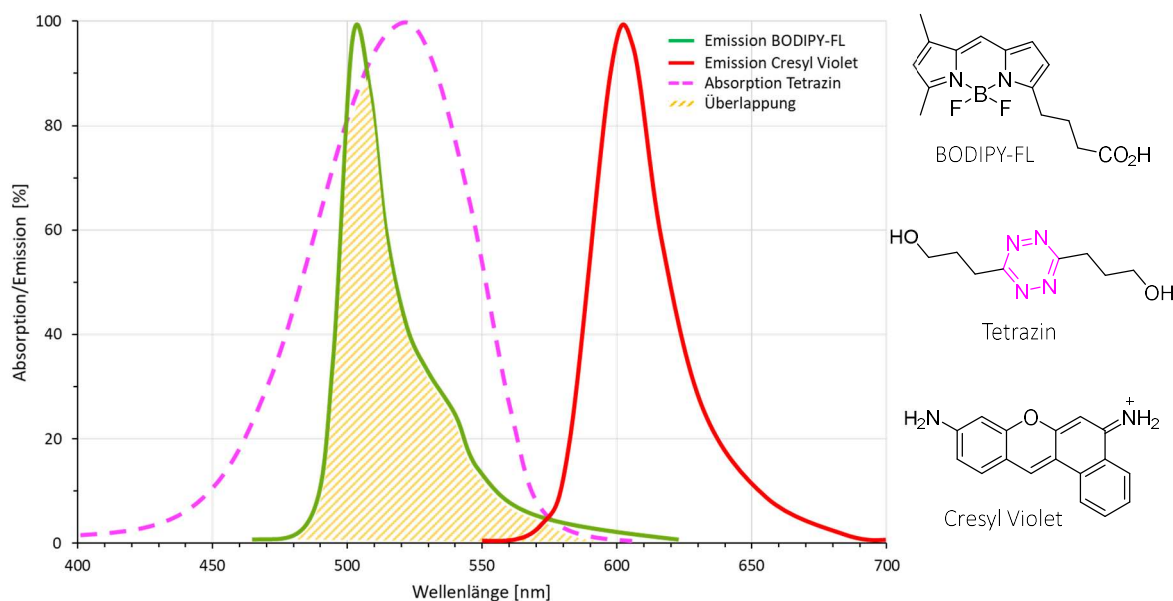


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Überlappungsbereiche des grün emittierenden **BODIPY-FL** (grün) und des rot emittierenden **Cresyl Violet** (rot) Farbstoffes mit der Absorptionsbande des dargestellten Tetrazins (pink).^[121]

Eine Alternative von WEISSELER *et al.*^[68] nutzt Fluoreszenzlöschung durch Bindungsenergieübertragung (TBET; *Trough Bond Energy Transfer*). Dafür entwickelten sie konformationsbeschränkte BODIPY-Tetrazin-Derivate, bei denen die räumliche Donor-Akzeptor-Nähe optimiert ist. BODIPY und Tetrazin sind dabei starr über ein konjugiertes π -System, in dieser Reihe über eine Phenylbrücke, miteinander verbunden, wodurch sich eine Verdrehung aus der Koplanarität um 90° ergibt. Im Vergleich zum FRET-*Quenching* benötigt ein TBET keine Überlappung der Emissions- und Absorptionsbanden von Fluorophor und dem Tetrazin.^[122] Diese neuartigen fluorogenen Sonden erreichen mit **TCO** einen *Turn-On* von bis zu 1600, welcher etwa 80 mal höher ist als bei vergleichbaren Sonden, die über einen flexiblen Linker zwischen dem Fluorophor und einem Tetrazin verbunden sind. Die von WOMBACHER *et al.*^[123] synthetisierten Xanthen-Fluorophore wurden über eine direkte Konjugation mit einem Tetrazin modifiziert. Hiermit konnte der Abstand zwischen Donor und Akzeptor verringert werden, was einen Dexter-Energietransfer ermöglicht. Im Gegensatz zur FRET-Strategie kommt es durch den kleineren Abstand ($< 0,5$ nm) zur Überlappung der Orbitale, wodurch es zu einem Elektronenaustausch und somit zum Energietransfer kommt. Dafür müssen sich die Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor überlappen, wohingegen eine spektrale Überlappung nicht erforderlich ist. Diese Austausch-Wechselwirkung nimmt exponentiell mit dem Abstand von Donor und Akzeptor ab. Mit dieser Strategie konnten Xanthen-Tetrazin-Derivate über den gesamten sichtbaren Emissionsbereich synthetisiert werden.

Der Vorteil fluorogener Sonden mit hohem *Turn-On* zeigt sich bei der biologischen Anwendung. Um eine ausreichende Markierung mit der Sonde zu gewährleisten wird diese im Überschuss zur Probe hinzugegeben, da die Konzentration direkt proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit ist. Der überschüssige, ungebundene Farbstoff erzeugt bei herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen jedoch eine starke Hintergrundfluoreszenz. Dieser kann extrazellulär oder bei fixierten Zellen durch mehrmaliges Waschen reduziert werden. In lebenden Zellen kann bereits aufgenommener intrazellulärer Farbstoff nicht mehr durch Waschen entfernt werden, was zu starken Störsignalen bei der Bildgebung führen kann. Zudem führt das Waschen der Proben zur Verringerung der adhärenz Zellen, des spezifischen Signals und verzögert die Echtzeitüberwachung dynamischer Prozesse. Fluorogene Sonden müssen hingegen nicht durch Waschschriffe entfernt werden, da ungebundener Farbstoff eine geringe Grundfluoreszenz aufweist und somit keine, oder sehr geringe Hintergrundfluoreszenz verursacht.

Aus der Bandbreite der Fluoreszenzfarbstoffe (**Abbildung 14**) sind in Bezug auf die Färbung und Bildgebung von Nukleinsäuren die Cyanin-Styryl-Farbstoffe hervorzuheben. Diese Farbstoffklasse zeichnet sich durch mittlere bis hohe Extinktionskoeffizienten, guten Photostabilitäten sowie der chemischen Zugänglichkeit aus. Die Besonderheit ist ihre Steigerung der Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Nukleinsäuren.^[124-125] Verschiedene Derivate dieser Farbstoffklasse konnten auf Basis des Cyanin-Indol-Chinolinium-Farbstoffes (**CyIQ**) bereits erfolgreich von WAGENKNECHT *et al.* synthetisiert werden.^[126-128] Dieser besitzt im Vergleich zu den klassischen Farbstoffen wie Bordipyromethen-Derivate (**BODIPY**) und Fluorescein eine große Stokes-Verschiebung sowie eine erhöhte Photostabilität.^[129-130] Besonders die Stokes-Verschiebung ist für bioanalytische Anwendungen von großer Bedeutung, da zwischen der Anregungswellenlänge und der Emissionswellenlänge unterschieden werden kann.

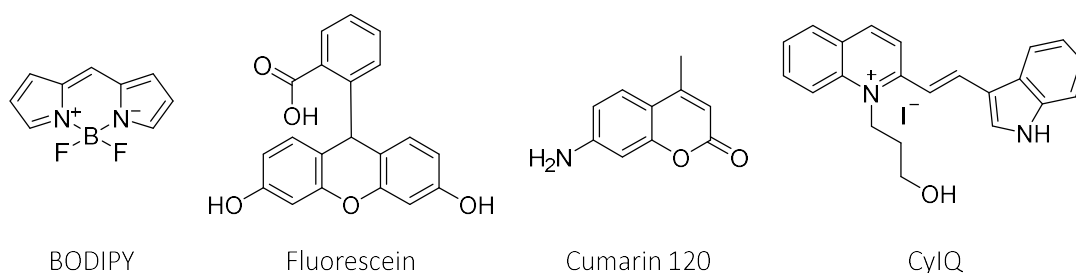


Abbildung 14: Strukturen verschiedener Farbstoffklassen. **BODIPY**, **Fluorescein** aus der Klasse der Xanthen-Farbstoffe, **Cumarin 120** als Cumarin-Farbstoff und Cyanin-Indol-Chinolinium (**CyIQ**) aus der Klasse der Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

3.4.2 Dienophile für die iEDDA-Reaktion

Neben den verwendeten Tetrazinen müssen ebenso die Dienophile als Kupplungspartner zur Analyse der Reaktionsgeschwindigkeit berücksichtigt werden. Die Auswahl an kommerziell erhältlichen oder einfach zu synthetisierenden Molekülen mit Doppelbindung bietet zahlreiche Reaktionspartner für die iEDDA-Reaktion. Allerdings ist die Wahl des Dienophils entscheidend, da die Bildung des Übergangszustands je nach Dienophil in ihrer Reaktivität um mehrere Größenordnungen variieren kann. Detaillierte Untersuchungen wurden seit den 90er Jahren von SAUER *et al.*^[131] und zahlreichen weiteren Arbeitsgruppen unternommen, woraus sich einige Trends zur Reaktivität von Dienophilen ableiten lassen. In Bezug auf die elektronischen Eigenschaften, bewirken elektronenschiebende Gruppen am Dienophil ein Anheben des HOMOs, wodurch die HOMO-LUMO-Lücke verringert wird und daraufhin die Reaktivität der iEDDA-Reaktion steigt. Eine Zunahme des sterischen Effekts durch Substituenten hebt diese Auswirkung wieder auf. Durch eine angepasste Wahl der Substituenten kann diesem negativen Einfluss jedoch gut entgegengewirkt werden. Besteht eine Ringspannung im Molekül, so steigert das ebenfalls die Reaktivität.^[132] Das reaktivste bekannte Dienophil für biologische Anwendungen von iEDDA-Reaktionen stellt *trans*-Cycloocten (**TCO**) dar. Durch seine starke Verdrehung in der Konformation ähnelt es dem Übergangszustand im Reaktionsmechanismus. Somit ist die Energiebarriere, um in diesen Zustand zu gelangen herabgesetzt, wodurch eine schnellere Cyclisierung erfolgen kann.^[133] Durch die Entwicklung eines bicyclischen Systems, bei dem das **TCO** mit einem Cyclopropan fusioniert wird, konnte die Ringspannung noch weiter erhöht werden. Weitere Dienophile, die häufig Anwendung in iEDDA-Reaktionen finden sind Norbornene, 1-Methyl-Cyclopropene und Bicyclononine (**BCN**). So nutzte HILDERBRAND *et al.* für die erste publizierte Anwendung der iEDDA-Reaktion *in vivo* norbornenmodifizierte Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Tetrazin reagierten.^[107] Mit **BCN** wird neben den cyclischen Alkenen ein cyclisches Alkin als Dienophil eingesetzt. Strukturell ist es ein Cyclooctin, an welches ein Cyclopropan anelliert ist. Hervorzuheben ist dabei ihre Eigenschaft, Produkte mit definierter Stereochemie zu generieren.^[63, 134] Dennoch sind stark gespannte Dienophile wie **TCO**, **BCN** und Norbornene bisher noch nicht für die breite Anwendung im biologischen Bereich zugänglich. Durch die sterische Hinderung die diese Moleküle mit sich bringen, können endogene Enzyme und metabolische Prozesser gestört oder inaktiviert werden. DEVARAJ *et al.*^[135] erkannte in diesem Zusammenhang das Potenzial der Cyclopropene als Dienophile in der bioorthogonalen Chemie. Die geringe Stabilität unsubstituierter Cyclopropene konnte durch Einführen einer Methylgruppe an der 1-Position verbessert werden, ohne dabei die Reaktivität einzuschränken. Der Substituent in 3-Position konnte durch seinen elektrochemischen Charakter so gewählt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit um zwei Größenordnungen erhöht wurde. Mittlerweile gibt es eine große Vielfalt an 1-methyl-3-substituierten Cyclopropenen (**1MCP**) die zur Markierung von Biomolekülen verwendet werden.^[136]

Zusammenfassend ist in **Abbildung 15** eine Übersicht der meist verwendeten Dienophil-Strukturen für die Anwendung in iEDDA-Reaktionen dargestellt.

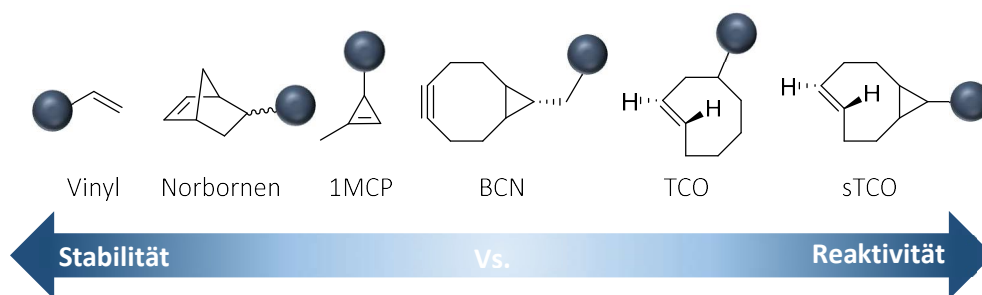


Abbildung 15: Reihe ausgewählter Dienophile die für iEDDA-Reaktionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt werden. Dargestellt ist der Verlauf von Stabilität gegen die Reaktivität der Strukturen.

3.5 Nukleosid-Analoga für metabolische Markierung und Detektion über iEDDA-Reaktion

Die iEDDA-Reaktion ist bis dato das leistungsstärkste System zur bioorthogonalen Markierung von Molekülen und bietet eine große Auswahl an Modifizierungs-Strategien. Zusammen mit den anderen „Click“-Reaktionen wurde sie ursprünglich für die Markierung von Proteinen und Glykostrukturen entwickelt und nachfolgend auf Nucleinsäuren übertragen.^[137-138] Trotz des enormen Potentials in Experimenten *in vitro* gibt es nur wenige Anwendungen für die metabolische Markierung von Nucleinsäuren *in vivo*.

Die iEDDA-Reaktion bietet zahlreiche Vorteile gegenüber anderen „Click“-Reaktionen und findet dennoch ihre Grenzen, wenn sie in die zellulären Stoffwechselwege eingeführt wird. Wie in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt wurde, ist für eine erfolgreiche metabolische Markierung von Nucleinsäuren die Akzeptanz des modifizierten Bausteins von den involvierten endogenen Enzymen ausschlaggebend. Die Substitution von hoch reaktiven, aber sehr großen Dienophilen wie **TCO**, **BCN** und Norbornenen können die endogene Enzymmaschinerie hemmen und somit den gesamten Stoffwechselweg der Nucleotidsynthese beeinflussen.^[139]

Die kleinste mögliche Modifikation mit einem Dienophil stellt die Vinyl-Gruppe dar, welche an die Nucleobase geknüpft wird und so als konjugierte Verbindung mit Tetrazinen eine iEDDA-Reaktion eingehen kann.^[105] Dieses Dienophil wurde 2014 von LUEDTKE *et al.* über das 5-Vinyl-2'-desoxyuridin (**VdU**) als modifiziertes Nucleosid zur metabolischen Markierung von DNA erfolgreich angewandt.^[140] Es war somit die erste publizierte Anwendung der iEDDA-Reaktion zur Markierung von DNA *in vivo*. Die Detektion des inkorporierten **VdUs** konnte anschließend über ein Tetramethylrhodamin-Tetrazin-Konjugat über Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Im selben Jahr zeigte die Arbeitsgruppe von MARX, dass ein 7-Vinyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin (**VdA**), welches erstmals durch SEELA *et al.*^[141] synthetisiert

wurde mit einer 14-fachen Geschwindigkeit im Vergleich zu **VdU** reagieren kann. Dennoch wurde dieses bisher nicht für Anwendungen *in vivo* eingesetzt, sodass keine Aussage über die zelluläre Akzeptanz von **VdA** getroffen werden kann.^[142] Die Einführung der Modifikation an der N7-Position des Adenins ist aufgrund der Ausbuchtung in der Struktur der Kinase bevorzugt. Jedoch erzeugt die Substitution eine positive Ladung, welche zur Depurinierung führen kann.^[143] Daher verwendete MARX das 7-Deaza-Derivat was sich zur Modifizierung von Purin-Nukleosiden durchsetzen konnte. Ein weiterer Vorteil der Einbringung der Modifikation an den Positionen C5 und N7 ist, dass die Vinyl-Gruppe in die große Furche der DNA hineinragt. Die Positionierung der Basen in der doppelsträngigen DNA ist in **Abbildung 16** dargestellt. Die Furchen der DNA-Helix sind bevorzugte Orte für die Interaktion von Proteinen oder anderen Molekülen mit der DNA. Besonders in der großen Furche werden die Basen stark exponiert, wodurch hier eine bevorzugte Interaktion stattfinden kann und somit die Zugänglichkeit für Kupplungspartner gesteigert ist.

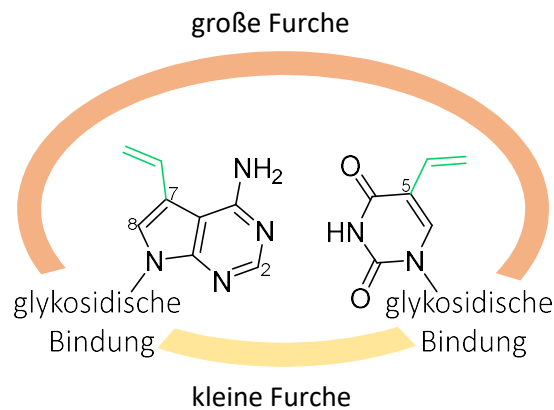


Abbildung 16: Positionierung der Basen innerhalb der doppelsträngigen DNA-Helix am Beispiel von **VdA** und **VdU**. Die Vinyl-Gruppe an den bevorzugten Positionen ragt dabei in die große Furche hinein.

Dennoch konnte die Detektion des **VdU** nicht ohne vorherige Fixierung der Zellen und die Denaturierung der DNA mit Salzsäure erfolgen. Durch diesen Schritt wurde die dicht gepackte Chromatinstruktur aufgebrochen um die Vinyl-Gruppe weiter freizulegen und somit die effektive Reaktion mit dem fluoreszierenden Tetrazin-Farbstoff zu ermöglichen. Diese harschen chemischen Bedingungen verhindern den Nachweis der nativen DNA-Struktur in einer gut erhaltenen zellulären Umgebung. Um die Notwendigkeit der Denaturierung zu umgehen entwickelten TANG *et al.* ein optimiertes System. Dabei nutzen sie eine Hetero-Diels-Alder Reaktion in der, unter physiologischen Bedingungen, ein Fluorescein markiertes o-Chinolinonchinonmethid (oQQF) mit einem Vinylthioether-Thymidin (**VTdT**) als Dienophil umgesetzt wurde. Nach metabolischem Einbau des **VTdT** konnte die Hetero-Diels-Alder Reaktion ohne vorherige Denaturierung der DNA stattfinden und ermöglichte somit die Bildgebung nativer DNA.^[144] Diese Markierungsstrategie wurde jedoch ebenfalls nur in fixierten

Zellen durchgeführt, zeigte aber auf, dass durch ein optimiertes Zusammenspiel der Reaktionspartner auch der Einsatz für die Bildgebung in lebenden Zellen möglich sein kann.

Dieser Meilenstein gelang kürzlich LUEDTKE *et al.*^[145], indem er die sterische Hinderung, welche durch die Chromatinstruktur verursacht wird, über einen in die DNA interkalierenden Tetrazin-Farbstoff umgeht. Die entwickelte fluorogene **PINK**-Sonde (*Probe for Imaging Nucleosidic Alkene groups*) basiert auf dem Farbstoff Acridinorange, welcher in der Molekularbiologie zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet wird und in **Abbildung 17** dargestellt ist. Die Funktionalisierung mit dem fluoreszenzlöschenden Tetrazin erfolgte an der 3-Position, während die Dimethylaminogruppe an der 6-Position erhalten bleibt.

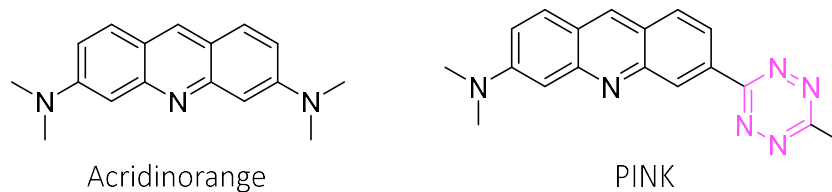


Abbildung 17: Struktur des interkalierenden Nukleinsäure-Farbstoffs Acridinorange und die von LUEDTKE *et al.* entwickelte **PINK**-Sonde.

Die iEDDA-Reaktion erfolgt dabei mit zuvor in die DNA eingebautem **VdU** oder analog für RNA mit 5-Vinyl-Uridin (**VU**). Nach Interkalation von **PINK** in die Nukleinsäure kommt es zu einer koplanaren Ausrichtung der 5-Vinyl-Gruppe und der 3-Tetrazin-Gruppe, was zu einer schnellen Reaktion und zum *Turn-On* der Sonde führt. Mit dieser dualen Verstärkungsstrategie gelang es LUEDTKE, die iEDDA-Reaktion zur metabolischen Markierung von Nukleinsäuren in lebenden Zellen anzuwenden.

Während dieser Ansatz für die *in vivo* Bildgebung von DNA der erste seiner Art ist, konnte die iEDDA-Reaktion für den Nachweis von RNA bereits in lebenden Mäusen erfolgreich demonstriert werden. So nutzte die Arbeitsgruppe von XU die Strategie inkorporiertes **VU** über ein **BODIPY**-Tetrazin in Tumorgewebe von Mäusen nachzuweisen.^[146] Dafür wurde den Nagetieren zuerst **VU** injiziert und sechs Stunden später folgte eine Injektion mit **BODIPY**-Tetrazin. Über ein Bildgebungssystem konnte der Tumor über die Fluoreszenz der fluorogenen Sonde *in vivo* lokalisiert werden. Zusätzlich entwickelten sie eine duale Detektionsstrategie, um sowohl die DNA als auch RNA simultan in Zellen nachzuweisen. Dafür nutzten sie **EdU** zur Markierung der DNA und **VU** für die RNA. Nachdem die Zellen fixiert wurden, erfolgte die Zugabe eines Azid-Farbstoffs, um die DNA mittels CuAA zu visualisieren. Zeitgleich wurde ein Tetrazin-Biotin-Konjugat zugegeben, welches in einer iEDDA-Reaktion mit dem **VU** reagierte. Durch Verwendung eines Streptavidin-Farbstoff-Konjugats wurde somit auch die RNA in den Zellen detektiert. Dadurch erhielten sie Einblicke in die Verhaltensweisen von DNA und RNA in verschiedenen Stadien der Zellteilung.

Für die metabolische Markierung von RNA untersuchten SPITALE *et al.* die Inkorporationsgrade verschiedener vinylmodifizierter Nucleoside. Dabei konnten sie zeigen, dass 2-Vinyl-Adenosin (**2-VA**) gegenüber **VU** und 7-Vinyl-7-deazaadenosin (**7-dVA**) den höchsten prozentualen Einbau erzielen konnte, wohingegen 8-Vinyl-Adenosin, 8-Vinyl-Guanosin sowie 5-Vinyl-Cytidin nicht inkorporiert wurden.^[41]

Die Wahl des Dienophils zur Modifikation der Nucleoside beschränkte sich bisher aufgrund ihrer kleinen Struktur ausschließlich auf die Vinyl-Gruppe, da man bisher davon ausging, dass größere Substituenten nicht von den beteiligten Enzymen akzeptiert werden. ZHOU *et al.* konnte die erste Anwendung eines Cyclopropen-modifizierten Adenosins (**cpA**) zur metabolischen Markierung von RNA in fixierten Zellen aufzeigen.^[147]

Abschließend stellt **Abbildung 18** eine Übersicht der Nucleoside dar, die bisher für die metabolische Markierung von Nucleinsäuren *in vivo* im Kontext der iEDDA-Reaktion bzw. der Hetero-Diels-Alder Reaktion publiziert wurden. Um weitere vielversprechende und fortschrittliche Anwendungen vor allem hinsichtlich der Bildgebung in lebenden Zellen zu erreichen, müssen weitere Limitationen überwunden werden. Durch die Entwicklung noch flexiblerer und aufeinander angepasster Systeme können die Markierungs-Strategien für Nucleinsäuren kontinuierlich vorangetrieben werden. Somit werden auch weiterhin wichtige biologische Anwendungen zur Bildgebung möglich sein, bis das Potential der iEDDA-Reaktion *in vivo* voll ausgeschöpft sein wird.

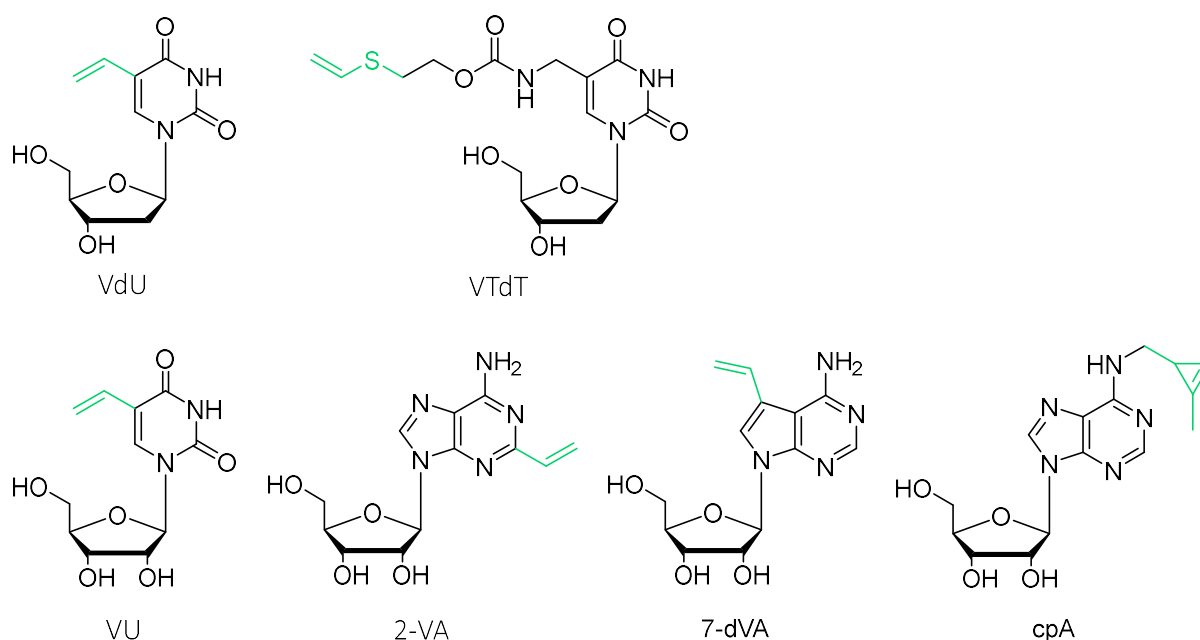


Abbildung 18: Übersicht bisher publizierter Nucleoside zur metabolischen Markierung von Nucleinsäuren *in vivo* im Kontext der iEDDA-Reaktion. **VTdT** wurde in einer Hetero-Diels-Alder Reaktion verwendet. Oben sind 2'-Desoxynucleoside und unten Nucleoside aufgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Dienophilmodifizierte Nucleoside zur metabolischen Markierung von DNA

Um die bisherigen Limitierungen der iEDDA-Reaktion in biologischen Systemen aufzuheben, müssen neben der Vinyl-Gruppe weitere, reaktivere Dienophile an Nucleoside angebracht werden. Die Synthese solcher neuartiger Nucleoside soll dabei durch einen modularen Aufbau erfolgen, sodass möglichst effizient eine Nucleosid-Bibliothek entstehen kann, die in Bezug auf ihre chemischen Eigenschaften und deren Verträglichkeit *in vivo* getestet werden kann.

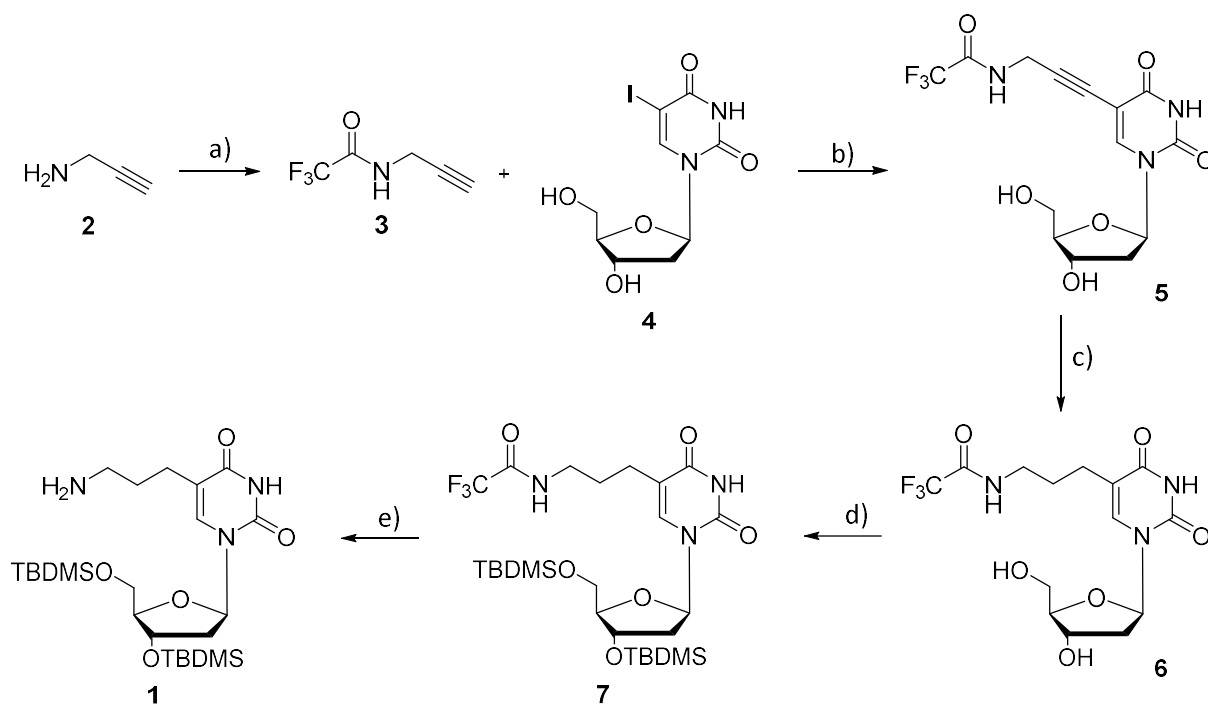
Der Nachweis der bioorthogonalen Reaktion von inkorporierten Nucleosiden und dem Reporter-molekül wird durch die dicht gepackte Chromatinstruktur im Zellkern erschwert.^[145] Dies erforderte häufig eine vorherige Denaturierung der DNA, um eine Reaktion mit dem Reporter zugänglich zu machen.^[60, 140] Die erste Publikation, die ohne denaturierende Schritte auskam, wurde von TANG *et al.* unter der Verwendung von **VTdT** gezeigt.^[144] Das Besondere an diesem modifizierten Nucleosid ist die Linker-Struktur, über welche die Vinyl-Funktion an das Thymidin eingeführt wurde. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es unter anderem dadurch zu einer besseren Reaktivität des Dienophils innerhalb des dicht gepackten Chromatins kam und somit auf die Denaturierung verzichtet werden konnte.

In Anlehnung an diese Erkenntnisse sollten Nucleosid-Bausteine synthetisiert werden, die eine Linker-Struktur enthalten, an dem die Dienophile variiert werden können. Bisher verwendete Nucleoside enthalten überwiegend die Vinyl-Funktion als Dienophil. Betrachtet man jedoch die Reaktionsgeschwindigkeiten, die diese Funktion in einer iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen erreichen kann, so befinden sich diese im unteren Bereich. Um gezielt hochdynamische Prozesse *in vivo* abbilden zu können, werden reaktivere Dienophile benötigt. Jedoch steigt die Reaktivität über die Ringspannung mit einer Zunahme der Molekülgröße, was wiederum in Konflikt mit der Akzeptanz endogener Enzyme steht. Um modifizierte Nucleoside erfolgreich in naszierende DNA einzubauen, muss vor allem die Akzeptanz der NMP-Kinase gewährleistet werden. Aus diesem Grund soll die Modifikation an der C5-Position des 2'-Desoxyuridins erfolgen, da hier durch Freiräume in der Kinase-Struktur^[41] die Akzeptanz der Modifikation erhöht ist und die Modifikation in der großen Furche des DNA-Doppelstrangs lokalisiert wird.

Die Wahl des zu modifizierenden Nucleosids fällt in der Literatur überwiegend auf 2'-Desoxyuridin. Es ist bereits mit verschiedenen Halogen-Substituenten an der C5-Position kommerziell erhältlich und es bestehen bereits zahlreiche Methoden zur Modifizierung.^[42, 60, 140, 144, 148] Daher sollten auch im Folgenden die Modifikationen an Uridin erfolgen.

4.1.1 Synthese der linkermodifizierten 2'-Desoxyuridin-Bausteine **1**, **8** und **11**

Zu Beginn sollte ein aminopropylmodifizierter, TBDMS-geschützter 2'-Desoxyuridin (dU)-Baustein (**1**) synthetisiert werden. Die Aminopropylgruppe sollte an der C5-Position eingeführt werden und dient dabei als Linker zwischen dU und dem angebrachten Dienophil. Dieser Baustein ist bereits literaturbekannt und kann als Ausgangsmolekül zur Einführung von Modifikationen über Carbamat- oder Amidbindungen dienen. Zur Synthese von **1** wurde die in **Schema 4** dargestellte Syntheseroute verfolgt.

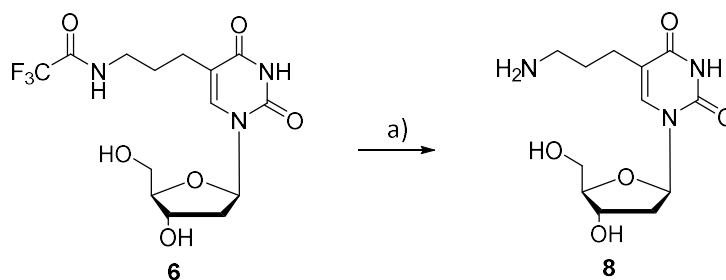


Schema 4: Syntheseroute zum TBDMS-geschützten 2'-Desoxyuridin-Baustein **1**. a) Ethyltrifluoroacetat, MeOH, 0 °C für 30 min, RT, ü.N., 76 %; b) Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, RT, ü.N., 88 %; c) Pd(OH)₂/C, Et₃SiH, MeOH, RT, ü.N., 65 %; d) TBDMS-Cl, DMF, RT, ü.N., 60 %; e) NH₃ (aq.), MeOH, 80 °C, ü.N., 63 %.

Das kommerziell erhältliche 5-Iodo-2'-desoxyuridin (**IdU**) (**4**) wurde über eine Sonogashira Kreuzkupplung^[149] mit einem Trifluoroacetat (TFA) geschütztem Propargylamin^[150] (**3**) an der C5-Position der Nucleobase modifiziert. Das Alkin wurde mit Triethylsilan und Palladiumhydroxid auf Kohlenstoff hydriert, um Nucleosid **6** zu erhalten.^[151] Die 3'- und 5'-OH Gruppen wurde mit TBDMS geschützt, um eventuelle Nebenreaktionen in der anschließenden Carbamatbindung zu vermeiden.^[152] Die TFA-Gruppe wurde durch Zugabe von konzentriertem wässrigen Ammoniak zu einer methanolischen Lösung von **7** abgespalten, wodurch der Nucleosid-Baustein **1** in einer Ausbeute von 16 % über fünf Schritte erhalten wurde.^[153]

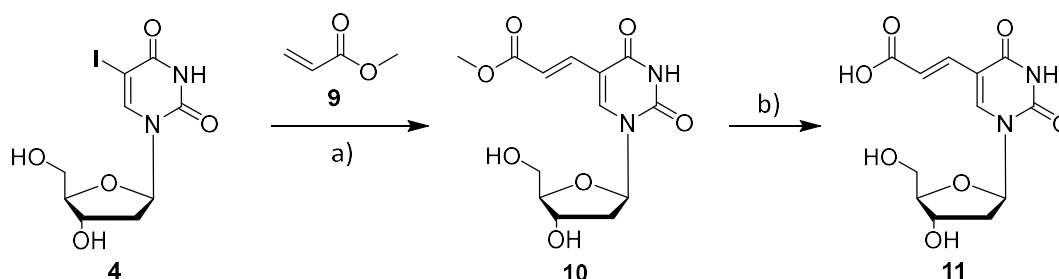
Aufgrund der geringen Löslichkeit von **7** in wässrigen Ammoniak wurde ein alternativer Baustein ohne die TBDMS-Schutzgruppen synthetisiert. Hierzu wurde ausgehend von **6** die TFA-Gruppe direkt

mit Ammoniak entschützt, um Nucleosid **8** in einer Ausbeute von 40 % über 4 Schritte zu erhalten (**Schema 5**)^[154].



Schema 5: Synthese eines alternativen aminopropylmodifizierten 2'-Desoxyuridin-Bausteins **8** mit ungeschützten 3'- und 5'-OH Gruppen. a) NH_3 (aq.), RT, ü.N., quantitative Ausbeute.

Um den Einfluss des elektronenschiebenden und -ziehenden Effekts einer Amidbindung, über welche Dienophile an den Linker eingebracht werden, zu untersuchen, sollte ein weiterer Nucleosid-Baustein (**11**) synthetisiert werden. Im Gegensatz zu Nucleosid-Baustein **8** sollte dabei anstelle des sekundärenamins eine freie Säuregruppe als Reaktionspartner substituiert werden, sodass es zu einer umgekehrten Position der Peptidbindung am Dienophil kommt. Zudem sollte der Linker ein konjugiertes System beinhalten. Durch die Untersuchungen von WAGENKNECHT *et al.*^[155] konnte gezeigt werden, dass ein Linker-System mit eingeschränkten Freiheitsgraden erhöhte Affinität bezüglich einer iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen aufweist. Daher wurde der Linker mit einem konjugierten System konzipiert. Über die in **Schema 6** dargestellte Route nach RONG und SOLOWAY *et al.* sollte der propensäure-modifizierte Nucleosid-Baustein **11** synthetisiert werden.^[156]

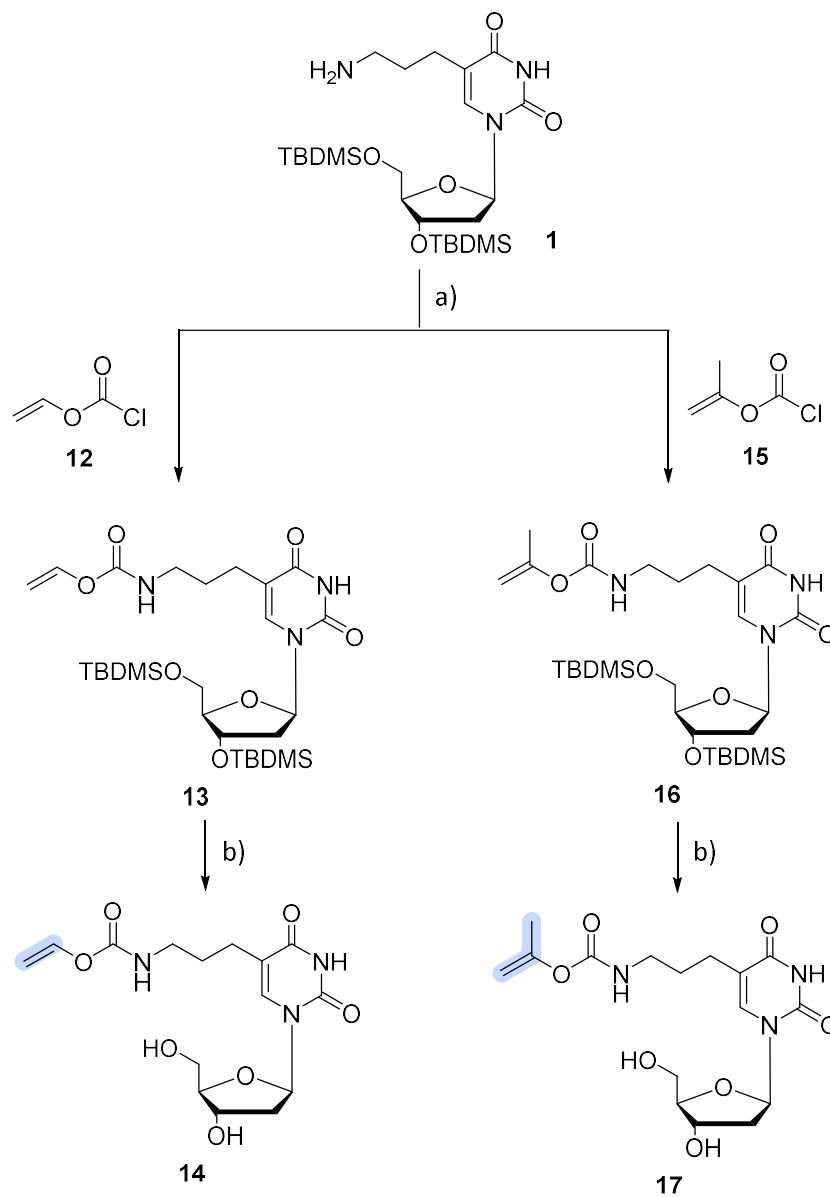


Schema 6: Synthese des propensäuremodifizierten Nucleosid-Bausteins **11**. a) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , Et_3N , Dioxan, 105°C , 40 min, 70 %; b) 1 M NaOH , 3 h, 90 %.

IdU (4) wurde zunächst in einer palladiumkatalysierten Heck-Reaktion mit Methylacrylat (**9**) zu Nucleosid **10** umgesetzt. Nach der Verseifung mit Natriumhydroxid konnte der Nucleosid-Baustein **11** mit einer terminalen Säurefunktion in einer Ausbeute von 63 % über zwei Stufen erhalten werden.

4.1.2 Synthese der „Vinyl“-modifizierten Nucleoside

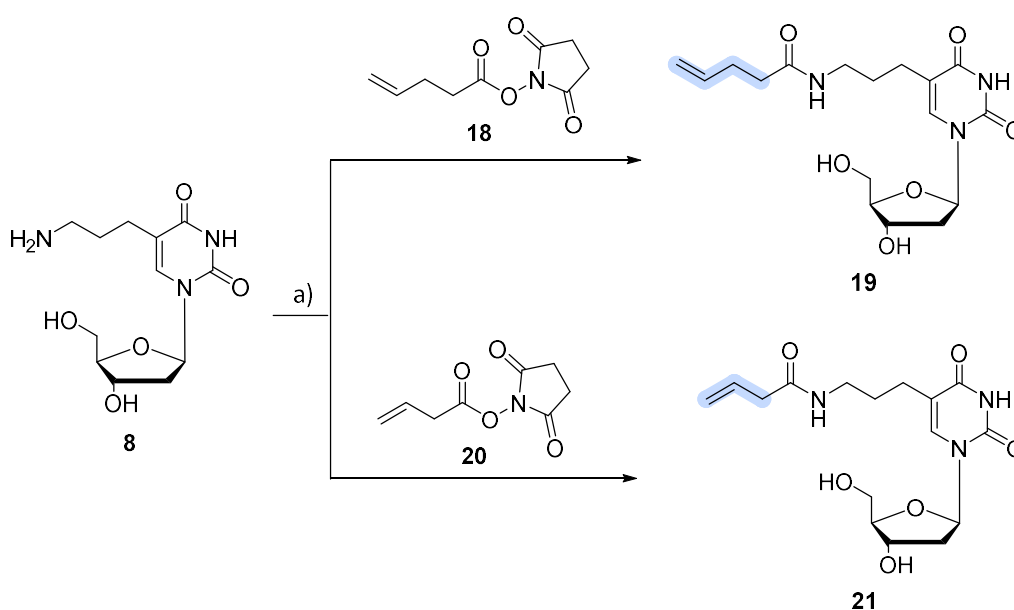
Um den Einfluss der verschiedenen Linker-Strukturen besser bewerten und sie mit literaturbekannten, modifizierten Nucleosiden^[140, 144] vergleichen zu können, sollten die Nucleosid-Bausteine **1** und **11** zunächst mit endständigen Doppelbindungen, im Folgenden allgemein als „Vinyl“-Gruppe beschrieben, verbunden werden. Zur metabolischen Markierung von Nucleinsäuren ist die Vinyl-Gruppe als Dienophil die am häufigsten eingeführte Modifikation und bietet daher eine gute Vergleichbarkeit mit bereits literaturbekannten modifizierten Nucleosiden. Das nachfolgend aufgeführte **Schema 7** zeigt die Syntheseroute, durch die der Nucleosid-Baustein **1** über eine Carbamatbindung mit den entsprechenden Vinyl-Strukturen modifiziert wurde.



Schema 7: Syntheseroute zur Darstellung der Vinylmodifizierung über Carbamatbindung an den Nucleosiden **14** und **17**. a) Et₃N, DCM, -78 °C, RT, ü.N.; b) Et₃N · 3HF, THF, RT, ü.N. **14** wurde mit einer Ausbeute von 49 % über zwei Schritte erhalten. **17** wurde mit einer Ausbeute von 87 % über zwei Schritte erhalten.

Die Bildung der Carbamatbindung erfolgte nach LIU und AUSTIN et al. durch die Verwendung eines erworbenen Chlorameisensäure-Vinylesters (**12**) bzw. eines Chlorameisensäure-Isopropenylesters (**15**). Dieser wurde jeweils mit der Aminogruppe von **1** unter basischen Bedingungen zu den Nucleosiden **13** und **16** umgesetzt.^[157] Die zusätzliche Methyl-Gruppe an der Doppelbindung von **15** soll dabei die Elektronendichte des Dienophils weiter erhöhen und damit die Reaktivität steigern.^[158] Nach Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen konnten die geplanten, „Vinyl“-modifizierten Nucleoside **14** und **17** erhalten werden.

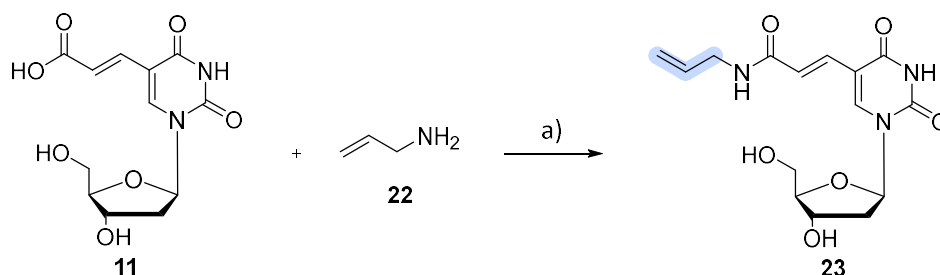
Das Einbringen der „Vinyl“-Funktionalitäten sollte für einen Vergleich auch über eine Peptidbindung erfolgen. Diese wurde ausgehend von Nucleosid **8** über die dargestellte Syntheseroute (**Schema 8**) erreicht werden.



Schema 8: Einführung der „Vinyl“-Funktionalitäten über eine Peptidbindung an Nucleosid-Baustein **8**. a) DMF, RT, ü.N., Nucleosid **19** konnte in einer Ausbeute von 7 % über zwei Stufen gewonnen werden. Nucleosid **21** konnte mit 11 % Ausbeute über zwei Stufen isoliert werden.

Die Synthesestrategie folgte der nach WOMBACHER und JÄSCHKE et al. publizierten Methode. Hierbei erfolgt die Peptidbindung über das freie Amin des Nucleosid-Bausteins **8** und den N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester als „Vinyl“-Vorstufen.^[159-160] Die vorangegangenen Synthesen der NHS-Ester der 4-Pentensäure (**18**) und der 3-Butensäure (**20**) folgten bereits literaturbekannten Strategien.^[161-162] Durch die nachfolgende Peptidkupplung konnten die geplanten „Vinyl“-modifizierten Nucleoside **19** und **21** erhalten werden. Die beiden unterscheiden sich dabei in einer CH₂-Gruppe von der Doppelbindung bis zur Carbonylgruppe. Damit sollte der Einfluss der Peptidbindung auf die Reaktivität des Dienophils in der iEDDA-Reaktion untersucht werden.

Zur Synthese eines „Vinyl“-modifizierten Nucleosids, bei dem sich die Peptidbindung im Vergleich zu Nucleosid **21** in umgekehrter Position befindet, wurde die in **Schema 9** dargestellte Route ausgehend von dem säuremodifizierten Nucleosid **11** verfolgt. Die Reaktion verläuft dabei analog zu der vorherigen Peptidkupplung, jedoch ohne eine vorherige Isolation der Esterverbindung.^[163] Die freie Säuregruppe des Nucleosid-Bausteins **11** wird dabei *in situ* durch die Zugabe von DCC aktiviert, um anschließend mit dem kommerziell erworbenen Allylamin (**22**) eine Peptidbindung auszubilden. Auf diese Weise konnte Nucleosid **23** in einer Ausbeute von 13 % gewonnen werden.

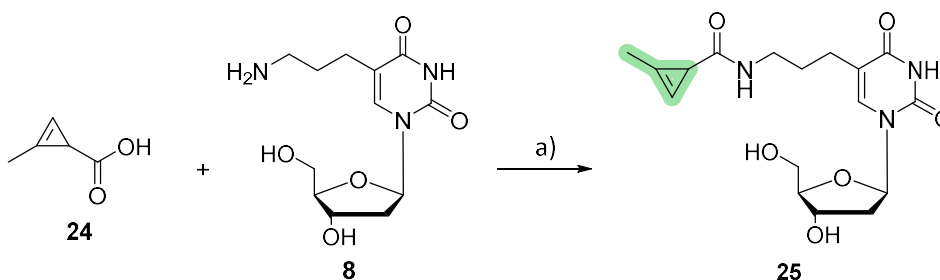


Schema 9: Synthese des „Vinyl“-modifizierten Nucleosids **23** über eine Peptidbindung an dem ungesättigten Linker-System. a) DCC, DMAP, MeOH, 0 °C, RT, ü.N., 13 %.

4.1.3 Synthese der cyclopropen- und norbornenmodifizierten Nucleoside

Sterisch gehinderte Dienophile sollten ausschließlich über Peptidbindungen an die Nucleosid-Bausteine angeknüpft werden. Um die entsprechenden Cyclopropene und Norbornene mit einer Säuregruppe bzw. einer Aminogruppe zu gewinnen, konnte auf bereits literaturbekannte Synthesen zurückgegriffen werden.

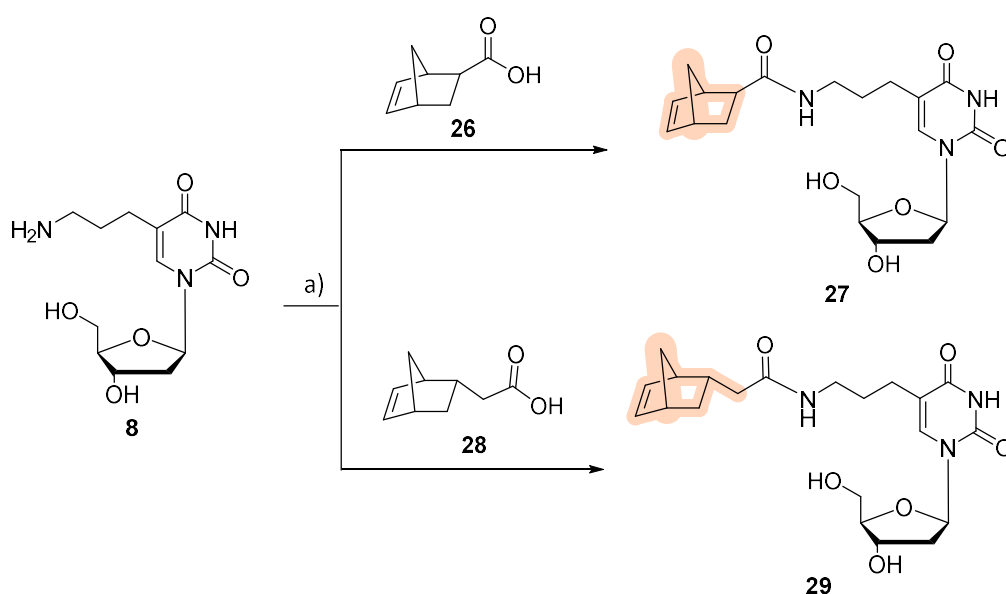
Da unsubstituierte Cyclopropene eine geringe Stabilität aufweisen, sollte daher zur Einführung als Dienophil ein 1-Methyl-Cyclopropen (1MCP) Derivat verwendet werden. Die eingeführte Methyl-Gruppe hat einen stabilisierenden Effekt, ohne dabei die Reaktivität des Cyclopropens zu beeinflussen.^[136] Die Bindung des 1MCPs an den Aminopropyl-Linker des Nucleosid-Bausteins **1** erfolgte nach der Synthese in **Schema 10**.



Schema 10: Darstellung des 1MCP-modifizierten Nucleosids **25** über eine Peptidbindung an dem Propan-Linker. a) DCC, DMAP, MeOH, 0 °C, RT, ü.N., 26 %.

Nachdem die 1MCP-Carbonsäure (**24**) ausgehend von literaturbekannten Strategien^[164-165] erfolgreich synthetisiert wurde, konnte das Molekül in einer Peptidkupplung mit Baustein **8** durch die Zugabe von DCC in das geplante 1MCP-modifizierte Nukleosid **25** umgesetzt werden.^[166] In dieser Reaktion empfiehlt sich DMAP als Additiv, da es besonders bei sterisch gehinderten Resten zu verbesserten Ausbeuten führt.^[167] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte Nukleosid **25** in einer Ausbeute von 26 % erhalten werden.

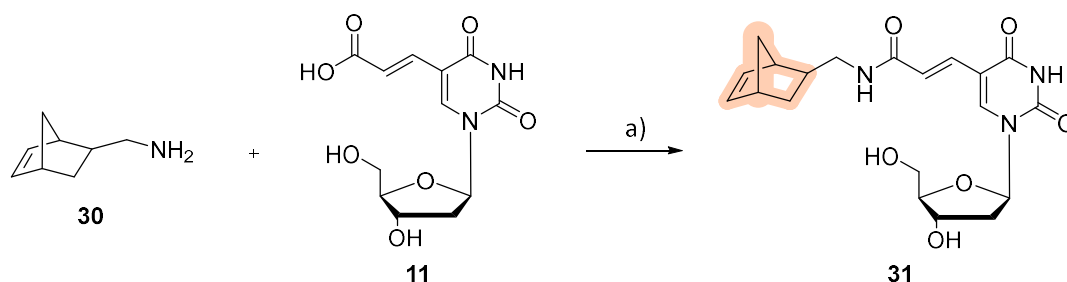
Die am meisten sterisch gehinderten Dienophile, welche in dieser Arbeit verwendet werden sollten, stellen die Norbornenmodifikationen dar. Durch die Synthese entsprechender modifizierter Nukleoside sollten diese untersucht werden. Dafür sollte zunächst die in **Schema 11** dargestellte Route verfolgt werden.



Schema 11: Peptidkupplung der beiden Norbornensäuren **26** und **28** mit dem Nukleosid-Baustein **8** zur Darstellung der norbornenmodifizierten Nukleoside **27** und **29**. a) DCC, DMAP, MeOH, 0 °C, RT, u.N., 40 % für **27**, 37 % für **29**.

Die Synthese der exo-Norbornensäure **26** erfolgte nach der Methode von MADHAVAN *et al.*^[163] durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion ausgehend von Dicyclopentadien und der folgenden Umsetzung mit Acrylsäure zur Gewinnung von **26**. Die endo-Norbornensäure **28** ist kommerziell erhältlich. Die beiden Moleküle wurden jeweils mit dem Nukleosid-Baustein **8** in einer Peptidkupplung analog zu den bisherigen Bedingungen umgesetzt.^[166] Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung konnten die beiden norbornenmodifizierten Nukleoside **27** und **29** erhalten werden. Sie unterscheiden sich im Abstand zur Carbonylgruppe der Peptidbindung. Während bei Nukleosid **27** das Norbornen direkt an das C-Atom des Carbonyls gebunden ist, so ist bei Nukleosid **29** eine weitere CH₂-Gruppe eingeführt, um den Einfluss der Peptidbindung auf das Dienophil untersuchen zu können.

Zur Vervollständigung der Nukleosid-Bibliothek wurde ein analoges norbornenmodifiziertes Nukleosid mit einer im Vergleich zu Nukleosid **29** umgekehrten Peptidbindung nach der Syntheseroute in **Schema 12** hergestellt.



Schema 12: Synthese zur Darstellung des norbornenmodifizierten Nukleosids **31**. a) DCC, DMAP, MeOH, 0 °C, RT, ü.N., 10 %.

Das dargestellte Norbornen-Amin **30** wurde durch die Synthese nach BUCHMEISER *et al.* aus einem Norbornencarbonitril und der Umsetzung mit Lithiumaluminiumhydrid erhalten.^[168] Die anschließende Peptidkupplung mit dem Nukleosid-Baustein **11** erfolgte durch die Aktivierung mit DCC und DMAP^[166], um somit das geplante Nukleosid **31** in einer Ausbeute von 10 % zu erhalten.

4.2 iEDDA-Reaktion der modifizierten Nukleoside mit Tetrazinen

In der chemischen Biologie nimmt die iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen eine besondere Stellung ein^[75, 105], da alle Kriterien einer bioorthogonalen Reaktion erfüllt sind. Zudem besitzt sie das Potential hochdynamische Prozesse in biologischen Systemen zu detektieren, da mit den geeigneten Reaktionspartnern Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von bis zu $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden können. Dadurch eignet sie sich besonders für Anwendungen *in vivo*, welche immer mehr in den Fokus der Forschung gelangen und das Substratspektrum der iEDDA-Reaktion immer mehr erweitern.

4.2.1 Analyse der iEDDA-Reaktion mittels HPLC

Ob die modifizierten Nukleoside als Dienophil in einer iEDDA-Reaktion geeignet sind, sollte durch die Reaktion der Nukleoside mit ausgewählten Tetrazinen untersucht werden. In einem ersten Experiment wurden die Nukleoside **14**, **17**, **25**, **27** und **29** mit den in **Abbildung 19** dargestellten Tetrazinen **32**, **33** und **pyTZ** umgesetzt werden.

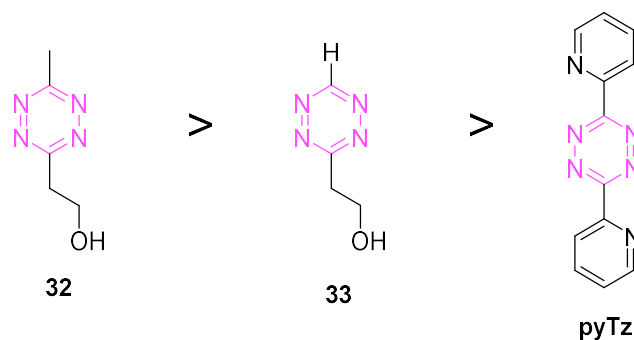


Abbildung 19: Ausgewählte Tetrazine zur iEDDA-Reaktion mit modifizierten Nucleosiden mit aufsteigender Reaktivität. Tetrazin **31** ist ein disubstituiertes Methyl-Tetrazin, Tetrazin **33** ist ein monosubstituiertes H-Tetrazin sowie das **pyTz**.

Bei Tetrazin **32** handelt es sich um ein disubstituiertes Methyl-Tetrazin und im Vergleich dazu steht **33** als monosubstituiertes H-Tetrazin, welches eine höhere Reaktivität in einer iEDDA-Reaktion besitzt.^[114] Als Substituent besitzen beide eine Hydroxygruppe, die zur Einführung eines Reporter-moleküls dienen kann. Die Tetrazine **32** und **33** wurden von Philipp Geng synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Literatur wurde ebenso das kommerziell erhältliche **pyTz** herangezogen, welches gegenüber **32** und **33** reaktiver ist und als eines der Modell Tetrazine der Stand der Technik zur Untersuchung von iEDDA-Reaktionen mit 1,2,4,5-Tetrazinen darstellt.^[169]

Für die jeweiligen Reaktionsansätze wurde, ausgehend von Stammlösungen des modifizierten Nucleosids mit dem jeweiligen Tetrazin in einem, in der Literatur verwendeten Verhältnis^[140] von 1:2,4 in H₂O angesetzt und für fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Die „Click“-Ansätze sollten im Anschluss über die Reverse-Phase-HPLC (RP-HPLC) auf die Abnahme der Edukte und die Entstehung von „Click“-Produkten untersucht werden. Die folgende **Abbildung 20** zeigt Nucleosid **14** und die verschiedenen Tetrazine **32**, **33** und **pyTz** sowie die Analyse deren iEDDA-Reaktion.

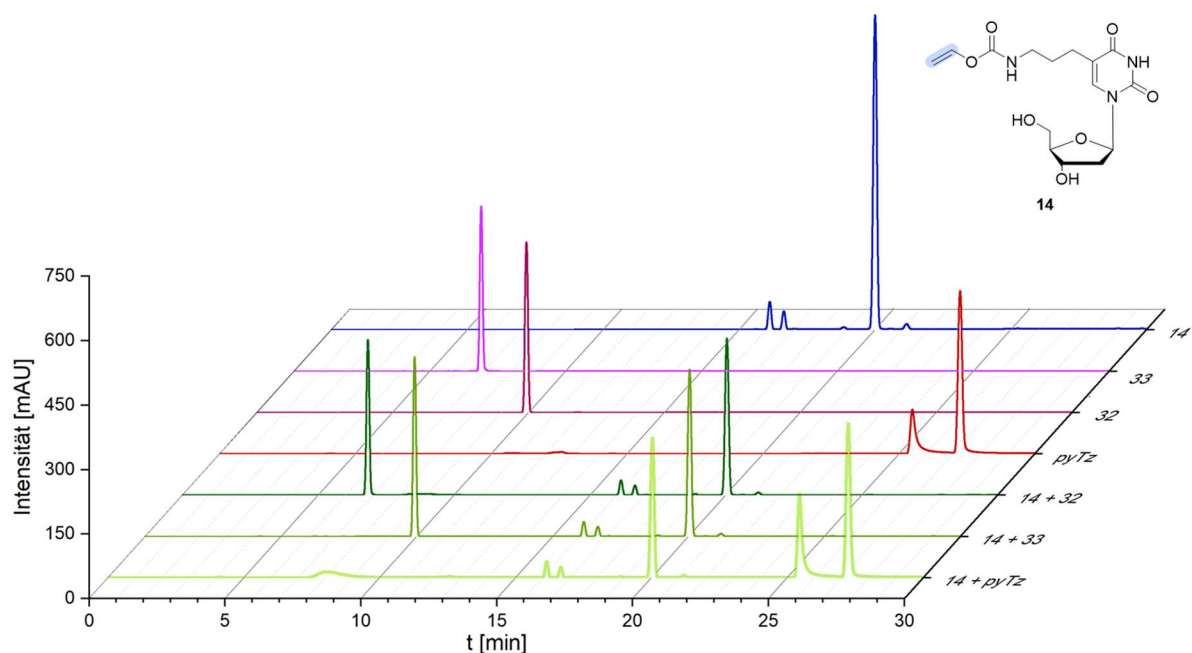


Abbildung 20: RP-HPLC-Analyse von Nucleosid **14**, 1,00 mM (blau) mit den Tetrazinen **32**, **33** und **pyTZ**, je 2,4 mM (rote Farben) sowie den entsprechenden Reaktionsansätzen (grüne Farben). Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

Zunächst wurden alle Reaktionspartner einzeln über die HPLC charakterisiert. Dadurch ergaben sich verschiedene Retentionszeiten aller Edukte. Die Auftrennung der „Click“-Ansätze (grüne Farben) zeigte jedoch nicht die gewünschte Bildung eines neuen Signals, was darauf schließen lässt, dass keine Edukte in ein entsprechendes „Click“-Produkt umgesetzt wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass Nucleosid **14** nicht als Dienophil in einer iEDDA-Reaktion mit den hier verwendeten Tetrazinen umgesetzt werden kann.

Resultierend aus diesen Beobachtungen sollte die Reaktion von Nucleosid **17** mit **pyTz** untersucht werden. Durch die zusätzliche Einführung der Methyl-Gruppe an der Doppelbindung sollte eine erhöhte Reaktivität durch den positiven induktiven Effekt erzielt werden. Das Experiment begrenzte sich auf das reaktivste Tetrazin, das **pyTz**. Weil auch in diesem Ansatz durch das Ausbleiben eines neu gebildeten Signals deutlich wurde, dass keine Umsetzung der Edukte stattgefunden hat (**Abbildung A. 1**) eignet sich **17** ebenfalls nicht zum Einsatz in einer iEDDA-Reaktion mit den verwendeten Tetrazinen.

Die Versuchsreihe mit dem 1MCP-modifizierten Nucleosid **25** (**Abbildung A. 2**) und den beiden norbornenmodifizierten Nucleosiden **27** und **29** (**Abbildung A. 3**) erfolgte analog. Die Übersicht der Chromatogramme in **Abbildung 21** zeigt dabei exemplarisch die Auswertung der iEDDA-Reaktion von Nucleosid **27** mit den verschiedenen Tetrazinen.

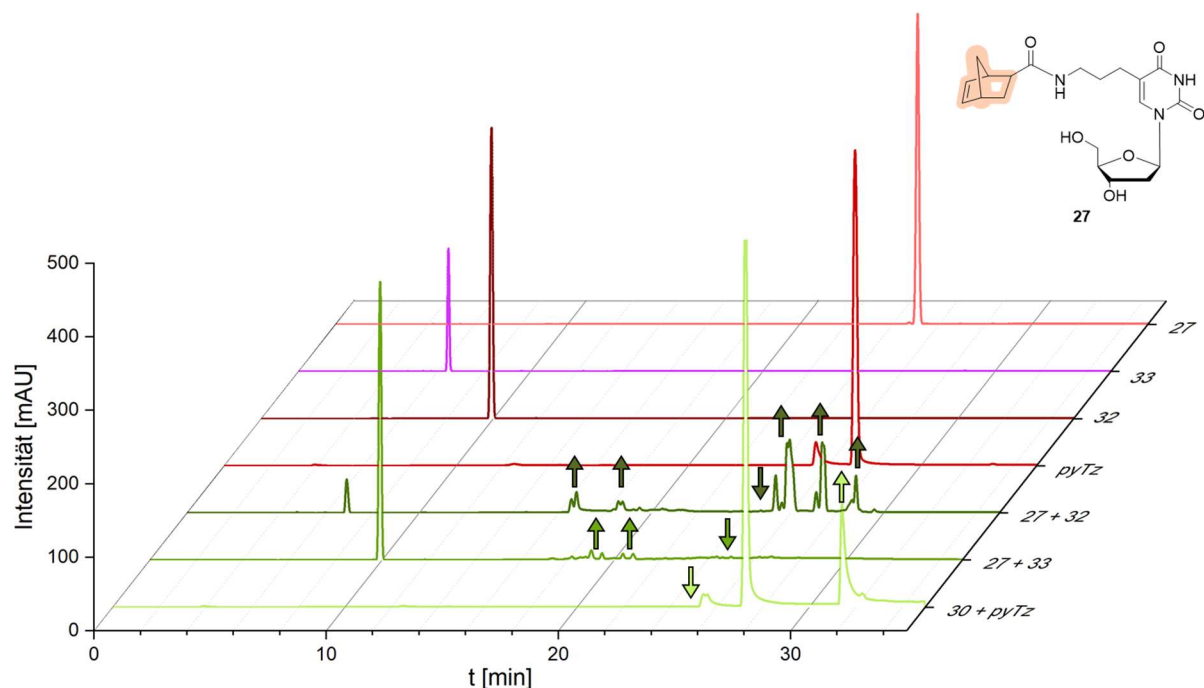


Abbildung 21: RP-HPLC-Analyse von Nucleosid **27**, 1mM (rosa) mit den Tetrazinen **32**, **33** und **pyTZ** je 24 mM (rote Farben) sowie den jeweiligen Reaktionsansätzen (grüne Farben). Die entsprechenden Pfeile in den Reaktionsansätzen markieren die Abnahme der Edukte oder die Bildung eines neuen Signals. Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

In den Reaktionsansätzen konnte die Umsetzung des Nucleosid-Signals durch seine stetige Abnahme beobachtet werden. Da das Tetrazin im Überschuss zugegeben wurde, ist hier die Verringerung in den Chromatogrammen nicht signifikant erkennbar. Das zusätzliche Entstehen von neuen Signalen lässt auf die Bildung von „Click“-Produkten schließen. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden die neu gebildeten Signale durch ESI Massenspektrometrie analysiert, wodurch die iEDDA-Reaktion von **27** mit den entsprechenden Tetrazinen nachgewiesen werden konnte. Derselbe Ansatz wurde daraufhin für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert, um die Stabilität der „Click“-Produkte zu bestimmen (**Abbildung A. 4**). Da sich keine Veränderungen im Chromatogramm gezeigt haben, kann davon ausgegangen werden, dass die „Click“-Produkte erwartungsgemäß über mehrere Tage stabil sind. Deswegen konnten die Nucleoside **25**, **27** und **29** als geeignete Dienophile für diese iEDDA-Reaktion identifiziert werden.

Außerdem sollten die Geschwindigkeitskonstanten der iEDDA-Reaktionen für die einzelnen Nucleoside bestimmt werden. Dafür wurde als Reaktionspartner das **pyTZ** verwendet, da es ein sehr reaktives Tetrazin mit einer ausreichenden Stabilität darstellt und daher in der Literatur überwiegend als Referenz verwendet wird.^[170] Im Vergleich zu den vorangegangenen „Click“-Ansätzen wurde hier ein fünffacher Überschuss an Nucleosid zugegeben, um einen vereinfachten Zugang zur Reaktionskinetik zu erhalten, indem die Reaktion somit als pseudo 1. Ordnung betrachtet werden kann. Über die

Geschwindigkeitskonstante pseudo 1. Ordnung kann unter Einbeziehung der quasikonstanten Nukleosidkonzentration die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung bestimmt werden, welche bei der iEDDA-Reaktion vorliegt. Der Überschuss an Nukleosid wurde für eine interne Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewählt. Zur Bestimmung wurde ein Reaktionsansatz bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, wobei jede Stunde eine Probe zur Analyse über die RP-HPLC entnommen wurde (**Abbildung A. 5**). Dabei stellten sich jedoch einige Nachteile dieser Methode heraus, wodurch sie für das vorliegende System mit den eingesetzten Nukleosiden nicht praktikabel erschien. Zum einen zeigt die Reaktion, exemplarisch an dem 1MCP-modifizierten Nukleosid **25** auch nach über zehn Stunden keine vollständige Umsetzung des Tetrazins. Weiterhin weist das gebildete Produkt-Signal im Chromatogramm eine Retentionszeit auf, die sich mit der des **pyTz** überschneidet. In Bezug auf die norbornenmodifizierten Nukleoside, welche asymmetrische Verbindungen sind, entstehen bei der iEDDA-Reaktion mit den ebenfalls asymmetrischen Tetrazinen Stereoisomere und Regioisomere der „Click“-Produkte, was sich in den Chromatogrammen durch die Entstehung von mehreren Produktsignalen zeigt. Diese Faktoren verhindern die sichere Bestimmung der Reaktionskinetik. Daher sollte eine alternative Methode gefunden werden.

Mit dieser Versuchsreihe konnte dennoch gezeigt werden, dass das 1MCP-modifizierte Nukleosid **25** sowie die beiden norbornenmodifizierten Nukleoside **27** und **29** mit den ausgewählten Tetrazinen **32**, **33** und **pyTZ** in einer iEDDA-Reaktion angewandt werden können. Die beiden „Vinyl“-modifizierten Nukleoside **14** und **17** zeigen im Gegensatz dazu keine Umsetzung. Daher sollte nachfolgend die „Vinyl“-Gruppe über eine Peptidbindung anstelle der Carbamatbindung an das Nukleosid eingeführt werden, um somit eine Steigerung in der Reaktivität zu untersuchen. Diese strukturellen Merkmale wurden mit der Synthese der beiden Nukleoside **19** und **21** umgesetzt. Um den Einfluss der Peptidbindung auf die Elektronendichte des Dienophils zu untersuchen, unterscheiden sich die „Vinyl“-Gruppen um zwei zusätzliche CH₂-Gruppen bei Nukleosid **19** und um eine weitere CH₂-Gruppe bei **21** im Vergleich zu Nukleosid **14**. Die Unterschiede der Strukturen können aus der **Abbildung 22** entnommen werden. Aufgrund der dargestellten Nachteile einer Analyse über die RP-HPLC wurden diese Nukleoside direkt in die folgenden Experimente überführt.

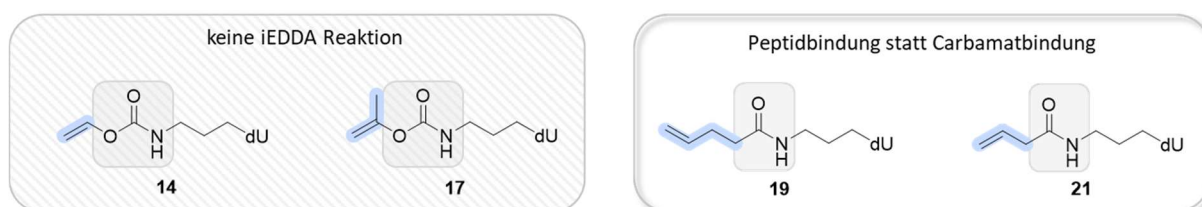


Abbildung 22: Links: Vinylmodifizierte Nukleoside **14** und **17** mit Carbamatbindung die nicht mit den ausgewählten Tetrazinen in einer iEDDA-Reaktion umgesetzt werden konnten. Rechts: „Vinyl“-modifizierte Nukleoside **19** und **21** mit Peptidbindung.

4.2.2 Analyse der iEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie

Tetrazine eignen sich zur Modifikation mit Reportermolekülen, wobei meist ein Fluoreszenzfarbstoff über einen Linker angeknüpft wird. Dadurch kann die Eigenschaft von Tetrazinen als *Quencher* genutzt werden, um die Reaktion spektroskopisch zu verfolgen.^[121] Durch die Freisetzung von Stickstoff während der iEDDA-Reaktion wird die Tetrazinstruktur aufgelöst und somit die Fluoreszenzlöschung aufgehoben. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dieser *Turn-On* kann, aufgetragen gegen die Zeit, wiederum zur Reaktionsverfolgung genutzt werden um daraus die Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen. Dieses Verfahren wurde zuvor in Zusammenarbeit von Nicola Seul und Philipp Geng über den Vergleich einer RP-HPLC-Analyse mit einem Fluoreszenzexperiment verifiziert.

Die geplante Messreihe sollte dabei mit den tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen **34** und **35** (**Abbildung 23**) erfolgen. Diese wurden ebenfalls von Philipp Geng im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

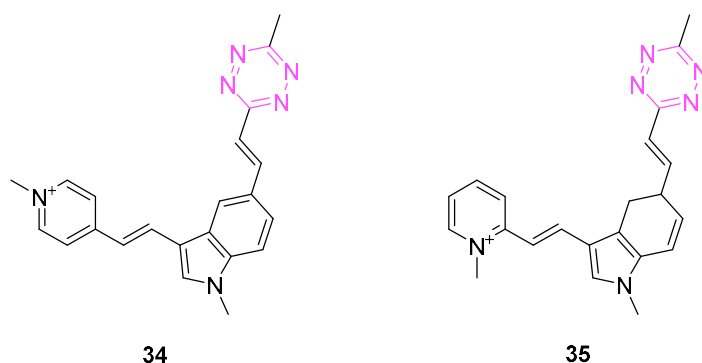
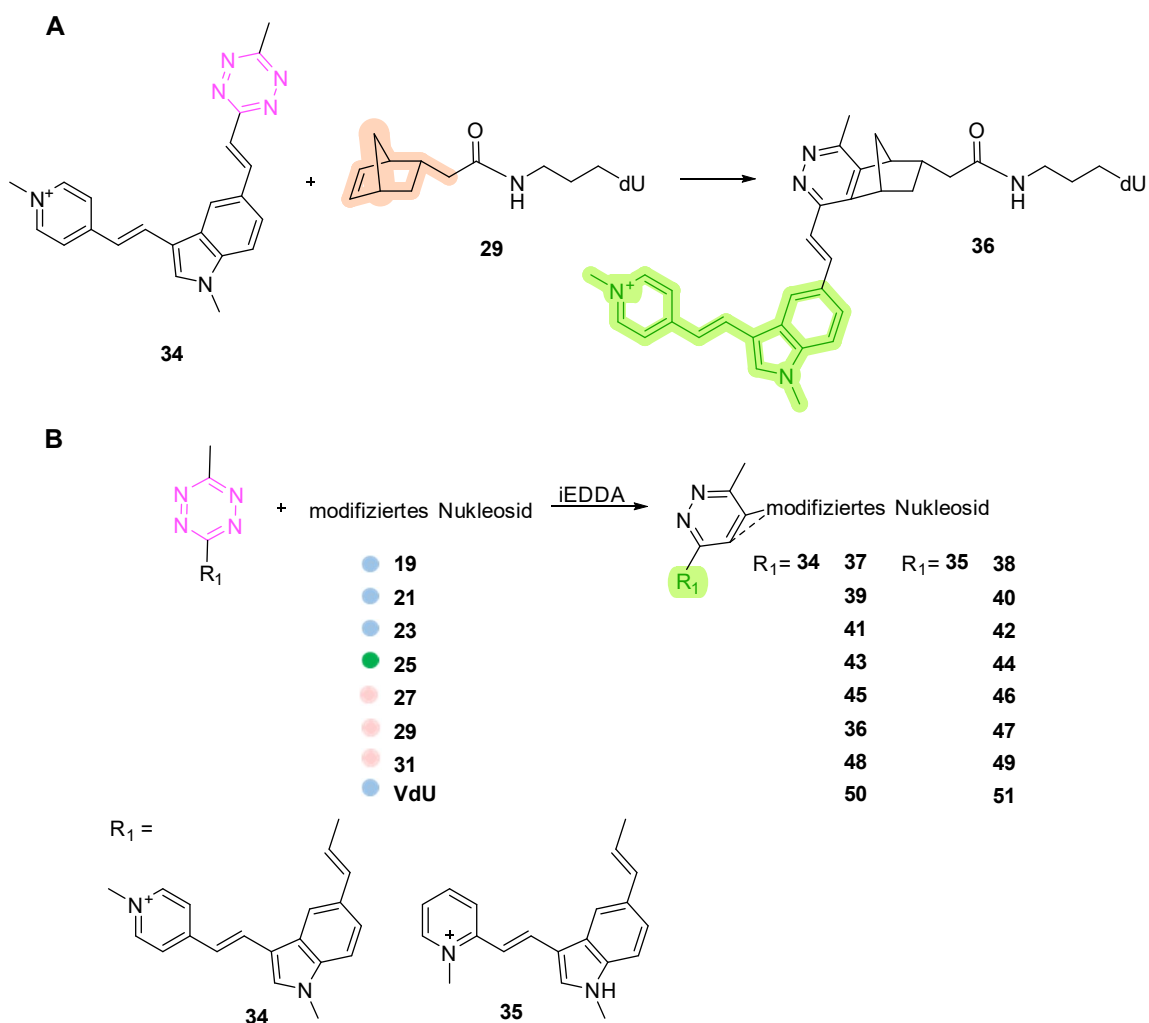


Abbildung 23: Die beiden tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe **34** und **35**, welche zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten in einer iEDDA-Reaktion mit modifizierten Nukleosiden verwendet wurden.

Für die iEDDA-Reaktion wird eine Reaktionskinetik 2. Ordnung angenommen. Um die Bedingungen möglichst realitätsnah zu halten und um die Reaktion als pseudo 1. Ordnung betrachten zu können, wird einer der Reaktionspartner im Überschuss in die Reaktion eingebracht. Da in dieser Messreihe der Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden sollte, wurde das Nukleosid im Überschuss zugegeben.^[171] Die Reaktionsansätze erfolgten aus Stammlösungen in H₂O, sodass der DMSO Anteil in der Reaktion bei 1 % lag (**Tabelle 5, Kapitel 6.2.1**). Gerade in Bezug auf die Anwendbarkeit in biologischen Systemen sollte der Anteil von 1 % DMSO nicht überschritten werden, da DMSO in höheren Konzentrationen zytotoxisch ist. Die iEDDA-Reaktion mit Fluoreszenzanstieg ist in **Schema 13** für das Tetrazin **34** mit Nukleosid **27** exemplarisch dargestellt, sowie eine Übersicht der „Click“-Produkte.



Schema 13: A: iEDDA-Reaktion des tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl Farbstoffs **34** und dem norbornenmodifizierten Nucleosid **29**. Durch die Reaktion kommt es zur Freisetzung von Stickstoff, wodurch die Struktur des fluoreszenzlöschenden Tetrazins aufgelöst wird. Somit kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz (grün) beim gebildeten „Click“-Produkt **36**. B: Übersicht der gebildeten „Click“-Produkte (**36-51**) in der Reaktion mit den Tetrazin-Farbstoffen und den jeweiligen modifizierten Nucleosiden. ● Norbornenmodifikation ● 1MCP-Modifikation ● „Vinyl“-Modifikation

Durch die vorangegangene RP-HPLC-Analyse zeichnete sich eine langsame Umsetzung der Edukte ab. Daher wurden die Messintervalle des Fluoreszenzsignals auf 24 h über fünf Tage festgelegt sowie eine finale Messung an Tag sieben um die vollständige Umsetzung des Nucleosids zu gewährleisten. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 437 nm (**34**) bzw. 424 nm (**35**) angeregt und die Emissionsspektren in einem Bereich von 439 bzw. 452 nm bis 800 nm aufgenommen. Bei der Messreihe des norbornenmodifizierten Nucleosids **29** konnte bereits an Messtag zwei keine weitere Zunahme in der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, weswegen die Messintervalle auf 30 min über 7,5 Stunden reduziert und eine finale Messung nach 24 Stunden durchgeführt wurde.

Die erhaltenen Messdaten wurden, wie in **Abbildung 24** beispielhaft für die Reaktion von **29** mit **34** ausgewertet und dargestellt.

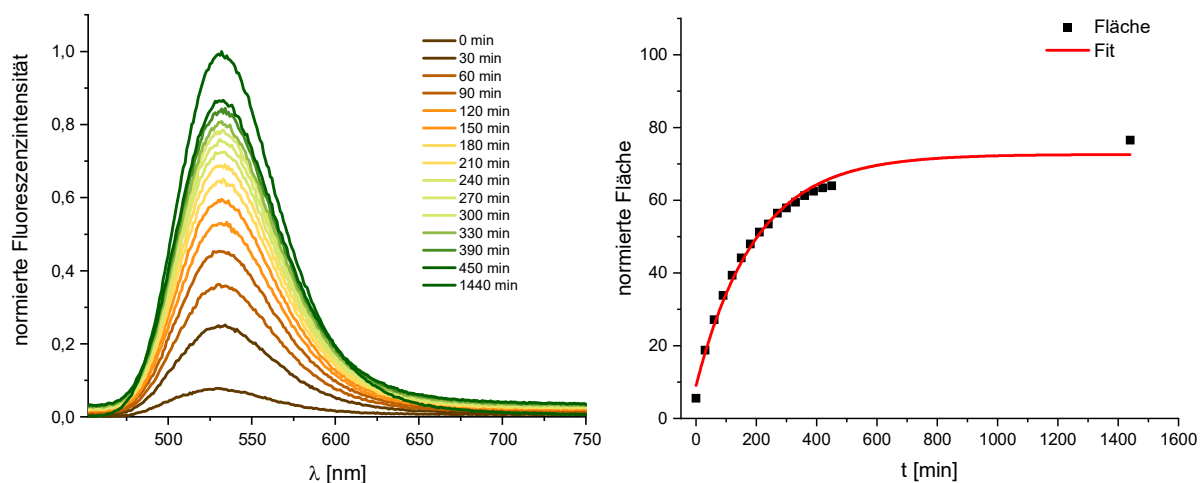


Abbildung 24: Fluoreszenzspektroskopische Verfolgung der iEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **29** und Tetrazin-Farbstoff **34** bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 437$ nm und einem Emissionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 452$ bis 750 nm. Links: Normierte Emissionsspektren der Messintervalle über 7,5h sowie der finalen Messung nach 24 h. Rechts: Kinetische Darstellung der Messwerte die über eine monoexponentielle Funktion angepasst wurden (Kapitel 6.2.1).

Mit den generierten Messwerten konnten die photophysikalischen Eigenschaften der „Click“-Produkte, das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 für die iEDDA-Reaktionen bestimmt werden. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität nach der Reaktion ist auch mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Fotografie der beiden Küvetten in der folgenden **Abbildung 25** zeigt bei einer Anregung mit einer UV-Lampe bei 395 nm einen deutlichen Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen dem Tetrazin-Farbstoff **34** (linke Küvette) und dem entstandenen „Click“-Produkt **36** (rechte Küvette).



Abbildung 25: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zwischen dem Tetrazin-Farbstoff **34** in der linken Küvette und dem „Click“-Produkt **36** in der rechten Küvette nach der iEDDA-Reaktion mit Nukleosid **29**. Die Proben sind unter UV-Anregung bei 395 nm.

Zudem konnten die „Click“-Produkte durch ESI Massenspektrometrie der jeweiligen Proben identifiziert werden. Zur Bewertung der modifizierten Nucleoside als Dienophil in dieser iEDDA-Reaktion wurden die erhaltenen Daten aus **Tabelle 1** nach absteigender Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (k_2) aufgelistet. Zudem wurde **VdU** mit in die Messreihe aufgenommen, um einen Bezug zu einem literaturbekanntem modifizierten Nucleosid herzustellen und somit die Ergebnisse besser bewerten zu können.

Tabelle 1: Photophysikalische Eigenschaften der „Click“-Produkte nach der iEDDA-Reaktion der tetrazin-modifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe **34** oder **35** mit den modifizierten Nucleosiden **19**, **21**, **25**, **27** und **29**.

Tetrazin	Nucleosid	„Click“-Produkt	λ_{em} [nm]	$\Delta\lambda$ [eV] ^[a]	Turn-On	$k_2 \cdot 10^{-2}$ [$M^{-1}s^{-1}$]
34	● 29	36	532	0,506	22	105 ± 4,00
	● 27	45	535	0,520	25	7,70 ± 0,06
	● 25	43	532	0,506	23	0,51 ± 0,05
	● 21	39	533	0,511	11	2,10 ± 0,03
	● VdU	50	536	0,524	21	0,37 ± 0,01
	● 19	37	534	0,515	48	0,15 ± 0,01
35	● 29	47	521	0,544	5	87,5 ± 0,4
	● 27	46	523	0,553	7	4,54 ± 0,04
	● 25	44	518	0,530	3	1,64 ± 0,03
	● 19	38	520	0,540	5	1,43 ± 0,02
	● 21	40	516	0,521	4	1,30 ± 0,03
	● VdU	51	522	0,549	6	0,86 ± 0,03

[a] Stokes-Verschiebung ● Norbornenmodifikation ● 1MCP-Modifikation ● „Vinyl“-Modifikation

Generell ist aus der **Tabelle 1** zu erkennen, dass sich die Tendenz der Nucleoside bezüglich k_2 mit den beiden Tetrazin-Farbstoffen **34** und **35** nicht signifikant unterscheidet. Deutlich erkennbar ist jedoch, dass das norbornenmodifizierte Nucleosid **29** mit Abstand die größten Geschwindigkeitskonstanten aufweist ($k_2 = 105 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$). Das ist im Vergleich zu **27** eine 14-fache Erhöhung ($k_2 = 7,70 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$) für die Reaktion mit **34** und eine über 20-fache Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante mit Tetrazin **35** ($k_2 = 4,54 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$). Damit konnte eine Reaktivität erreicht werden, die deutlich über der Reaktion eines unsubstituierten Norbornens mit **pyTz** ($k_2 = 15,5 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$)^[170] liegt und sich wiederum im selben Bereich einer der schnellsten berichteten Reaktion von Norbornen mit einem 3-(4-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine ($k_2 \sim 190 \cdot 10^{-2} M^{-1}s^{-1}$)^[107] einfindet. Entgegen den Erwartungen zeigt das 1MCP-Nucleosid **25** k_2 -Werte im Bereich der „Vinyl“-

modifizierten Nukleoside ($k_2 \sim 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Durch die erhöhte Ringspannung im 1MCP (54,1 kcal/mol)^[172] sollte **25** eine erhöhte Reaktivität im Vergleich zu Norbornenen (21,6 kcal/mol)^[173] aufzeigen, wohingegen sie in dieser Messreihe um den Faktor 40 verringert ist. Betrachtet man zunächst die Strukturen der beiden norbornenmodifizierten Nukleoside **27** und **29** so unterscheiden sie sich ausschließlich in einer CH₂-Gruppe zwischen der Peptidbindung und dem Norbornen. Bei **27** ist das Norbornen direkt an die Peptidbindung eingeführt und kann dadurch von den induktiven Effekten mehr beeinflusst werden als **29**, bei dem eine zusätzliche CH₂-Gruppe zwischengeschaltet ist. Da Nukleosid **25** ebenfalls direkt an die Peptidbindung gekuppelt ist und die Werte für k_2 unter den Erwartungen lagen, kann hier davon ausgegangen werden, dass die Peptidbindung einen negativen induktiven Effekt der Carbonylgruppe auf das Dienophil ausübt und dadurch die Elektronendichte verringert wird. Dass die Reaktivität von 1MCPen über den Substituenten beeinflusst wird, zeigte bereits die Arbeit von DEVARAJ et al.^[136] Im Allgemeinen liegen die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten mit einem Faktor von 10^{-2} deutlich unter denen, die in der Literatur für diese Dienophile angegeben werden.^[107, 136] Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die in der Literatur aufgeführten Werte für k_2 oftmals mit sehr reaktiven Tetrazinen, wie dem **pyTz**, bestimmt wurden und die entsprechenden Dienophile auch nicht über eine Linker-Struktur an ein Nukleosid gebunden sind. Wird **VdU** als Referenz herangezogen, so zeigt sich in den Reaktionen mit den hier verwendeten Tetrazin-Farbstoffen eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten mit $k_2 \sim 0,4 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ im Vergleich zu einer Reaktion mit **pyTz** ($k_2 \sim 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^[140]. Daher sollte zur Steigerung der Reaktivität ein optimiertes Linker-System mit einer, im Vergleich zu den bisherigen Nukleosiden umgedrehten Position der Peptidbindung sowie einem konjugierten System analysiert werden. Die Umsetzung erfolgte mit den modifizierten Nukleosiden **23** und **31**. Mit dieser Auswahl wurde sowohl das reaktivste, norbornenmodifizierte Nukleosid **32** als auch das weniger reaktive „Vinyl“-modifizierte Nukleosid **21** für eine Optimierung herangezogen. Die veränderte Position der Peptidbindung soll einen positiven induktiven Effekt erzielen und damit die Elektronendichte des Dienophils erhöhen, um damit eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Das zusätzliche konjugierte System führt zur Einschränkung der Freiheitsgrade, wodurch sich eine erhöhte Affinität zu Tetrazinen in einer iEDDA-Reaktion beobachten lässt.^[155]

Die optimierten Nukleoside **23** und **31** wurden analog der bisherigen Messreihe über Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Die erhaltenen Daten können aus der folgenden **Tabelle 2** entnommen werden.

Tabelle 2: Photophysikalische Eigenschaften der „Click“-Produkte nach der iEDDA-Reaktion der tetrazin-modifizierten Cyanyn-Styryl-Farbstoffe **34** oder **35** mit den modifizierten Nucleosiden **23** und **31**.

Tetrazin	Nucleosid	„Click“-Produkt	λ_{em} [nm]	$\Delta\lambda$ [eV] ^[a]	Turn-On	$k_2 \cdot 10^{-2}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
34	● 31	48	536	0,524	15	178,0 ± 0,4
	● 23	41	532	0,506	3	0,81 ± 0,02
35	● 31	49	519	0,535	9	152,5 ± 0,2
	● 23	42	529	0,493	2	1,70 ± 0,06

[a] Stokes-Verschiebung ● Norbornenmodifikation ● „Vinyl“-Modifikation

Das norbornenmodifizierte Nucleosid **31** zeigt eine deutlich gesteigerte Geschwindigkeitskonstante mit den beiden Tetrazin-Farbstoffen **34** und **35**, weshalb die Messreihe auf sieben Stunden mit einer finalen Messung nach einem Tag angesetzt wurde (**Kapitel 6.2.1**). Das „Vinyl“-modifizierte Nucleosid **23** wurde hingegen, wie zuvor, über insgesamt sieben Tage gemessen. Im Vergleich zu den davor gemessenen Nucleosiden konnte insbesondere die Geschwindigkeitskonstante des Norbornens durch die umgekehrte Position der Peptidbindung und des eingeführten konjugierten Systems nochmals erhöht werden. Im Vergleich zu **29** zeigt **31** eine Verdopplung der Geschwindigkeitskonstante mit $k_2 = 178 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die Reaktion mit Tetrazin **34** und $k_2 = 153 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die Reaktion mit Tetrazin **35**. Somit kann angenommen werden, dass in diesem Fall die Elektronendichte des Dienophils durch ein alternatives Linker-System im Vergleich zu Nucleosid **29** weiter erhöht werden konnte, was zu einer schnelleren Reaktionsgeschwindigkeitskonstante in einer iEDDA-Reaktion führt. Dieser positive Effekt konnte jedoch nicht auf Nucleosid **23** übertragen werden. Das alternative Linker-System zeigt im Vergleich zu Nucleosid **21** eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstante mit Tetrazin **34** um den Faktor 2,6 auf $k_2 = 0,81 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Auch der Turn-On sinkt auf ein Drittel des Wertes von Nucleosid **21** ab (Turn-On = 3). In der Reaktion mit Tetrazin **35** unterscheiden sich die erhaltenen Ergebnisse von **23** weniger. In Bezug auf k_2 konnte eine geringe Verbesserung im Vergleich zu Nucleosid **21** erzielt werden $k_2 = 1,70 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, wohingegen der Turn-On um den Wert 2 verringert ist. Dies widerspricht jedoch der Annahme, dass die umgekehrte Position der Peptidbindung zu einer Erhöhung der Reaktivität führt. Werden in diesem Fall ausschließlich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten betrachtet, so zeigt das „Vinyl“-modifizierte Nucleosid **23**, mit dem optimierten Linker-System in der iEDDA-Reaktion mit Tetrazin **34** die niedrigsten Werte für k_2 in der gesamten Messreihe. Jedoch besitzt es in der Reaktion mit Tetrazin **35** die größten Werte für k_2 für die „Vinyl“-modifizierten Nucleoside (**19**, **21** und **VdU**) und liegt zudem im Wertebereich des 1MCP-modifizierten Nucleosids **25**. Hierbei zeigt sich deutlich die Abhängigkeit des Zusammenspiels zwischen Dienophil und Tetrazin, die für eine erfolgreiche iEDDA-Reaktion optimal aufeinander angepasst

werden müssen, um weitere Verbesserungen in der Reaktionsgeschwindigkeit sowie den photophysikalischen Eigenschaften zu erzielen.

In Bezug auf die tetrazinmodifizierten Farbstoffen ist zu bemerken, dass **34** und **35** ähnliche k_2 -Werte erreichen, sich aber in den *Turn-On* Werten deutlich voneinander unterscheiden. So erzielt **34** Werte zwischen ~ 11 bis 48 wohingegen sich bei **35** maximal ein Verhältnis von 9 ergibt. Dagegen erzielt **35** in den Messreihen die größeren *Stokes*-Verschiebungen von bis zu 0,55 eV. Sowohl der *Turn-On* als auch die *Stokes*-Verschiebung sind für die Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie von Zellen besonders wichtige Faktoren. Ein Vorteil solcher fluorogenen Sonden, wie den Tetrazin-Farbstoffen **34** und **35**, ist gegenüber herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen, dass diese nicht durch Waschschriffe aus der Probe entfernt werden müssen, da durch die *Turn-On* Verhältnisse ungebundener Farbstoff keine oder nur eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz erzeugt. Auch eine große *Stokes*-Verschiebung ist bei der Fluoreszenzmikroskopie eine wichtige Eigenschaft, da die erhaltenen Fluoreszenzsignale der Sonden häufig lichtschwach sind und somit durch das eingestrahle Licht und Lichtquellen am Mikroskop überstrahlt werden können. Durch die Anordnung von Filtern kann das emittierende Licht vom Anregungslicht getrennt werden, was bei größeren *Stokes*-Verschiebungen effizienter ist als bei kleinen Verschiebungen. Somit trägt nur das lichtschwächere Fluoreszenzsignal der Probe zur Bildgebung bei.^[174] Ob nun ein höherer *Turn-On* oder die größere *Stokes*-Verschiebung der beiden tetrazinmodifizierten Farbstoffe bei einem Zellexperiment von Vorteil ist, kann aus den erhaltenen Messwerte noch nicht hervorgehen.

Über diese fluoreszenzspektroskopische Analyse konnten alle in dieser Messreihe analysierten, modifizierten Nucleoside als geeignete Dienophile in einer iEDDA-Reaktion mit den verwendeten tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl Farbstoffen bestätigt werden. Weiterführend sollte nun dieses System in die Anwendung auf *in vivo* Versuche übertragen werden.

4.3 Inkorporation der modifizierten Nucleoside in naszierende DNA

Zur metabolischen Markierung naszierender DNA werden die modifizierten Nucleoside dem Kultivierungsmedium zugesetzt und gelangen durch einen aktiven Transport durch die Membran ins Zellinnere.^[37, 39] Dort müssen sie von den endogenen Kinasen als Substrat akzeptiert werden, um zu den entsprechenden Nucleotidtriphosphaten umgesetzt zu werden. Erst danach dienen sie als Substrat für die DNA-Polymerase und können im Rahmen der Zellteilung in naszierende DNA eingebaut werden.

4.3.1 Viabilitätstest

Bei der Testung von neuen Substanzen in einer Zellkultur wird in der Regel zunächst überprüft, ob diese zytotoxische Eigenschaften besitzen. Dies kann über einen Zellproliferations-Test (MTT-Test) erfolgen. Der Test basiert auf der intrazellulären Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) zu blauem Formazan. Die Absorption des Formazans kann zwischen 550 und 600 nm photometrisch detektiert werden, wobei die Intensität direkt mit der Zellviabilität korreliert. Für die Toxizitätsuntersuchungen wurden HeLa Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der modifizierten Nucleoside über 48 h inkubiert. Die getesteten Konzentrationen wurden aus den jeweiligen Stammlösungen in Zellkulturmedium verdünnt, so dass die DMSO Konzentration stets unter 1 % lag. Das folgende Diagramm in **Abbildung 26** zeigt die prozentuale Viabilität der mit den jeweiligen Konzentrationen der modifizierten Nucleosid behandelten Zellen. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle und wurden als 100 % Viabilität festgelegt (grau).

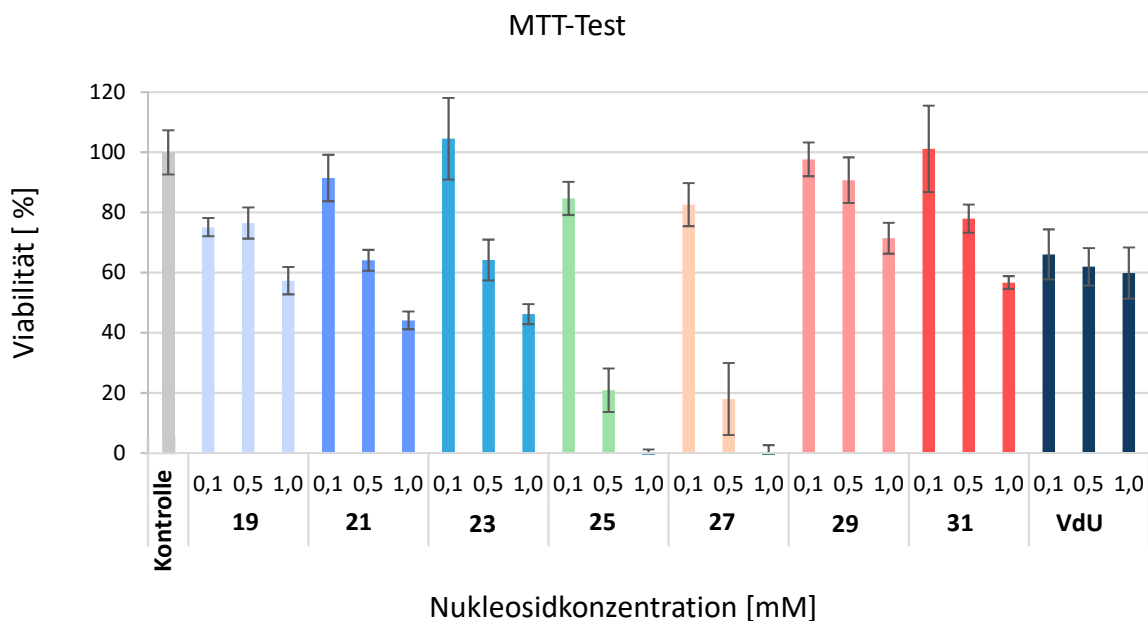


Abbildung 26: MTT-Test der modifizierten Nucleoside **19**, **21**, **23**, **25**, **27**, **29**, **31** und **VdU**. HeLa Zellen wurden für 48 h mit den jeweiligen Konzentrationen inkubiert. Es wurde die prozentuale Viabilität gegen die Konzentration der Nucleoside Aufgetragen. Pro Konzentration wurden n=6 Proben gemittelt und die unbehandelten Zellen (Kontrolle) als 100 % Viabilität festgelegt (**Kapitel 6.3.6**).

Alle getesteten modifizierten Nucleoside weisen eine geringe bis moderate Zytotoxizität auf. Die mittlere letale Dosis (LD₅₀) der Nucleoside **19**, **29** und **31** zeigen mit Werten von LD₅₀ > 1 mM die geringste Toxizität, die mit **VdU** vergleichbar ist. Die beiden „Vinyl“-modifizierten Nucleoside **21** und

23 zeigen mit einem $LD_{50} \sim 0,8$ mM einen ebenso geringen zytotoxischen Effekt. Eine moderate Toxizität weisen die Nukleoside **25** und **27** mit $LD_{50} \sim 0,3$ mM auf. Aus den Ergebnissen des MTT-Tests lässt sich schließen, dass alle Nukleoside, bis auf **25** und **27** unter den angewandten Bedingungen nicht toxisch sind und zur potentiellen metabolischen Markierung von DNA eingesetzt werden können. Um den zytotoxischen Effekt der beiden Nukleoside **25** und **27** so gering wie möglich zu halten, wurde eine maximale Konzentration von 0,25 mM für die folgenden Zellexperimente festgelegt.

4.3.2 Optimierung des Zellkulturmediums

Der Erfolg einer metabolischen Markierungsstrategie ist maßgeblich von der Inkorporationsrate des modifizierten Moleküls abhängig. Dieses steht jedoch in Konkurrenz mit den natürlichen Bausteinen und kann aufgrund der Modifikation auch eine verringerte Umsetzung in den Stoffwechselwegen aufweisen. Um die Konkurrenzsituation zwischen modifizierten und natürlichen Nukleosiden entgegenzuwirken, sollten die Zellen in einem Zellkulturmedium inkubiert werden, welchem keine natürlichen Nukleoside zugesetzt sind. Somit sollte eine gesteigerte Verwertung der modifizierten Nukleoside erreicht werden, da eine künstliche Verknappung der natürlichen Bausteine erzeugt wird. Um dennoch sicherzustellen, dass die Zellen in einem solchen Medium weiterhin überleben können, sollte zunächst über eine Wachstumskurve die Zellteilung überwacht werden. Zur Umsetzung eines solchen Zellkulturmediums wurde ein MEM (*Minimum Essential Medium*) ohne Glutamin und ohne Nukleoside anstelle des herkömmlichen DMEM (*Dubelcco's modified Eagle's medium*) benutzt. Das Auslassen von Glutamin stellte sich dabei als ein wichtiger Faktor heraus, da L-Glutamin eine essentielle Stickstoffquelle in der Nukleosidsynthese darstellt.^[175] Zusätzlich wurde ein dialysiertes fötales Kälberserum (FCS; *fetal calve serum*) zugesetzt, welches keine Nukleoside mehr beinhaltet. So konnte ein Medium ohne natürliche Nukleoside hergestellt werden, welches im Folgenden als *No/No-Medium* (*no glutamine, no nucleosides*) bezeichnet wird.

Aus dem Diagramm in **Abbildung 27** kann entnommen werden, dass die Zellen, welche in dem herkömmlichen DMEM kultiviert wurden, das schnellste Wachstum zeigen, wohingegen die Zellen in *No/No-Medium* deutlich in ihrem Wachstum verlangsamt sind. Werden nun die Zellen aus dem *No/No-Medium* betrachtet, welchem die natürlichen Nukleoside zugesetzt wurden, zeigt sich ein schnelleres Wachstum im Vergleich zum *No/No-Medium*.

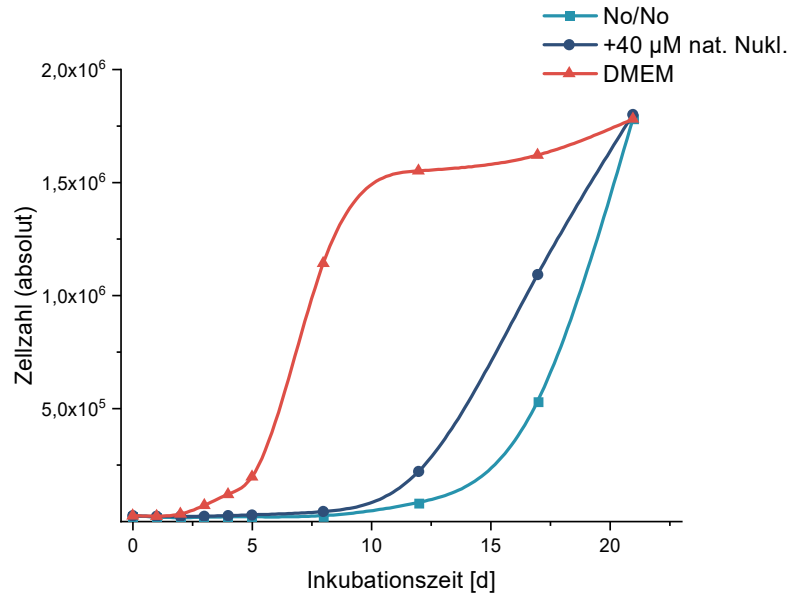


Abbildung 27: Wachstumskurve von HeLa Zellen die in unterschiedlichen Zellkulturmedien kultiviert wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ über 20 Tage kultiviert (**Kapitel 6.3.6**). Die Daten stellen die Mittelwerte der absoluten Zellzahl dar (n=2Wells).

Daraus kann gefolgert werden, dass der Mangel an Nucleosiden ein verlangsamtes Zellwachstum bewirkt, da die Zellen diese für die Replikation der DNA aus den eigenen Abbauprodukten der Nucleoside synthetisieren müssen (engl.: *salvage pathway*) oder sie in einer Synthese *de novo* aufbauen, was viel Energie erfordert und dadurch in einem verlangsamten Wachstum resultiert. Diese induzierte Knappheit könnte eine erhöhte Inkorporationsrate des modifizierten Nucleosids in die DNA erzielen. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden in **Kapitel 4.4** die Auswirkungen der Medien in Bezug auf die metabolische Markierung der DNA weiter untersucht.

4.3.3 Isolation genomischer DNA

Da der Aufbau eines bildgebenden Experiments über Fluoreszenzmikroskopie in der Zellkultur von vielen verschiedenen Parametern beeinflusst werden kann, sollte zunächst mit einer alternativen Nachweismethode die Inkorporation der modifizierten Nucleoside nachgewiesen werden. Hierfür sollte die genomische DNA von HeLa Zellen, die mit den jeweiligen Nucleosiden **19**, **21**, **25**, **27** und **29** inkubiert wurden, isoliert werden, um anschließend die inkorporierten Nucleoside daraus nachzuweisen. Zur Isolation der DNA wurden verschiedene Methoden angewandt, wobei mit dem FlexiGene Kit (QIAGEN) die besten Ergebnisse mit einem vergleichsweise geringen Zeitaufwand erzielt wurden (**Kapitel 4.3.3**). Ein weiterer Vorteil ist die enzymatische Erschließung der DNA ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel, wie es bei den beiden Alternativmethoden mit dem TRIzol™-

und DNAzol™-Reagenz der Fall ist. Zudem sind beide Reagenzien kanzerogen, wodurch die ersten Schritte der Isolation unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden müssen. Nach Isolation der genomischen DNA wurde diese in Puffer gelöst, die Konzentration über eine *ND-100 Spectrophotometer* der Firma NANODROP™ bestimmt (**Kapitel 6.2**) und für die weitere Analyse vorbereitet.

In einer ersten Nachweismethode sollte die isolierte DNA über einen enzymatischen Verdau in Mononukleoside gespalten werden, um diese anschließend über Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) zu detektieren. Für den Verdau wurden zwei verschiedene Ansätze getestet, wobei sich das „Vier-Stunden Zwei-Enzyme“- System gegenüber dem „*Nucleoside Digestion Mix*“ (NEW ENGLAND BIOLABS) durchgesetzt hat, da hier eine größere Menge an DNA verdaut werden konnte. Anschließend wurden die Ansätze über RP-HPLC sowie LC/MS analysiert. Dabei konnten lediglich die natürlichen Nukleoside über ihre spezifischen Retentionszeiten identifiziert werden, wohingegen die modifizierten Nukleoside nicht detektiert wurden (**Abbildung A. 6**). Da die Inkorporationsrate modifizierter Nukleoside sehr gering ist^[41], konnte davon ausgegangen werden, dass diese Methode für die vorliegenden Nukleoside nicht sensitiv genug ist.

4.3.4 Nachweis modifizierter Nukleoside in genomischer DNA

Eine alternative Nachweismethode der inkorporierten modifizierten Nukleoside lieferte die Arbeit von SPITALE *et al.*^[176] Hierbei wird die genomische DNA aus Zellen, die zuvor mit modifizierten Nukleosiden inkubiert wurden, isoliert und anschließend mit einem Biotin-Tetrazin in einer iEDDA-Reaktion *in vitro* umgesetzt (**Kapitel 6.3.6**). Nach Aufreinigung der biotinylierten DNA wird diese über einen Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: *horseradish peroxidase*) -Streptavidin *Dot Blot* analysiert. Ein *Dot Blot* ist eine Methode in der Biochemie, bei der Moleküle auf einer Membran immobilisiert werden, um sie anschließend meist durch eine Immunfärbung oder über eine Sonde zu detektieren. Für den Nachweis der modifizierten Nukleoside wurden HeLa Zellen in No/No-Medium kultiviert und diese über 72 h mit jeweils 250 µM der Nukleoside **19, 21, 25, 27, 29** und **VdU** inkubiert. Es folgte die Isolation der genomischen DNA und die anschließende Umsetzung mit Biotin-Tetrazin. Die aufgereinigte biotinylierte DNA wurde in verschiedenen Konzentrationen auf eine positiv geladene Nylonmembran punktförmig aufgetragen (engl.: *Dot Blot*). Durch die anschließende Belichtung unter UV-Licht (254 nm) wurde die DNA auf der Membran vernetzt und für die folgende Inkubation mit dem HRP-Streptavidin-Konjugat vorbereitet. Die Auswertung erfolgte über enzymatische Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats durch die HRP, welche über einen Luminisenzdetektor erfasst wurde. Der schematische Ablauf des *Dot Blot* ist in **Abbildung 28** dargestellt.

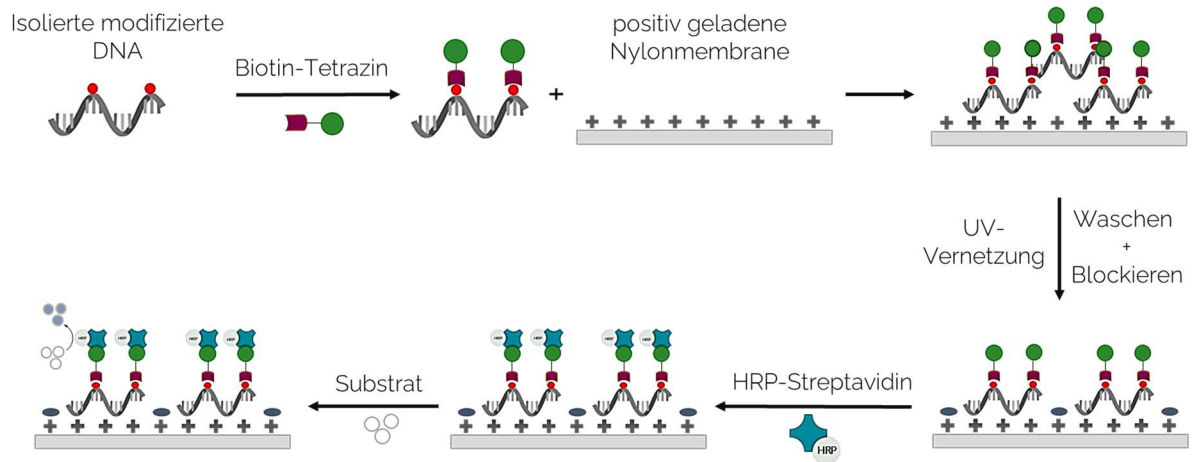


Abbildung 28: Schematischer Ablauf des *Dot Blots* zum Nachweis der inkorporierten modifizierten Nucleoside in genomische DNA. Die isolierte genomische DNA wird nach der Inkubation der Zellen mit den modifizierten Nucleosiden mit einem Biotin-Tetrazin in einer iEDDA-Reaktion *in vitro* umgesetzt. Diese biotinylierte DNA wurde anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen und nach der UV-Vernetzung mit Wasch- und Blockierschritten anschließend mit einem HRP-Streptavidin-Konjugat inkubiert. Die Detektion der modifizierten Nucleoside erfolgte in einem Lumineszenzdetektor durch die enzymatische Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats durch die HRP.

Als zusätzliche Kontrolle wurde die DNA auf der Membran anschließend durch eine Methyleneblau-Färbung (MeBl) nachgewiesen, um somit falsch positive Ergebnisse durch eventuelle Verunreinigungen auf der Membran auszuschließen. Als weitere Kontrolle wurde Wasser als Probe auf die Membran aufgetragen, um ebenfalls falsch positive Nachweise des Chemilumineszenzsignals auszuschließen. Die nachfolgende

Abbildung 29 zeigt den *Dot Blot* der Nucleoside **19**, **21**, **25**, **27** und **29**. Zusätzlich wurde **VdU** als Referenz mit in die Versuchsreihe aufgenommen, um die Ergebnisse im Anschluss besser bewerten zu können. Die Nucleoside sind in aufsteigender Reihenfolge nach ihrer Inkorporationsrate aufgeführt.

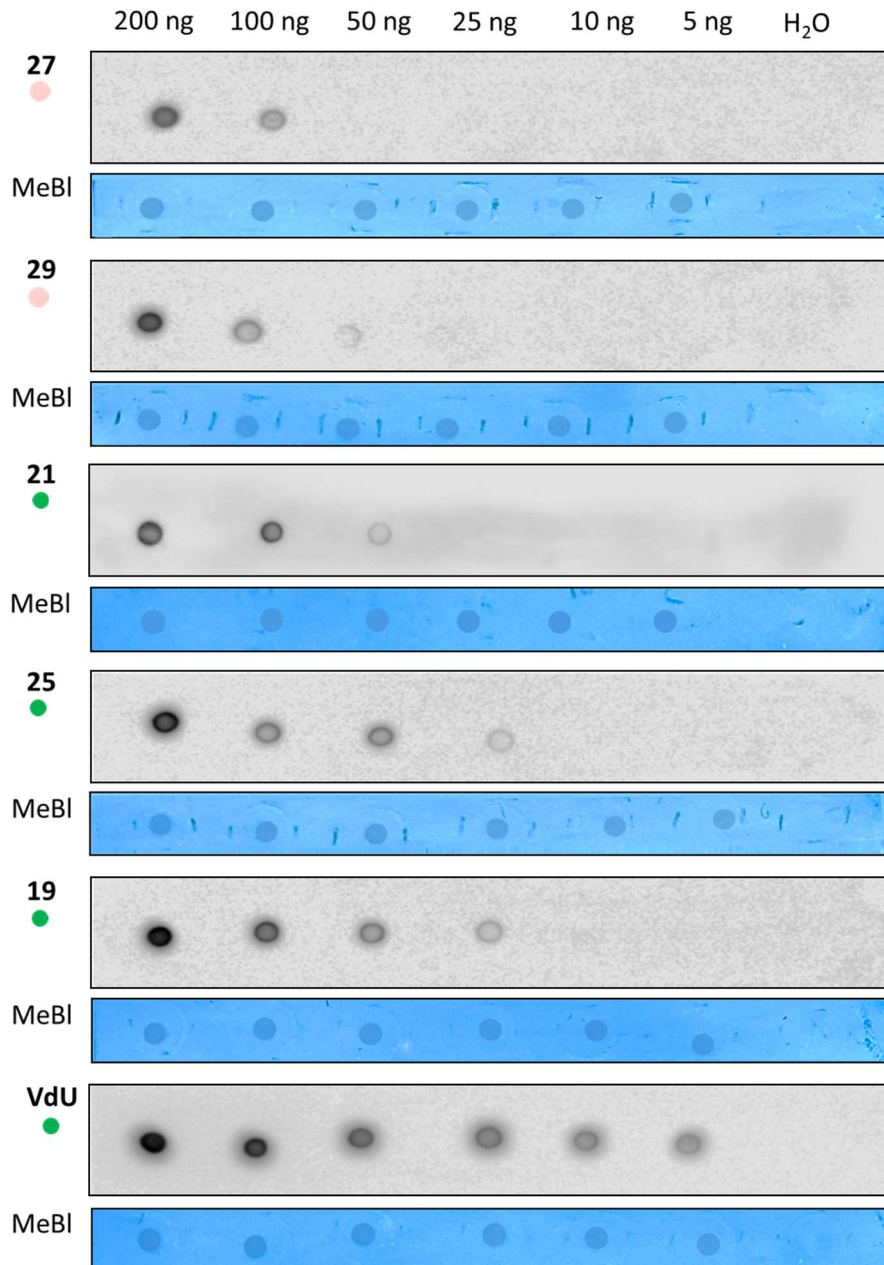


Abbildung 29: Dot Blot ausgewählter modifizierter Nucleoside mit Methylenblau-Färbung (MeBl) als Kontrolle. Die biotinylierte DNA wurde in den Konzentrationen von 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng und 5 ng aufgetragen. Zusätzlich wurde Wasser als Negativkontrolle aufgetragen. Die Auswertung erfolgte am Odyssey® XF Imaging System der Firma LI-Cor im Lumineszenzkanal. ● Norbornenmodifikation ● 1MCP-Modifikation ● "Vinyl"-Modifikation

Zunächst lässt sich durch den *Dot Blot* erkennen, dass bei allen Nucleosiden ein deutliches Signal im Lumineszenzkanal erhalten wurde und durch die mitgeführten Kontrollen ein falsch positives Ergebnis ausgeschlossen werden kann. Werden zunächst die beiden norbornenmodifizierten Nucleoside **29** und **31** betrachtet, so zeigen diese ein deutliches Signal bis zu einer Konzentration von 100 ng DNA, wobei

29 ein weiteres, aber deutlich schwächeres Signal für die Konzentration von 50 ng aufzeigt. Das „Vinyl“-modifizierte Nukleosid **21** zeigt bis zu einer Konzentration von 50 ng ein deutliches Lumineszenzsignal. Somit stellt **21** das am geringsten inkorporierte der drei „Vinyl“-modifizierten Nukleoside **19**, **21** und **VdU** dar. Eine nochmals gesteigerte Inkorporation in die genomische DNA zeigt das 1MCP-modifizierte Nukleosid **25**, welches bis zu einer Konzentration von 25 ng nachweisbar ist. Die zweithöchste Inkorporationsrate zeigt das „Vinyl“-modifizierte Nukleosid **19**, welches deutlich in einer Konzentration von 25 ng detektiert wurde und ein weiteres, schwaches Signal bei einer DNA Konzentration von 10 ng zeigt. Werden nun die Ergebnisse mit der Inkorporationsrate des **VdU** verglichen, welches bei 5 ng noch ein starkes Lumineszenzsignal erzielt, so wird deutlich, dass die modifizierten Nukleoside eine nur halb so große Inkorporationsrate in die genomische DNA aufweisen. Wird Nukleosid **29** mit der geringsten Inkorporationsrate **VdU** gegenübergestellt, welches die höchste Inkorporationsrate aufweist, so wird gleichzeitig die Modifikation mit dem sterisch anspruchsvollsten Dienophil mit der kleinstmöglichen Modifikation mit einem Dienophil verglichen. Daraus lässt sich eine deutliche Abhängigkeit der Inkorporationsrate von der sterischen Hinderung der Modifikation an einem Nukleosid ableiten. Je größer die sterische Hinderung der Modifikation, umso geringer ist die Inkorporationsrate in die genomische DNA. Somit steigt die Inkorporation ausgehend von den Norbornenen über das 1MCP bis hin zu den „Vinyl“-Funktionalitäten. Diese Tendenz lässt sich am plausibelsten durch die Akzeptanz der substratspezifischen NMP-Kinase begründen. Diese bietet zwar an der C5-Position einen Freiraum zum Einbringen von Modifikationen am Nukleosid, jedoch ist dieser durch die umliegende Struktur begrenzt, wodurch der räumliche Anspruch nicht beliebig ausgenutzt werden kann.

Über den HRP-Streptavidin *Dot Blot* mit biotinylierter DNA konnte eine zuverlässige und sensitive Methode zum semiquantitativen Nachweis der Inkorporation von modifizierten Nukleosiden erfolgen. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch sterisch gehinderte Dienophile, wie Norbornene und 1MCP, von den zelleigenen Enzymen als Substrate akzeptiert werden und somit in naszierende DNA im Zuge der metabolischen Markierung eingebaut werden. Es konnte zwar eine verringerte Inkorporationsrate im Vergleich zu **VdU** beobachtet werden, dennoch blieb der Nukleosidstoffwechselweg und die Viabilität weiterhin erhalten, sodass die Zellen in die S-Phase des Zellzyklus eintreten konnten und in diesem die Inkorporation der modifizierten Nukleoside erfolgte.

4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Durch die Ergebnisse, welche über den HRP-Streptavidin *Dot Blot* mit biotinylierter DNA erhalten wurden, sollte in einem weiterführenden Experiment der direkte Nachweis von inkorporierten, modifizierten Nukleosiden in Zellen erfolgen. Dafür sollten die Nukleoside in einer iEDDA-Reaktion über die tetrazinmodifizierten Farbstoffe markiert werden und über konfokale Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die dicht gepackte Chromatinstruktur des Zellkerns dar, weshalb häufig eine chemische Denaturierung der DNA vor Zugabe des Tetrazin-Farbstoffes erfolgt.^[140] Dadurch kann das Dienophil innerhalb der DNA-Struktur für den Reaktionspartner zwar zugänglich gemacht werden, jedoch wird dadurch auch die zelluläre Struktur zerstört. Bisher gelang es nur LUEDTKE *et al.* mit seiner **PINK**-Strategie inkorporiertes **VdU** bereits in lebenden Zellen über iEDDA-Reaktion nachzuweisen.^[145]

Mit den beiden tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen **34** und **35** sollte untersucht werden, ob eine Denaturierung der DNA umgangen werden kann, da diese eine gesteigerte DNA Affinität aufweisen.^[155] Zudem eignen sie sich als fluorogene Sonden besonders gut für die Detektion in der Fluoreszenzmikroskopie, da der ungebundene Farbstoff nur eine geringe Hintergrundfluoreszenz verursacht. In diesem Experiment sollte weiterhin untersucht werden, welcher der beiden Tetrazin-Farbstoffe **34** und **35** sich aufgrund seiner photophysikalischen Eigenschaften für die Anwendung in zellulärer Umgebung besser eignet, um die inkorporierten modifizierten Nukleoside nachzuweisen. Für die Untersuchung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden zunächst $2 \cdot 10^4$ HeLa Zellen, aus einer Kultur in *No/No*-Medium pro *Well* eines Ibidi μ *Slides* ausgesät und die Zellen für 24 h adhären lassen. Anschließend wurde, mit 250 μ M des jeweiligen modifizierten Nukleosids angereichertes Medium zugegeben und die Zellen darin für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nicht mit Nukleosid inkubiert wurden. Nach der metabolischen Markierung der DNA wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und für 24 h mit 20 μ M des jeweiligen Tetrazin-Farbstoffs bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Farbstoff erfolgte die Bildgebung der Zellen ohne Entfernung des ungebundenen Farbstoffs durch einen weiteren Waschschrift, am Konfokalmikroskop (**Kapitel 6.3.6**). In **Abbildung 30** sind die Aufnahmen der modifizierten Nukleoside **19**, **21**, **25**, **27** und **29** mit dem Tetrazin-Farbstoff **34** im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt.

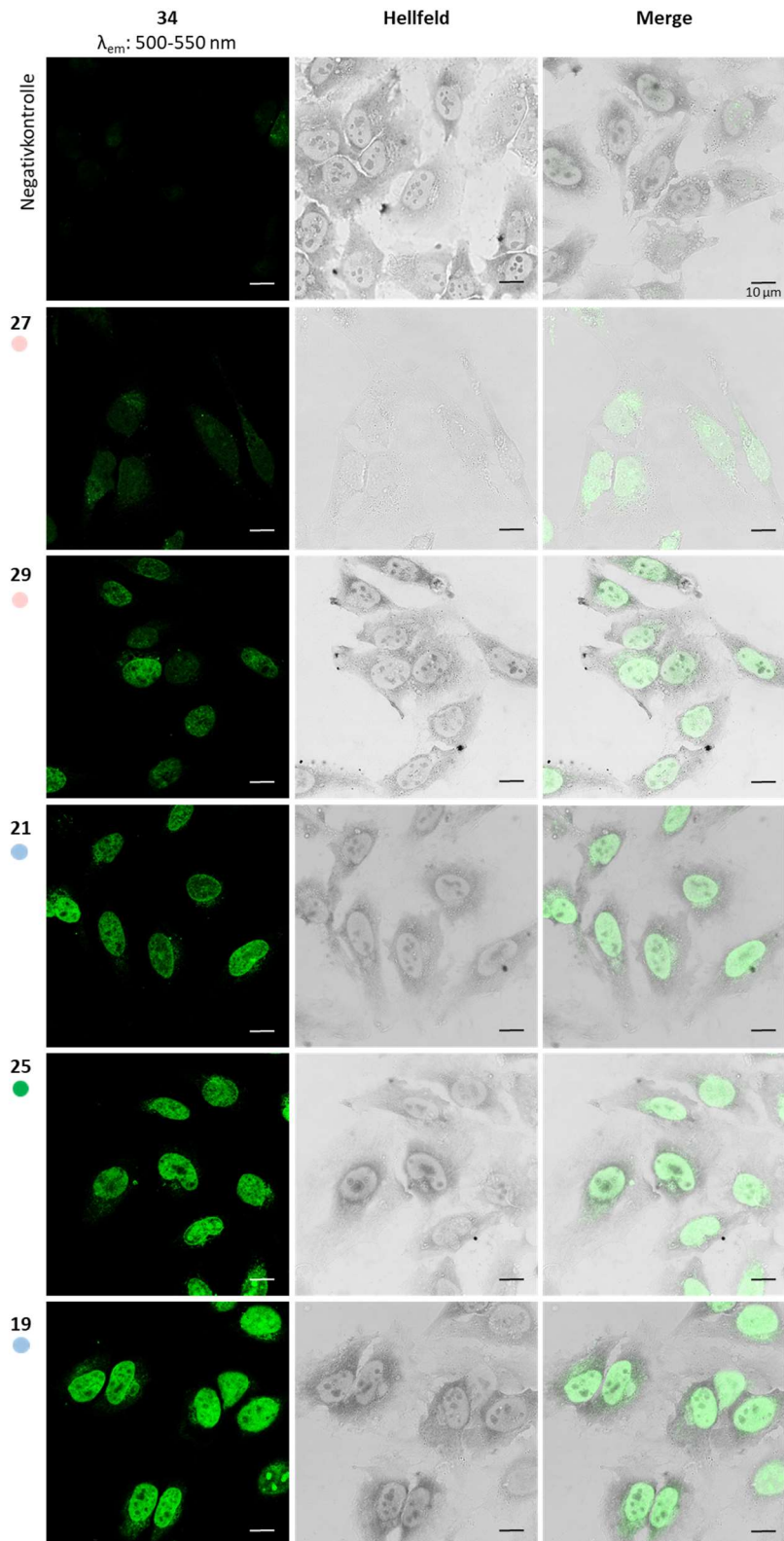


Abbildung 30: Nachweis der modifizierten Nucleoside **19**, **21**, **25**, **27** und **29** in zellulärer DNA über iEDDA-Reaktion mit Tetrazin-Farbstoff **34**. HeLa Zellen wurden mit 250 µM des jeweiligen Nucleosids in *No/No*-Medium für 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit PFA fixiert wurden, erfolgte die Zugabe von 20 µM Tetrazin-Farbstoff in Medium und Inkubation für 24 h bei 37 °C. Die Detektion erfolgte mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie LEICA TCS SP8. Objektiv ACS APO 63x/1.30 OIL. Laser 488 nm. Die Auswertung erfolgte durch die Leica LAS X Software im Maßstab von 10 µm. ● Norbornenmodifikation ● 1MCP-Modifikation ● "Vinyl"-Modifikation.

Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und einem Emissionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$. Die erhaltenen Aufnahmen zeigen für jede Probe ein spezifisches Fluoreszenzsignal im Zellkern. Die Anordnung der Zellbilder erfolgte aufsteigend nach der optischen Intensität des Fluoreszenzsignals. Dabei ist wichtig anzumerken, dass die dargestellten Abbildungen in ihrer Sättigung einheitlich angepasst wurden, um das schwache Fluoreszenzsignal zu verdeutlichen. Da die Negativkontrolle auch in der Bildbearbeitung exakt gleichbehandelt wurde, können falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Zudem wird ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensitäten mit den, über den *Dot Blot* erhaltene Einbauraten übereinstimmen. So zeigen die beiden norbornenmodifizierten Nukleoside das schwächste Fluoreszenzsignal, welches sich über das 1MCP-(**25**) bis hin zu den „Vinyl“-modifizierten Nukleosiden **19** und **21** steigert. Als zusätzliche Kontrolle erfolgte im Anschluss die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33342, was die intrazelluläre Lokalität des Fluoreszenzsignals der „Click“-Produkte im Zellkern bestätigt (**Abbildung A. 7**). Auch **VdU** wurde in diesem Zellexperiment untersucht und zeigte auch ohne eine Erhöhung der Farbsättigung ein starkes Fluoreszenzsignal im Zellkern, weshalb auf diese Anpassung zur besseren Abbildung verzichtet wurde (**Abbildung A. 7**). Somit korreliert die Intensität des Fluoreszenzsignals mit der Einbaurate der modifizierten Nukleoside, wobei sich durch die verwendeten Tetrazin-Farbstoffe eine ausreichende Sensitivität ergibt, um auch geringe Mengen an Nukleosid nachweisen zu können.

Da in den bisherigen Versuchen das *No/No*-Medium verwendet wurde, sollte eine gesteigerte Inkorporationsrate der modifizierten Nukleoside im Vergleich zur Verwendung des herkömmlichen DMEM vorliegen. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde ein Zellexperiment analog zu den vorherigen Bedingungen durchgeführt, jedoch unter Kultivierung der Zellen in herkömmlichen DMEM. Das Zellexperiment erfolgte exemplarisch für Nukleosid **19** und **VdU** mit den höchsten Inkorporationsraten und ist in **Abbildung 31** dargestellt.

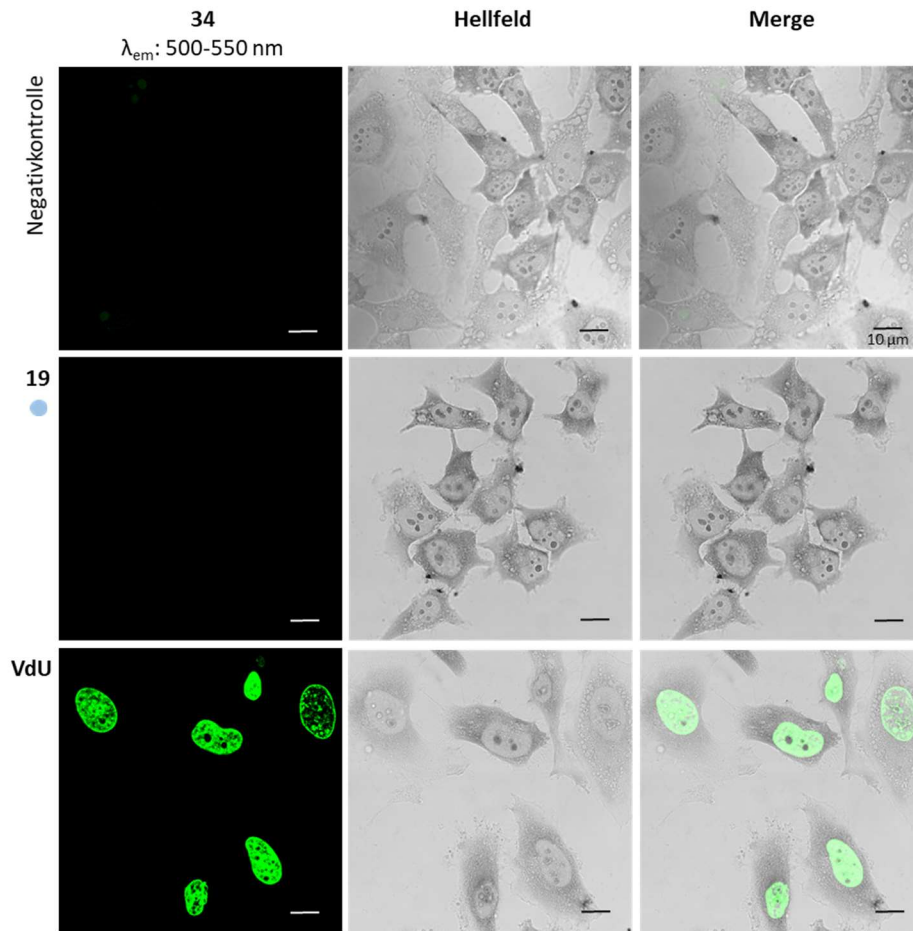


Abbildung 31: Vergleich des Zellkulturmediums für den Nachweis des „Vinyl“-modifizierten Nukleosids **19** und **VdU** über Farbstoffe **34** in zellulärer DNA. HeLa Zellen wurden mit 250 μM des jeweiligen Nukleosids in DMEM für 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit PFA fixiert wurden, erfolgte die Zugabe von 20 μM des Tetrazin-Farbstoffs **34** in Medium und Inkubation für 24 h bei 37 °C. Die Detektion erfolgte mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie LEICA TCS SP8. Objektiv ACS APO 63x/1.30 OIL. Laser 488 nm. Die Auswertung erfolgte durch die Leica LAS X Software im Maßstab von 10 μm .

Hierbei zeigte sich in der DMEM-Kultur ein deutlicher Unterschied zu den vorherigen Aufnahmen in *No/No*-Medium. Während bei der **VdU** Probe in DMEM ein ähnlich hohes Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Probe in *No/No*-Medium erzielt wird, so ist kein Fluoreszenzsignal für die Inkubation mit Nukleosid **19** detektierbar. Da es sich bei **VdU** um die kleinste mögliche Modifikation mit einem Dienophil an einem Nukleosid handelt, ist die Akzeptanz der endogenen Enzyme nicht ausschlaggebend beeinträchtigt und kann in herkömmlichen DMEM erfolgen. Somit konnte bestätigt werden, dass ein optimiertes Medium mit einer künstlichen Verknappung an natürlichen Nukleosiden zu einem verbesserten Einbau der sterisch gehinderten modifizierten Nukleoside führt. Diese Optimierung der Kultivierungsbedingungen ist ein wichtiger Parameter für die metabolische Markierung, da die modifizierten Nukleoside eine geringe Einbaurrate aufweisen und durch diese Veränderung ihr Nachweis in zellulärer Umgebung erst ermöglicht wurde.

Um zu untersuchen, welche photophysikalischen Eigenschaften für die Anwendung in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie besondere Relevanz haben, wurde im Vergleich zu **34** der Tetrazin-Farbstoff **35** für dieselben Experimente herangezogen. In vorherigen Untersuchungen zeigten beide Farbstoffe ähnliche Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die getesteten Nucleoside. Allerdings liegen bei **34** höhere *Turn-On* Werte vor, wohingegen **35** eine höhere Stokes-Verschiebung aufweist. Da beide dieser Faktoren wichtige Kriterien für den Erfolg eines bildgebenden Zellexperimentes darstellen, konnte zuvor keine Aussage über die bevorzugte Anwendung gestellt werden. Der Vergleich der beiden Tetrazin-Farbstoffe ist in **Abbildung 32** exemplarisch für das modifizierte Nucleosid **21** und **VdU** dargestellt.

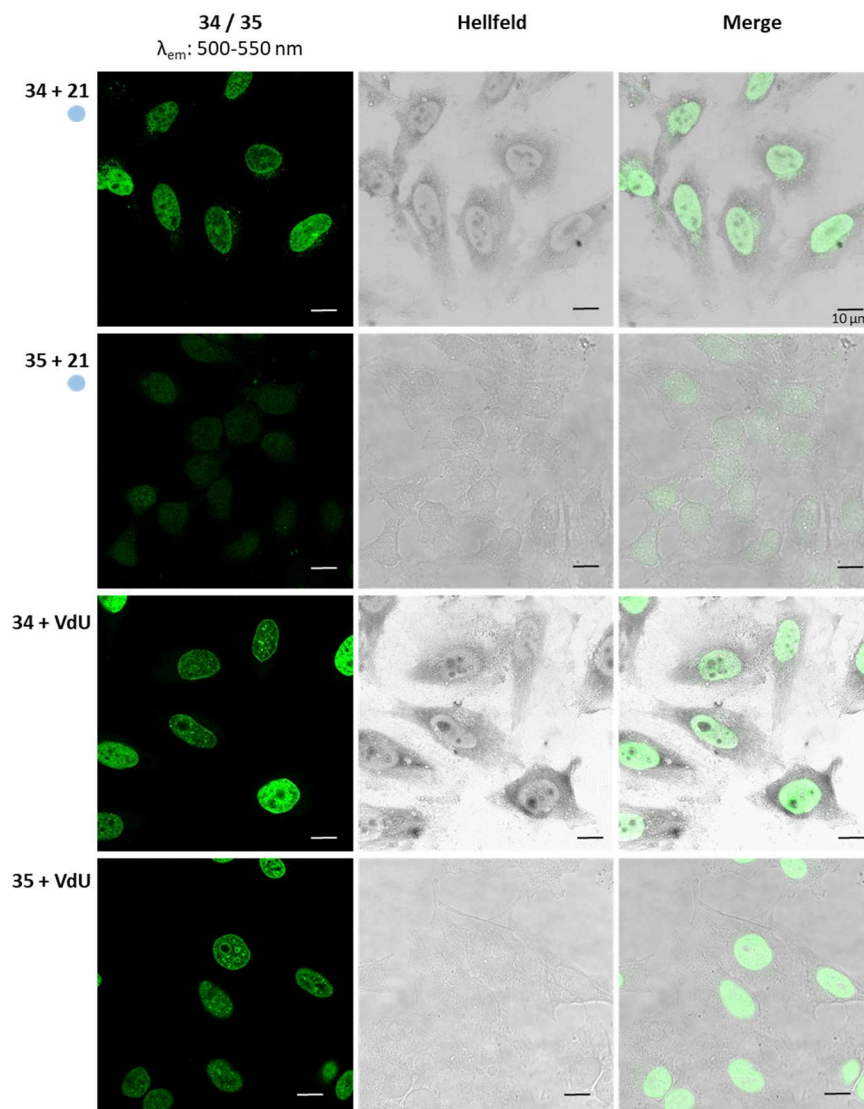


Abbildung 32: Vergleich der beiden tetrazinmodifizierten Farbstoffe **34** und **35** zum Nachweis der modifizierten Nucleoside **21** und **VdU** in zellulärer DNA. HeLa Zellen wurden mit 250 µM des jeweiligen Nucleosids in *No/No*-Medium für 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit PFA fixiert wurden, erfolgte die Zugabe von 20 µM des jeweiligen Tetrazin-Farbstoffs in Medium und Inkubation für 24 h bei 37 °C. Die Detektion erfolgte mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie LEICA TCS SP8. Objektiv ACS APO 63x/1.30 OIL. Laser 488 nm. Die Auswertung erfolgte durch die Leica LAS X Software im Maßstab von 10 µm.

Während sich bei **VdU** kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität darstellen lässt, so zeigt das „Vinyl“-modifizierte Nucleosid **21** eine deutliche Verringerung der Signalintensität für die Reaktion mit Tetrazin-Farbstoff **35**. Daraus lässt sich schließen, dass die höheren *Turn-On* Werte von **34** bei einer geringen Inkorporation des Nucleosids von Vorteil gegenüber der größeren Stokes-Verschiebung von **35** ist. Durch die Erhöhung der Fluoreszenzintensität wird die Nachweismethode deutlich sensitiver und ist somit für die Anwendung in dieser Arbeit besser geeignet.

Da die erhaltenen Fluoreszenzsignale den Ergebnissen des *Dot Blots* entsprechen, wurden die beiden optimierten Nucleoside **23** und **31** direkt in einem Zellexperiment mit dem Tetrazin-Farbstoff **34** analysiert (**Abbildung 33**).

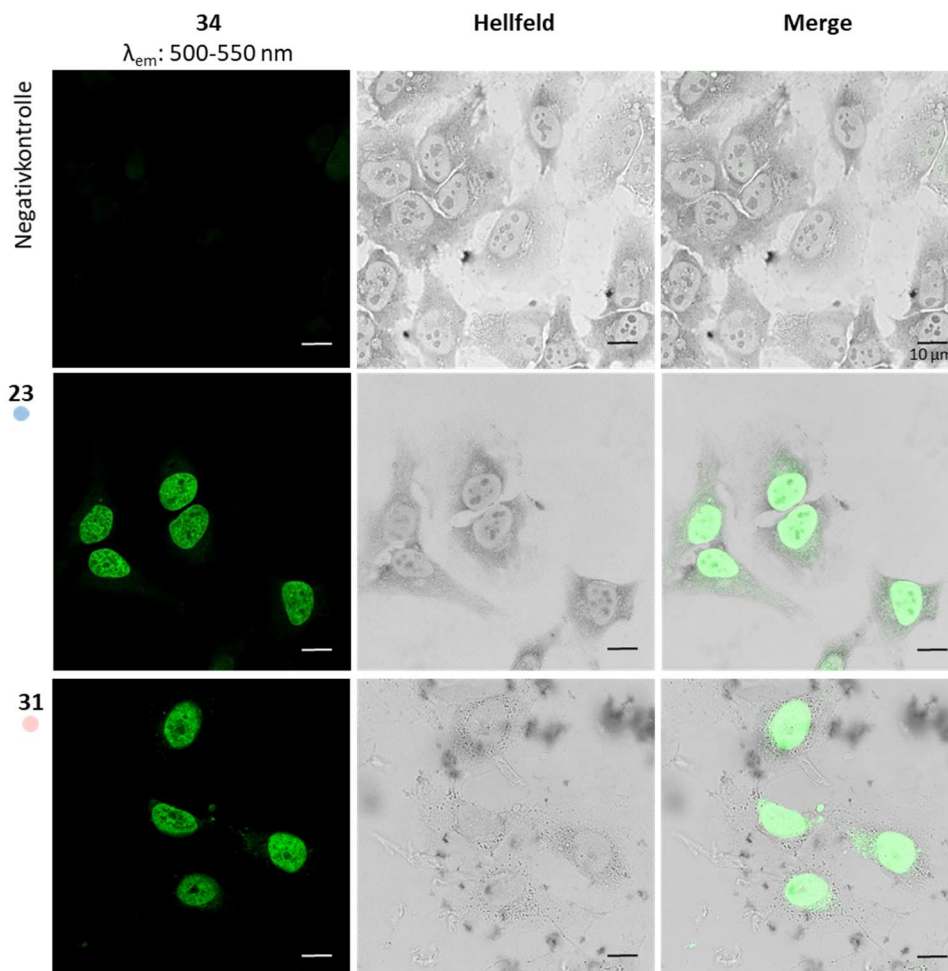


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der modifizierten Nucleoside **23** und **31** in zellulärer DNA nach iEDDA-Reaktion mit Tetrazin-Farbstoff **34**. HeLa Zellen wurden mit 250 µM des jeweiligen Nucleosids in *No/No*-Medium für 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit PFA fixiert wurden, erfolgte die Zugabe von 20 µM Tetrazin-Farbstoff in Medium und Inkubation für 24 h bei 37 °C. Die Detektion erfolgte mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie LEICA TCS SP8. Objektiv ACS APO 63x/1.30 OIL. Laser 488 nm. Die Auswertung erfolgte durch die Leica LAS X Software im Maßstab von 10 µm. ● Norbornenmodifikation ● „Vinyl“-Modifikation.

Auch für diese Nucleoside zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ein deutliches und spezifisches Fluoreszenzsignal im Zellkern. Ebenfalls wurde hier zur Bestätigung der Lokalisierung des Signals eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342 durchgeführt, wodurch die spezifische Darstellung der „Click“-Produkte im Zellkern bestätigt wurde (**Abbildung A. 7**). Bei einer gleichen Einstellung der Farbsättigung konnte mit den beiden optimierten Nucleosiden gegenüber **19** und **29** ein stärkeres Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Die nächstliegende Vermutung für diese Beobachtung liegt in den höheren *Turn-On* Werten der Reaktionen von **23** und **31**. Während diese für die optimierten Nucleoside **23** und **31** Raten von 3 und 15 aufweisen, liegen bei den Nucleosiden **19** und **29** Werte von 48 und 22 vor. So wird deutlich, dass in diesem Experiment ein höherer *Turn-On* nicht unmittelbar zu einer verbesserten Detektion des Fluoreszenzsignals führt. Nucleosid **23** weist in diesem Vergleich den geringsten *Turn-On* auf, erzielt aber die besten Ergebnisse in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung. Auch die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieses Zellexperiments. Die beiden norbornenmodifizierten Nucleoside **29** und **31** sind die deutlich reaktivsten Dienophile in dieser Testreihe. Dennoch zeigten die mit den entsprechenden Nucleosiden behandelten Zellen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den Nucleosiden **19**, **21**, **25** und **27** mit den vermeintlich schlechteren Werten. Dies zeigt sich auch im Vergleich der optimierten Nucleoside **23** und **31** deren Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten sich mit $k_2 \sim 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_2 \sim 180 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ signifikant unterscheiden. Jedoch zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kaum Unterschiede in der Ausprägung des detektierten Signals. Um die unterschiedlichen Intensitäten der erhaltenen Fluoreszenzsignale zu erklären, kann stattdessen die unterschiedliche Struktur der Linker-Systeme herangezogen werden. Naheliegend ist eine gesteigerte Akzeptanz des optimierten Linker-System der modifizierten Nucleoside im Nucleosidstoffwechselweg, wodurch **23** und **31** eine höhere Einbaurate in naszierende DNA erzielen. Durch die Verkürzung des Linkers um eine CH_2 -Gruppe und die verringerte Flexibilität durch das konjugierte System könnten sich die Nucleoside möglicherweise besser in den freien Raum der Kinase anpassen. Aufgrund dessen kann ein stärkeres Fluoreszenzsignal erreicht werden, da mehr fluoreszierende „Click“-Produkte in der zellulären DNA vorliegen. Da die zuvor erhaltenen Ergebnisse aufzeigten, dass die Norbornenmodifikationen eine geringere Einbaurate aufweisen als das 1MCP- und die „Vinyl“-modifizierten Nucleoside, kann auch im Fall der optimierten Nucleoside davon ausgegangen werden, dass das norbornenmodifizierte Nucleosid **31** weiterhin eine geringere Einbaurate zu dem „Vinyl“-modifizierten Nucleosid **23** aufweist. Daraus resultierend wäre wiederum eine geringere Fluoreszenzintensität der entsprechend behandelten Zellen mit **31** im Vergleich zu **23** zu erwarten gewesen. Allerdings konnten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen keinen signifikanten Unterschied dieser beiden Nucleoside in der Intensität ihres Fluoreszenzsignals aufzeigen. Somit ist in diesem Fall der Ausgleich des deutlich höheren *Turn-On* Werts von **31** im

Vergleich zu **23** in Kombination mit einer geringeren Einbaurrate von **31** plausibel, um ein optisch nicht unterscheidbares Fluoreszenzsignal zu erhalten.

Durch diese Zelleexperimente konnte gezeigt werden, dass der Nachweis modifizierte Nukleoside, welche über die metabolische Markierung in DNA eingebaut werden, besonders von der Inkorporationsrate abhängig ist. Durch den hier dargestellten Vergleich konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Einbaurrate in die genomische DNA sich nur durch einen im Vergleich stark erhöhten *Turn-On* kompensierend auf die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals auswirkt. Somit überwiegt der Einfluss der Inkorporationsrate gegenüber den photophysikalischen Eigenschaften der „Click“-Produkte auf die bildgebenden Ergebnisse am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

5. Zusammenfassung uns Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben eine klare Korrelation zwischen einer effizienten metabolischen Markierung von naszierender DNA mit der Struktur entsprechend modifizierter Nucleoside und ihrer Größe sowie die einhergehenden sterischen Hinderungen der Dienophile aufgezeigt.

Durch die Synthese einer modular aufgebauten Nucleosid-Bibliothek (**Abbildung 34**) konnten die Inkorporationsraten sowie die Reaktivität in einer iEDDA-Reaktion mit tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen in Abhängigkeit des Dienophils und der Linker-Struktur, über welche diese an das 2'-Desoxyuridin gebunden sind, untersucht werden.

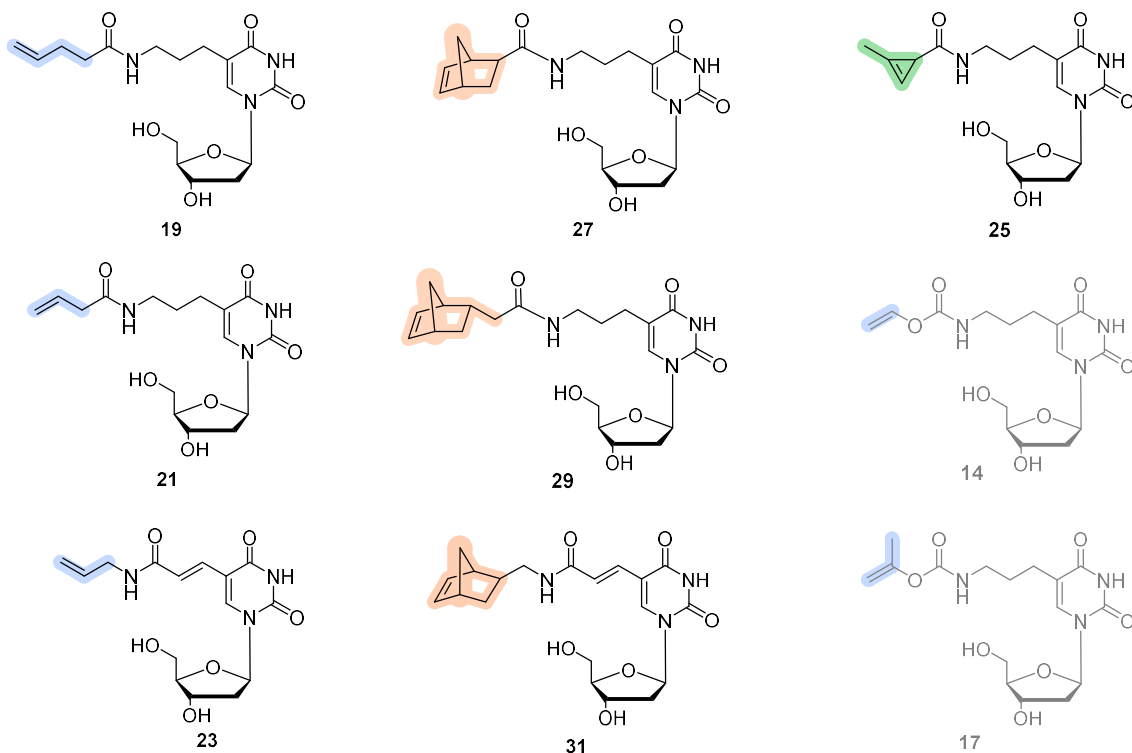


Abbildung 34: Bibliothek der modifizierten Nucleoside welche in einer iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen zu den entsprechenden „Click“-Produkten umgesetzt wurden. Die „Vinyl“-modifizierten Nucleoside **19** und **21**, das 1MCP-modifizierte Nucleosid **25**, sowie die norbornenmodifizierten Nucleoside **27**, **29**. Das „Vinyl“- und norbornenmodifizierte Nucleosid **23** und **31** beinhalten ein optimiertes Linker-System mit einer umgekehrten Position der Peptidbindung und die Verringerung um eine CH_2 -Gruppe im Vergleich zu den vorherigen Nucleosiden.

Die über Fluoreszenzspektroskopie bestimmten Geschwindigkeitskonstanten liegen für die modifizierten Nucleoside in einem Bereich von 1 bis $0,01 \cdot 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dabei zeigten sich die norbornenmodifizierten Nucleoside (**27**, **29** und **31**) als reaktivstes Dienophil gegenüber dem 1MCP- (**25**) und den „Vinyl“-Modifikationen (**19**, **21** und **23**) in der Reaktion mit den Tetrazin-Farbstoffen **34**

und **35**. Der zusätzliche Einfluss auf die Reaktivität durch die verwendete Linker-Struktur zeigte sich zunächst in der fehlenden Reaktion mit dem reaktiven **pyTz** und den vinylmodifizierten Nucleosiden **14** und **17**, welche über eine Carbamatbindung an das Nucleosid eingebracht sind. Weiterhin konnte eine deutliche Steigerung der Reaktivität der norbornenmodifizierten Nucleoside über eine veränderte Linker-Struktur von **31** gegenüber **29** gezeigt werden. Dabei ist bei **31** die Position der Peptidbindung im Vergleich zu **29** umgekehrt, was zu einer erhöhten Elektronendichte am Dienophil und somit zu einer gesteigerten Reaktivität führt. Zusätzlich erzielt die konjugierte Doppelbindung des Linker-Systems eingeschränkte Freiheitsgrade, was eine erhöhte Affinität in einer iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen bewirkt und die Reaktivität darüber weiter optimiert. Dieser aktivierende Effekt zeigte sich bei dem „Vinyl“-modifizierten Nucleosid **23**, welches ebenfalls über den optimierten Linker verbunden wurde nicht so ausgeprägt. Hierbei konnten nur in der Reaktion mit dem Tetrazin-Farbstoff **35** eine gering gesteigerte Reaktivität gegenüber dem Nucleosid **19** erzielt werden. Dies verdeutlicht die Auswirkungen einer präzise koordinierten Kombination von Dienophilen und Tetrazinen, um das Potential in einer iEDDA-Reaktion vollständig ausschöpfen zu können. Zur Einbringung einer Modifikation an Nucleosiden kann über ein passendes Linker-System die Reaktivität und die Eigenschaften des „Click“-Produktes weiter optimiert werden und so zu verbesserten Anwendung von iEDDA-Reaktionen in biologischen Systemen beitragen. Tetrazin **34** erzielte die besseren *Turn-On* Werte, wohingegen **35** die größere *Stokes*-Verschiebung aufweist. Die Analyse der iEDDA-Reaktionen *in vitro* mit den modifizierten Nucleosiden und den Tetrazin-Farbstoffen konnte wichtige Ergebnisse erzielen, um den Einsatz in einem biologischen System abzuschätzen.

Für den Einsatz der modifizierten Nucleoside zur metabolischen Markierung von DNA konnte zunächst deren zytotoxische Wirkung in einer definierten Konzentration ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte die Inkorporation der Nucleoside durch ein optimiertes Kulturmedium gesteigert werden. Dies wurde durch die Kultivierung der HeLa Zellen in *No/No*-Medium, welches keine natürlichen Nucleoside sowie L-Glutamin enthält erreicht. Somit lag eine geringere Konkurrenzsituation der modifizierten Nucleoside mit den natürlichen Bausteinen der DNA vor, wodurch die Inkorporation positiv beeinflusst werden konnte. Der Nachweis, dass die modifizierten Nucleoside **19**, **21**, **25**, **27** und **29** über die metabolische Markierung in naszierende DNA eingebaut werden, konnte semi-quantitativ über einen HRP-Straptavidin-*Dot Blot* gezeigt werden. Bei diesem Experiment steht vor allem die Akzeptanz der modifizierten Nucleoside gegenüber den endogenen Enzymen im Fokus. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen der relativen Einbaurate und der sterischen Hinderung des eingebrachten Dienophils. Somit zeigen die norbornenmodifizierten Nucleoside **27** und **29** die geringste Einbaurate, während diese sich über das 1MCP-modifizierte (**25**) bis hin zu den „Vinyl“-modifizierten Nucleosiden **19** und **21** weiter steigert. Dennoch wurde deutlich, dass solch große Modifikationen wie Norbornene

und Cyclopropene von den endogenen Enzymen des Nucleosidstoffwechselweges weiterhin als Substrate akzeptiert und umgesetzt werden können.

Darüber hinaus konnten die modifizierten Nucleoside **19**, **21**, **23**, **25**, **27**, **29** und **31** nach der Reaktion mit den beiden Tetrazin-Farbstoffen **33** und **34** in fixierten Zellen über konfokale Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Dieser Nachweis auf qualitativer Ebene spiegelte die Inkorporationsraten des *Dot Blots* anhand der detektierten Fluoreszenzintensität wieder. Das 1MCP-modifizierte Nucleosid **25** stellt somit einen guten Kompromiss zwischen einer erhöhten Reaktivität gegenüber „Vinyl“-Modifikationen (**19**, **21** und **23**), welche auch bisher zur Anwendung *in vivo* ausschließlich eingesetzt wurden (**VdU**, **VTdT**) und einer verbesserten Einbaurrate gegenüber norbornenmodifizierten Nucleosiden (**27**, **29** und **31**) dar (**Abbildung 35**). Dennoch konnte mit dem optimierten und äußerst reaktiven norbornenmodifizierten Nucleosid **31** in der Bildgebung über einen ausgleichend hohen *Turn-On* Wert ebenso starke Fluoreszenzsignale detektiert werden wie im Vergleich mit dem „Vinyl“-modifizierten Nucleosid **23**, welches über eine deutlich höhere Inkorporationsrate verfügen sollte. Auch die einfache Synthese und die kommerzielle Verfügbarkeit der Norbornene im Vergleich zu 1MCP lässt ebenso Nucleosid **31** als ein äußerst potentielles Nucleosid zur metabolischen Markierung von DNA hervortreten.

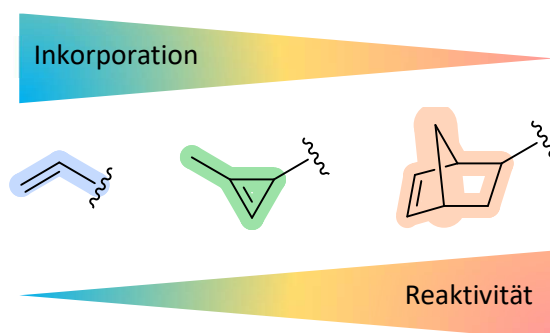


Abbildung 35: Korrelation der Effizienz zur metabolischen Markierung von DNA *via* iEDDA-Reaktion und der Reaktivität von Nucleosiden welche mit „Vinyl“-Gruppen, 1MCP oder Norbornenen modifiziert wurden.

Weiterhin ist hervorzuheben, dass der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der iEDDA-Reaktion in fixierten Zellen ohne eine vorherige Denaturierung der DNA erfolgen konnte. Als entscheidender Faktor für das Zustandekommen einer iEDDA-Reaktion in der dicht gepackten Chromatinstruktur ist die Zugänglichkeit der beiden Reaktionspartner, welche durch die DNA-affinen Tetrazin-Farbstoffe ermöglicht wurde.

Diese Arbeit eröffnet neue Möglichkeiten die Vielfalt an modifizierten Nucleosiden für die metabolische Markierung sowohl von DNA als auch von RNA weiter auszubauen. Vor allem in Hinsicht auf die Reaktivität der inkorporierten Nucleoside bieten diese ein erhöhtes Potential hochdynamische

Prozesse in zellulärer Umgebung über die Bildgebung erforschen zu können. Durch optimierte photophysikalische Eigenschaften der „Click“-Produkte kann die geringere Inkorporationsrate ausgeglichen werden und unter Verwendung DNA-affiner oder interkalierender Tetrazin-Farbstoffe kann eine iEDDA-Reaktion in der dicht gepackten, nativen Chromatinstruktur erreicht werden.

6. Experimentalteil

6.1 Präparatives Arbeiten

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, ALFAR AESAR, CARL ROTH, JENA BIOSCIENCE, SIGMA ALDRICH, TCI, THERMOFISHER und VWR bezogen. Soweit nicht anders beschrieben wird, wurden diese ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel waren mindestens in der Qualitätsstufe „*pro analysis*“ (p.a.). Trockene Lösungsmittel wurden dabei von ACROS ORGANIC bezogen und über Molekularsieb sowie unter Argonatmosphäre gelagert. Technische Lösungsmittel für die säulenchromatographische Aufarbeitung wurden bei 40 °C und den folgenden Drücken vordestilliert:

- Dichlormethan p = 850 mbar
- Cyclohexan p = 235 mbar
- n-Hexan p = 325 mbar

Für die Analyse an der HPLC wurden hochreine Lösungsmittel (HPLC *grade*) sowie doppelt entionisiertes Wasser aus einer MERCK *Milli-Q Direct 8* Entsalzungsanlage verwendet. Deuterierte Lösungsmittel wurden von EURISOTOP bezogen.

Allgemeine chemische Synthese

Bei Reaktionen die luft- und wasserempfindlich sind, wurden die verwendeten Glasgeräte zuvor nach standardisierter Schlenk-Technik präpariert. Dazu wurden sie mehrfach im Hochvakuum mit einer Heißluftpistole ausgeheizt und nach Abkühlen mit Argon (5.0, 99.999 % rein) geflutet. Feststoffe wurden im Argongegenstrom zugegeben, Flüssigkeiten und Lösungsmittel wurden mittels Kunststoffspritzen und Teflonkanülen zugesetzt. Reaktionen bei 0 °C wurden auf einem Eis-/Wasserbad durchgeführt. Tiefere Temperaturen wurden mit der Kältemischung von Trockeneis in Isopropanol (-78 °C) erreicht.

6.2 Analytische Methoden und Geräte

Chromatographie

- **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Zur Reaktionskontrolle wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminium-Platten der Firma MERCK verwendet (60 F₂₅₄ Kieselgel, Schichtdicke 0,25 mm). Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm (Fluoreszenzlöschung) oder 366 nm (Fluoreszenzanregung). Zur chemischen Auswertung wurden verschiedene Färbelösungen verwendet, in welche die DC-Platten eingetaucht und anschließend durch Erhitzen visualisiert wurden.

- 5 % H₂SO₄ in Methanol
- Kaliumpermanganat-Lösung (1,0 g KMnO₄, 2,5 g K₂CO₃, 0,1 g NaOH, 100 mL H₂O)
- Ninhydrin-Lösung (3,0 g Ninhydrin in 200 mL EtOH)

- **Flash-Säulenchromatographie (FC)**

Für die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel mit einer Porengröße von 60 Å und einer Partikelgröße von 40 – 60 µm der Firma SIGMA ALDRICH verwendet. Die Säule wurde nass gepackt und das zu reinigende Rohprodukt entweder im Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert und trocken aufgetragen. Anschließend wurde das Rohprodukt mit Seesand (reinst, mit HCl gereinigt) der Firma BERND KRAFT bedeckt. Der nötige Überdruck wurde mit einer Handpumpe erzeugt.

Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytische Auftrennung der Proben erfolgte an einem *UltiMate 3000* HPLC-System (*Dionex* mit Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS Fluoreszenzdetektor, Fraktionssammler) der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC unter Verwendung der Software *Chromeleon 7*. Die chromatographische Trennung erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung einer C₁₈-Trennsäule als stationäre Phase und einer Flussrate von 1,0 mL/min. Als mobile Phase wurde ein Lösungsmittelgradient aus Acetonitril und bidestilliertem Wasser verwendet. Das Injektionsvolumen der Probe betrug dabei 10 µL. Die verwendete Trennmethode ist in **Tabelle 3** dargestellt. Die Detektion erfolgt über einen UV-Diodenarray-Detektor in einem Spektralbereich von $\lambda = 200 - 600$ nm.

Tabelle 3: Verwendeter Gradient zur analytischen Auftrennung mittels HPLC.

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0	100	0
30	70	30
40	70	30
40,01	10	90
50	100	0
60	100	0

NMR-Spektroskopie

Die Analysen der Kernspinresonanz wurden an einem BRUKER *Avance 400* (400 MHz ^1H -NMR, 101 MHz ^{13}C -NMR) unter der Verwendung der *Software MestReNova* durchgeführt. Hierfür wurden ca. 5 - 10 mg der Substanz in 0,5 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in ein Probenröhrchen ($\varnothing = 5$ mm) überführt. Die chemische Verschiebung δ wurde in *parts per million* (ppm) angegeben und auf Tetramethylsilan (TMS) als Nullpunkt referenziert. Zur Kalibrierung wurden die Signale der unvollständig deuterierten Lösungsmittel verwendet:

- o CDCl_3 ^1H -NMR: d = 7,26 ppm ^{13}C -NMR: d = 77,16 ppm
- o DMSO-d_6 ^1H -NMR: d = 2,50 ppm ^{13}C -NMR: d = 39,52 ppm
- o $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ^1H -NMR: d = 3,31 ppm ^{13}C -NMR: d = 49,00 ppm

Signale von Lösungsmittelresten wurden mit einer von FULMER et al.^[177] erstellten Tabelle identifiziert. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben und die Multiplizitäten wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), t (Triplet), dt (Dublett von Triplet), ddd (Dublett von Dublett von Dublett), m (Multiplet).

Massenspektrometrie (MS)

Die massenspektrometrischen Messungen wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie (IOC) durchgeführt. Für die Elektronensprayionisation (ESI) wurden eine *Q Exactive Orbitrap* sowie eine *LTQ Orbitrap XL* von THERMO FISHER SCIENTIFIC verwendet. Der Molekülionenpeak sowie charakteristische Fragmentierungspeaks wurden über das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) charakterisiert. Die Auswertung erfolgte durch die Software *Xcalibur*.

Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS)

Die LC/MS-Messungen wurden ebenfalls von der analytischen Abteilung des IOC durchgeführt. Die Proben wurden dabei über eine analytische C₁₈-Trennsäule mit einem Lösungsmittelgradient aus Acetonitril und bidestilliertem Wasser (siehe **Tabelle 3**) aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch über die ESI charakterisiert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der isolierten DNA in wässriger Lösung wurden an einem *ND-100 Spectrophotometer* der Firma NANODROP™ durchgeführt. Hierfür wurde im Modus *Nucleic Acid* die Absorption bei 260 nm gemessen. Hierfür wurde ein Probenvolumen von 1 µL verwendet und die Berechnung der Konzentration erfolgte unter Verwendung des LAMBERT-BEER-Gesetzes.

6.2.1 *In vitro* „Click“-Experimente

HPLC-Analytik der „Click“-Reaktion zwischen modifizierten Nukleosiden und Tetrazinen

Die Analyse der „Click“-Experimente über die HPLC erfolgte zwischen den Nukleosiden **14**, **17**, **25**, **27** und **29** und den Tetrazinen **32**, **33** sowie **pyTz**. Dafür wurde aus den jeweiligen Stammlösungen (1 M Nukleosid in DMSO, 25 mM Tetrazin in DMSO) die benötigten Volumina entnommen, um die in **Tabelle 4** angegebenen Konzentrationen zu erhalten. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in Wasser, welches im Reaktionsgefäß vorgelegt wurde. Nach Zugabe des Nukleosids wurde das Tetrazin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Nachweis entstandener „Click“-Produkte erfolgte durch Auftrennung mittels Reverse-Phase-HPLC und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung (ESI-MS). Die für die Auftrennung mittels HPLC verwendete Trennmethode ist unter **Kapitel 6.2** in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 4: Entnommene Volumina und Endkonzentrationen der Reaktionspartner in den „Click“-Ansätzen.

	V _{Nukleosid} [µL]	C _{Nukleosid} [mM]	V _{Tetrazin} [µL]	C _{Tetrazin} [mM]	V _{H₂O} [µL]
„Click“-Ansatz	0,50	1,00	48,0	2,40	451,5

HPLC-Analyse zur Bestimmung der Reaktionskinetik

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit über die HPLC wurde die Reaktion von Nukleosid **25** mit **pyTz** analysiert. Dazu wurde ein Reaktionsansatz mit 0,5 mM **25** und 0,1 mM **pyTz** in PBS^{-/-} mit einem Endvolumen von 500 µL angesetzt. Die entsprechenden Volumina wurden dabei aus einer 1 M Stammlösung des Nukleosids sowie aus einer 25 mM Stammlösung des **pyTz** in DMSO entnommen. PBS^{-/-} und Nukleosid wurden im Reaktionsgefäß vorgelegt und nach Zugabe des **pyTz** erfolgte der sofortige Start eines HPLC Analysenlauf nach der Trennmethode in **Tabelle 3**. Der Reaktionsansatz wurde bei RT inkubiert, wobei jede Stunde ein Probevolumen von 10 µL in die HPLC injiziert wurde. Ab Stunde 5 wurde der Zeitabstand auf 5 Stunden vergrößert, wobei die letzte Messung nach 15 Stunden erfolgte.

Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der Reaktionskinetik über *Turn-On* Effekt

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte an einem Fluoromax-4 Spektrofluorometer der Firma HORIBA-SCIENTIFIC mit einem Peltier-Element zur Temperaturregelung. Eine Korrektur der Messungen erfolgte gegen die Raman-Streuung des jeweiligen Lösungsmittels. Es wurden Spektrophotometer Küvetten aus Quarz der Firma STARNA GmbH mit einer Schichtdicke von 10 mm und einem Probenvolumen von 1,00 mL verwendet. Es wurden folgende Parameter für die Messungen verwendet:

- Schrittweite (*Increments*): 1.0 nm
- Inkrementzeit: 0.2 s
- Integrationszeit: 0.1 s
- Spaltbreiten: 3 nm bzw. 5 nm sowie 2,5 bzw. 4 nm
- Temperatur: 20 °C
- λ_{ex} : 424 nm bzw. 437 nm
- λ_{em} : 439 bzw. 452 nm bis 800 nm

Für die spektroskopische Verfolgung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität im Verlauf der „Click“-Reaktion wurde aus einer 20 mM Stammlösung der Nukleoside in DMSO sowie aus einer 4 mM Stammlösung der Tetrazin-Farbstoffe in DMSO ein Reaktionsansatz erstellt. Dafür wurden jeweils 5,00 µL der Stammlösungen mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 1,00 mL eingestellt. Somit ergab sich im „Click“-Ansatz eine Konzentration von 100 µM Nukleosid zu 20 µM Tetrazin-Farbstoff in H₂O/DMSO mit 99:1. Als t₀ Messung wurden 5,00 µL der Tetrazin-Farbstoff Stammlösung mit 5,00 µL DMSO in ddH₂O auf ein Endvolumen von 1,00 mL eingestellt. Eine Übersicht des Ansatzprotokolls ist in **Tabelle 5** aufgeführt. Zur Korrektur der Messwerte erfolgten die Messungen gegen einen Blindwert

(*Blank*). Die Anregung erfolgte bei 424 nm für den tetrazinmodifizierten Cyanyn-Syryl Farbstoff **35** (Spaltbreite 5 nm, bzw 4 nm) und 437 nm für **34** (Spaltbreite 3 nm, bzw. 2,5 nm).

Für die Nucleoside **19**, **21**, **23** und **25** wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen sowie ein letztes an Tag 7 (Slit: 3 nm für **34**, 5 nm für **35**). Die Korrektur der Messwerte erfolgte durch den *Blank_{click}*, der nur das Nucleosid und DMSO enthält und welcher täglich vor der Messreihe gemessen wurde. Für Nucleosid **29** wurde über einen Zeitraum von 7,5 h die Fluoreszenzintensität in einem Zeitintervall von 30 min gemessen sowie einer finalen Messung nach 24 h (Slit: 3 nm für **34**, 5 nm für **35**). Für Nucleosid **31** wurde die Messzeit auf 3 h mit einem Zeitintervall von 10 min verkürzt und ebenfalls eine abschließende Messung nach 24 h durchgeführt (Slit 2,5 nm für **34**, 4 nm für **35**).

Tabelle 5: Übersicht der Proben zur Bestimmung der Reaktionskinetik

Probe	V _{Nucleosid} [μL]	C _{Nucleosid} [μM]	V _{Tz-Farbstoff} [μL]	C _{Tz-Farbstoff} [μM]	V _{DMSO} [μL]	V _{H₂O} [μL]
„Click“-Ansatz	5,00	100	5,00	20,0	-	990
t ₀	-	0	5,00	20,0	5,00	990
<i>Blank</i> _{t₀}	-	-	-	-	10,0	990
<i>Blank</i> _{click}	5,00	100	-	-	5,00	990

Über den Turn-On Effekt des Tetrazin-Farbstoffs kann die Reaktionskinetik abgeleitet werden. Dazu wurden die, über den *Blank* korrigierten Messwerte, zunächst normiert und anschließend die Integrale der Fluoreszenzspektren berechnet. Aus den erhaltenen Werten wurde ein Punktdiagramm erstellt und über eine Exponentialfunktion der Form (1) angepasst. Aus der Steigung k lässt sich die Geschwindigkeitskonstante k_2 berechnen. Der Turn-On Wert ergibt sich durch das Verhältnis der Integrale der t₀-Messung und der d7-Messung.

$$y = a + be^{-kx} \quad (1)$$

6.3 Zellkultur

Im Folgenden werden die verwendeten Zelllinien, Materialien, Geräte sowie die Methoden zur Kultivierung und Analyse der Zellen aufgeführt, welche für diese Arbeit verwendet wurden.

6.3.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellexperimente wurden mit wild type HeLa Zellen des humanen Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) der Firma ATCC durchgeführt.

6.3.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Auflistung der Verwendeten Lösungen und Medien für die Zellkultur, Chemikalien, Enzyme sowie Kits.

	Name	Lieferant/Hersteller
Medien/Zellkultur	0,25% Trypsin-EDTA	Gibco® life technologies® (Carlsbad, CA, USA)
	DMEM	Gibco® life technologies® (Carlsbad, CA, USA)
	PBS ^{-/-}	Gibco® life technologies® (Carlsbad, CA, USA)
	Fetal Bovine Serum (FCS)	Gibco® life technologies® (Carlsbad, CA, USA)
	Fetal Bovine Serum (FCS) dialysiert	Gibco® life technologies® (Carlsbad, CA, USA)
	ROTI®Cell Eagle's MEM-Alpha ohne Glutamin, ohne Nukleoside	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	Penicillin/Streptomycin	Gibco® life technologies® (Carlsbad, CA, USA)
Chemikalien	Biotin-benzyl-tetrazine	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	di-Natriumtetraborat	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	DMSO	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	DNAzol™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Ethanol absolut	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	HCl	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Methylenblau	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	MgCl ₂	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	NaCl	Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)
	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	NaOH	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	Natriumacetat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Experimentaltteil

	Natürliche Nukleoside (A, dA, T, dT, G, dG, C, dC, U)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	NH ₄ Cl	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Triton-X-100	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	TRIzol®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Enzyme	Alkalische Phosphatase(ALP)	Roche (Basel, Schweiz)
	HRP-konjugiertes Streptavidin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Nuklease P1	Roche (Basel, Schweiz)
	Nucleoside Digestion Mix	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Kits	FlexiGene DNA Kit	QIAGEN (Hilden, DE)
	Zellproliferationskit I (MTT)	Roche (Basel, Schweiz)
	Clean & Concentrator 5 Kit	Zymo (Freiburg, DE)
	SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

6.3.3 Zusammengesetzte Medien/Lösungen

Tabelle 7: Auflistung der angesetzten Medien zur Kultivierung sowie der verwendeten Lösungen.

	Zusammensetzung
Blockierlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,12 M NaCl • 0,016 M Na₂HPO₄ • 0,008 NaH₂PO₄ • 0,17 M SDS • neutraler pH-Wert
DMEM	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM • 10 % FCS • 100 U/mL Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	<ul style="list-style-type: none"> • 70 % Medium • 20 % FCS • 10 % DMSO
Methylenblau-Färbelösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,04 % Methylenblau • 0,3 M Natriumacetat

Experimentaltteil

No/No-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • ROTI®Cell Eagle's MEM-Alpha ohne Glutamin, ohne Nukleoside • 10 % FCS dialysiert • 100 U/mL Penicilin/Streptomycin
TE-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1 mL 1M Tris (pH 8,0) • 0,2 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) • 98,8 mL ddH₂O
Waschlösung A	<ul style="list-style-type: none"> • 1:10 Verdünnung der Blockierungslösung mit ddH₂O
Waschlösung B	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 M Tris-Base • 0,1 M NaCl • 0,02 M MgCl₂ • pH 9,5

6.3.4 Geräte

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Geräte

Anwendung	Gerät	Hersteller/Lieferant
Zellkultur	Absaugpumpe Vacusafe™	Integra Biosciences (Konstanz, DE)
	CO ₂ -Unkubator, CB220	Binder (Tuttlingen, DE)
	Sterilbank S@feMate™	VWR (Radnor, USA)
	Pipetten Eppendorf Research Plus	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifugation	HERMLE Z 206 A	Hermle (Wehingen, DE)
	Biofuge pico	Heraeus (Hanau, DE)
Mikroskopie	Inverses Lichtmikroskop	VWR (Radnor, USA)
	Konfokalmikroskop LEICA TCS SP8	Leica (Wetzlar, DE)
weitere Geräte	Laborschüttler Mini-100 Orbital Genie	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
	Plate Reader CLARIOstar plus	BMG Labtech (Ortenberg, DE)
	Odyssey® XF Imaging System	LI-COR (Lincoln, USA)

6.3.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Auflistung relevanter Verbrauchsmaterialien.

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Zellkultur	12-Well Platte	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
	96-Well Platte, F-bottom	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
	Cryoröhrchen	VWR (Radnor, USA)
	Falcon-Tubes 15 mL, 50 mL	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
	Mikroreaktionsgefäß 1,5 mL, 2,0 mL	Eppendorf (Hamburg, DE)
	Serologische Pipetten	VWR (Radnor, USA)
	µ-Slide 8 Well ibiTreat	Ibidi (Martinsried, DE)
	Mr Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Pasteurpipetten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
	Pipettenspitzen 0,1-10; 1-200; 100-1000 µL	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, DE)
	Petrischalen Ø 6 cm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Zellkulturflaschen mit Filterkappe, CELLSTAR®, 250 mL, 75 cm ²	VWR (Radnor, USA)	
Dot Blot	Amersham Hybond™-N ⁺	Cytiva (Marlborough, USA)

6.3.6 Methoden der Zellkultur

Standardisierte Arbeitsbedingungen in der Zellkultur

Um die Zellen sowie die Umwelt vor möglichen Kontaminationen zu schützen, erfolgten alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank. Es ist zwingend erforderlich unter sterilen Bedingungen zu arbeiten. Die verwendeten Materialien und Geräte sowie die getragenen Handschuhe wurden vor dem Arbeiten mit 80 % Ethanol desinfiziert. Sterile Kultivierungsmaterialien, Medien und Lösungen wurden erst unter der Sterilbank geöffnet. Zum Schutz der Umwelt wurden alle Abfälle und Verbrauchsmaterialien, die mit den Zellen in Kontakt waren autoklaviert. Flüssigabfälle wurden mit Desinfektionsmittelkonzentrat versetzt und ebenfalls autoklaviert.

Kryokonservierung von Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend trypsinisiert. Nach Abstoppen der Trypsinierung mit dem Zellkulturmedium wurden die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 2.000 x g zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (70 % Kultivierungsmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert, um eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL zu erreichen. Je 1 mL der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen pipettiert und dieses in eine auf 4 °C vorgekühlte Einfrierbox mit Isopropanol (*Mr. Frosty*) überführt. Diese wurden unverzüglich in einem -80 °C-Schrank eingefroren. Dort können die Zellen etwa 1 Monat verweilen, bis sie in flüssigen Stickstoff bei -196 °C zur Kryokonservierung überführt werden.

Auftauen von kryokonservierten Zelllinien

Das Kryoröhrchen wurde bei 37°C angetaut und sofort in 10 mL vorgewärmtes Medium in einer Zellkulturflasche T75 überführt. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden tote Zellen sowie restliches DMSO durch einen Mediumwechsel entfernt.

Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinie erfolgte in DMEM oder in No/No-Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 98 %. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreichten (etwa 3-4 Tage nach dem Aussäen), wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:20 passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäß wurden diese mit 1 mL 0,25 % Trypsin-EDTA (für T75 Flasche) für 3-5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde durch leichtes Klopfen des Gefäßes die Zellen gelöst und die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 9 mL Medium inhibiert. Schließlich wurde ein Teilvolumen der Zellsuspension in ein neues Zellkulturgefäß überführt, mit Medium aufgefüllt und weiter kultiviert.

Wachstumskurve

Zum Erstellen einer Wachstumskurve wurden $5 \cdot 10^4$ HeLa Zellen in jeweils 15 Wells einer 24 Well-Platte in 1 mL des zu untersuchenden Mediums ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden jeden Tag die Zellen aus 2 Wells des jeweiligen Mediums mit 500 µL PBS^{-/-} gewaschen und anschließend mit 100 µL 0,25 % Trypsin-EDTA von der Oberfläche gelöst. Es wurden 900 µL Medium zugegeben, die Zellen resuspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß der Marke EPPENDORF überführt. Es wurde für 3 min bei 2.500 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das erhaltene Zellpellet wurde gemäß der erwarteten Zellzahl in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. Es wurden 50 µL Zellsuspension mit 10 µL 0,4 % Trypanblau vermischt und für 1 min inkubiert. Dabei färbten sich nekrotische oder apoptotische Zellen blau, wohingegen lebende Zellen ungefärbt bleiben. Diese Lösung wurde mit einer Neubauer Zählkammer unter 10-facher

Vergrößerung am Lichtmikroskop ausgezählt. Die lebenden Zellen wurden in einer Doppelbestimmung in zwei Großquadranten ausgezählt und die Zellzahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ausgerechnet. In den übrigen Wells erfolgte jeweils nach 48 h ein Mediumwechsel.

Metabolische Markierung der DNA mit modifizierten Nucleosiden

Zur metabolischen Markierung der Nucleinsäuren wurden HeLa Zellen aus einer Kultur, die über einen längeren Zeitraum (mehrere Wochen) in *No/No*-Medium kultiviert wurden verwendet. Das Medium wurde entfernt und durch neues Medium mit der entsprechenden Konzentration an modifiziertem Nucleosid ersetzt. Die Verdünnung wurde aus einer 1 M Stammlösung in DMSO erstellt, so dass die DMSO-Konzentration unter 1 % lag. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen, um extrazelluläres modifiziertes Nucleosid zu entfernen.

Zellproliferations-Test (MTT-Test)

Für den Zellproliferations-Test wurden $1 \cdot 10^4$ HeLa Zellen pro Well einer 96-Well Platte in DMEM ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Reihe A und H, sowie Spalte 1 und 12 der Platte wurden mit PBS^{-/-} befüllt, um ein Austrocknen der Zellen in den äußeren Wells zu verhindern. Die Toxizität der modifizierten Nucleoside wurde jeweils bei einer Konzentration von 0,1 mM, 0,5 mM und 1,0 mM getestet und die Zellen für 48 h inkubiert. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden nicht mit modifizierten Nucleosiden behandelt. Pro Konzentration wurden jeweils sechs Wells in einer Mehrfachbestimmung getestet. Anschließend wurden 15 µL MTT-Lösung zugegeben und für drei weitere Stunden im Inkubator inkubiert. Die mitgeführte Positivkontrolle wurde zuvor mit 15 µL 10 % Triton-X-100 versetzt und 15 min inkubiert, um alle Zellen abzutöten. Es folgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µL Lyspuffer (*Solubilization buffer*) und Inkubation bei 37 °C im Inkubator für 24 h. Dadurch wurde der gelbe MTT-Farbstoff durch endogene Succinat-Dehydrogenasen in lebenden Zellen zu einem blau-violetten und wasserunlöslichem Formazan reduziert. Die Menge an entstandenen Formazan-Kristallen konnte nach der Lyse der Zellen quantitativ über Photometrie bestimmt werden. Die Messung des Formazangehaltes erfolgte mit einem Photometer (CLARIOstar plus) bei einer Absorption von 570 nm. Die Auswertung der Proben-Messwerte erfolgte nach Abzug der Positivkontrolle und dem relativen Vergleich zur Negativkontrolle in Prozent. Dafür wurden die Daten gemittelt und eine Standardabweichung berechnet. Die resultierenden Werte geben die relative Vitalität der Zellen nach der Behandlung mit den jeweiligen Nucleosiden in Prozent wieder.

DNA Isolation

- **Isolation mit *TRIzol*TM-Reagenz**

Diese Methode nutzt eine Phenol-Chloroform Extraktion zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Für die Isolation genomischer DNA wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in einer Petrischale (\varnothing 6 cm) ausgesät und für 24 h mit modifiziertem Nukleosid inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst mit PBS^{-/-} gewaschen und mit 250 μ L 0,25 % Trypsin-EDTA von der Oberfläche abgelöst. Die Zellen wurden in 500 μ L Medium resuspendiert und in ein EPPENDORF-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 1.200 x g für 3 min wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 350 μ L *TRIzol*[®] resuspendiert. Im Anschluss wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Lysat wurden 70 μ L Chloroform hinzugefügt, für 15 s geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde bei 12.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, wobei sich drei Phasen bilden. Die obere wässrige Phase wurde vollständig entfernt und verworfen. Zu der Interphase, in welcher sich die DNA befindet wurden nun 105 μ L Ethanol (100 %-ig und bei -80 °C vorgekühlt) zugegeben. Nach vorsichtigem Invertieren wurde der Ansatz für 30 Minuten bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand über dem DNA Pellet entfernt. Das entstandene DNA-Pellet wurde für fünf bis zehn Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in TE-Puffer unter Erwärmen und vortexen resuspendiert. Die Konzentration sowie die Reinheit (A260/A280) der isolierten genomischen DNA wurde unter Verwendung des NANODROP 3300 bestimmt.

- **Isolation mit *DNAzol*TM-Reagenz**

Für die Isolation genomischer DNA mit dem *DNAzol*TM-Reagenz wurden zunächst $1 \cdot 10^6$ Zellen in eine \varnothing 6 cm Petrischale ausgesät und für 24 h mit modifiziertem Nukleosid inkubiert. Nachdem das Medium entfernt wurde, folgte das zweimalige Waschen mit PBS^{-/-}. Es wurde 1 mL *DNAzol*TM zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Lysat wurde in ein 2 mL EPPENDORF-Gefäß überführt und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der entstandenen viskose Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 μ L Ethanol (100 %-ig und bei -80 °C vorgekühlt) und mehrfaches invertieren präzipitiert die DNA und wird als Niederschlag erkennbar. Die DNA wird mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und für 1 min an der Luft getrocknet. Es folgte ein Waschschriff mit 1 mL 75 % Ethanol. Nach mehrmaligem invertieren wird das EPPENDORF-Gefäß für 1-2 min stehen gelassen, damit sich die DNA wieder absetzen kann. Nach Entfernen des Ethanols wird die DNA nochmal für 5-15 s an der Luft getrocknet und anschließend in 20 μ L 8 mM NaOH gelöst. Die

Konzentration sowie die Reinheit (A260/A280) der isolierten genomischen DNA wurde unter Verwendung des NANODROP 3300 bestimmt.

- **Isolation mit FlexiGene Kit von QIAGEN**

Die Isolation der metabolisch markierten DNA zur Analyse über den *Dot Blot* erfolgte mit dem FlexiGene Kit. Dazu wurden $5 \cdot 10^5$ HeLa Zellen in eine Petrischale (\varnothing 6 cm) ausgesät und für 72 h mit den modifizierten Nukleosiden inkubiert. Das Medium wurde darauf entfernt und die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen. Durch Zugabe von 300 μ L 0,25 % Trypsin-EDTA wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst, in 1 mL Medium resuspendiert und in ein EPPENDORF-Gefäß überführt. Es wurde für 2 min bei 2.000 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 300 μ L *Buffer FG1* resuspendiert und nach Zugabe von 300 μ L *Buffer FG2/Protease* (300 μ L FG2 + 3 μ L Protease) mehrfach invertiert. Das Gemisch wurde bei 65 °C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Es folgte das Zusetzen von 600 μ L Isopropanol. Durch kräftiges Invertieren präzipitiert die DNA und wird als weißer Niederschlag sichtbar. Zum Absetzen wurde 3 min bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Mikroreaktionsgefäß wurde mit offenem Deckel kopfüber aufgestellt, um das restliche Lösungsmittel ablaufen zu lassen. Durch Zugabe von 600 μ L 70 % Ethanol, gefolgt von 5 s vortexen bildete sich ein DNA Pellet. Es wurde wieder zentrifugiert bei 10.000 x g für 3 min. Der Überstand wurde entfernt und das EPPENDORF-Gefäß nochmals für 5 min kopfüber aufgestellt. Nachdem das Pellet für weiter 5 min an der Luft getrocknet wurde, folgte schließlich das Resuspendieren in 100 μ L *Buffer FG3* und das vollständige Lösen bei 65 °C im Wasserbad für 30 min. Die DNA kann so bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden. Die Konzentration sowie die Reinheit (A260/A280) der isolierten genomischen DNA wurde unter Verwendung des NANODROP 3300 bestimmt.

Enzymatischer Verdau isolierter DNA

- **“Vier-Stunden Zwei-Enzyme“- Methode**

Für den enzymatischen Verdau der isolierten genomischen DNA in Mononukleoside wurden 50 μ L einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von 0,5 μ g/ μ L in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Die DNA wurde für 5 Minuten in einem Thermoblock bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu vermeiden. Danach wurden 100 μ L 30 mM Natriumacetatlösung (pH = 5,3), 5 μ L 20 mM Zinksulfatlösung zugegeben. Im Anschluss wurden 10 μ L Nuklease P1 (1 mg/mL, 200 U/mg) sowie 10 μ L alkalischen Phosphatase (150 U/mL) zugegeben und die Probe für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurde der pH-Wert durch Zugabe von 20 μ L 0,5 M Tris-Puffer auf einen pH-Wert von 8,5 angepasst. Die Probe wurde

erneut für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die enzymatisch verdaute DNA wurde anschließend mittels analytischer HPLC aufgereinigt (Verwendete Trennmethode: siehe **Kapitel 6.2, Tabelle 3**) bzw. über LC/MS analysiert (Verwendete Methode: siehe **Kapitel 6.2, Tabelle 3**).

- ***Nucleoside Digestion Mix - Methode***

Für den Verdau mittels *Digestion Mix* (NEW ENGLAND BIOLABS) wurde 1 µg der isolierten genomischen DNA in 20 µL ddH₂O pipettiert. Dazu wurden 2 µL des *Digestion Buffers* sowie 1 µL des *Digestion Mix* zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die enzymatisch verdaute DNA wurde anschließend mittels analytischer HPLC aufgereinigt (Verwendete Trennmethode: siehe **Kapitel 6.2, Tabelle 3**) bzw. über LC/MS analysiert (Verwendete Methode siehe **Kapitel 6.2, Tabelle 3**).

DNA Biotinylierung über iEDDA-Reaktion

Zunächst wurden je $5 \cdot 10^5$ HeLa Zellen aus einer *No/No*-Kultur in eine Petrischale (Ø 6 cm) ausgesät und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Inkubation mit dem modifizierten Nukleosid wurde dieses aus einer 1 M DMSO Stammlösung auf eine Konzentration von 250 µM in *No/No*-Medium verdünnt. Zusätzlich wurden die natürlichen Nukleoside A, dA, C, dC, G, dG (ohne T und U) in einer Konzentration von 10 mg/L aus einer Stammlösung zugesetzt. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und durch dieses frisch angesetzte *No/No*-Medium ersetzt. Es folgte die Inkubation über 72 h im Inkubator. Nach der metabolischen Markierung wurde die gesamte genomische DNA mit dem FLEXiGene Kit (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurden 15 µg der isolierten DNA mit 1 mM Biotin-benzyl-tetrazin (SIGMA ALDRICH) in destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 µL eingestellt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der iEDDA-Reaktionen erfolgte über das ZYMO *Clean & Concentrator 5* Kit. Dafür wurde der Reaktionsansatz mit 100 µL *RNA Binding Buffer* versetzt und gevortext. Es wurde das gleiche Volumen 100 % Ethanol zugesetzt und nochmals gevortext. Die Probe wurde in eine ZYMO-*Spin IC Column* überführt und die Säule in ein *Collection Tube* platziert. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 s wurde der Durchfluss verworfen. Es wurden 400 µL *RNA Prep Buffer* auf die Säule gegeben und nochmals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen. Es folgte ein Waschschrift durch Zugabe von 700 µL *RNA Wash Buffer* auf die Säule und erneuter Zentrifugation bei 10.000 x g für 2 min. Die Säule wurde in ein neues EPPENDORF-Gefäß überführt und 15 µL *DNase/RNase-Free Water* direkt auf die Säulenmatrix gegeben. Durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 s wurde die DNA eluiert.

HRP-Streptavidin *Dot Blot*

Die Methode des *Dot Blot* wurde genutzt, um nach der Inkubation von Zellen mit modifizierten Nucleosiden deren Inkorporation in die DNA nachzuweisen. Sie folgte dabei dem Protokoll nach SPITALE *et al.*^[176] Die Konzentration der aufgereinigten, biotinylierten DNA wurde über den NanoDrop bestimmt. Daraus wurden verschiedene Konzentrationen mit ddH₂O verdünnt. Eine Amersham Hybond™-N⁺-Membran wurde in passende Streifen zugeschnitten um darauf die Konzentrationen zu pipettieren. Je getestetem Nucleosid wurden sechs Konzentrationen biotinylierter DNA aufgetragen (200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng 5 ng) sowie eine H₂O Probe als Negativkontrolle. Mit einem Bleistift wurden zuvor die Positionen der Probe auf der Membran markiert. Es wurden je 2 µL der DNA-Lösung auf die Membran pipettiert und für 10 min an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte das Vernetzen der DNA mit der Membran, wobei diese für 10 min unter eine UV-Lampe (254 nm) mit etwa 1 cm Abstand platziert wurde. Nach der Fixierung wurde die Membran für 30 min unter ständigem Schütteln in Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in die HRP-Streptavidin-Konjugat-Lösung (1 :5000 Verdünnt in Blockierlösung) überführt und für 5 min unter Schütteln inkubiert. Es folgte das zweimalige Waschen für je 30 min in Waschlösung A. Gefolgt von zwei weiteren Waschschritten für je 8 min in Waschlösung B. Anschließend wurde die Membran auf Filterpapier etwas abgetropft und auf ein Tablett des Odyssey® XF Imaging System (LI COR) platziert. Das SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate wurde frisch nach den Angaben des Herstellers angesetzt und direkt auf die Membran pipettiert. Nach 3 min Inkubation erfolgte das Auslesen der Chemilumineszenz. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Image Studio Software. Um als weitere Kontrolle die DNA auf der Membran anzufärben, wurde diese im nächsten Schritt für 3 min in 100 % Ethanol und anschließend für 3 min in H₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation der Membran für 3 min in einer Methylenblaulösung. Abschließend wurde die Membran mehrmals mit H₂O gewaschen.

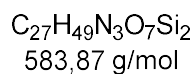
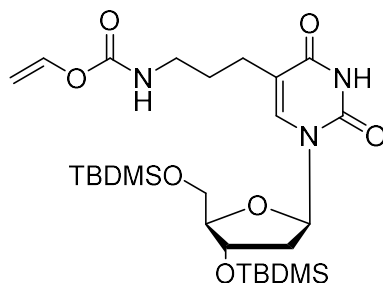
Konfokale Fluoreszenzmikroskopie metabolisch markierter DNA

Für die metabolische Markierung der DNA wurden zunächst $2 \cdot 10^4$ HeLa Zellen aus einer Kultur in *No/No*-Medium pro Well in ein µ-Slide 8-Well Ibidi ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde entfernt und durch frisch angesetztes *No/No*-Medium mit 250 µM des modifizierten Nucleosids ersetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS^{-/-} gewaschen und mit 3,5 % PFA in PBS^{-/-} für 10 min bei RT fixiert. Zum Abstoppen der Fixierung wurde das PFA entfernt und PBS^{-/-} mit 50 mM Glycin sowie 50 mM NH₄Cl zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Tetrazin-Farbstoffs in einer Konzentration von 20 µM in Medium, welcher für 24 h bei 37 °C inkubiert wurde.

Abschließend erfolgte die Gegenfärbung des Zellkerns mit Hoechst 33342. Dafür wurde die Stammlösung (10 mg/mL) 1:2000 mit PBS^{-/-} auf eine Endkonzentration von 5 µg/mL verdünnt. Mit dieser Lösung wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, anschließend mit PBS^{-/-} gewaschen und wieder überschichtet. Die Visualisierung des Zellkerns erfolgte am Konfokalmikroskop (LEICA TCS SP8) mit der Leica Application Suite (LAS-AF) Software und dem ACS APO 63x/1.30 OIL Objektiv. Die Tetrazin-Farbstoffe wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon Ionen Laser (10%) und das Hoechst 33342 bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem UV Laser (10 %) angeregt. Die Emission der Fluoreszenz wurde für die Tetrazin-Farbstoffe bei 500-550 nm und für Hoechst bei 420-490 nm detektiert. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024 x1024 Pixeln und einer Scangeschwindigkeit von 700 Hz aufgenommen.

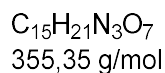
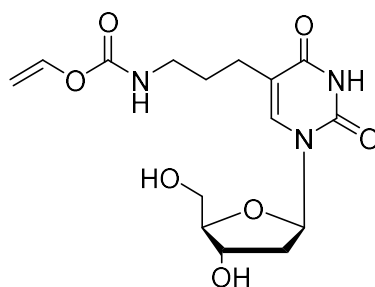
6.4 Synthesevorschriften

Nukleosid 13



Unter Schutzgas wurden 500 mg Nukleosid **1** (0,970 mmol, 1,00 Äq.) in 50 mL trockenem DCM gelöst und auf -78 °C gekühlt. Dazu wurden 80,0 µL Vinyl-Chlorformate (**12**) (0,970 mmol, 1,00 Äq.) und 380 µL trockenes Triethylamin (2,72 mmol, 2,80 Äq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter NaHCO₃ Lösung (3 x 50 mL) gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde vom Lösungsmittel unter vermindertem Druck befreit. Das Produkt wurde als weißer Feststoff ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Synthese weiterverwendet.

Nukleosid 14



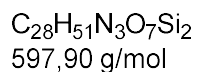
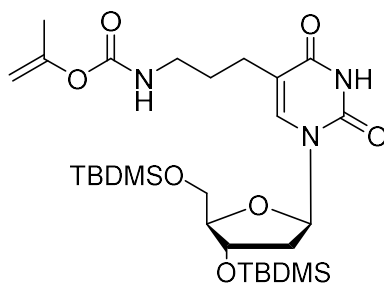
Unter Argonatmosphäre wurden 0,327 g Nukleosid **13** (0,562 mmol, 1,00 Äq.) in 20 ml trockenem THF gelöst. Dazu wurden 280 μ L Triethylamin Trihydrofluorid (1,66 mmol, 3,21 Äq.) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurden nochmals 560 μ L $Et_3N \cdot 3HF$ (3,32 mmol, 6,42 Äq.) zugegeben und wieder über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM/MeOH 0% \rightarrow 10%). Das Produkt konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 49% (170 mg, 0,478 mmol) über zwei Stufen erhalten werden.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 11,27 (s, 2H); 7,67 (s, 2H); 7,63 (s, 2H); 7,11 (dd, J = 14.1, 6.4 Hz, 2H); 6,17 (s, 1H); 5,23 (s, 1H); 5,00 (s, 2H); 4,69 (s, 1H); 4,41 (s, 1H); 4,24 (s, 3H); 3,76 (s, 2H); 3,56 (s, 1H); 3,00 (s, 2H); 2,20 (s, 2H); 2,09 (s, 2H); 1,57 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 163,34; 153,22; 150,33; 142,25; 136,36; 112,86; 94,43; 87,28; 83,88; 70,43; 61,32; 30,70; 27,95; 23,71.

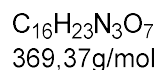
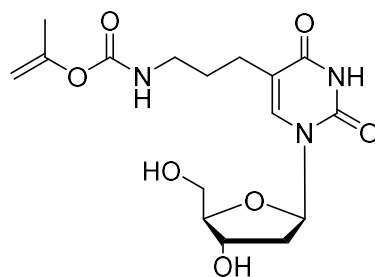
HRMS (ESI+): berechnet für $C_{15}H_{22}N_3O_7^+$: 356,1452 $[M + H]^+$, gefunden: 356,1441.

Nukleosid 16



Unter Schutzgas wurden 300 mg Nukleosid **1** (0,584 mmol, 1,00 Äq.) wurden in 30 mL trockenem DCM gelöst und auf -78 °C gekühlt. Dazu wurden 73,0 µL Isopropenyl- Chlorformiat (**15**) (66,0 mg, 0,548 mmol, 0,95 Äq.) und 160 µL trockenes Triethylamin (1,63 mmol, 2,80 Äq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde dreimal mit gesättigter NaHCO₃ Lösung gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernen und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung in die folgende Synthese eingesetzt.

Nukleosid 17



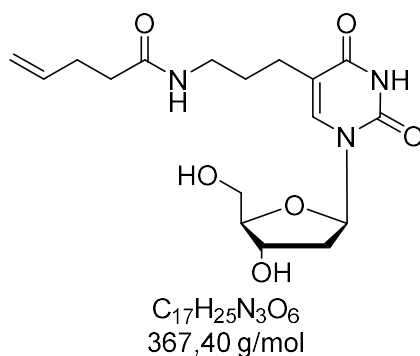
Unter Argonatmosphäre wurden 330 mg Nukleosid **16** (0,552 mmol, 1,00 Äq.) in 10 mL trockenem THF gelöst. Dazu wurden 290 μ L $Et_3N \cdot 3HF$ (1,79 mmol, 3,21 Äq.) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wurden nochmals 570 μ L $Et_3N \cdot 3HF$ (3,58 mmol, 6,42 Äq.) zugegeben und wieder über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , DCM/MeOH 5 % \rightarrow 10 %). Mit einer Ausbeute von 87 % über zwei Stufen wurden 188 mg (0,509 mmol) des Produktes als weißer Feststoff erhalten.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 11,27 (s, 1H); 7,68 (s, 1H); 7,41 (t, J = 5.6 Hz, 1H); 6,17 (t, J = 7,5, 6,2 Hz, 1H); 5,22 (d, J = 4,2 Hz, 1H); 5,00 (t, J = 5,1 Hz, 1H); 4,59 (s, 1H); 4,58 (s, 1H); 4,28 – 4,19 (m, 1H); 3,77 – 3,75 (m, 1H); 3,62 – 3,50 (m, 2H); 2,98 (q, J = 6.8 Hz, 2H); 2,23 – 2,15 (m, 2H); 2,12 – 2,03 (m, 2H); 1,84 (s, 3H); 1,57 (p, 2H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ ppm) = 163,35; 153,77; 152,77; 150,33; 136,33; 112,93; 100,39; 87,29; 83,88; 70,44; 61,34; 40,15; 28,08; 23,75; 19,64.

HRMS (ESI+): berechnet für $C_{16}H_{23}N_3O_7Na^+$: 392,1434 $[M + Na]^+$, gefunden: 392,1422.

Nukleosid 19



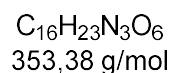
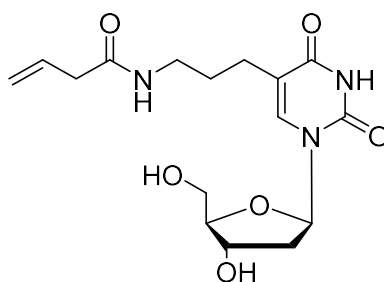
Eine Lösung aus 377 mg Nukleosid **8** (1,32 mmol, 1,00 Äq.) in 5 mL trockenem DCM wurde unter Argon auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 313 mg des Aktivesters **18** (1,59 mmol, 1,20 Äq.) in 1 mL trockenem DMF gelöst und in den ersten Ansatz zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend via Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 5 % → 10 %) aufgereinigt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 7 % (42,0 mg, 0,114 mmol) über zwei Stufen gewonnen werden.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 7,86 (s, 1H); 6,29 (t, J = 6.7 Hz, 1H); 5,83 (ddt, J = 16,9, 10,3, 6,3 Hz, 1H); 5,06 (dq, J = 17,1, 1,6 Hz, 1H); 4,98 (dq, J = 10,3, 1,5 Hz, 1H); 4,41 (dt, J = 5,8, 3,7 Hz, 1H); 3,91 (q, J = 3.4 Hz, 1H); 3,84 – 3,71 (m, 2H); 3,18 (t, J = 6,8 Hz, 2H); 2,40 – 2,26 (m, 6H); 2,27 – 2,24 (m, 2H); 1,69 (p, J = 7.0 Hz, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 175,42; 165,97; 152,25; 138,70; 138,27; 115,84; 114,75; 88,91; 86,34; 72,16; 62,83; 41,31; 39,37; 36,50; 31,00; 29,15; 25,04.

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₇H₂₅N₃O₆Na⁺: 390,1641 [M + Na]⁺, gefunden: 390, 1628.

Nukleosid 21



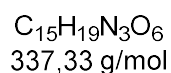
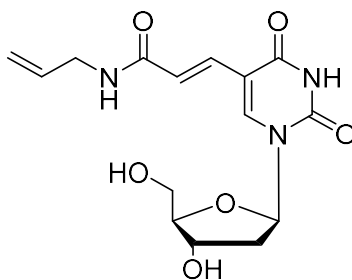
Unter Argonatmosphäre wurden 309 mg Nukleosid **8** (1,08 mmol, 1,00 Äq.) in 5 mL trockenem DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 238 mg des Aktivesters **20** (1,52 mmol, 1,20 Äq.) in 1 mL trockenem DMF gelöst und in den ersten Ansatz zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 8 % → 10 %). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 11 % (43,7 mg, 0,124 mmol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 7,85 (s, 1H); 6,28 (t, J = 6,8 Hz, 1H); 5,92 (ddd, J = 16,9, 10,0, 6,8 Hz, 1H); 5,23 – 5,11 (m, 2H); 4,41 (q, J = 4,4 Hz, 1H); 3,99 (d, J = 57,4 Hz, 2H); 3,84 – 3,69 (m, 2H); 3,18 (t, J = 6,9 Hz, 2H); 2,97 (d, J = 7,0 Hz, 3H); 2,32 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 2,27 – 2,23 (m, 2H); 1,70 (p, J = 7,3, 6,6 Hz, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 173,85; 165,96; 152,25; 138,71; 133,01; 118,69; 114,72; 88,90; 86,34; 72,15; 62,81; 42,11; 41,29; 39,48; 29,10; 25,05.

HRMS (ESI⁺): berechnet für C₁₆H₂₃N₃O₆Na⁺: 376,1485 [M + Na]⁺, gefunden: 376,1475.

Nukleosid 23



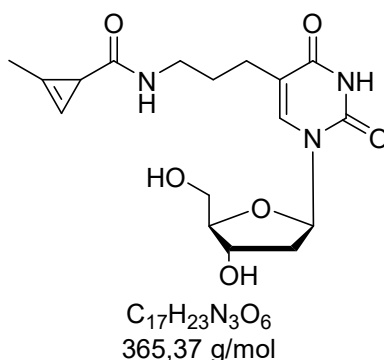
Zu einer Lösung von 120 μ L Allylamin (92,0 mg, 1,61 mmol, 1,20 Äq.) in 5 mL MeOH wurden unter Schutzgas-Atmosphäre 400 mg Nukleosid **11** (1,34 mmol, 1,00 Äq.), 416 mg DCC (2,02 mmol, 1,50 Äq.) sowie 164 mg DMAP (1,34 mmol, 1,00 Äq.) bei 0°C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 18 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend via Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 8 % \rightarrow 10 %) aufgereinigt. In einer Ausbeute von 13 % konnten 56,4 mg (167 μ mol) des Produktes als weißer Feststoff gewonnen werden.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 11,54 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,22 (t, J = 5,8 Hz, 1H); 7,13 (d, J = 15,5 Hz, 1H); 7,04 (d, J = 15,5 Hz, 1H); 6,15 (t, J = 6,5 Hz, 1H); 5,81 (ddt, J = 17,4, 10,3, 5,2 Hz, 1H); 5,25 (s, 1H); 5,17 – 5,12 (m, 2H); 5,06 (t, J = 12,5, 10,8 Hz, 1H); 4,29 – 4,23 (m, 1H); 3,83 – 3,74 (m, 3H); 3,62 (q, J = 11,7 Hz, 2H); 3,17 (s, 1H); 2,21 – 2,12 (m, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 165,47; 161,82; 149,32; 142,53; 135,42; 132,44; 121,23; 115,01; 109,04; 87,58; 84,57; 69,95; 60,96; 41,02; 40,19.

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₅H₁₉N₃O₆Na⁺: 360,1172 [M + Na]⁺, gefunden: 360,1160.

Nukleosid 25



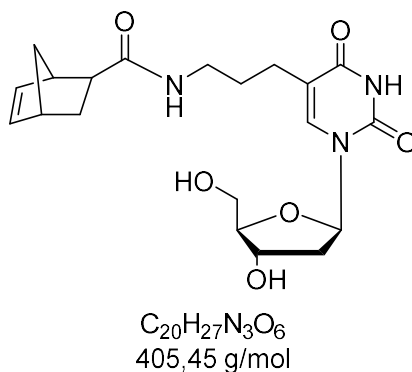
Unter Argonatmosphäre wurden 520 mg Nukleosid **8** (1,82 mmol, 1,20 Äq.) in 5 mL trockenem Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden ebenfalls unter Argon 0,149 g 1MCP-Carbonsäure **24** (1,52 mmol, 1,00 Äq.), 468 mg DCC (2,26 mmol, 1,50 Äq.) und 186 mg DMAP (1,52 mmol, 1,00 Äq.) in 5 mL trockenem MeOH gelöst und in den ersten Ansatz zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 18 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend via Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 5 % → 10 %) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 26 % (144 mg, 0,394 mmol) über zwei Stufen erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11,19 (s, 1H); 7,61 (d, J = 3,9 Hz, 1H); 7,53 (td, J = 5,8, 2,4 Hz, 1H); 6,63 (s, 1H); 6,09 (t, J = 6,9 Hz, 1H); 5,15 (d, J = 4,2 Hz, 1H); 4,98 (t, J = 5,3 Hz, 1H); 4,16 (dq, J = 6,4, 3,3 Hz, 1H); 4,02 (q, J = 5,3 Hz, 1H); 3,69 (q, J = 3,6 Hz, 1H); 3,55 – 3,43 (m, 2H); 3,09 (d, J = 4,9 Hz, 2H); 3,06 (s, 1H); 2,96 (dp, J = 16,8, 6,6 Hz, 2H); 1,99 (d, J = 1,3 Hz, 3H); 1,81 (d, J = 1,6 Hz, 1H); 1,45 (p, J = 7,2 Hz, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 174,66; 163,37; 150,32; 136,33; 112,97; 112,03; 96,07; 87,33; 83,87; 70,43; 61,32; 48,59; 37,80; 28,21; 23,76; 21,11; 10,43.

HRMS (ESI⁺): berechnet für C₁₇H₂₄N₃O₆⁺: 366,1660 [M + H]⁺, gefunden: 366,1661.

Nukleosid 27



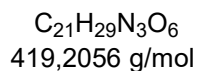
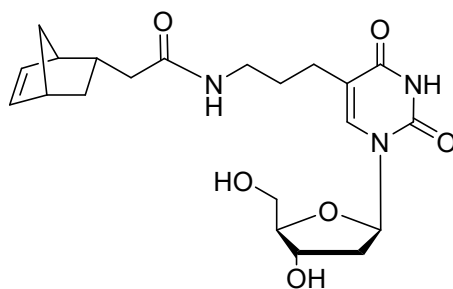
Unter Schutzgas wurden 500 mg Nukleosid **8** (1,75 mmol, 1,20 Äq.) in 5 mL trockenem MeOH gelöst und auf 0°C gekühlt. Dazu wurden 202 mg Exo-Norbornen-2-carboxylsäure **26** (1,46 mmol, 1,00 Äq.), 452 mg DCC (2,19 mmol, 1,50 Äq.) sowie 178 mg DMAP (1,46 mmol, 1,00 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 5 % → 10 %). Es konnten 291 mg (0,718 mmol, 55 % Ausbeute über zwei Stufen) eines weißen Feststoffs erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11,27 (s, 1H); 7,82 (t, J = 5,7 Hz, 1H); 7,68 (s, 1H); 6,17 (t, J = 6,9 Hz, 1H); 6,13 (d, J = 7,0 Hz, 2H); 5,22 (d, J = 4,2 Hz, 1H); 5,01 (t, J = 5,2 Hz, 1H); 4,28 – 4,21 (m, 1H); 3,76 (q, J = 3,7 Hz, 1H); 3,63 – 3,51 (m, 2H); 3,11 – 2,96 (m, 2H); 2,80 (d, J = 18,1 Hz, 2H); 2,25 – 2,13 (m, 2H); 2,17 – 2,07 (m, 2H); 2,09 – 1,98 (m, 2H); 1,80 – 1,73 (m, 1H); 1,64 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 1,55 (p, J = 7,0 Hz, 2H); 1,20 – 1,14 (m, 1H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 174,97; 163,83; 150,81; 138,18; 136,78; 113,48; 87,79; 84,35; 70,94; 61,83; 47,37; 46,13; 43,51; 41,44; 38,38; 30,07; 28,51; 24,33.

HRMS (ESI⁺): berechnet für C₂₀H₂₈N₃O₆⁺: 406,1917 [M + H]⁺, gefunden: 406,1971.

Nukleosid 29



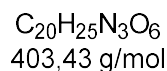
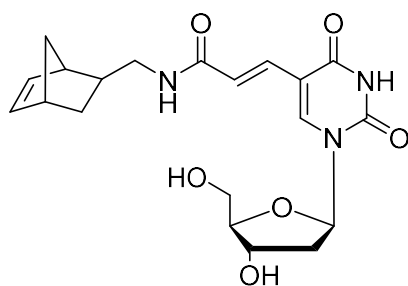
Zu einer Lösung von Nukleosid **8** (240 mg, 0,841 mmol, 1,20 Äq.) in 5 mL MeOH wurden unter Schutzgas-Atmosphäre 110 mg Norbornencarbonsäure **28** (0,723 mmol, 1,00 Äq.), 170 mg DCC (1,07 mmol, 1,50 Äq.) und 90,0 mg DMAP (0,737 mmol, 1,00 Äq.) bei 0 °C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 18 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend via Säulenchromatographie (DCM/MeOH 5 % → 10 %) aufgereinigt. Mit einer Ausbeute von 14 % wurden 42,6 mg (0,102 mmol) des Produktes als hellgelber Feststoff isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ ppm) = 7,86 (s, 1H); 6,29 (t, J = 6,7 Hz, 1H); 6,18 (dd, J = 5,8, 3,0 Hz, 1H); 5,99 (dd, J = 5,8, 2,9 Hz, 1H); 4,44 – 4,38 (m, 1H); 3,92 (q, J = 3,4 Hz, 1H); 3,87 – 3,64 (m, 2H); 3,21 – 3,12 (m, 2H); 2,53 – 2,37 (m, 1H); 2,32 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 2,30 – 2,19 (m, 2H); 2,05 – 1,94 (m, 1H); 1,99 – 1,86 (m, 2H); 1,69 (p, J = 7,0 Hz, 2H); 1,42 (d, J = 8,2, 2,1 Hz, 1H); 1,29 (d, J = 7,9, 1,6 Hz, 1H); 0,62 – 0,55 (m, 1H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 175,84; 165,97; 152,25; 138,52; 133,28; 114,77; 88,92; 86,36; 72,17; 62,84; 46,98; 43,90; 42,26; 41,31; 39,30; 36,96; 32,61; 29,24; 25,05.

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₁H₃₀N₃O₆⁺: 420,2129 [M + H]⁺, gefunden: 420,2124.

Nukleosid 31



Zu einer Lösung von 173 mg Norbornen-Amin **30** (1,41 mmol, 1,20 Äq.) in 5 mL MeOH wurde unter Schutzgas-Atmosphäre 350 mg Nukleosid **11** (1,17 mmol, 1,00 Äq.), 363 mg DCC (1,76 mmol, 1,50 Äq.) und 243 mg DMAP (1,17 mmol, 1,00 Äq.) bei 0°C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 18 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend via Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 5 % → 10 %) aufgereinigt. Mit einer Ausbeute von 10 % konnten 45,0 mg (112 μmol) des Produkts als weißer Feststoff erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9,83 (s, 1H); 8,25 (d, J = 3,7 Hz, 1H); 8,21 – 8,06 (m, 1H); 7,13 – 7,00 (m, 2H); 6,17 – 6,13 (m, 2H); 6,10 – 6,02 (m, 1H); 6,01 – 5,89 (m, 1H); 5,19 (s, 2H); 4,29 – 4,22 (m, 1H); 3,79 (q, J = 3,6 Hz, 1H); 3,67 – 3,55 (m, 2H); 2,99 – 2,88 (m, 1H); 2,81 – 2,71 (m, 2H); 2,22 – 2,12 (m, 3H); 1,78 (ddd, J = 12,8, 9,3, 3,9 Hz, 1H); 1,36 – 1,27 (m, 1H); 1,25 – 1,10 (m, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ (ppm) = 165,37; 161,98; 149,40; 142,47; 136,89; 132,57; 121,65; 109,13; 87,58; 84,53; 69,97; 60,98; 48,93; 44,65; 43,72; 42,85; 41,91; 41,20; 30,43; 29,83.

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₀H₂₅N₃O₆Na⁺: 426,1641 [M + Na]⁺, gefunden: 426,1630.

7. Anhang

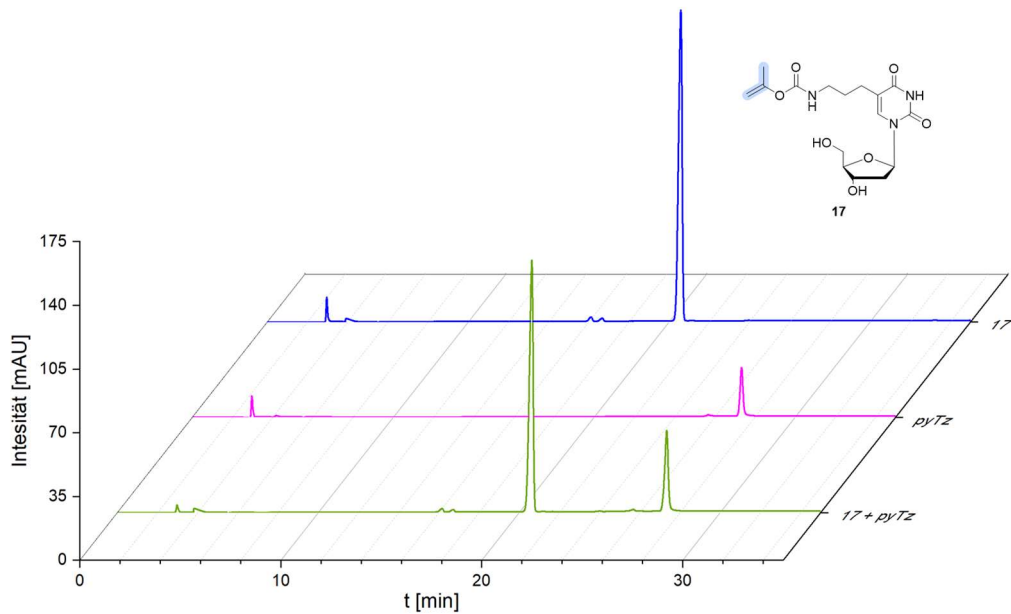


Abbildung A. 1. HPLC-Analyse von Nucleosid **17** (blau) mit **pyTZ** (rote Farben) sowie dem entsprechenden Reaktionsansatz (grün). Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

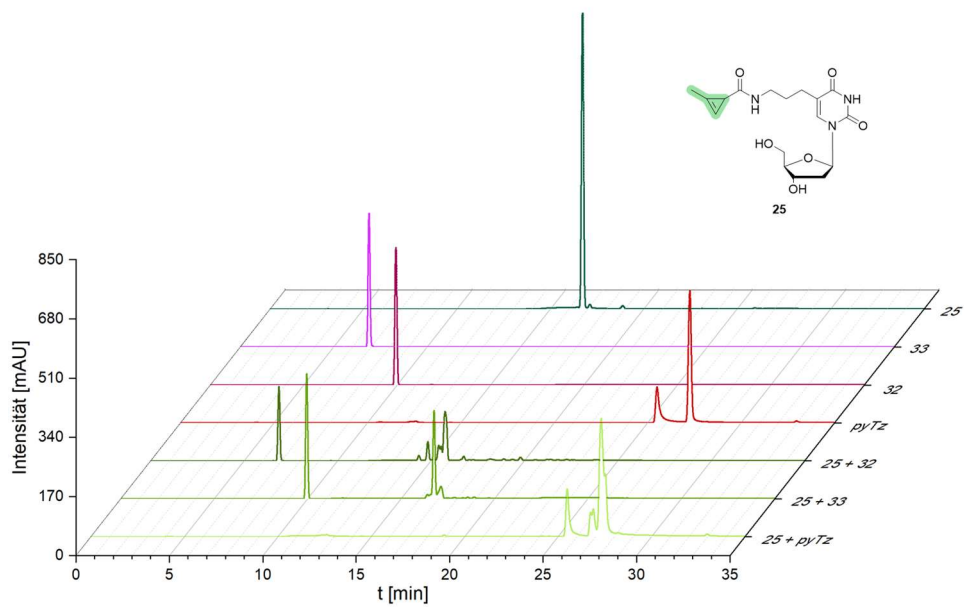


Abbildung A. 2: HPLC-Analyse von Nucleosid **25** (dunkelgrün) mit den Tetrazinen **32**, **33** und **pyTZ** (rote Farben) sowie den entsprechenden Reaktionsansätzen (grüne Farben). Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

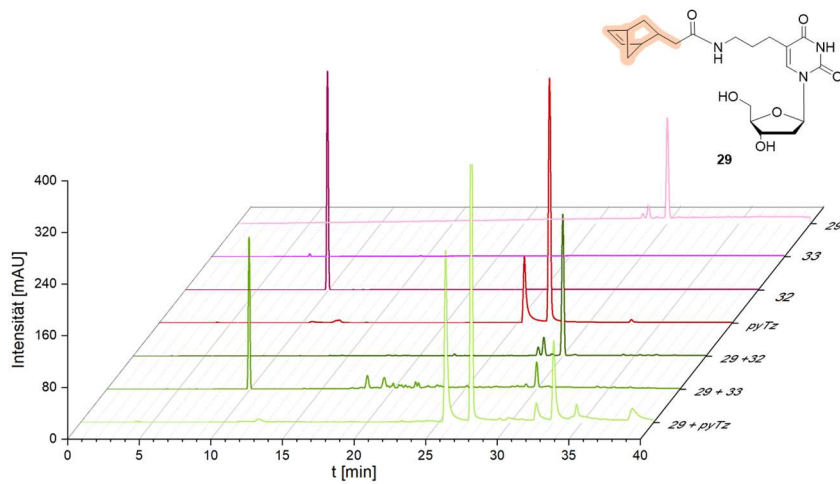


Abbildung A. 3: HPLC-Analyse von Nucleosid **29** 1,0 mM (rosa) mit den Tetrazinen **32**, **33** und **pyTZ** je 2,4 mM (rote Farben) sowie den entsprechenden Reaktionsansätzen (grüne Farben). Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

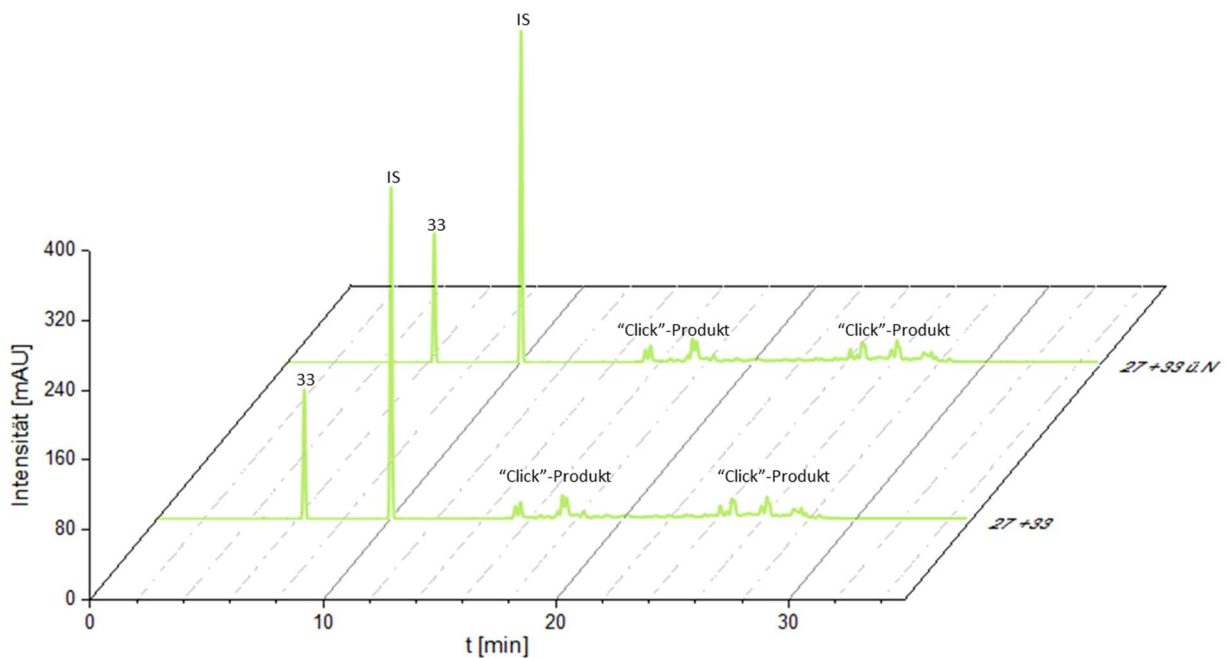


Abbildung A. 4: HPLC-Analyse der Stabilität des „Click“-Produktes von Nucleosid **29** (1,0 mM) mit Tetrazin **33** (2,4 mM) über 24 h. Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

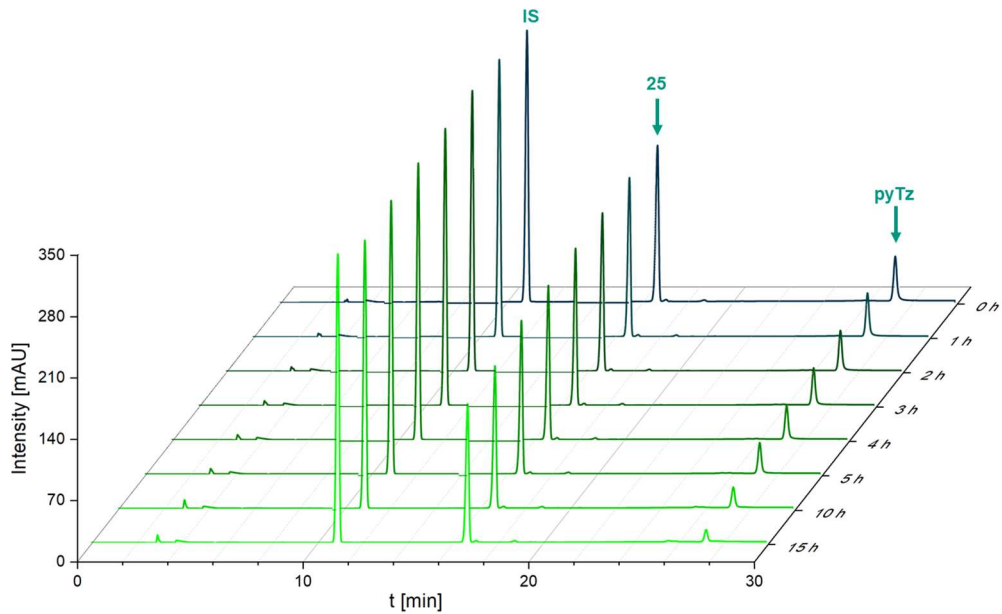


Abbildung A. 5: HPLC-Analyse zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit von Nukleosid **25** (0,5 mM) mit **pyTz** (0,1 mM) sowie eines internen Standards (IS). Der Reaktionsansatz wurde bei RT inkubiert wobei jede Stunde eine Probe zur Analyse entnommen wurde. Nach 5 h wurde das Zeitintervall auf 5 h vergrößert mit einer finalen Messung nach 15 h. Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

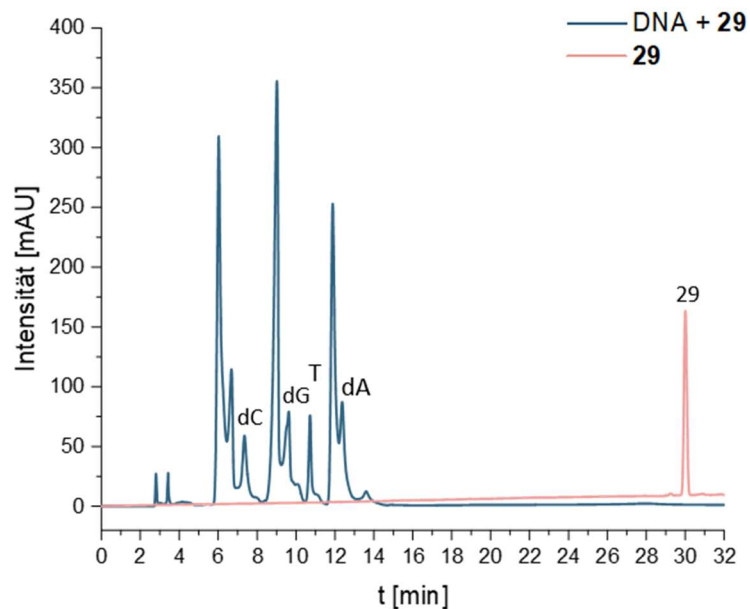


Abbildung A. 6: HPLC-Analyse zum Nachweis der Inkorporation des modifizierten Nukleosids **29** in die DNA, nachdem die isolierte genomische DNA über die "Vier-Stunden Zwei-Enzyme"- Methode in Mononukleoside verdaut wurde. Die dafür genutzte Trennmethode kann aus der **Tabelle 4** in **Kapitel 6.2.1** entnommen werden.

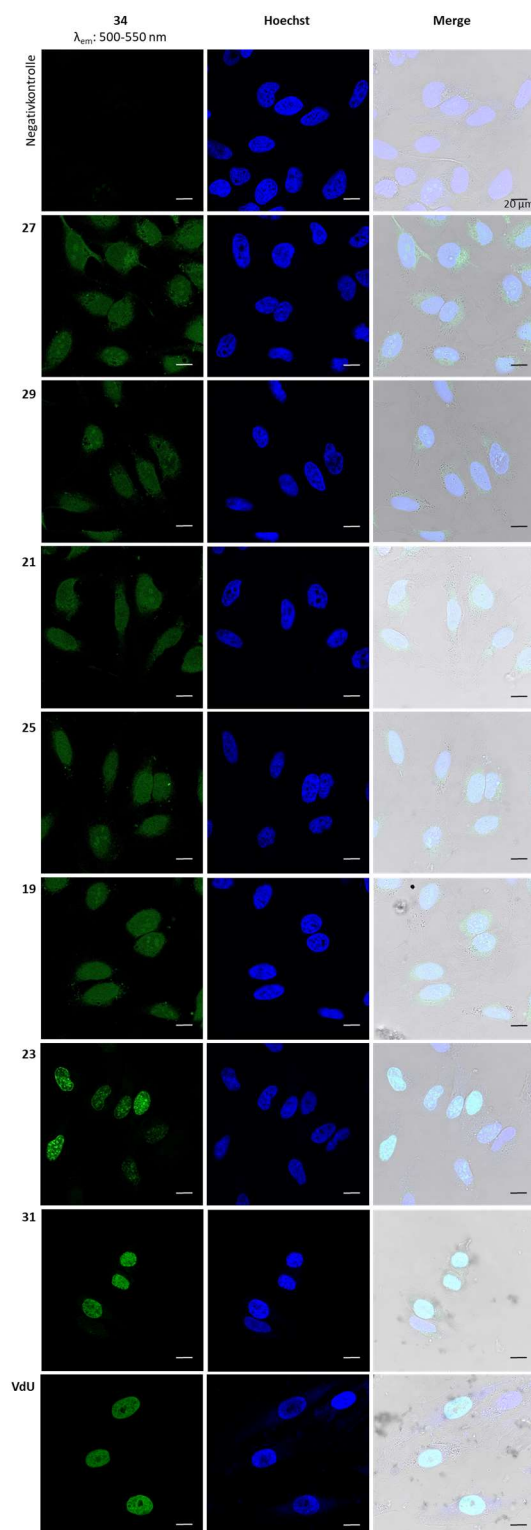


Abbildung A. 7: Nachweis der modifizierten Nucleoside **19**, **21**, **23**, **25**, **27**, **29**, **31** und **VdU** in zellulärer DNA über iEDDA-Reaktion mit Tetrazin-Farbstoff **34**. HeLa Zellen wurden mit 250 µM des jeweiligen Nucleosids in No/No-Medium für 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen mit PFA fixiert wurden, erfolgte die Zugabe von 20 µM Tetrazin-Farbstoff in Medium und Inkubation für 24 h bei 37°C. Die Anfärbung der Zellkernen erfolgte zudem über Hoechst 3342 (5 µg/mL). Die Detektion erfolgte mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie LEICA TCS SP8. Objektiv ACS APO 63x/1.30 OIL. Laser 405 nm und 488 nm. Die Auswertung erfolgte durch die Leica LAS X Software im Maßstab von 10 µm.

8. Literaturverzeichnis

- [1] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [2] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [3] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [4] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [5] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603-609.
- [6] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 625-636.
- [7] B. Yameen, M. Ali, M. Álvarez, R. Neumann, W. Ensinger, W. Knoll, O. Azzaroni, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 183-192.
- [8] D. A. Ossipov, J. Hilborn, *Macromolecules* **2006**, *39*, 1709-1718.
- [9] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.
- [10] R. Y. Tsien, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 5612-5626.
- [11] D. S. Johnson, E. Weerapana, B. F. Cravatt, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 949-964.
- [12] R. Kurzrock, D. J. Stewart, *Oncotarget* **2016**, *7*, 2155-2158.
- [13] K. Wu, N. A. Yee, S. Srinivasan, A. Mahmoodi, M. Zakharian, J. M. Mejia Oneto, M. Royzen, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 1259-1271.
- [14] P. G. Tardi, N. L. Boman, P. R. Cullis, *J Drug Target* **1996**, *4*, 129-140.
- [15] U. Reisacher, D. Ploschik, F. Rönicke, G. B. Cserép, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4032-4037.
- [16] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [17] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H. A. Wagenknecht, *Chembiochem* **2015**, *16*, 1541-1553.
- [18] V. Borsenberger, S. Howorka, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1477-1485.
- [19] P. K. Horan, M. J. Melnicoff, B. D. Jensen, S. E. Slezak, *Methods Cell Biol.* **1990**, *33*, 469-490.
- [20] V. Ntziachristos, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 1-33.
- [21] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat Chem Biol* **2005**, *1*, 13-21.
- [22] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [23] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 3878-3881.
- [24] A. Lopez Aguilar, J. G. Briard, L. Yang, B. Ovrzyn, M. S. Macauley, P. Wu, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 611-621.
- [25] P. V. Chang, C. R. Bertozzi, *Chem Commun (Camb)* **2012**, *48*, 8864-8879.
- [26] J. Chen, A. Tsai, S. E. O'Leary, A. Petrov, J. D. Puglisi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 804-814.
- [27] A. Quiñones-Hinojosa, N. Sanai, J. S. Smith, M. W. McDermott, *J Neurooncol* **2005**, *74*, 19-30.
- [28] D. W. Stacey, M. Hitomi, *Cytometry A* **2008**, *73*, 270-278.
- [29] R. J. De Boer, A. S. Perelson, *J Theor Biol* **2013**, *327*, 45-87.
- [30] E. L. Zajackowski, Q.-Y. Zhao, Z. H. Zhang, X. Li, W. Wei, P. R. Marshall, L. J. Leighton, S. Nainar, C. Feng, R. C. Spitale, T. W. Bredy, *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 1858-1865.
- [31] K. Nguyen, M. Fazio, M. Kubota, S. Nainar, C. Feng, X. Li, S. X. Atwood, T. W. Bredy, R. C. Spitale, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2148-2151.
- [32] M. Rabani, J. Z. Levin, L. Fan, X. Adiconis, R. Raychowdhury, M. Garber, A. Gnirke, C. Nusbaum, N. Hacohen, N. Friedman, I. Amit, A. Regev, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 436-442.
- [33] D. Zink, T. Cremer, R. Saffrich, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, W. Ansorge, E. H. K. Stelzer, *Hum. Genet.* **1998**, *102*, 241-251.
- [34] S. V. Vinogradov, A. D. Zeman, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *J. Controlled Release* **2005**, *107*, 143-157.
- [35] Z. Zawada, A. Tatar, P. Mocilac, M. Buděšínský, T. Kraus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9891-9895.

-
- [36] S. Nainar, B. J. Cuthbert, N. M. Lim, W. E. England, K. Ke, K. Sophal, R. Quechol, D. L. Mobley, C. W. Goulding, R. C. Spitale, *Nat Methods* **2020**, *17*, 311-318.
- [37] M. Pastor-Anglada, S. Pérez-Torras, *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
- [38] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447.
- [39] Y. Zhang, R. E. Kleiner, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3347-3351.
- [40] S. Lutz, L. Liu, Y. Liu, *Chimia (Aarau)* **2009**, *63*, 737-744.
- [41] M. Kubota, S. Nainar, S. M. Parker, W. England, F. Furche, R. C. Spitale, *ACS Chem Biol* **2019**, *14*, 1698-1707.
- [42] A. Neef, N. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, *15*.
- [43] D. Farquhar, D. N. Srivastva, N. J. Kuttesch, P. P. Saunders, *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 324-325.
- [44] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 1239-1245.
- [45] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779-1791.
- [46] M. Tera, S. M. K. Glasauer, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1939-1943.
- [47] K. Wu, M. He, I. Khan, P. N. Asare Okai, Q. Lin, G. Fuchs, M. Royzen, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 10456-10459.
- [48] K. Betz, F. Streckenbach, A. Schnur, T. Exner, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5181-5184.
- [49] A. Hottin, K. Betz, K. Diederichs, A. Marx, *Eur. J. Chem.* **2017**, *23*, 2109-2118.
- [50] D. Loakes, P. Holliger, *Chem. Commun.* **2009**, 4619-4631.
- [51] H. M. Pinedo, G. F. Peters, *J. Clin. Oncol.* **1988**, *6*, 1653-1664.
- [52] S. Diermeier-Daucher, S. T. Clarke, D. Hill, A. Vollmann-Zwerenz, J. A. Bradford, G. Brockhoff, *Cytometry A* **2009**, *75*, 535-546.
- [53] J. J. Cassiman, E. de Clercq, H. van den Berghe, *Mutat Res* **1983**, *117*, 317-327.
- [54] R. A. Silverstein, E. González de Valdivia, N. Visa, *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 332-340.
- [55] K. Burger, B. Mühl, M. Kellner, M. Rohrmoser, A. Gruber-Eber, L. Windhager, C. C. Friedel, L. Dölken, D. Eick, *RNA Biology* **2013**, *10*, 1623-1630.
- [56] H. G. Gratzner, R. C. Leif, D. J. Ingram, A. Castro, *Exp Cell Res* **1975**, *95*, 88-94.
- [57] X. Tang, D. L. Falls, X. Li, T. Lane, M. B. Luskin, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 5837-5844.
- [58] A. Ligasová, D. Strunin, R. Liboska, I. Rosenberg, K. Koberna, *PLoS One* **2012**, *7*, e52584.
- [59] B. Lehner, B. Sandner, J. Marschallinger, C. Lehner, T. Furtner, S. Couillard-Despres, F. J. Rivera, G. Brockhoff, H. C. Bauer, N. Weidner, L. Aigner, *Cell Tissue Res* **2011**, *345*, 313-328.
- [60] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2415-2420.
- [61] R. D. Row, J. A. Prescher, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1073-1081.
- [62] X. Zhang, Y. Zhang, *Molecules* **2013**, *18*, 7145-7159.
- [63] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638-18643.
- [64] G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl Fluoresc* **2015**, *3*, 042001.
- [65] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272-1279.
- [66] S. Mayer, K. Lang, *Nachr. Chem.* **2016**, *64*, 301-305.
- [67] T. Carell, M. Vrabel, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 9.
- [68] J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917-6920.
- [69] J. B. Haun, N. K. Devaraj, B. S. Marinelli, H. Lee, R. Weissleder, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3204-3213.
- [70] Y. Sun, Y. Chen, T. Peng, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 6019-6027.
- [71] Kenry, B. Liu, *Trends Chem.* **2019**, *1*, 763-778.
- [72] G. Ben-Nissan, M. Sharon, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3627-3637.
- [73] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16-20.
- [74] J. Balcar, G. Chrisam, F. X. Huber, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1481-1484.
- [75] R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [76] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
-

-
- [77] L. G. G. V. V. Rostovtsev, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [78] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600-10604.
- [79] Z. Yu, T. Y. Ohulchanskyy, P. An, P. N. Prasad, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16766-16769.
- [80] J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1362-1369.
- [81] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 5852-5856.
- [82] R. M. Hamelik, A. Krishan, *Cytometry A* **2009**, *75*, 862-865.
- [83] P. V. Danenberg, R. S. Bhatt, N. G. Kundu, K. Danenberg, C. Heidelberger, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1537-1540.
- [84] F. Kohlmeier, A. Maya-Mendoza, D. A. Jackson, *Chromosome Res* **2013**, *21*, 87-100.
- [85] H. Zhao, H. D. Halicka, J. Li, E. Biela, K. Berniak, J. Dobrucki, Z. Darzynkiewicz, *Cytometry A* **2013**, *83*, 979-988.
- [86] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 20404-20409.
- [87] L. Guan, G. W. van der Heijden, A. Bortvin, M. M. Greenberg, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2184-2190.
- [88] D. Qu, G. Wang, Z. Wang, L. Zhou, W. Chi, S. Cong, X. Ren, P. Liang, B. Zhang, *Anal. Biochem.* **2011**, *417*, 112-121.
- [89] A. B. Neef, F. Samain, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1750-1753.
- [90] S. Nainar, S. Beasley, M. Fazio, M. Kubota, N. Dai, I. R. Correa, Jr., R. C. Spitale, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2149-2152.
- [91] 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.
- [92] G. R. Abel, Z. A. Calabrese, J. Ayco, J. E. Hein, T. Ye, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 698-704.
- [93] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [94] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [95] G. Almeida, E. Sletten, H. Nakamura, K. Palaniappan, C. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443-2447.
- [96] M. Tera, N. W. Luedtke, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2991-2997.
- [97] M. Tera, Z. Harati Taji, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 15405-15409.
- [98] J. W. Lichtman, J. A. Conchello, *Nat Methods* **2005**, *2*, 910-919.
- [99] D. J. Stephens, V. J. Allan, *Science* **2003**, *300*, 82-86.
- [100] L. Parhamifar, L. Wu, H. Andersen, S. M. Moghimi, *Methods (San Diego, Calif.)* **2014**, *68*, 300-307.
- [101] O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122.
- [102] D. L. Boger, S. M. Sakya, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1415-1423.
- [103] A. Hamasaki, R. Ducray, D. L. Boger, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 185-193.
- [104] A. Meijer, S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8989-8994.
- [105] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2885-2896.
- [106] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [107] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [108] N. K. Devaraj, R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816-827.
- [109] D. N. Kamber, Y. Liang, R. J. Blizzard, F. Liu, R. A. Mehl, K. N. Houk, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8388-8391.
- [110] H. Wu, B. T. Cisneros, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17942-17945.
- [111] G. Beliu, A. J. Kurz, A. C. Kuhlemann, L. Behringer-Pliess, M. Meub, N. Wolf, J. Seibel, Z.-D. Shi, M. Schnermann, J. B. Grimm, L. D. Lavis, S. Doose, M. Sauer, *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 261.
- [112] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1736-1738.
- [113] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646-9649.
- [114] Y. Liang, J. L. Mackey, S. A. Lopez, F. Liu, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17904-17907.
-

- [115] D. Svatunek, M. Wilkovitsch, L. Hartmann, K. N. Houk, H. Mikula, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 8171-8177.
- [116] R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375-3378.
- [117] J.-P. Meyer, P. Kozlowski, J. Jackson, K. M. Cunanan, P. Adumeau, T. R. Dilling, B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8201-8217.
- [118] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [119] U. M. Battisti, R. García-Vázquez, D. Svatunek, B. Herrmann, A. Löffler, H. Mikula, M. M. Herth, *Bioconjug Chem* **2022**, *33*, 608-624.
- [120] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 2869-2872.
- [121] B. Pinto-Pacheco, W. P. Carbery, S. Khan, D. B. Turner, D. Buccella, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 22140-22149.
- [122] R. Bandichhor, A. D. Petrescu, A. Vespa, A. B. Kier, F. Schroeder, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10688-10689.
- [123] A. Wiczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506-1510.
- [124] F. Hövelmann, O. Seitz, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 714-723.
- [125] F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 14192-14196.
- [126] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [127] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 044003.
- [128] H.-K. Walter, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- [129] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Chem.* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [130] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*.
- [131] J. Sauer, & Wiest, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *74(10)*, 353-353.
- [132] F. Thalhammer, U. Wallfahrer, J. S. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851-6854.
- [133] F. Liu, Y. Liang, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11483-11493.
- [134] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. Hendriks, F. P. Rutjes, J. C. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 9422-9425.
- [135] J. Yang, J. Šečkutě, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476-7479.
- [136] J. Yang, Y. Liang, J. Šečkutě, K. N. Houk, N. K. Devaraj, *Eur. J. Chem.* **2014**, *20*, 3365-3375.
- [137] K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317-10320.
- [138] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat Chem* **2012**, *4*, 298-304.
- [139] A. Verri, F. Focher, R. J. Duncombe, I. Basnak, R. T. Walker, P. L. Coe, E. De clerq, G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, S. Spadari, *Biochem. J* **2000**, *351*, 319-326.
- [140] U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 9168-9172.
- [141] F. Seela, M. Zulauf, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3233-3240.
- [142] H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederwieser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827-10829.
- [143] N. Müller, G. Eisenbrand, *Chem. Biol. Interact.* **1985**, *53*, 173-181.
- [144] A. Gubu, L. Li, Y. Ning, X. Zhang, S. Lee, M. Feng, Q. Li, X. Lei, K. Jo, X. Tang, *Eur. J. Chem.* **2018**, *24*, 5895-5900.
- [145] M. O. Loehr, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202112931.
- [146] H.-s. Liu, T. Ishizuka, M. Kawaguchi, R. Nishii, H. Kataoka, Y. Xu, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2958-2966.
- [147] Z. He, S. Peng, Q. Wei, S. Jia, S. Guo, K. Chen, X. Zhou, *CCS Chemistry* **2020**, *2*, 89-97.
- [148] D. A. Barawkar, R. K. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8505-8514.
- [149] J. Bijapur, S. Bergqvist, T. Brown, M. D. Keppler, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1802-1809.
- [150] A. S. K. Hashmi, J. Hofmann, S. Shi, A. Schütz, M. Rudolph, C. Lothschütz, M. Wieteck, M. Bührle, M. Wölfle, F. Rominger, *Eur. J. Chem.* **2013**, *19*, 382-389.

-
- [151] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538.
- [152] S. Nakamura, S. Ogasawara, S. Matuda, I. Saito, K. Fujimoto, *Molecules* **2012**, *17*, 163-178.
- [153] U. Reisacher, Karlsruhe Institut für Technologie (KIT) **2019**.
- [154] M. Nuzzolo, A. Grabulosa, A. M. Z. Slawin, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel, P. C. J. Kamer, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3229-3236.
- [155] P. Geng, E. List, F. Rönicke, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Chem.* **2022**, e202203156.
- [156] F.-G. Rong, A. H. Soloway, *Nucleosides and Nucleotides* **1994**, *13*, 2021-2034.
- [157] F. Liu, D. J. Austin, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2273-2276.
- [158] O. Larrañaga, A. de Cózar, *ChemistryOpen* **2019**, *8*, 49-57.
- [159] D. Englert, R. Matveeva, M. Sunbul, R. Wombacher, A. Jäschke, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 3480-3483.
- [160] P. Werther, J. S. Möhler, R. Wombacher, *Eur. J. Chem.* **2017**, *23*, 18216-18224.
- [161] Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13085-13088.
- [162] M. J. s. A. Sunbul, **2019**.
- [163] N. Naganna, N. Madhavan, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5870-5873.
- [164] M. K. Pallerla, J. M. Fox, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3593-3595.
- [165] B. R. Elling, J. K. Su, Y. Xia, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9097-9100.
- [166] N. Naganna, N. Madhavan, *RSC Advances* **2015**, *5*, 93027-93031.
- [167] S. S. Wang, J. P. Tam, B. S. H. Wang, R. B. Merripield, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *18*, 459-467.
- [168] Y. S. Vygodskii, A. S. Shaplov, E. I. Lozinskaya, O. A. Filippov, E. S. Shubina, R. Bandari, M. R. Buchmeiser, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7821-7830.
- [169] D. Jamroz, N. Fischer-Durand, M. Palusiak, S. Wojtulewski, S. Jarzyński, M. Stępniewska, M. Salmain, B. Rudolf, *Appl. Organomet. Chem.* **2020**, *34*, e5507.
- [170] A. C. Knall, M. Hollauf, C. Slugovc, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4763-4766.
- [171] Y. Lee, W. Cho, J. Sung, E. Kim, S. B. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 974-983.
- [172] R. D. Bach, O. Dmitrenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4444-4452.
- [173] P. v. R. Schleyer, J. E. Williams, K. Blanchard, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *92*, 2377-2386.
- [174] S. Zajonc, M. Ducci, *CHEMKON* **2013**, *20*, 9-13.
- [175] J. W. Pelley, in *Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition)* (Ed.: J. W. Pelley), W.B. Saunders, Philadelphia, **2012**, pp. 119-124.
- [176] M. Gupta, M. Singha, D. B. Rasale, Z. Zhou, S. Bhandari, S. Beasley, J. Sakr, S. M. Parker, R. C. Spitale, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 7183-7187.
- [177] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

9. Appendix

Publikationen

The Efficiency of Metabolic Labeling of DNA by Diels-Alder Reactions with Inverse Electron Demand: Correlation with the Reactivity of Modified 2'-Deoxyuridines

D. Ganz, P. Geng, H.-A. Wagenknecht, *ACS Chem. Biol.*, **2022**, submitted.

Labelling of DNA and RNA in the cellular environment by means of bioorthogonal cycloaddition chemistry

D. Ganz, D. Harijan, H.-A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1*, 86.

Postsynthetic Modifications of DNA and RNA by Means of Copper-Free Cycloadditions as Bioorthogonal Reactions

K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 990-1011.

Tagungen und Konferenzen

August 2019: Deutsche Nukleinsäurechemiegesellschaft e.V. (DNG) IX. Treffen in Saarbrücken (Posterbeitrag)

Oktober 2020: Deutsche Nukleinsäurechemiegesellschaft e.V. (DNG)
V. Doktorandenseminar in Bad Herrenalb (Posterbeitrag)

September 2021: Deutsche Nukleinsäurechemiegesellschaft e.V. (DNG) X. Treffen in Bad Herrenalb (Posterbeitrag)

Mai 2022: Keystone Symposia, Regulatory RNAs: From Bench to Bedside, Santa Fe, NM, USA (Posterbeitrag)

10. 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 02.November 2022

Dorothee Corinna Ganz