

**Synthese und Charakterisierung tetrazinmodifizierter Cyanin-  
Styryl-Fluorophore für die Markierung von Oligonukleotiden  
*in vivo* über bioorthogonale *iEDDA*-Reaktionen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte  
**Dissertation**  
von  
**M. Sc. Philipp Geng**  
aus Überlingen

**Karlsruhe, Juni 2023**

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht  
Korreferent: Prof. Dr. Joachim Podlech  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2023



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

*"Fanaticism consists of redoubling your efforts when you have forgotten your aim."*

- George Santayana -



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Theoretische Grundlagen .....	4
2.1. Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren.....	4
2.1.1. Transfektion.....	4
2.1.2. Metabolische Markierung .....	7
2.2. Bioorthogonale Reaktionen .....	10
2.2.1. „Click“-Reaktionen für bioorthogonale Reaktionen.....	12
2.2.2. <i>iEDDA</i> -Reaktionen .....	17
2.2.3. Tetrazine für bioorthogonale Reaktionen.....	21
2.2.4. Dienophile für bioorthogonale <i>iEDDA</i> -Reaktionen .....	23
2.3. Tetrazine in der Fluoreszenzmarkierung.....	27
3. Themenstellung .....	33
4. Synthese und Charakterisierung.....	35
4.1. Synthese der tetrazinmodifizierten Fluorophore .....	35
4.2. Synthese BCN-modifizierter Nukleoside .....	43
4.3. Synthese BCN-modifizierter Oligonukleotide .....	46
5. Spektroskopische Untersuchungen .....	50
5.1. Optische Spektroskopie mit BCN-modifizierten Nukleosiden .....	54
5.2. Optische Spektroskopie mit BCN-modifizierten Oligonukleotiden.....	65
6. Zellbiologische Untersuchungen.....	74
6.1. Zytotoxizität der tetrazinmodifizierten Fluorophore.....	74
6.2. Fluoreszenzmikroskopie.....	76
7. Zusammenfassung .....	82
8. Experimentalteil.....	85
8.1. Geräte, Materialien und Methoden.....	85

8.2.	Synthesevorschriften .....	91
8.3.	Oligonukleotide .....	121
8.4.	Optische Charakterisierung der Fluorophore .....	129
8.5.	<i>In vitro</i> „Click“-Experimente .....	130
8.6.	Zellexperimente .....	136
9.	Ergänzende Spektren .....	140
10.	Literaturverzeichnis .....	145
11.	Appendix .....	153
11.1.	Publikationsliste.....	153
11.2.	Konferenzen und Posterbeiträge .....	153

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Å	Ångström
A	Akzeptor, Adenosin, Absorption
ACN	Acetonitril
AMD	Phosphoramidit/Phosphonat
ATT	6-Aza-2-thiothymin
a.u.	Willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
Äq	Äquivalente
BARAC	Biarylazacyclooktinion
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BTTES	2-[4-((Bis[(1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-amino)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethylhydrogensulfat
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
ca.	circa
CyIQ	Cyanin-Indol-Chinolin
COL	CPG-Säule ( <i>column</i> )
CP_A/CP_B	Capping-Reagenzien
cU	2'-O-Propargyluridin
CuAAC	Kupfer(I)katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
D	Donor
d	Dublett
DA	Diels-Alder-Reaktion
Db	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan

DET	Dexter-Energietransfer
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DIBO	Dibenzocyclooctinol
DMA	Dimethylacetal
DMF	Dimethylformamid
DMF-DMA	Dimethylformamid-dimethylacetal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT-Cl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(d)NTP	(2'-Desoxy) ribonukleotidtriphosphat
DPTZ	3,6-Di-pyridyl-1,2,4,5-tetrazin
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
EDG	Elektronenschiebende Gruppe ( <i>electron donating group</i> )
ETDS	Energietransfer in einen dunklen Zustand ( <i>energy transfer into a dark state</i> )
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
EWG	Elektronenziehende Gruppe ( <i>electron withdrawing group</i> )
F	Fluoreszenz
FBS	Fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FRET	FÖRSTER-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
GAS	Argon (für Oligonukleotidkopplung)
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital ( <i>highest occupied molecular orbital</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HR	Hochauflösend ( <i>high resolution</i> )
IC	Interne Umwandlung ( <i>internal conversion</i> )

ICDS	Interne Umwandlung in einen dunkeln Zustand ( <i>internal conversion into a dark state</i> )
<i>iEDDA</i>	Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf ( <i>inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition</i> )
ISC	Interkombination ( <i>intersystem Crossing</i> )
<i>J</i>	Kopplungskonstante
L	Liter
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital ( <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> )
M	molar
m	Multipllett
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MCP	Methylcyclopropen
MeCN	Acetonitril
mg	Miligramm
MHz	Megahertz
Min.	Minuten
mL	Mililiter
mM	milimolar
mmol	Milimol
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
M_W	Lösungsmittelabfall
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ns	Nanosekunde
OXI	Oxidationslösung ( <i>oxidizer</i> )
p	Pentett
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösungen ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer

pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
QPhos	1,2,3,4,5-Pentaphenyl-1'-(di- <i>tert</i> -butylphosphino)-ferrocen
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Sek.	Sekunden
SFTz	Seoul-Fluor-Tetrazin
Smp	Schmelzpunkt
S <sub>n</sub>	Singulett-Zustand n
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
SPAAC	Spannungsgetriebene Azid-Alkin Cycloaddition ( <i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i> )
SPANC	Spannungsgetriebene Alkyn-Nitron-Cycloaddition ( <i>strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition</i> )
t	Triplett
T	Thymidin
T <sub>1</sub>	erster elektronisch angeregter Triplettzustand
TBET	Übertragung von Bindungsenergie ( <i>Through bond energy transfer</i> )
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure
TCO	Trans-Cyclooctan
TET	Tetrazolaktivator
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TO	Thiazolorange
TREAT-HF	Triethylamin-Trihydrofluorid

TRM	Tritylmonitor
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbares Licht
WTH	Wartezeit
z.B.	zum Beispiel
$\delta$	chemische Verschiebung
$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$	STOKES-Verschiebung
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
$\lambda_{\text{em.}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{exc.}}$	Anregungswellenlänge
$\phi_{\text{F}}$	Fluoreszenzquanten-ausbeute
_I_	Co-Oxidationslösung für Phosphonate
_L_	Adamantoylcarbonylchloridaktivator für Phosphonate
_U_	Oxidationslösung für Phosphonate

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

[a] Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

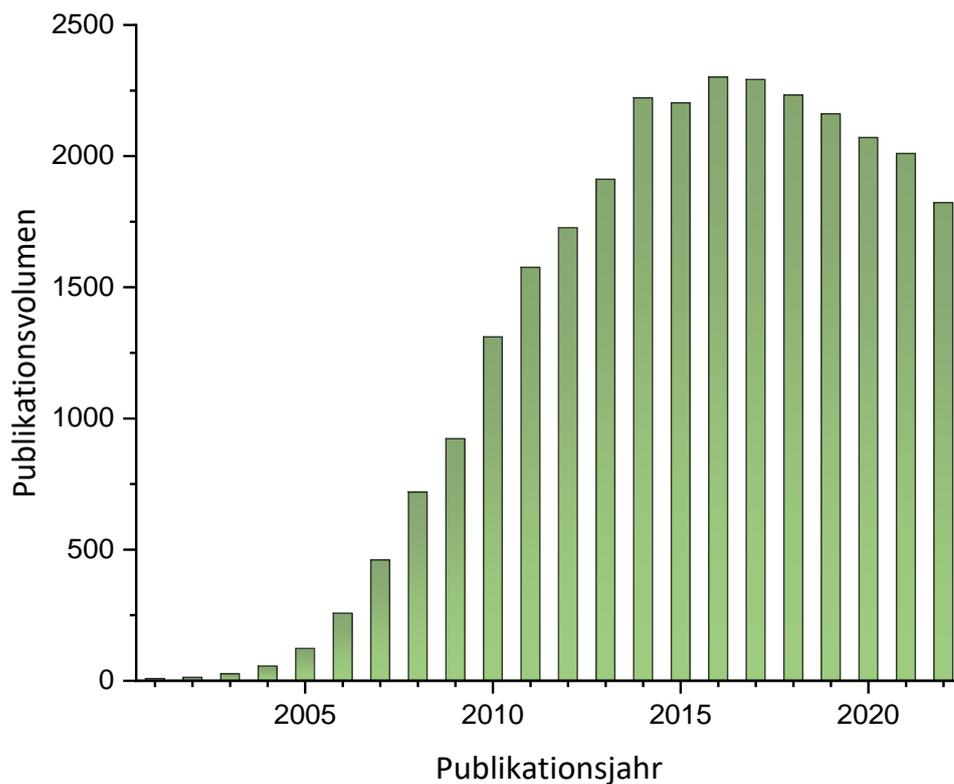
[b] *IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNO)*

[c] S. E. Braslavsky, *Glossary of Terms used in Photochemistry*, 3. Auflage, *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79, 293

# 1. Einleitung

Durch eine immer bessere medizinische Versorgung, eine gesundheitlich bewusstere Ernährung sowie die Reduktion von Giftstoffen in der Umwelt wird die Weltbevölkerung im Durchschnitt immer älter.<sup>[1]</sup> So stieg die weltweite durchschnittliche Lebenserwartung allein in den letzten 20 Jahren von 67 auf 73 Jahre an.<sup>[2]</sup> Dabei steigt mit zunehmendem Alter aber auch das Risiko, an Krebs oder Demenz zu erkranken, exponentiell an. Gleichzeitig ist jedoch ein prozentualer Rückgang der Krebssterblichkeit festzustellen.<sup>[3]</sup> Um die Mortalitätsrate von Krebs weiter zu senken, rückt die Bekämpfung dieser Krankheit immer weiter in den Fokus medizinischer Forschung.<sup>[4-7]</sup> Dabei ist insbesondere die anhaltende Entwicklung im Bereich der Krebsdiagnostik, der Therapie und des Screenings essentiell. Hierbei ist es für die medizinische Forschung vor allem von Interesse, die Prozesse abnormaler Zellen detektieren zu können und so Rückschlüsse auf die in Frage kommende Behandlungen zu ziehen.

Um solche Prozesse aufzuklären, haben sich in den letzten Jahren besonders bildgebende Verfahren mit fluoreszenten Sonden hervor getan. Diese haben zu bisher verwendeten Radionukliden den Vorteil, dass diese preiswerter sind und die zu detektierende Zelle keiner Strahlenbelastung ausgesetzt sind. Eine der bedeutendsten Methoden ist die Proteinmarkierung mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP).<sup>[8]</sup> Dieses Protein kann mit dem zu untersuchenden Protein als Fusionsprotein genetisch codiert und exprimiert werden, um so Informationen zur Verteilung oder Anordnung in lebenden Zellen zu gewinnen. Allerdings eignet sich diese Methode nicht für die Untersuchung von Glykanen, Lipiden oder Nukleinsäuren in lebenden Systemen. Stattdessen stellt die bioorthogonale „Click“-Chemie zur Fluoreszenzmarkierung, welche in den letzten Jahren an immer mehr Wert gewonnen hat, hierfür eine vielversprechende Alternative dar.<sup>[9]</sup> Der Begriff der „Click“-Chemie wurde 2001 von K. BARRY SHARPLESS *et al.* geprägt und beschreibt chemische Reaktionen, bei denen Moleküle schnell und zielgerichtet aus kleineren, modularen Bausteinen synthetisiert werden.<sup>[10]</sup>



**Abbildung 1:** Zahl der Publikationen zur „Click“-Chemie in den Jahren 2001 bis 2022.<sup>[11]</sup>

Die erhaltenen Erkenntnisse und Möglichkeiten der „Click“-Chemie waren dabei so bedeutend, dass die Forscher CAROLYN BERTOZZI, MORTEN MELDAL sowie K. BARRY SHARPLESS 2022 für ihre Arbeit an der Entwicklung der „Click“-Chemie mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurden.<sup>[12]</sup> Dabei ist die Relevanz der „Click“-Chemie an der seit 2003 exponentiell gestiegenen Zahl an Publikationen zu erkennen, welche im Jahr 2016 ihren Höhepunkt erreichten (Abbildung 1).<sup>[11]</sup>

Trotz aller bisherigen Fortschritte auf dem Gebiet der „Click“-Chemie stellen große Signal-zu-Rausch-Verhältnisse, geringe Photostabilitäten der fluoreszenten Sonden sowie zelltoxische Additive wie Kupfer bei bioorthogonalen „Click“-Reaktionen bei der fluoreszenten Bildgebung von Zellen eine große Herausforderung dar.<sup>[13-15]</sup> Hier steht besonders das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Mittelpunkt, da die organischen Fluorophore im Überschuss direkt an das zu untersuchende Zielmolekül angebunden werden, um einen effizienten Umsatz der Reaktion zu gewährleisten. Dabei entsteht

durch nicht umgesetzte Farbstoffmoleküle eine starke Hintergrundfluoreszenz, welche die Messung erschwert. Es ist dabei üblich, die Hintergrundfluoreszenz durch mehrmaliges Herauswaschen des ungebundenen Fluorophors zu verringern. Allerdings ist dies bei vielen, kleinen Zellproben nur sehr schwer umsetzbar und *in vivo* sogar unmöglich.<sup>[16]</sup>

Um dieses Problem zu umgehen, haben sich in den letzten Jahren besonders fluorogene Farbstoffe hervor getan. Diese Art von Farbstoffen zeichnet sich dadurch aus, dass sie durch eine eingebrachte funktionelle Gruppe eine deutlich verringerte Fluoreszenz aufweist. Solche funktionellen Gruppen werden allgemein als Fluoreszenzlöcher bezeichnet.<sup>[17]</sup> Durch eine bioorthogonale „Click“-Reaktion mit dem Zielmolekül wird anschließend die fluoreszenzlöschende Gruppe verändert und so die Fluoreszenz des Farbstoffes hergestellt. In diesem Zusammenhang ist die Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (*iEDDA*) als „Click“-Reaktion, unter Nutzung von tetrazinmodifizierten Farbstoffen, von großem Interesse für die Forschung geworden.<sup>[18]</sup>

Bioorthogonale Reaktionen mit tetrazinmodifizierten Farbstoffen haben hierbei nicht nur den Vorteil, ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu ermöglichen, sondern sie gehören darüber hinaus auch zu den schnellsten und effizientesten bekannten „Click“-Reaktionen. Zusätzlich kommt eine *iEDDA*-Reaktion ohne zusätzliche Additive wie zelltoxischem Kupfer aus und ermöglicht so die Fluoreszenzmarkierung in lebendem Gewebe. Werden diese Tetrazine mit einem photostabilen, nicht-toxischem Farbstoff, wie solchen aus der Cyanin-Styryl-Klasse, kombiniert,<sup>[19]</sup> wird ein leistungsstarkes Werkzeug zur Aufklärung von Zellprozessen in lebenden Zellen erhalten.

Die hier vorliegende Arbeit soll sich mit der Synthese und Charakterisierung solcher tetrazinmodifizierter Cyanin-Styryl-Farbstoffe befassen, um eine Anwendung über bioorthogonale „Click“-Reaktionen in lebenden Zellen und unter waschfreien Bedingungen zu ermöglichen.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren

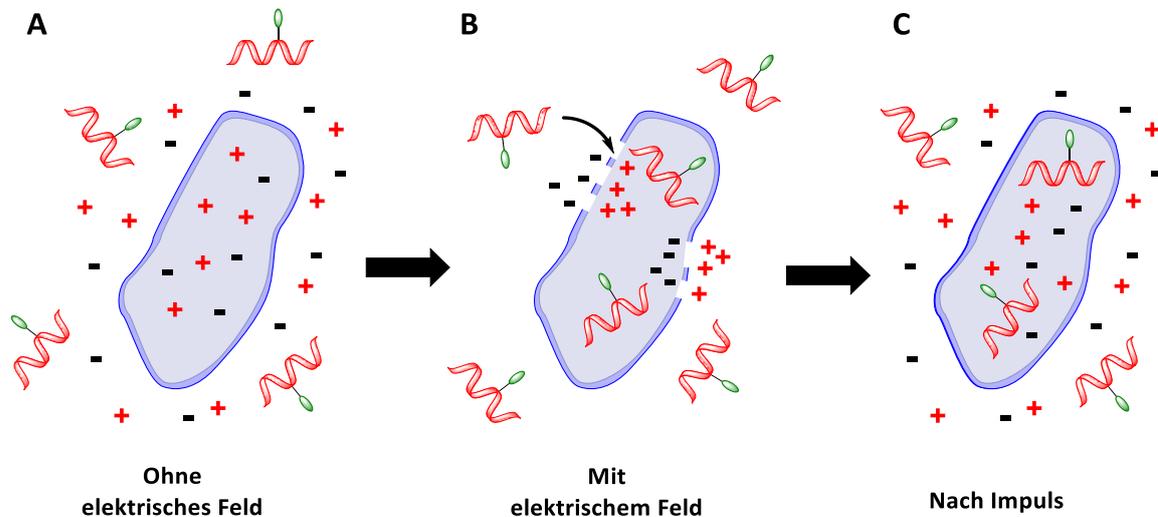
Die Markierung von Nukleinsäuren ist eine viel genutzte Methode, um die Funktion von Nukleinsäuren zu verstehen. Die dabei zugrundeliegenden Konzepte zur Markierung bilden hierbei die Voraussetzung für die Grundlagenforschung, Biotechnologie und medizinisch-diagnostischen Anwendungen. Insbesondere in der Grundlagenforschung werden fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren verwendet, um zellinterne Vorgänge wie die Translation, Transkription und Replikation aufzuklären.<sup>[20-24]</sup> Der Vorteil dieser Methoden liegt darin, dass sich über Super-Resolutions-Fluoreszenzmikroskopie sehr genaue raumzeitliche Informationen über die Prozesse in einer lebenden Zellen gewinnen lassen.<sup>[25-27]</sup> Hierbei gehören vor allem die Transfektion und die metabolische Markierung zu den bekanntesten Methoden zur Markierung von Nukleinsäuren.

#### 2.1.1. Transfektion

Der Begriff Transfektion beschreibt in der Biologie das Einführen von genetischem, zellfremdem Material in eukaryotische Zellen, wobei zwischen der stabilen und transienten Transfektion unterschieden wird.<sup>[28,29]</sup> Während bei der stabilen Transfektion das Fremdmaterial dauerhaft in das Genom inkorporiert wird, ist in der transienten Transfektion das Material nur für eine begrenzte Zeit in die Wirtszelle eingebracht. Um genetisches Material in eukaryotische Zellen zu transfizieren, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden.<sup>[30]</sup> Im Nachfolgenden werden die Elektroporese und Lipofektion, zwei oft verwendete Methoden zur Transfektion von Nukleinsäuren vorgestellt, um deren zugrundeliegenden Prinzipien zu verdeutlichen.

Bei der Elektroporese wird vorübergehend die Barrierefunktion der Plasmamembran übergangen, indem die Zellen einem Spannungsimpuls ausgesetzt werden. Dabei induziert das elektrische Feld eine Spannung durch die Zellmembran, wodurch sich diese öffnet und geladenes, extrazelluläres Material in das Zytoplasma der Zelle eingebracht werden kann. Nach dem Impuls schließt sich die Zellmembran durch regenerative Prozesse wieder (Abbildung 2).<sup>[31-33]</sup> Dies führt zu einer hohen Transfektionseffizienz und Genexpressionsrate in prämitotischen Zellen.<sup>[30,34,35]</sup> Zusätzlich ist die entwickelte Methode schnell und einfach durchführbar und erfordert nur geringe Anpassungen auf

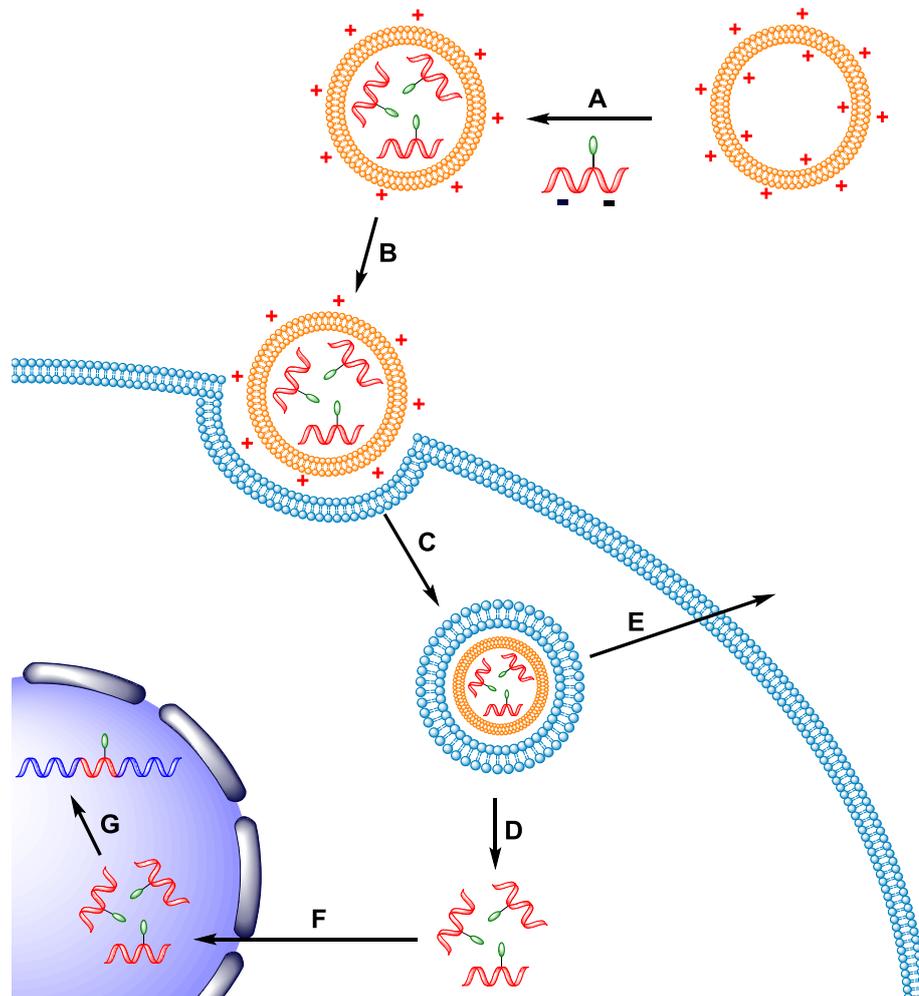
die jeweilig verwendete Zellkultur. Aufgrund der harschen Bedingungen beim Anlegen der Spannung und dem dadurch einhergehenden Verlust intrazellulärer Moleküle, geht dies oft mit einer Verringerung der Zellviabilität einher.<sup>[36-39]</sup> Daher funktioniert die Elektroporation im Allgemeinen nur mit robusteren Zellen, wie z.B. Krebszellen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Elektroporationsprozesses. **(A)** Vor dem Anlegen des elektrischen Feldes befindet sich das zu transfizierende Material außerhalb der Zelle. **(B)** Ein angelegtes elektrisches Feld induziert eine Spannung durch die Zellmembran, wodurch diese für das zu transfizierende Material passierbar wird. **(C)** Nach dem Impuls schließt sich die Zellmembran wieder, mit dem transfizierten Material im Inneren der Zelle.

Dagegen ist die Lipofektion eine chemische Transfektionsmethode, bei welcher kationische Lipidmoleküle zur Transfektion von zellfremdem Material verwendet werden. Die Lipidmoleküle bilden unilamellare Liposomen, welche mit negativ geladenen markierten Nukleinsäuren interagieren und dabei Lipidkomplexe bilden. Diese Komplexe ermöglichen dabei die Fusion mit der negativ geladenen Plasmamembran der zu transfizierenden Zelle. Anschließend kann die Nukleinsäure, durch Auflösung des Lipidkomplexes, in das Zytosol freigesetzt werden. Die markierte Nukleinsäure migriert anschließend in den Nukleus und wird dort transkribiert (Abbildung 3). Aktuellere Generationen von Lipofektionsreagenzien verwenden nicht-liposomale Lipide, um einen Komplex mit den Nukleinsäuren herzustellen. Dabei wird der Komplex direkt endozytiert und in das Zytosol freigesetzt. Nicht-liposomale Lipide haben eine hohe Transfektionseffizienz bei einer Vielzahl von Zelltypen, wie z.B. Kleinhirnkörnerzellen.<sup>[40-42]</sup> Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie oft in Gegenwart von Zellserum

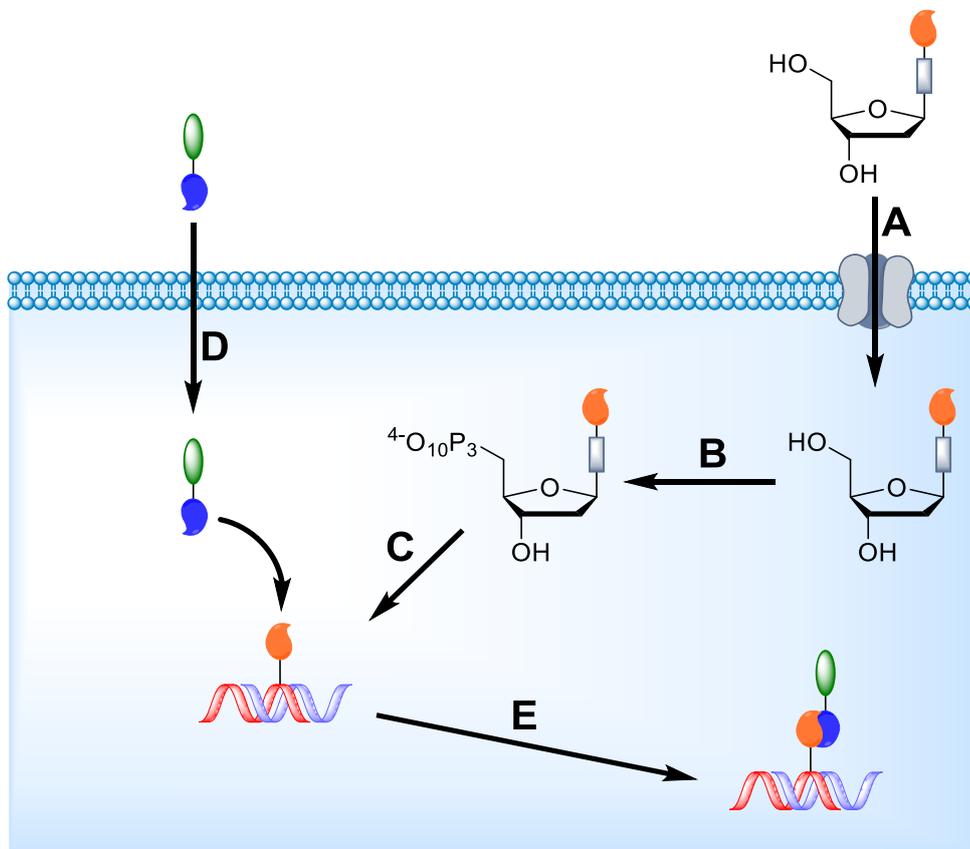
durchgeführt wird, was zu einem verbesserten Zellwachstum und einer höheren Zellviabilität führt, indem zytotoxische Effekte durch die Transfektionsreagenzien, welche bestimmte Gene unspezifisch aktivieren oder deaktivieren, minimiert werden.<sup>[43]</sup> Weitere Vorteile sind die technisch einfache Umsetzung der Methode, die hohe Reproduzierbarkeit und der geringe Optimierungsaufwand.<sup>[30]</sup> Die Lipofektion eignet sich sowohl für die transiente als auch für die stabile Transfektion in lebenden Zellen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Lipofektion. **(A)** Bildung des Lipoplexes durch positiv geladene unilamellare Liposomen und der negativ geladenen markierten Nukleinsäure. **(B)** Fusion mit der negativ geladenen Plasmamembran der Zelle. **(C)** Ein, nach Durchschreiten der Membran, in ein Endosom eingeschlossener Lipoplex. **(D)** Freisetzung der markierten Nukleinsäure nach endosomaler Flucht. **(E)** Ausstoß des Lipoplexes bei nicht erfolgreicher endosomaler Flucht. **(F)** Migration der markierten Nukleinsäure in den Nucleus. **(G)** Transkription der markierten Nukleinsäure.

## 2.1.2. Metabolische Markierung

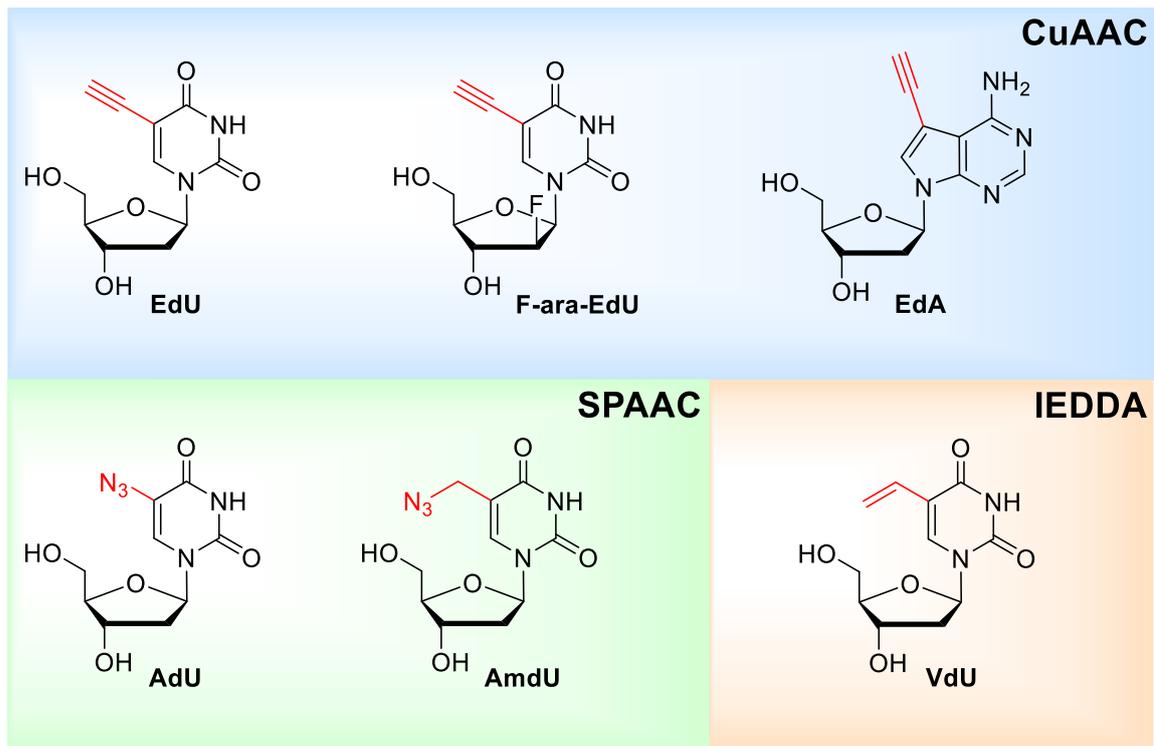
Bei der metabolischen Markierung von Nukleinsäuren werden chemisch modifizierte, natürliche Nucleoside verwendet, welche über den „Salvage-Pathway“ in (2′-Desoxy)-ribonucleosidtriphosphate ((d)NTPs) verarbeitet werden, um von zelleigenen DNA- oder RNA-Polymerasen verwendet werden zu können (Abbildung 4).<sup>[44]</sup> Ein wichtiger Faktor dieser Methode ist, dass die modifizierten Bestandteile der Nucleoside klein genug sind, um den Stoffwechsel nicht zu beeinträchtigen. Dadurch ist es möglich, dynamische Stoffwechselprozesse *in vivo* zu beobachten und Aufschluss über die daran beteiligten Moleküle zu erhalten.<sup>[45-47]</sup> Somit können Mechanismen, wie die Replikation der DNA, der Zellzyklus und die Regeneration von Gewebe, in ihren Vorgängen wesentlich besser untersucht werden.<sup>[48,49]</sup>



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung einer metabolischen Markierung von Nucleinsäuren über den „Salvage Pathway“ durch „Click“-Reaktion. **(A)** Das modifizierte Nucleosid wird über einen Ionenkanal durch die Zellmembran transportiert. **(B)** Aufbau der dNTPs durch Nucleosid Kinase. **(C)** Inkorporation der dNTPs durch Polymerase in die naszierende DNA. **(D)** Einbringung der modifizierten Fluorophore entweder durch Transfektion oder intrinsischer Zellpermeabilität. **(E)** Detektion der markierten DNA durch „Click“-Reaktion.

Da die Größe der modifizierten Nucleoside von entscheidender Bedeutung ist, ist es oftmals nicht möglich, mit bereits mit fluoreszenten Sonden modifizierten Nucleosiden einen metabolischen Einbau zu realisieren. Daher haben sich modifizierte Nucleoside etabliert, welche mit Reportern postsynthetisch über „Click“-Reaktionen umgesetzt werden können, um auf diese Weise eine Fluoreszenzmarkierung zu erreichen. Dafür haben sich in den letzten Jahren eine Vielzahl an Verbindungen für die Markierung von DNA und RNA hervorgetan (Abbildung 5). Eine der am häufigsten verwendeten modifizierten Nucleoside für die Markierung von DNA ist das Thymidin-Analogon 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (**EdU**), da es leicht von Zellen aufgenommen und zum Triphosphat metabolisiert werden kann. Dies führt zu einem effizienten Einbau in die DNA.<sup>[50,51]</sup> Anschließend kann eine Visualisierung der DNA beispielsweise durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) unter Verwendung azidfunktionalisierter Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen.

Obwohl **EdU** für die metabolische Markierung von Nucleinsäuren weit verbreitet ist, weist diese Verbindung auch Nachteile auf, die auf ihre Zytotoxizität bei Konzentrationen im mikromolaren (mM) Bereich zurückzuführen sind.<sup>[52,53]</sup> Als weniger zytotoxische Alternative wurde das Arabinofuranosyl-Derivat 2'-Desoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridin (**Fara-EdU**, Abbildung 5) entwickelt.<sup>[50]</sup> Diese Verbindung erwies sich nicht nur als weniger toxisch als das **EdU**-Analogon, sondern wurde auch erfolgreich in Zebrafischproben und bei Zellexperimenten angewendet, bei denen ein langfristiges Überleben der Zellen vorausgesetzt wird.<sup>[50]</sup> Neben den Pyrimidin-Analoga gibt es auch Beispiele purinbasierter ethynylmodifizierter Nucleoside. So zeigte 7-Deaza-7-ethynyl-2'-desoxyadenosin (**EdA**, Abbildung 5) eine selektive metabolische Markierung in Zebrafischembryonen, während 7-Deaza-7-ethynyl-2'-desoxyguanosin (**EdG**) keine positiven Ergebnisse erzielen konnte.<sup>[54]</sup>



**Abbildung 5:** Auswahl der zur Durchführung von metabolischer Markierung erprobter modifizierter Nucleoside. Ethynyl-modifizierte Nucleoside für CuAAC-Reaktionen (**Blau**). Azid-modifizierte Uridine für die Anwendung in kupferfreien SPAAC-Reaktionen (**Grün**). Vinyl-modifiziertes Uridin für schnelle *iEDDA*-Reaktionen (**Orange**).

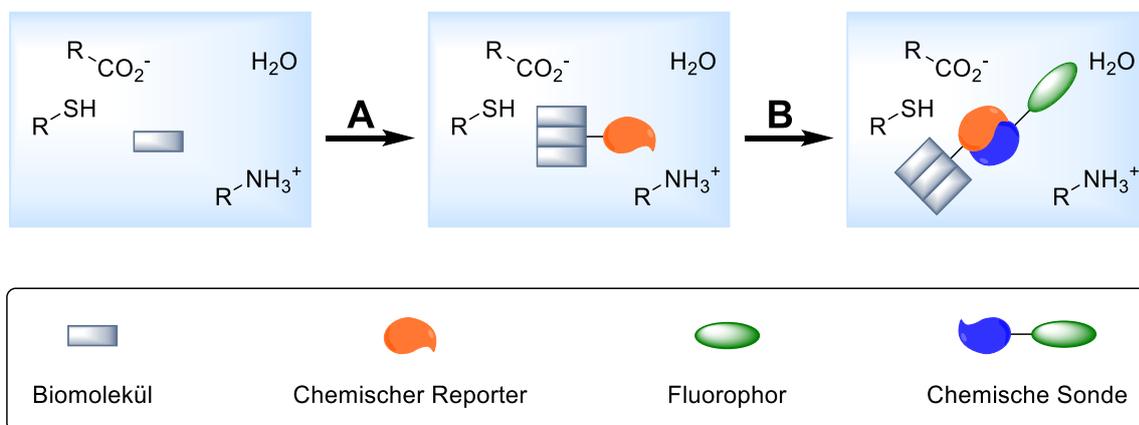
Eine alternative Modifikation von Nucleosiden stellen Azide dar. Diese können über eine kupferfreie, ringspannungsgetriebene Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC) mit entsprechend modifizierten Fluorophoren reagieren. Ein großer Nachteil aromatischer azidmodifizierter Nucleoside ist allerdings deren begrenzte Stabilität in wässrigen Medien. So wurden beispielsweise mit 5-Azido-2'-desoxyuridin (**AdU**, Abbildung 5) nur sehr schwache Fluoreszenzintensitäten bei zellulärmarkierter DNA gemessen.<sup>[55,56]</sup> Durch die Verwendung eines 5-(Azidomethyl)-2'-desoxyuridins (**AmdU**, Abbildung 5) konnte die Stabilität in wässrigen Medien deutlich erhöht werden, was zu einer verbesserten Markierung von DNA nach SPAAC mit einem Fluorophor führt.<sup>[56]</sup> Durch **AmdU** war es LUEDTKE *et al.* möglich, DNA in permeabilisierten HeLa-Zellen mit einem Bicyclononin-Fluorophor (BCN-Fluorophor) zu visualisieren.<sup>[56]</sup>

Durch Weiterentwicklung der vorliegenden Konzepte wurde auch 5-Vinyl-2'-desoxyuridin (**VdU**, Abbildung 5) zur Markierung von DNA verwendet.<sup>[57]</sup> Analog zum etablierten **EdU** ist die Vinylmodifikation des Nucleosids klein genug, um eine effiziente Zellaufnahme und

zusätzlich eine Akzeptanz durch zelleigene Enzyme zu ermöglichen. Dabei erwies sich **VdU** durch seine effiziente Inkorporationsrate und geringe Zytotoxizität als geeignet für die metabolische Markierung von Nucleinsäuren. Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Markierung von modifizierten Nucleosiden durch „Click“-Reaktionen *in vivo* ist eine hohe Selektivität der Reaktion. Dabei stellen komplexe zelluläre Systeme und deren spezifische intrazellulären Bedingungen eine der größten Herausforderung beim Übergang von Experimenten *in vitro* auf *in vivo* dar.<sup>[54]</sup> Ein mögliches Instrument der Forschung, um solche Versuchsanordnungen übertragen zu können, ist die bioorthogonale Chemie.

## 2.2. Bioorthogonale Reaktionen

Unter bioorthogonalen Reaktionen werden chemische Reaktionen verstanden, in welchen zwei funktionelle Gruppen selektiv, schnell und ohne Nebenreaktionen miteinander reagieren, ohne das System, in welchem sie sich befinden, zu beeinflussen.<sup>[58]</sup> Wird dieses Konzept zur chemoselektiven Markierung von modifizierten Zellbausteinen angewendet, wird in diesem Zusammenhang auch von bioorthogonalen Markierungen gesprochen. Der Begriff der bioorthogonalen Markierung wurde von BERTOZZI *et al.* durch die Markierung von azidhaltigen Glykoproteinen mit Phosphinsonden über Staudinger-Ligation geprägt und gewann seitdem zunehmend an Bedeutung.<sup>[44,59,60]</sup> In den meisten Fällen handelt es sich dabei um einen zweistufigen Prozess (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung einer zweistufigen bioorthogonalen Markierung. **(A)** Inkorporation des an ein Biomolekül gebundenen chemischen Reporters *in vivo* **(B)** Bioorthogonale Markierung zwischen dem Reporter und der eingebrachten chemischen Sonde.<sup>[61]</sup>

Im ersten Schritt der bioorthogonalen Markierung wird ein an ein Biomolekül geknüpfter, chemischer Reporter in eine Zelle eingebaut. Der chemische Reporter besitzt dabei in der Regel eine funktionelle Gruppe, welche nicht natürlich in der zu untersuchenden Umgebung vorkommt. Somit sind diese in der Lage Reaktionen einzugehen, ohne, dass es zu ungewollten Nebenreaktionen mit den Funktionalitäten im biologischen System kommt.<sup>[62]</sup> Der Einbau in die Zelle geschieht dabei entweder über metabolische oder chemische Methoden (siehe Kapitel 2.1.2).<sup>[63]</sup> Nach dem Einbau des chemischen Reporters in das zu untersuchende Biomolekül reagiert dieser in einer bioorthogonalen Reaktion mit der komplementären Einheit einer extern eingeführten chemischen Sonde. So ist es möglich, Biomoleküle gezielt mit einer spezifischen Sonde zu modifizieren.<sup>[64-66]</sup> Dadurch können beispielsweise Biotinylierungen<sup>[67]</sup>, Glykosylierungen<sup>[68]</sup>, Lipidierungen<sup>[69]</sup> effizient und einfach durchgeführt werden. Eine besondere Rolle bei der Markierung von Biomolekülen spielt dabei die Fluoreszenzmarkierung, welche in den letzten Jahren durch die Entwicklung der Super-Resolutions-Fluoreszenzmikroskopie deutlich an Bedeutung gewonnen hat.<sup>[70]</sup>

Neben der chemischen Selektivität müssen für eine bioorthogonale Fluoreszenzmarkierung weitere Kriterien erfüllt werden. Für eine Anwendung in der Zelle erfordert es zusätzlich eine effiziente und schnelle Reaktion beider Reaktionspartner. Außerdem muss die Stabilität des Produktes unter physiologischen Bedingungen in wässrigem Milieu bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,0 bis 7,4 gewährleistet sein. Weiterhin darf weder von den Produkten noch den Edukten eine Toxizität für die Zelle ausgehen.

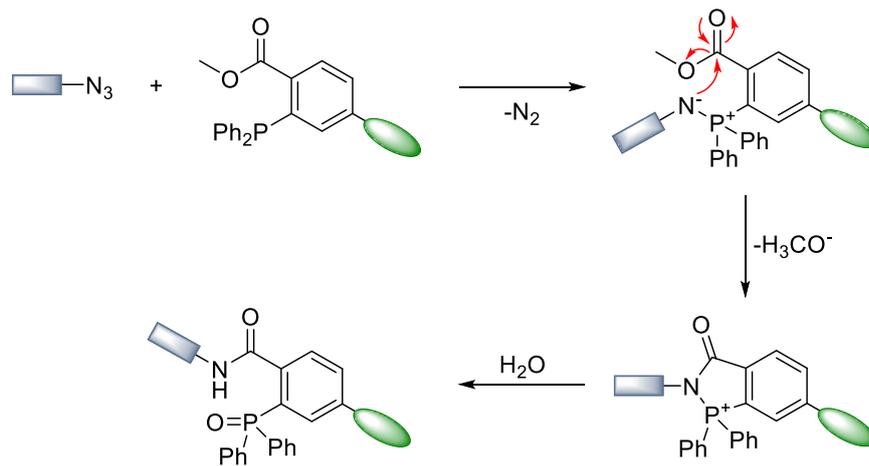
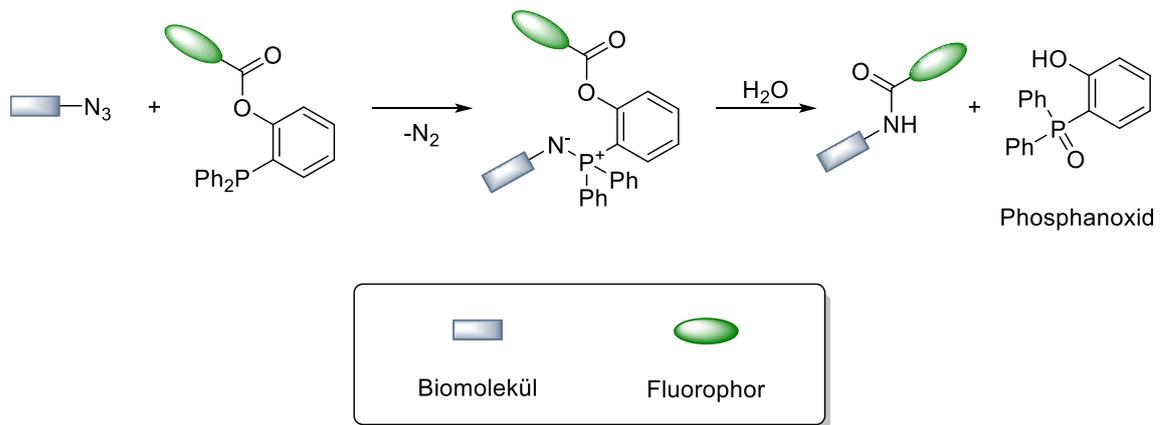
Ein weiteres Kriterium ergibt sich durch die geringen Konzentrationen der Biomoleküle in der Zelle. Da eine bioorthogonale Reaktion allgemein als eine Reaktion zweiter Ordnung beschrieben werden kann, ist die Ausbeute proportional zur Geschwindigkeitskonstanten und Konzentration der chemischen Sonde.<sup>[65]</sup> Jedoch kann eine zu hohe Konzentration an eingebrachten Reportern oder Sonden zu Nebenwirkungen in der Zellphysiologie führen und sollte deshalb vermieden werden.<sup>[65]</sup> Aufgrund der geringen eingesetzten Mengen an Edukt, sollten für eine effektive Markierung die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung für die bioorthogonale Reaktion zwischen  $1,0 \cdot 10^{-3}$  und  $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  liegen.<sup>[65,71,72]</sup> In den vergangenen Jahren konnten sich weitere Reaktionen, vor allem das

durch von K. BARRY SHARPLESS mitbegründete Prinzip der „Click“-Reaktionen durchsetzen, welche eine Vielzahl der angesprochenen Kriterien erfüllen.<sup>[73]</sup> Eine Auswahl an „Click“-Reaktionen soll im nachfolgenden Kapiteln vorgestellt werden.<sup>[10]</sup>

### 2.2.1. „Click“-Reaktionen für bioorthogonale Reaktionen

Eine der ersten entwickelten bioorthogonalen Reaktionen stellt die von E. SAXON und C. BERTOZZI angewendete Staudinger-Ligation dar.<sup>[60]</sup> Hierbei konnten in Glykokonjugaten eingebaute Azide mit Triarylphosphinen umgesetzt werden, wobei stabile Zelloberflächenaddukte erzeugt werden konnten. Dabei reagiert das, an das Biomolekül angebrachte, Azid in einer Staudinger-Ligation mit einem markierten Triarylphosphin und bildet unter Stickstoff-Extrusion und wässriger Aufarbeitung ein über eine Amidbindung verknüpftes Addukt (Abbildung 7A). In einer weiterentwickelten Variante der Staudinger-Ligation wird die Phosphanoxeinheit während des Hydrolyseschritts abgespalten, wobei von einer spurlosen Staudinger-Ligation gesprochen wird (Abbildung 7B).<sup>[74]</sup>

Obwohl Staudinger-Ligationen eine hervorragende Biokompatibilität aufweisen, sind die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion mit Werten im Bereich von  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  vergleichsweise langsam.<sup>[75]</sup> Des Weiteren gelten die verwendeten Phosphane als äußerst oxidationsempfindlich, weswegen diese in höheren Konzentration eingesetzt werden müssen.<sup>[66]</sup>

**A****B**

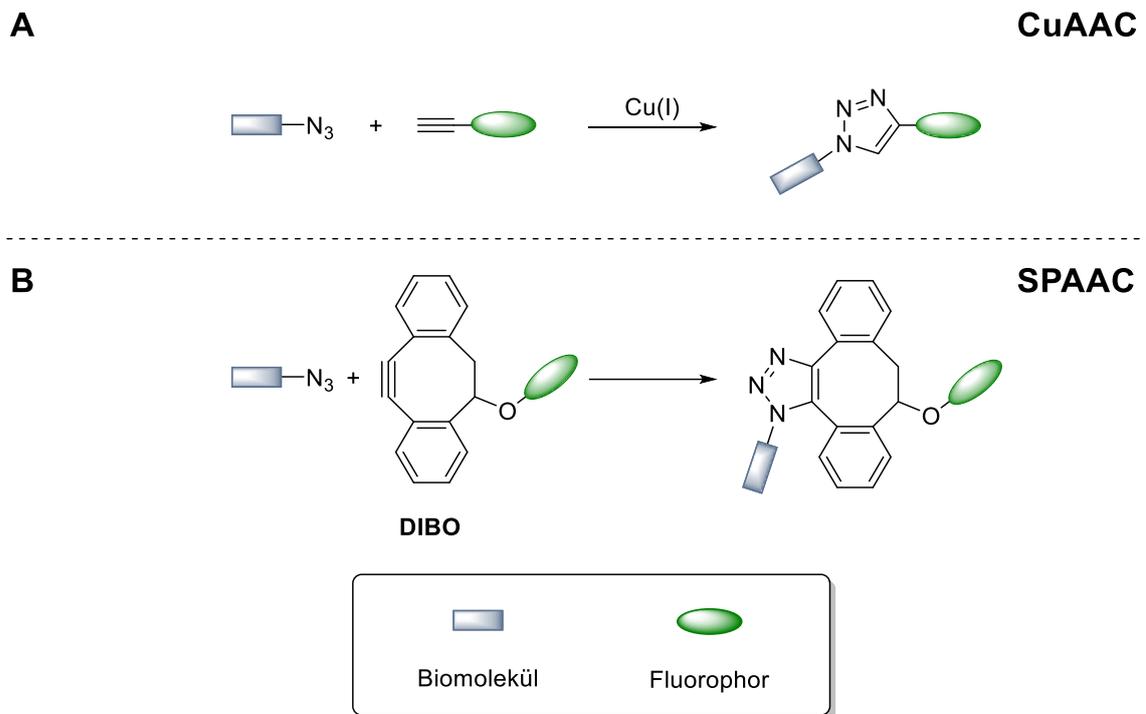
**Abbildung 7:** Reaktionsschema einer bioorthogonalen Staudinger Reaktion. **(A)** Klassische Staudinger-Ligation bei der die Phosphanoxideinheit am „Click“-Produkt verbleibt. **(B)** Spurlose Staudinger-Ligation unter Abspaltung der Phosphanoxideinheit während der Hydrolyse.

Trotz der geringen Geschwindigkeitskonstanten von Aziden in Staudinger-Ligationen, ist deren Nutzung für bioorthogonale „Click“-Reaktionen in biochemischen Anwendungen von Vorteil. Grund hierfür ist, dass Azidgruppen praktisch nicht in biologischen Molekülen vorkommen und trotz hoher Reaktivität chemoselektive Reaktionen eingehen. Zusätzlich sind Azidfunktionalitäten sehr klein und vergrößern somit das zu modifizierende Biomolekül kaum.<sup>[76]</sup> So finden azidmodifizierte Moleküle in der von K.B. SHARPLES *et al.* und M. MELDAL *et al.* unabhängig voneinander entdeckten kupferkatalysierten [3 + 2]-Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) ebenfalls Anwendung in der bioorthogonalen „Click“-Reaktion. Bei diesem Reaktionstypus bilden Azide mit Alkinen über Ringschlussreaktion stabile Triazole aus (Abbildung 8).<sup>[77,78]</sup> Diese Reaktion basiert auf der 1,3-dipolaren

Cycloadditionen von Aziden mit Alkinen nach HUISGEN, welche üblicherweise bei Temperaturen von 70 °C durchgeführt wird. Dadurch ist die 1,3-dipolare Cycloadditionen für Experimente *in vivo* ungeeignet.<sup>[78-80]</sup> Allerdings konnte durch die katalytische Zugabe von Kupfer(I)-Salzen die Geschwindigkeitskonstante um bis zu acht Größenordnungen erhöht werden, wodurch die Reaktion auch bei niedrigeren Temperatur erfolgreich durchgeführt werden konnte.<sup>[66]</sup> Ein Grund für die Reaktivitätssteigerung findet sich im Mechanismus der Reaktion: Durch die Bildung eines Kupferacetylids wird das terminale Alkin aktiviert. Dieses bildet mit dem Azid in der Folge einen sechsgliedrigen Cu(III)-Metallzyklus mit geringerer Energiebarriere als die katalysatorfreie Reaktion aus, bevor sich das Cycloadditionsprodukt bildet.<sup>[80]</sup>

Übliche Geschwindigkeitskonstanten der CuAAC liegen somit bei Werten um  $1,0 \cdot 10^1$  bis  $1,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , wodurch diese Reaktionen eine um das  $10^3$  bis  $10^4$ -fach gesteigerte Reaktivität gegenüber der Staudinger-Ligation besitzen.<sup>[81]</sup> Neben der erhöhten Kinetik sind vor allem die verbesserte Chemo- und Regioselektivität sowie die Stabilität der Reaktanden gegenüber wässrigen Medien weitere Vorteile der CuAAC.<sup>[82]</sup> Trotz allem ist ein entscheidender Nachteil dieser „Click“-Reaktionen die Zelltoxizität des benötigten Kupferkatalysators, der die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle katalysiert.<sup>[83]</sup> Durch wasserlösliche Liganden wie beispielsweise 2-[4-((Bis[(1-*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-amino)-methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]ethylhydrogensulfat (BTES) ist es allerdings möglich, den Kupfer(I)-Katalysator zu komplexieren. Auf diese Weise war es Wu *et al.* möglich, Abbildungen der Glykanbiosynthese während der frühen Entwicklung des Zebrafisches zu erstellen.<sup>[84]</sup>

Neben der CuAAC entdeckte BERTOZZI *et al.* mit der spannungsgetriebenen Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC) einen neuartigen Reaktionstypus, welcher sich die Ringspannung cyclischer Alkine zunutze macht und so komplett ohne einen Kupferkatalysator auskommt (Abbildung 8).<sup>[85]</sup> Durch die parallele Entwicklung reaktiver Cyclooctinverbindungen, wie beispielsweise Dibenzocyclooctinol (DIBO), Bicyclo[6.1.0]non-4-in (BCN) und Biarylazacyclooctinon (BARAC) konnten Geschwindigkeitskonstanten von  $1,0 \cdot 10^{-2}$  bis  $1,0 \cdot 10^0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  erreicht werden.<sup>[66,86]</sup>

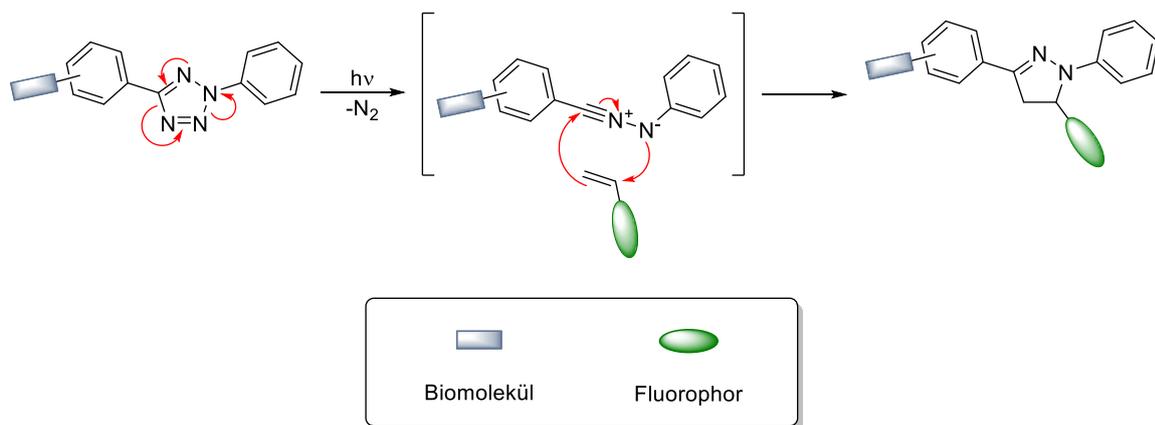


**Abbildung 8:** (A) Übersichtsreaktion der Cu(I)-katalysierten [3 + 2]-Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). (B) Übersichtsreaktion der spannungsgetriebenen Alkin-Azid-Cycloaddition mit einem modifizierten Dibenzocyclooctin (DIBO).<sup>[66]</sup>

Trotz der deutlichen Vorteile der CuAAC und SPAAC gegenüber der Staudinger-Ligation sind diese „Click“-Reaktionen nur bedingt für die metabolische Markierung von lebenden Zellen geeignet. Gründe dafür sind neben dem zelltoxischen Kupfer der CuAAC auch die geringe Aufnahme der Azidmodifizierten Biomoleküle und der sterisch anspruchsvollen gespannten Ringverbindungen, welche in der SPAAC verwendet werden. Daher beschränkt sich der Einsatz dieser Methoden meist nur auf Experimente *in vitro* oder Markierungen in zuvor fixierten Zellen.

Als eine weitere Entwicklung in der Erforschung bioorthogonaler „Click“-Reaktionen gilt die Photoclick-Reaktion von Tetrazolen. Bei dieser bilden sich bei Bestrahlung mit Licht bei UV-nahen Wellenlängen *in situ* Nitrilimine unter Abspaltung von elementarem Stickstoff aus. Das so aktivierte Nitrilimin kann anschließend in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit einem substituierten, terminalen oder ringgespannten Alken reagieren, wodurch ein Pyrazolinaddukt entsteht (Abbildung 9). Mit dieser Art der Cycloaddition war es LIN *et al.* möglich, erste potentielle biologische Anwendungen für die „Photoclick“-Reaktionen aufzuzeigen.<sup>[87]</sup> Hierbei ergibt sich durch die Photoinduzierbarkeit ein großer

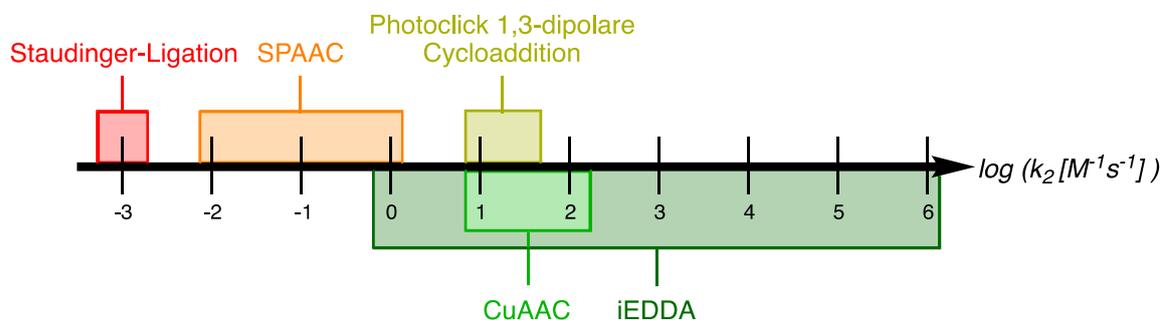
Vorteil im Hinblick auf raumzeitliche Analysen in biologischen Systemen.<sup>[66]</sup> Außerdem waren die entstandenen Pyrazolinaddukte, im Gegensatz zu den eingesetzten Edukten in der Lage, ein deutliches Fluoreszenzsignal zu emittieren. Durch den entstandenen Kontrast aus fluoreszentschem „Click“-Produkt und den nicht fluoreszierenden Ausgangsstoffen war es LIN *et al.* und ZHANG *et al.* möglich, Untersuchungen an lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit aufzunehmen.<sup>[88,89]</sup> Die üblichen Geschwindigkeits-konstanten der „Photoclick“-Reaktionen liegen zwischen  $1,0 \cdot 10^1$  bis  $6,0 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und sind damit im Bereich der Geschwindigkeitskonstanten von CuAAC-Reaktionen.<sup>[90]</sup> Trotzdem halten sich die Beispiele für Anwendungen von „Photoclick“-Reaktionen *in vivo* vor allem auf Grund der Notwendigkeit von Licht im UV-Bereich in Grenzen, da hierdurch die DNA und andere Biomoleküle der zu untersuchenden Zelle nachhaltig geschädigt und die Zellviabilität deutlich gemindert wird. Zusätzlich neigen die sehr reaktiven Nitrilimine zur Bildung von Wasseraddukten, was die gezielte bioorthogonale Anwendung für Markierungsexperimente erschwert.



**Abbildung 9:** Schema der Photoclick-Reaktionen eines tetrazolmodifizierten Biomoleküls mit einem markierten, terminalen Alken.<sup>[63]</sup>

Ein Durchbruch im Bereich der bioorthogonalen „Click“-Reaktionen wurde mit der Entwicklung der *iEDDA*-Reaktion zwischen Tetrazinen und gespannten Dienophilen erzielt. Die *iEDDA*-Reaktion zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass diese unter physiologischen pH-Werten stattfinden kann und nicht auf Metallkatalysatoren angewiesen ist. Dadurch ist sie den bisher vorgestellten „Click“-Methoden in Bezug auf

die Zellviabilität überlegen. Zusätzlich weisen *iEDDA*-Reaktionen, vor allem mit Tetrazinen, außerordentlich hohe Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von  $1,0 \cdot 10^0$  bis  $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  auf, wodurch diese um das bis zu 10.000-fache schneller sind als die CuAAC (Abbildung 10).<sup>[64,91]</sup>

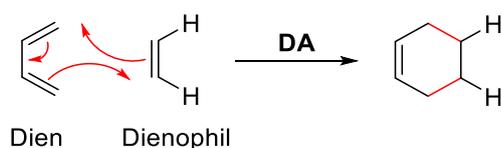


**Abbildung 10:** Einordnung der Geschwindigkeitskonstanten ausgewählter, bioorthogonaler „Click“-Reaktionen.<sup>[64,66,75,81,90,91]</sup>

Durch die stark erhöhte Reaktionskinetik ist es bei *iEDDA*-Reaktionen möglich, mit äußerst niedrigen Konzentrationen zu arbeiten. Außerdem sind Tetrazine und deren *iEDDA*-Produkte in wässrigen Milieu stabil und zeichnen sich durch eine hohe Chemospezifität aus. So stellt diese „Click“-Reaktion ein unersetzliches Werkzeug zur Untersuchung von dynamischen Prozessen in lebenden Zellen dar und soll im nachfolgenden Kapitel genauer beschrieben werden.

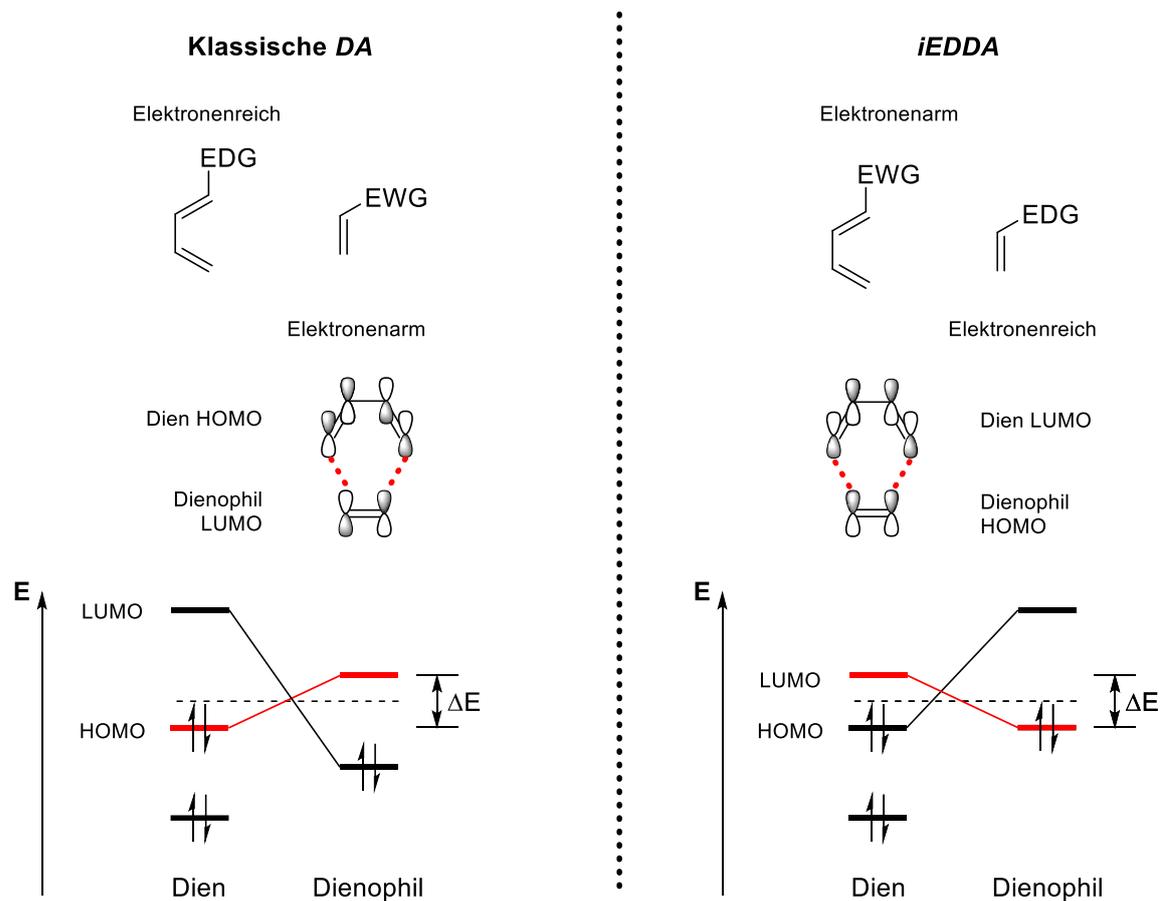
### 2.2.2. *iEDDA*-Reaktionen

Die klassische Diels-Alder-Reaktion (DA-Reaktion) beschreibt einen [4+2] Ringschluss zwischen einem Dien und einem Dienophil und wurde 1928 von O. DIELS und K. ALDER entwickelt (Abbildung 11).<sup>[92]</sup>



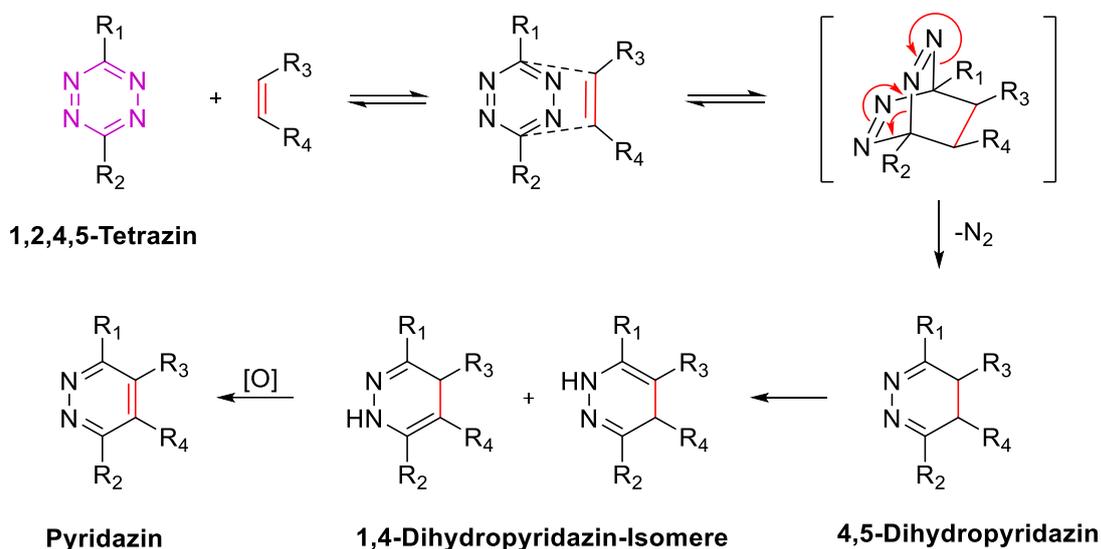
**Abbildung 11:** Schema der Diels-Alder-Cycloaddition (DA) zwischen einem Dien und einem Dienophil. Die neu gebildeten  $\sigma$ -Bindungen sind in rot abgezeichnet.

Der Mechanismus der DA-Reaktion kann über dessen Grenzorbitale mittels Molekülorbitaltheorie beschrieben werden. Dabei spielt die Energiedifferenz zwischen dem höchst besetzten Molekülorbital (HOMO, engl.: „*highest occupied molecular orbital*“) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO, engl.: „*lowest unoccupied molecular orbital*“) eine maßgebende Rolle. So wird die Wechselwirkung der beteiligten Orbitale umso besser, je niedriger die Energiedifferenz zwischen HOMO-LUMO (HOMO-LUMO-Lücke) ist. Allgemein lässt sich ableiten, dass eine Minimierung der HOMO-LUMO-Lücke zu einer Maximierung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.<sup>[64]</sup> Die Lage der Orbitalenergien wird grundlegend von der vorliegenden Elektronendichte der reaktiven Zentren des Diens und des Dienophils beeinflusst. So resultieren elektronenschiebende Gruppen (EDGs, engl.: „*electron donating groups*“) in einer Anhebung der HOMO-Energie, während elektronenziehende Gruppen (EWGs, engl.: „*electron withdrawing groups*“) die Energie der vorliegenden LUMO-Molekülorbitale absenken. Die DA-Reaktion lässt sich dabei in zwei Arten unterteilen: Die klassische DA-Reaktion und die *iEDDA*-Reaktion. In der klassischen DA-Reaktion wechselwirken das HOMO eines elektronenreichen Diens mit dem LUMO eines elektronenarmen Dienophils, während in der *iEDDA*-Reaktion das LUMO eines elektronenarmen Diens mit dem HOMO eines elektronenreichen Dienophils wechselwirkt (Abbildung 12).<sup>[93-95]</sup> Obwohl in beiden Reaktionsarten unterschiedliche Grenzorbitale beteiligt sind, erfolgt die Bildung des cyclischen Produkts nach demselben Reaktionsmechanismus. Um die Reaktionsgeschwindigkeit der DA-Reaktionen weiter zu erhöhen, spielen neben den elektrischen Effekten auch Effekte der sterischen Hinderung, die Stereochemie sowie der Spannung und die Wahl des Lösemittels eine entscheidende Rolle.<sup>[64]</sup> So bildet sich bei der Verwendung eines protischen Lösemittels, wie beispielsweise Wasser, ein aktivierter Komplex des Übergangszustandes, welcher durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert wird und damit die DA-Reaktion weiter beschleunigt.<sup>[96]</sup> Dieser Umstand kommt vor allem bioorthogonalen *in vivo* Experimenten in lebenden Zellen zugute, da hier die Anwendung ausschließlich in wässrigem Milieu erfolgt.



**Abbildung 12:** Molekülorbitalschema der Grenzorbitale einer klassischen Diels-Alder-Reaktion und der *i*EDDA. Die maßgeblichen Wechselwirkungen der Molekülorbitale sind in Rot dargestellt.  $\Delta E$  gibt die Energiedifferenz der HOMO- und LUMO-Molekülorbitale an. Elektronenschiebende Gruppen = EDG („electron donating group“); elektronenziehende Gruppen = EWG („electron withdrawing group“).<sup>[64,95]</sup>

Ein besonderer Einfluss auf die LUMO-Energie des Diens ergibt sich über Heteroatome in dessen  $\pi$ -System. So liegen die  $sp^2$ -Hybridorbitale von Heteroatomen in der Regel niedriger als die vergleichbaren Kohlenstoff-Analoga, wodurch das Einbringen von Stickstoff-, bzw. Sauerstoffatomen die Energie des  $LUMO_{\text{Dien}}$  absenkt.<sup>[97]</sup> Dieser Effekt wird umso stärker, je mehr Heteroatome sich im selben  $\pi$ -System befinden. Damit gehört die Stoffklasse der Tetrazine zu den reaktivsten, bekannten Dienen in der *i*EDDA-Reaktion. So wurde der Elektronenmangelaromat 1,2,4,5-Tetrazin zum ersten Mal von der Gruppe um LINDSEY *et al.* in einer *i*EDDA-Reaktion mit elektronenreichen Dienophilen erfolgreich umgesetzt.<sup>[98,99]</sup> Mechanistisch erfolgt diese in mehreren Schritten (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Mechanismus der *iEDDA*-Reaktion mit einem 1,2,4,5-Tetrazin und einem Dienophil. Die olefinische Bindung des Dienophils ist in rot dargestellt.<sup>[64,95]</sup>

Zunächst reagiert das 1,2,4,5-Tetrazin in einer [4+2]-Cycloaddition mit einem Dienophil zu einem stark gespannten, bicyklischen Intermediat. In der Folge spaltet sich elementarer Stickstoff in einer Retro-DA-Reaktion ab und es bildet sich ein 4,5-Dihydropyridazin. Anschließend kommt es zur Isomerisierung zu 1,4-Dihydropyridazin, welches langsam unter Oxidation zum Pyridazin reagiert. Werden Alkine als Dienophile verwendet, entsteht in der Retro-DA-Reaktion direkt das Pyridazin-Produkt.<sup>[64,95]</sup> Dabei zeichnet sich die *iEDDA*-Reaktion mit Tetrazinen nicht nur durch ihre, wie in Kapitel 2.1 angesprochene Geschwindigkeit aus. Des Weiteren setzt sie ausschließlich für Zellen ungiftigen elementaren Stickstoff frei und benötigt keine Katalysatoren oder externe Energiequellen, wie beispielsweise Licht. Somit erfüllt die *iEDDA*-Reaktion mit Tetrazinen alle Kriterien für eine bioorthogonale Reaktion.<sup>[97]</sup> Die ersten erfolgreichen bioorthogonalen Markierungsmethoden, welche *in vitro* und *in vivo* mit dieser Reaktion durchgeführt werden konnten, wurden unabhängig voneinander von HILDERBRAND und FOX entwickelt und stellen dabei die schnellsten bisher bekannten bioorthogonalen Reaktionen dar.<sup>[100,101]</sup> Die geeignete Wahl der verwendeten Tetrazine und Dienophile ist für eine effiziente bioorthogonale *iEDDA*-Reaktion entscheidend und soll in den nächsten Unterkapiteln näher betrachtet werden.

### 2.2.3. Tetrazine für bioorthogonale Reaktionen

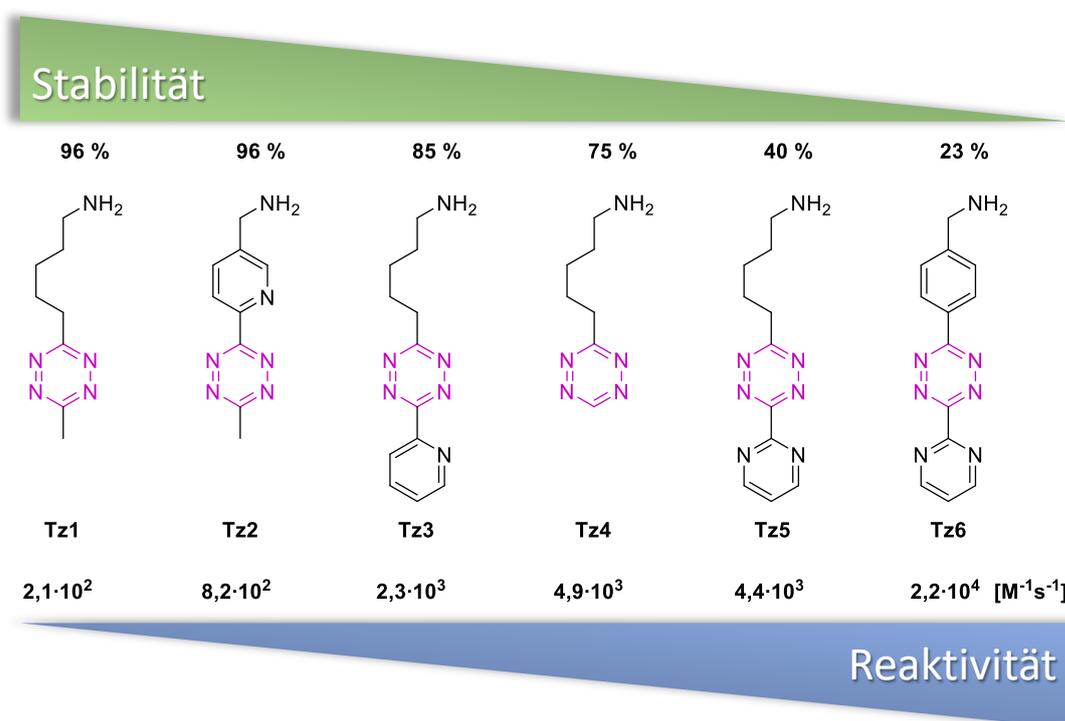
Strukturell existieren für Tetrazine drei Isomere, welche in Abbildung 14 abgebildet sind. Während 1,2,3,4-Tetrazine (*v*-Tetrazine)<sup>[102]</sup> und 1,2,3,5-Tetrazine (*as*-Tetrazine)<sup>[102]</sup> für die Wissenschaft eine eher untergeordnete Rolle spielen, sind 1,2,4,5-Tetrazine (*s*-Tetrazine)<sup>[102]</sup> aufgrund ihrer Stabilität und synthetischen Flexibilität von großer Bedeutung.<sup>[103]</sup> Allerdings wurde 2019 von BOGER *et al.* gezeigt, dass das 4,6-Diphenyl-*as*-tetrazin eine intrinsische Reaktivität aufweist, welche mit der Reaktivität des isomeren 3,6-Diphenyl-1,2,4,5-tetrazin vergleichbar ist. Jedoch beschränkt sich diese Beobachtung nur auf Reaktionen mit Amidinen, während die für bioorthogonale Reaktionen häufig verwendeten gespannten Olefine und Alkine nur eine geringe Reaktivität aufweisen.<sup>[104]</sup> Für *s*-Tetrazine sind hingegen eine Vielzahl an Anwendungen in Markierungsexperimenten bekannt. So konnten DEVARAJ *et al.* mit einem Farbstoff-substituierten *s*-Tetrazin beispielsweise zur bioorthogonalen Transferreaktion genutzt werden, um MicroRNA in lebenden Zellen zu detektieren.<sup>[105]</sup> Hierbei wird sich auch die für *s*-Tetrazine charakteristische rote bis pinke Färbung, welche durch ihre Absorptionsbande bei ca. 500-530 nm zustande kommt, zu Nutze gemacht.<sup>[95]</sup> Damit kann diese zur Reaktionskontrolle, aber auch zur Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten mittels UV/Vis-Spektroskopie verwendet werden.<sup>[106-109]</sup>



Abbildung 14: Strukturisomere der Tetrazin-Stoffklasse.

In Bezug auf die Wahl des Tetrazins für die *iEDDA*-Reaktion ist es wesentlich, die LUMO-Energie energetisch herabzusetzen, um die Reaktivität mit entsprechenden Dienophilen zu steigern. Bei *s*-Tetrazin handelt es sich um einen so genannten Elektronenmangelaromaten, welcher die Elektronendichte aufgrund der erhöhten

Elektronegativität von Stickstoff auf die Heteroatome verschiebt. Dieser Umstand sorgt bereits für ein abgesenktes LUMO. Allerdings können durch Substitution von elektronenziehenden Gruppen am *s*-Tetrazin die LUMO-Energie noch weiter abgesenkt und damit ihre Reaktivität weiter gesteigert werden (Abbildung 12).<sup>[110]</sup> Allerdings geht mit einer erhöhten Reaktivität auch eine Abnahme der Stabilität einher.<sup>[111]</sup> Demzufolge sind die Effekte für *in vivo*-Reaktionen zwischen Reaktivität und Stabilität abzuwägen.<sup>[64]</sup> So führten *HILDEBRAND et al.* an einer Reihe verschiedener Tetrazine eine *iEDDA*-Reaktion mit trans-Cycloocten (TCO) durch, um die Beziehung der Reaktivität und Stabilität zu vergleichen.<sup>[111]</sup> Hierbei wurden die Reaktionen in phosphatgepufferten Salzlösungen (PBS, engl.: "phosphate-buffered saline") bei 37 °C durchgeführt und die Stabilität in fötalem Rinderserum (FBS, engl.: "fetal bovine serum") bei 37 °C für 10 h ausgewertet (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Reaktivitäts/Stabilitäts-Beziehungen zwischen ausgewählten Tetrazinen mit TCO in PBS bei 37 °C im Verlauf von 10 h.<sup>[111]</sup>

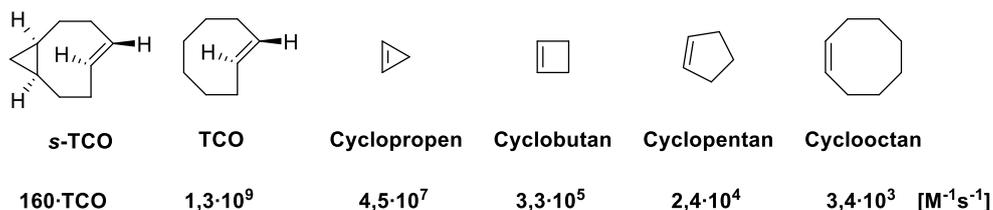
Dabei zeigt das substituierte Tetrazin **Tz1** mit 96 % hoher Stabilität, aber eine vergleichsweise langsame Kinetik. Wird die Alkylkette durch ein aromatisches, elektronenziehendes Pyridyl (**Tz2**) substituiert, so steigt die Reaktivität um ca. das

Vierfache an, während die Stabilität konstant bleibt. Durch das Einbringen immer weiterer, elektronenziehender Gruppen konnten *HILDEBRAND et al.* zeigen, dass dadurch die Reaktionskinetik zwar ansteigt, aber die Stabilität immer mehr abnimmt. So zeigt **Tz6** mit 23 % nach 10 h eine nur sehr niedrige Stabilität, aber eine um das 100-Fach erhöhte Reaktionskinetik im Vergleich zu **Tz1**. Trotz vergleichsweise langsamen Geschwindigkeitskonstanten von Methyl-substituierten Tetrazinen finden diese aufgrund ihrer erhöhten Stabilität verstärkt Verwendung in bioorthogonalen Reaktionen und sind damit von großer Bedeutung für die Anwendung in lebenden Zellen.<sup>[111]</sup> Da die Kinetik der *iEDDA*-Reaktion nicht nur von der Struktur, sterischen Hinderung und Stabilität des Tetrazins abhängig ist, sondern die eingesetzten Dienophile als „Click“-Partner einen mindestens genauso großen Beitrag an dieser Reaktion leisten, sollen diese im Folgenden weiter betrachtet werden.

#### **2.2.4. Dienophile für bioorthogonale *iEDDA*-Reaktionen**

Wie in Kapitel 2.2.3 angesprochen, können die LUMO-Energien des Tetrazins durch Substitution von elektronenziehenden Gruppen abgesenkt werden. Gleichzeitig können elektronenschiebende Gruppen an Dienophilen genutzt werden, um dessen HOMO-Energien anzuheben und so die  $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}\text{-LUMO}_{\text{Dien}}$ -Lücke weiter zu verringern (Abbildung 12).<sup>[64,94]</sup> Da jedoch jede Substitution gleichzeitig die Sterik des Moleküls erhöht und somit die Reaktionskinetik verringert, muss dieser Effekt durch die Wahl der zu verwendenden Dienophilen ausgeglichen werden.<sup>[112]</sup> Dabei sind vor allem gespannte cyclische Verbindungen von besonderer Relevanz.<sup>[64]</sup> So konnten *SAUER et al.* beispielsweise einen Zusammenhang zwischen der Ringspannung und der Geschwindigkeitskonstanten der *iEDDA*-Reaktion mit Tetrazinen herstellen.<sup>[113]</sup> Demnach steigt die Reaktivität mit steigender Ringspannung von Cycloocten bis Cyclopropen bei der *iEDDA*-Reaktion mit 3,6-Bis-methoxycarbonyl-*s*-tetrazin deutlich an (Abbildung 16). Außerdem konnten sie feststellen, dass die Geschwindigkeitskonstanten von verdrehten cyclischen Verbindungen wie TCO höher sind als die des nicht verdrehten Analogons *cis*-Cycloocten.<sup>[113]</sup> Ein Erklärungsansatz findet sich dabei über die Kronenkonformation des TCOs, welche eine größere Ähnlichkeit mit der Diels-Alder-Übergangsstruktur aufweist, als die Halb-Stuhl-Konformation des *cis*-Cyclooctens.<sup>[114]</sup> Dies resultiert in geringeren

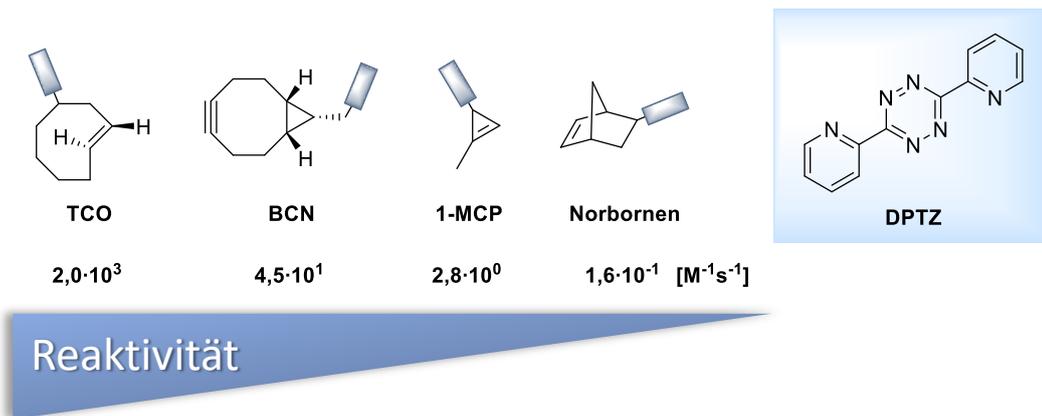
Verzerrungsenergien, welche wiederum für den Übergangszustand überwunden werden müssen.



Reaktivität

**Abbildung 16:** Übersicht cyclischer Alkene und Cycloocten-Derivate und deren Reaktivitäten bei der *iEDDA*-Reaktion. <sup>[113-115]</sup>

Eine weitere Verbesserung der Reaktionskinetik von TCO konnte darüber hinaus durch die Einführung eines bicyclischen Systems mit einem Cyclopropanring (*s*-TCO) erzielt werden, da hierüber die Ringfusion der Kronenkonformation noch weiter blockiert werden kann. Im Vergleich zu TCO konnten TAYLOR *et al.* mittels *s*-TCO in einer *iEDDA*-Reaktion mit 3,6-Diphenyl-*s*-Tetrazin eine um das 160-fach erhöhte Geschwindigkeitskonstante messen.<sup>[115]</sup> Zusätzlich sind neben der Ringspannung auch stereochemische Effekte der Dienophile zu berücksichtigen. Hierbei konnte die Arbeitsgruppe um CARELL mit *exo*-Norbornenen eine dreimal schnellere Geschwindigkeitskonstante mit 3,6-Diphenyl-*s*-Tetrazin als deren *endo*-Analoga ermitteln.<sup>[116]</sup> Für konkrete *iEDDA*-Reaktionen zwischen Tetrazinen und dienophilmodifizierten Biomolekülen finden in der Praxis neben TCO auch Dienophile aus den Klassen der Bicyclonone (BCN), Norbornene, Vinyl und der 1-Methylcyclopropene (1-MCP) Anwendung (Abbildung 17).<sup>[97]</sup>



**Abbildung 17:** Dienophil-modifizierte Biomoleküle für *iEDDA*-Anwendungen *in vivo* und *in vitro*. Die Dienophile sind nach ihrer Reaktivität gegenüber 3,6-Di-pyridyl-1,2,4,5-tetrazin (DPTZ) geordnet.<sup>[97]</sup> Von links nach rechts: *trans*-Cycloocten (TCO)<sup>[100]</sup>; Bicyclo(6.1.0)non-4-in-9-yl-methanol (BCN)<sup>[117]</sup>; 1-Methylcyclopropen (1-MCP)<sup>[118]</sup> und Norbornen.<sup>[119]</sup>

Auch in diesem Vergleich zeigt TCO die höchste Reaktionskinetik, wodurch sich TCO-modifizierte Biomoleküle für eine Vielzahl an *in vivo*-Anwendungen anbieten. Durch ROBILLARD *et al.* wurde TCO erfolgreich verwendet, um Radioimmunbildgebungen mit geringen Konzentrationen an Tumorantigenen durchzuführen.<sup>[120]</sup> So konnten TCO-modifizierte Antigene an einem Tumor mit  $^{111}\text{In}$  radiomarkierten Tetrazinen in einem „*Pretargeting*“-Experiment an Mäusen nachgewiesen werden. Eine Auswahl an in 3-Position substituierten 1-Methylcyclopropene wurde hingegen von DEVARAJ *et al.* synthetisiert.<sup>[121]</sup> Dabei wurde festgestellt, dass amidomethylsubstituierte 1-Methylcyclopropene bei der *iEDDA*-Reaktion mit Tetrazinen eine erhöhte Reaktionskinetik und Stabilität in wässrigen Lösungen in Gegenwart von Thiolen haben als vergleichbare Cyclopropene. Des Weiteren wurde die Verwendung der so synthetisierten amidomethylsubstituierten 1-Methylcyclopropene als stabile Mini-Tags für den Nachweis von DNA-Matrizen als Biokonjugation mit tetrazinmodifizierten Fluorogenen demonstriert.<sup>[121]</sup> VAN DELFT *et al.* und Fox *et al.* konnten durch die Verwendung der cyclischen Alkinverbindung Bicyclo(6.1.0)non-4-in-9-yl-methanol (BCN-OH) aufzeigen, dass diese imstande ist, *in vivo* für die Detektion hochspezifischer Proteinmodifikationen verwendet zu werden. Auch für den Nachweis der Glykanexpression in metastasierenden Melanomzellen mittels SPAAC und spannungsgetriebenen Alkyn-Nitron-Cycloaddition (SPANC) konnten modifizierte BCN-Derivate erfolgreich getestet werden.<sup>[122]</sup> Fox *et al.* zeigten außerdem, dass sich mit der *iEDDA*-Reaktion von BCN-OH und Tetrazinen einzelne

Produkte mit definierter Stereochemie bilden. Hierbei konnten sie ein Aminosäure-BCN-Konjugat in Aminoacyl-tRNA-Synthetase einbauen und dessen Nachweis in *E. coli*. und lebenden Säugetierzellen durch fluorogene Markierung mit modifizierten Tetrazinen demonstrieren.<sup>[123]</sup> Auch die, durch ihre chemische Stabilität und nur gering ausgeprägte Ringspannung, vergleichsweise unreaktiven Norbornene werden in biochemischen Experimenten verwendet. Dabei nutzten HILDERBRAND *et al.* als erste Norbornen-Antikörper-Konjugate, um menschliche Brustkrebszellen über Fluoreszenzmarkierung mit Tetrazinen nachzuweisen.<sup>[101]</sup>

### 2.3. Tetrazine in der Fluoreszenzmarkierung

Um die in den vorherigen Kapiteln angesprochenen Diene und Dienophile in der bioorthogonalen Markierung von Biomolekülen nutzen zu können, müssen diese mit einer geeigneten chemischen Sonde verknüpft werden. Dies erfolgt über einen sogenannten Linker. Als Linker werden dabei üblicherweise Alkyamide,<sup>[124]</sup> Phenyle,<sup>[125]</sup> Alkinyne<sup>[126]</sup> oder Alkenyle<sup>[127]</sup> verwendet. Als chemische Sonden haben sich in den letzten Jahren insbesondere fluorogene Farbstoffe durchgesetzt.

In der Praxis existieren verschiedene Methoden für die Umsetzung bioorthogonaler Markierungen. So kann bei der Verwendung von Fluoreszenzsonden deren Konzentration angepasst werden, um die Markierungseffizienz zu steigern. Dabei erfolgt aufgrund der Proportionalität von Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit die Anpassung so, dass die Menge an eingesetzter Sonde an die Geschwindigkeitskonstante angepasst wird. Da bei sehr langsamen Reaktionen ein vergleichsweise großer Überschuss an Fluoreszenzsonden hinzugegeben werden muss, entsteht in der Fluoreszenzmikroskopie ein hohes Hintergrundsignal, welches das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Experiments erniedrigt und zu unscharfen Aufnahmen führt. Lösungsansätze, wie das mehrmalige Herauswaschen der überschüssigen Sonde mit PBS, können zur Minimierung des Hintergrundsignals genutzt werden.<sup>[64,128]</sup> Allerdings verringern die Waschschriffe die spezifische Markierung, können Zellen wegspülen oder nachhaltig schädigen und erschweren durch eine zeitaufwendige Durchführung die zeitliche Beobachtung dynamischer Zellprozesse.<sup>[129-131]</sup>

Eine geschicktere Methode zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz kann durch die Nutzung fluorogener Sonden geschehen. Diese Sonden zeichnet aus, dass durch Modifikation der Sonde die Fluoreszenz des Farbstoffs zunächst erniedrigt wird. Dabei fungiert die Modifikation gleichzeitig als reaktives Zentrum bei der „Click“-Reaktion. Während dieser Reaktionen wird die vorliegende Funktionalität entweder zerstört oder verändert, so dass der fluoreszenzerniedrigende Effekt aufgehoben wird. Es kommt dabei zur Rückbildung der ursprünglichen Fluoreszenz des Farbstoffes, wodurch auf mögliche Waschschriffe bei *in vivo* Anwendungen verzichtet werden kann. Die beobachtete Fluoreszenzerhöhung während der „Click“-Reaktion wird allgemein als *Turn-on* oder *Light-up* bezeichnet. Diese stellt das Verhältnis zwischen der Fluoreszenzintensität bzw.

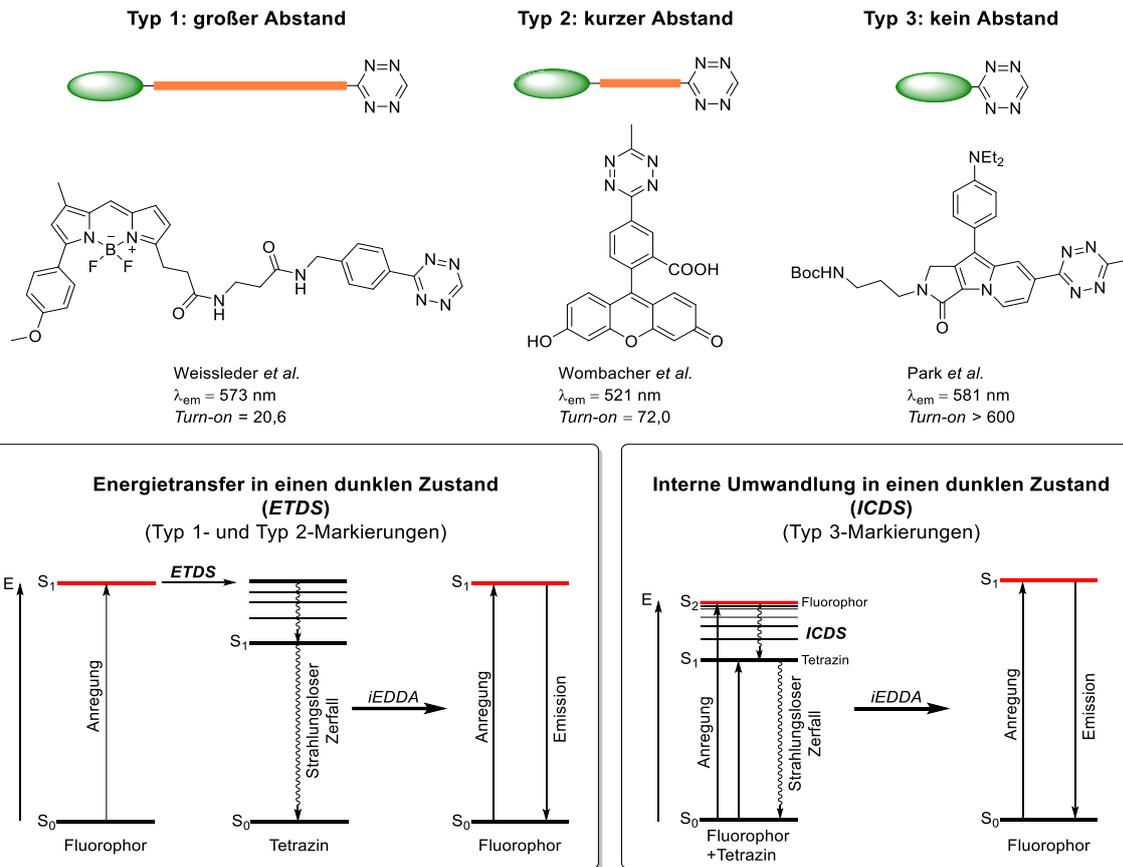
der Quantenausbeute des „Click“-Produkts nach der Reaktion und der fluorogenen Sonde zu Beginn der Reaktion dar.<sup>[64,128]</sup> Grundlage für diese Fluoreszenzniedrigung bilden drei photophysikalische Mechanismen. Dazu zählen der sogenannte FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (*FRET*), die Bindungsenergieübertragung (*TRET*, engl.: „*through-bond energy transfer*“) und der photoinduzierte Energietransfer (*PET*, engl.: „*photoinduced energy transfer*“).<sup>[132-134]</sup> Dabei gehören *s*-Tetrazine zu den mitunter effektivsten und am weitesten verbreiteten Chromophoren für Anwendungen mit fluorogenen Farbstoffen.<sup>[135]</sup> Diese absorbieren Photonen bei Wellenlängen von 500-530 nm und setzen sich im Verlauf der *iEDDA*-Reaktion unter Stickstofffreisetzung zu Pyridazinen um, wodurch ihr fluoreszenzlöschender Effekt aufgehoben wird.

Eine der ersten Arbeitsgruppen, welche das Potential der tetrazinmodifizierten Fluorophore erkannten, waren WEISSLEDER *et al.* Diese konnten Methyl-*s*-Tetrazine erfolgreich mit 4,4-Difluoro-4-bora-3*a*,4*a*-diazas-indacen (BODIPY), Oregon Green und Cumarin-Farbstoffen kombinieren und die Fluoreszenzlöschung aufgrund der Tetrazinfunktionalität beobachten.<sup>[124]</sup> Bei der darauffolgenden *iEDDA*-Reaktion mit einem TCO konnte dabei ein bis zu 20-facher *Turn-on* nach vollständigem Umsatz der Reaktion gemessen werden. Des Weiteren beobachteten WEISSLEDER *et al.* eine Wellenlängenabhängigkeit des *Turn-ons*. Während Farbstoffe, welche im Bereich von 495-543 nm absorbieren, höhere *Turn-on*-Effekte aufweisen, findet bei Farbstoffen, die eine Anregung nahe dem ultravioletten oder infraroten Bereich besitzen, kaum bis keine Fluoreszenzsteigerung statt. Sie vermuteten daraufhin, dass dieser Effekt einem *FRET* zwischen der Emissionsbande des Farbstoffs und der Absorptionsbande des *s*-Tetrazins zugrunde liegt.<sup>[124]</sup> In einer späteren Veröffentlichung konnten WOMBACHER *et al.* die gleichen Beobachtungen ebenfalls mit grün bis dunkelrot fluoreszierenden Xanthenfarbstoffen machen. Hier wurde ebenfalls ein *FRET*- oder ein Dexter-Energietransfer (*DET*) vermutet. Ihre Aussage begründeten sie damit, dass beide Energieübertragungsmechanismen von der spektralen Donor-Akzeptor-Überlappung abhängen.<sup>[136]</sup> Zu einem anderen Ergebnis kamen PARK *et al.*, als diese die Bildgebung von Proteinen und subzellulären Organellen unter Lebendzellbedingungen mittels monochromer Seoul-Fluor-Tetrazin-Sonden (SFTz-Sonden) untersuchten. Hierbei postulierten sie eine starke elektronische Kopplung zwischen dem SF-Kern und dem

Tetrazin-Chromophor, welche zu einer Fluoreszenzlöschung durch einen Dunkelzustand (engl.: „*dark-state quenching*“) führt.

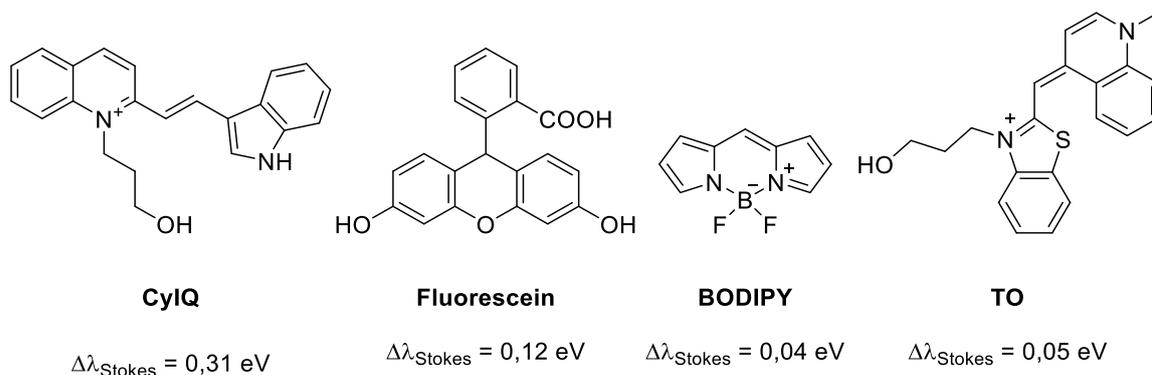
Um die unterschiedlichen Beobachtungen der Gruppen WEISSLEDER/WOMBACHER und PARK zu vereinen, entwickelten XIAOGANG *et al.* die Modelle des Energietransfers in einen dunklen Zustand (*ETDS*, engl.: „*energy transfer to a dark state*“) und der internen Umwandlung in einen dunklen Zustand (*ICDS*, engl.: „*internal conversion to a dark state*“) (Abbildung 18).<sup>[133,134]</sup> Dem *ETDS*-Mechanismus zufolge führt eine große Energielücke zwischen dem hellen Zustand des Fluorophors und dem dunklen Zustand des Tetrazins (Typ 1 *Quencher*) und/oder ein kürzerer Abstand zwischen dem Fluorophor und dem Tetrazin (Typ 2 *Quencher*) zu einer verbesserten Fluoreszenzlöschungseffizienz, reduzierten Hintergrundemissionen und einem erhöhten Fluoreszenz-*Turn-on* bei *iEDDA*-Reaktionen. Dieser vereinheitlichte *ETDS*-Mechanismus überwindet die Beschränkung auf den Fluorophor-Tetrazin-Abstand, die Richtung der Dipolmomente und das Bindungsmuster zwischen dem Fluorophor und der Tetrazingruppe trägt zum Verständnis des Fluoreszenzlöschungsmechanismus von tetrazinmodifizierten Farbstoffen bei. Der *ETDS*-Mechanismus ist im Wesentlichen eine Vereinigung von *FRET*, *DET* und *TBET*, wobei der Energieakzeptor (Tetrazin) ein dunkler *Quencher* ist (Abbildung 18). Der *ICDS*-Mechanismus dient hingegen dazu die Fluoreszenzlöschung in tetrazinfunktionalisierten, fluorogenen Sonden mit integrierten  $\pi$ -Konjugationen zu erklären. In diesen Sonden befindet sich ein tiefliegender dunkler Zustand ( $n$ - $\pi^*$ -Übergänge im Tetrazin) unterhalb des hellen Zustands ( $\pi$ - $\pi^*$ -Übergänge über das gesamte Tetrazin-fluorophor), welcher die *ICDS* auslöst und zur Fluoreszenzlöschung führt. Anschließend führt eine *iEDDA*-Reaktion zur Zerstörung des Tetrazin-Anteils und eliminiert den entsprechenden dunklen Zustand, wodurch die Fluoreszenz wiederhergestellt wird.

XIAOGANG *et al.* stellten zudem fest, dass das *ICDS*- und das *ETDS*-Modell entgegengesetzte Abhängigkeiten von der Energielücke zwischen dem hellen und dem dunklen Zustand zeigen. Langwellige *ICDS*-Fluorophore mit kleinem  $\Delta E$  führen dabei zu einer Verstärkung der internen Umwandlung und bieten im Vergleich zu den *ETDS*-basierten Sonden einen höheren *Turn-on*.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung der drei Typen tetrazinmodifizierter Sonden mit ausgewählten Molekülstrukturen.<sup>[124,137,138]</sup> Die Strukturen sind mit den entsprechenden Emissionsmaxima und den dazugehörigen *Turn-on*-Werten nach der *iEDDA*-Reaktion versehen. Eingerahmt werden die Mechanismen des Energietransfers in einen dunklen Zustand (*ETDS*; links) und der internen Umwandlung in einen dunklen Zustand (*ICDS*; rechts) für tetrazinmodifizierte Fluorogene gezeigt. Die hellen Zustände sind in rot gekennzeichnet, die dunklen Zustände sind in schwarz dargestellt.

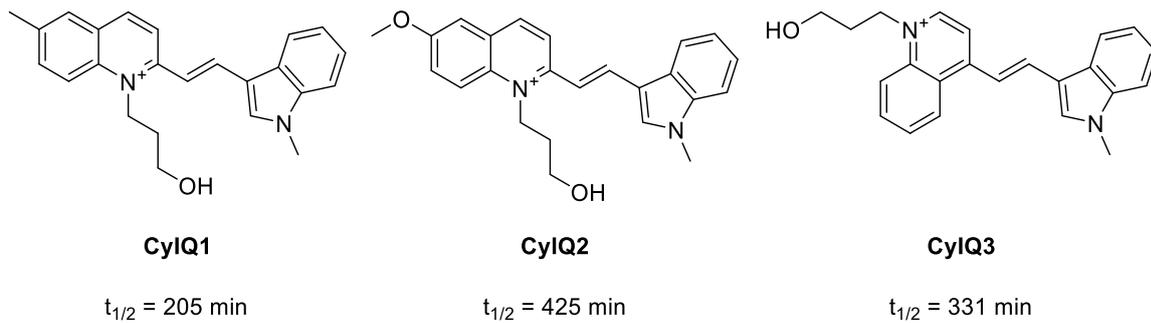
Zusätzlich zu den bisher vorgestellten Fluorophoren existieren eine Reihe weiterer, für die Anwendung in bioorthogonalen „Click“-Reaktionen interessante Fluoreszenzfarbstoffe. Dazu gehört auch die Farbstoffklasse der Cyanin-Styryl-Farbstoffe, welche die Anforderungen für die molekulare Bildgebung, wie Stabilität in zellulärer Umgebung, ausreichende Fluoreszenzhelligkeit und hohe Photostabilitäten erfüllt. Des Weiteren sind sie synthetisch einfach zugänglich und zeigen eine Fluoreszenzsteigerung in Gegenwart von Oligonukleotiden. Hierdurch ergibt sich ein hohes Potential für die Fluoreszenzmarkierung von DNA- und RNA-Strängen.<sup>[139-141]</sup> So synthetisierten WAGENKNECHT *et al.* einen Cyanin-Indol-Chinolinium-Farbstoff (CylQ), welcher größere Stokes-Verschiebungen und höhere Photostabilitäten als bisher verwendete Farbstoffe wie Fluorescein, BODIPY und Thiazolorange (TO) aufweist (Abbildung 19).<sup>[142,143]</sup>



**Abbildung 19:** Übersicht ausgewählter Fluoreszenzfarbstoffe mit den dazugehörigen Stokes-Verschiebungen. Cyanin-Indol-Chinolinium-Farbstoff (CyIQ), Fluorescein, 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (BODIPY) und Thiazolorange (TO).<sup>[144]</sup>

Hierbei zeigt die Stokes-Verschiebung von CyIQ mit 0,31 eV einen um das drei- bis sechsfach höheren Wert als die Farbstoffe Fluorescein, BODIPY und TO.<sup>[144-146]</sup> Da bei spektroskopischen Untersuchungen zwischen dem Anregungslicht und den emittierten Photonen der Probe unterschieden werden muss, ist eine große Stokes-Verschiebung zur Unterscheidung der bei der Fluoreszenzmessung detektierten Photonen und damit für bioanalytische Anwendungen essenziell.<sup>[144]</sup> Des Weiteren konnten WAGENKNECHT *et al.* die Photostabilitäten von CyIQ, TO, BODIPY und Fluorescein bei der kovalenten Verknüpfung an DNA untersuchen.<sup>[142]</sup> Dabei zeigten sie, dass sich BODIPY als interne DNA-Modifikation in weniger als zehn Minuten auf etwa 10 % verbleibende Fluoreszenzintensität verringert. Auch Fluorescein und TO zeigten nach weniger als zwei Stunden Bestrahlung nur noch 10 % ihrer Fluoreszenzintensität. Eine Ausbleichung des CyIQ-Farbstoffs wurde hingegen erst nach einer deutlich längeren Bestrahlungsdauer von mehr als 15 Stunden unter denselben Bedingungen beobachtet.<sup>[142]</sup> Damit zeigen CyIQ-Farbstoffe deutlich höhere Photostabilitäten als die anderen Farbstoffe und sind dadurch flexibler in der fluoreszenten Bildgebung einsetzbar. Auf dieser Basis konnten WAGENKNECHT *et al.* weitere CyIQ-Farbstoffe mit verbesserten Photostabilitäten synthetisieren.<sup>[139,140]</sup> Drei solcher Farbstoffe sind in Abbildung 20 dargestellt. Dabei wurde unter neuer Messordnung zunächst die Halbwertszeit von CyIQ auf 90 Minuten bestimmt.<sup>[140]</sup> Daraufhin konnten sie durch Methylierung des sekundären Stickstoffs am Indol die Photostabilität auf eine Halbwertszeit von 205 Minuten verlängern (CyIQ1). Dabei wurde angenommen, dass die N-Methylgruppe das Indol vor einer photoinduzierten Hydroxylierung während der Bestrahlung schützt.<sup>[140]</sup> Durch zusätzliche Substitution einer elektronenschiebenden

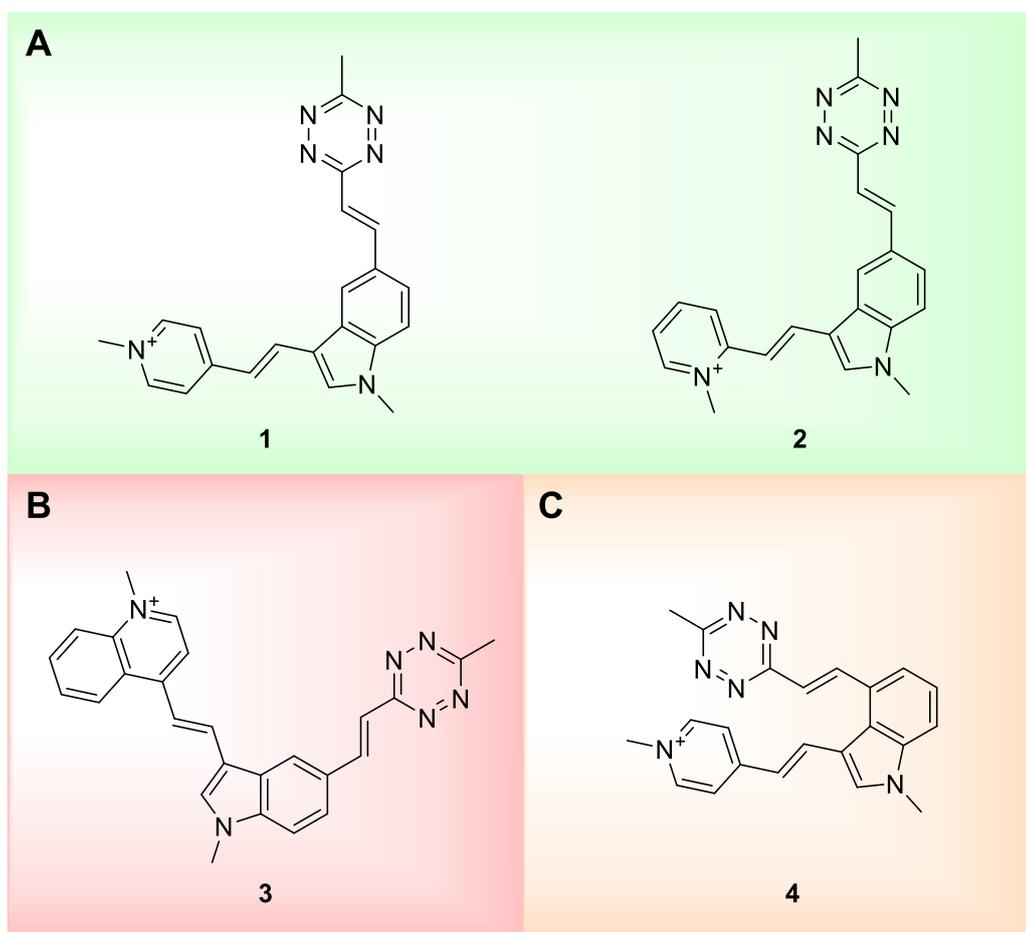
Methoxygruppe an der Chinoliniumfunktion war es der Gruppe zudem möglich, die Photostabilität der Cyanin-Styryl-Farbstoffe auf 425 Minuten zu verdoppeln (CyIQ2).<sup>[140]</sup> Außerdem führte die Synthese von CyIQ3, bei welcher die Verknüpfungsstelle des Chinoliniums von Position 2 auf 4 geändert wurde, ebenfalls zu einer gesteigerten Halbwertszeit von 331 Minuten. Die Kombination aus hoher Photostabilität und guten optischen Eigenschaften machen CyanineStyryl-Farbstoffe zu vielversprechenden Verbindungen für die molekulare Bildgebung.



**Abbildung 20:** Übersicht ausgewählter Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit verbesserter Photostabilität.<sup>[147]</sup>

### 3. Themenstellung

Um das Repertoire bisher bekannter fluorogener Farbstoffe für bioorthogonale *iEDDA*-Reaktionen an Nukleinsäuren zu erweitern, sollen vier neuartige und fluorogene tetrazinmodifizierte Cyanin-Styryl-Fluorophore mit grüner, gelber und roter Fluoreszenz synthetisiert werden. Hierzu soll die Synthese modular aus einfachen Vertretern der Cyanin-Styryl-Klasse auf Basis bereits im Arbeitskreis WAGENKNECHT untersuchter und literaturbekannter Analoga erfolgen.<sup>[19,147,148]</sup> Die Tetrazinfunktionalität soll dabei über eine Ethenylbrücke mit dem Cyanin-Styryl-Fluorophor konjugiert werden, um eine effektive Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs zu ermöglichen (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Die in dieser Arbeit herzustellenden tetrazinmodifizierte Cyanin-Styryl-Fluorophore **1-4** mit grüner (**A**), roter (**B**) und gelber (**C**) Fluoreszenz. Die Farbstoffe sind so modifiziert, dass diese neben ihrer Fluoreszenz auch Einflüsse der Farbstoffstruktur, wie sterisch gehinderte Substrate oder eine andere Substratgeometrie berücksichtigen.

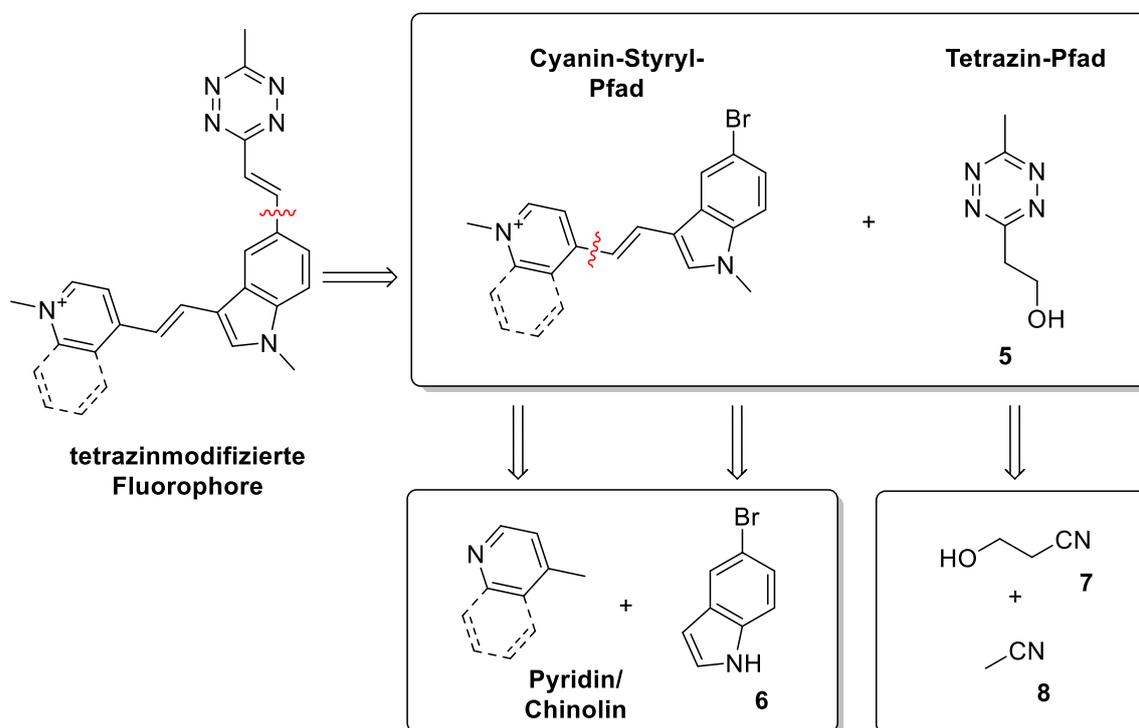
Auf diese Weise soll ein schneller und effizienter Zugang zu dieser Art von fluorogenen Farbstoffen ermöglicht werden. Anschließend sollen die fluorogenen Farbstoffe mit den tetrazinfreien Derivaten ihrer Klasse auf deren spektroskopischen Eigenschaften und Stabilität in wässrigen Lösungen verglichen werden. Zusätzlich sollen die Farbstoffe spektroskopisch anhand ihres Fluoreszenzanstiegs und der Geschwindigkeit in der *iEDDA* Reaktion bei der Verwendung unterschiedlicher dienophilmodifizierter Nukleoside und dienophilmodifizierter Oligonukleotide untersucht werden. Hierbei soll vor allem überprüft werden, mit welcher Dienophil-Nukleosid-Kombination tetrazinmodifizierte Cyanin-Styryl-Fluorophore effiziente *iEDDA*-Reaktionen eingehen, um diese in bioorthogonalen Reaktionen *in vivo* anwenden zu können. Außerdem soll der Einfluss verschiedener Linkersysteme zwischen dem Nukleosid und dem Dienophil bezüglich der *iEDDA*-Reaktion näher betrachtet werden.

Anschließend sollen Experimente mit den tetrazinmodifizierten Farbstoffe in HeLa-Zellen durchgeführt werden. Hierbei soll gezeigt werden, dass die hergestellten Farbstoffe in der Lage sind, die Zellwand eigenständig zu passieren und dort mit einem dienophilmodifizierten Oligonukleotid zu reagieren. Dabei soll vor allem untersucht werden, ob sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis unter waschfreien Bedingungen verbessern lässt. Des Weiteren sollen die hergestellten Farbstoffe auf ihre Zelltoxizität über ein MTT-Assay getestet werden. Abschließend soll mit den hergestellten tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen eine metabolische Fluoreszenzmarkierung in lebenden Zellen unter waschfreien Bedingungen durchgeführt werden, um deren Anwendbarkeit in einer natürlichen Umgebung zu evaluieren.

## 4. Synthese und Charakterisierung

### 4.1. Synthese der tetrazinmodifizierten Fluorophore

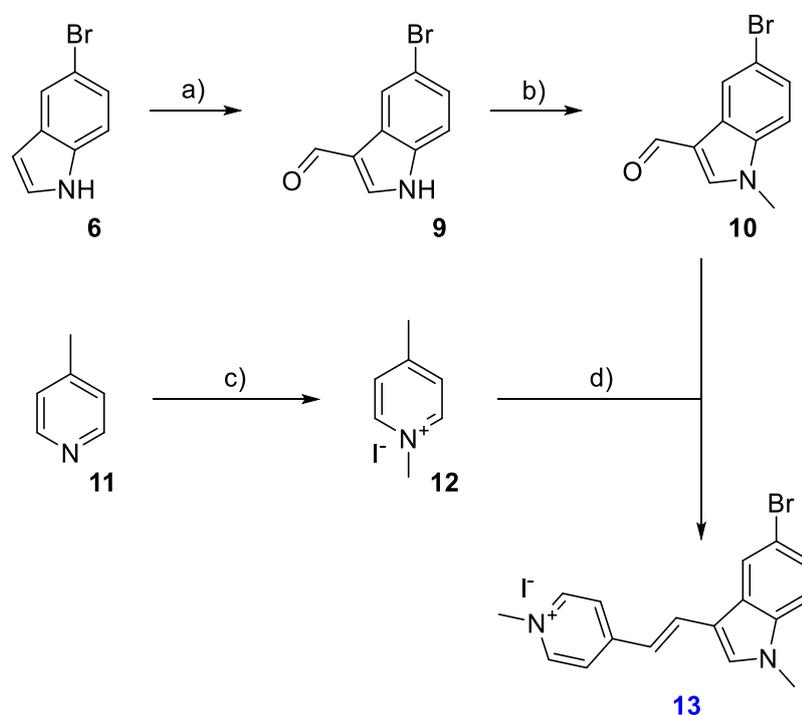
Um einen einfachen und schnellen Zugang zu einem breiten Spektrum an tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen zu ermöglichen, soll die Synthese modular erfolgen. Ein retrosynthetischen Ansatz zur Synthese dieser Farbstoffe ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Wahl der hergestellten Cyanin-Styryl-Farbstoffe orientiert sich dabei vor allem daran, strukturell ähnliche Farbstoffe zu bereits durch P. BOHLÄNDER und C. SCHWECHHEIMER publizierten Farbstoffen mit Emissionsbanden zwischen 500 – 800 nm herzustellen.<sup>[19,147,148]</sup> Hierdurch sollen die Effekte von Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie deren strukturelle Einflüsse auf die Fluorogenität der tetrazinmodifizierten Farbstoffe übertragen werden.



**Abbildung 22:** Retrosynthetischer Ansatz zur Synthese der tetrazinmodifizierten Fluorophore. Dabei besteht der Cyanin-Styryl-Pfad für das Fluorophor aus einem bromierten Indol **6** und einem Pyridin- bzw. Chinolinderivat (linker Pfad). Das Tetrazin **5** wird aus den entsprechenden Nitrilen **7** und **8** gebildet (rechter Pfad).

Nach retrosynthetischer Betrachtung der tetrazinmodifizierten Fluorophore wird klar, dass diese aus drei einfach zugänglichen Verbindungen dargestellt werden können. So lässt sich das Cyanin-Styryl-Fluorophor aus dem Indol **6** und einem Pyridin- bzw. Chinolinderivat herstellen. Diese Verbindungen sind kommerziell verfügbar und können abhängig von der Struktur des Zielprodukts einfach modifiziert werden. Auch die, über eine Ethenylbrücke an das Fluorophor gebundene, Tetrazineinheit lässt sich aus den kommerziell leicht erhältlichen Bausteinen 3-Hydroxypropionitril (**7**) und Acetonitril (**8**) herstellen und im weiteren Reaktionsverlauf so modifizieren, dass das methylysubstituierte Tetrazin **5** durch Kreuzkupplungsreaktion mit einem der bromierten Farbstoffe umgesetzt werden kann.

Die Synthese der Cyanin-Styryl-Farbstoffe erfolgt dabei über drei Stufen durch eine im Arbeitskreis WAGENKNECHT etablierte Synthesestrategie und soll anhand des bromierten Cyanin-Styryl-Farbstoffs **13** exemplarisch dargestellt werden (Schema 1).<sup>[144,149]</sup>

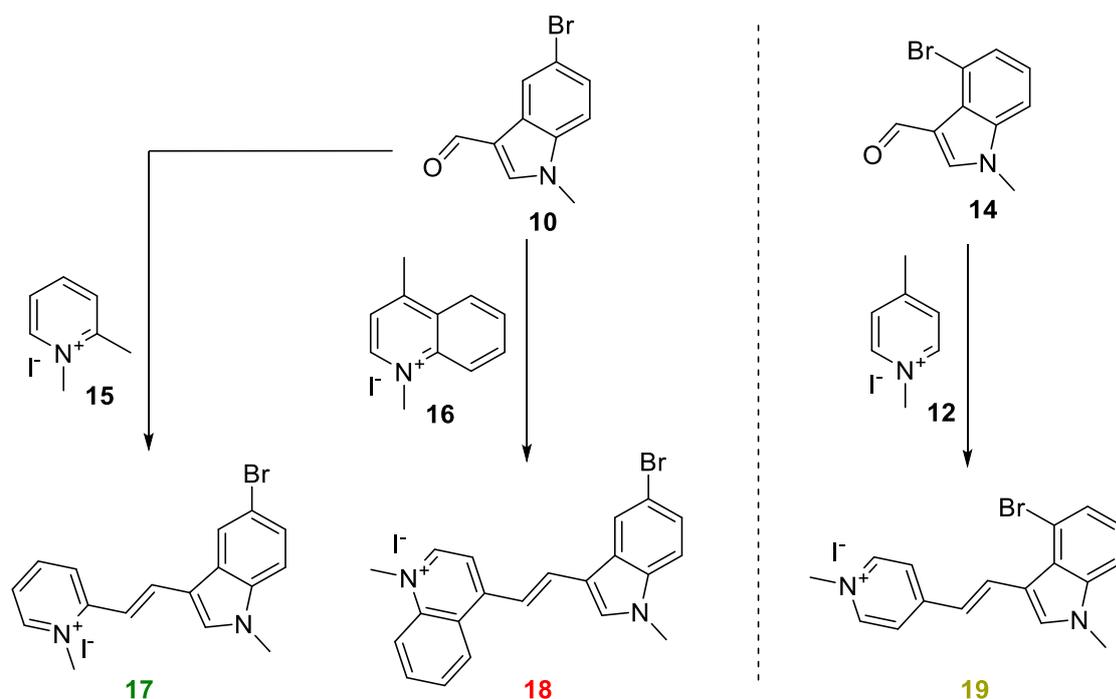


**Schema 1:** Synthesestrategie des Cyanin-Styryl-Pfads am Beispiel des Farbstoffs **13**. **a)** 1.) POCl<sub>3</sub>, DMF, 0 °C, 2 h, 2.) H<sub>2</sub>O, 2 M NaOH, pH 9, 93 %; **b)** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Dimethylcarbonat, DMF, 130 °C, 18 h, 97 %; **c)** MeI, Aceton, Reflux, 1,5 h, 97 %; **d)** Piperidin, EtOH, 80 °C, 18 h, 88 %.

Im ersten Schritt der Reaktion wird die Ausgangsverbindung 5-Bromindol (**6**) in einer Vilsmeier-Haack-Reaktion zum Indol-Derivat **9** formyliert. Dabei wird zunächst mit Phosphoroxychlorid und Dimethylformamid (DMF) ein Chloriminiumion gebildet. In einer elektrophilen aromatischen Substitution wird die Formylierung an der 3-Position des Bromindols **9** realisiert. Dabei kommt es aufgrund der erhöhten Elektronendichte des Heteroatoms am Indol ausschließlich zur Ausbildung des 3-Formyl-Produktes **9**. Dies wird in der Betrachtung der mesomeren Grenzstrukturen ersichtlich, da die entsprechende Grenzstruktur als einzige ein voll intaktes  $\pi$ -Elektronensystem am Benzolring und damit die höchste Gewichtung aufweist. Hierdurch sind bei der Formylierung von Indolen in 3-Position Ausbeuten im nahezu quantitativen Bereich möglich.

Im Anschluss an die Vilsmeier-Haack-Formylierung wurde das Heteroatom des Indols **9** zur Steigerung der Photostabilität mittels Dimethylcarbonat zum Indol-Produkt **10** methyliert (Schema 1, Reaktion b). Parallel zur Synthese des Indol-Derivats **10** wurde eine im Arbeitskreis WAGENKNECHT etablierte Methode zur *N*-Methylierung des 1-Methylpyridins **11** durchgeführt, um das Molekül in der Folgereaktion zu stabilisieren (Schema 1, Reaktion c).<sup>[139,149,150]</sup> Die so erhaltenen, modularen Bausteine **10** und **12** wurden anschließend genutzt, um in einer, im Arbeitskreis WAGENKNECHT ebenfalls gut untersuchten, aldolartigen Kondensation mit Piperidin als Base den entsprechenden, bromierten Farbstoff **13** zu erhalten.

Durch Variation der verwendeten Indol- und Pyrimidin-Derivate konnten durch die gleiche Methodik weiterhin die drei Cyanin-Styryl-Farbstoffe **17**, **18** und **19** hergestellt werden. Diese sind in Schema 2 dargestellt.

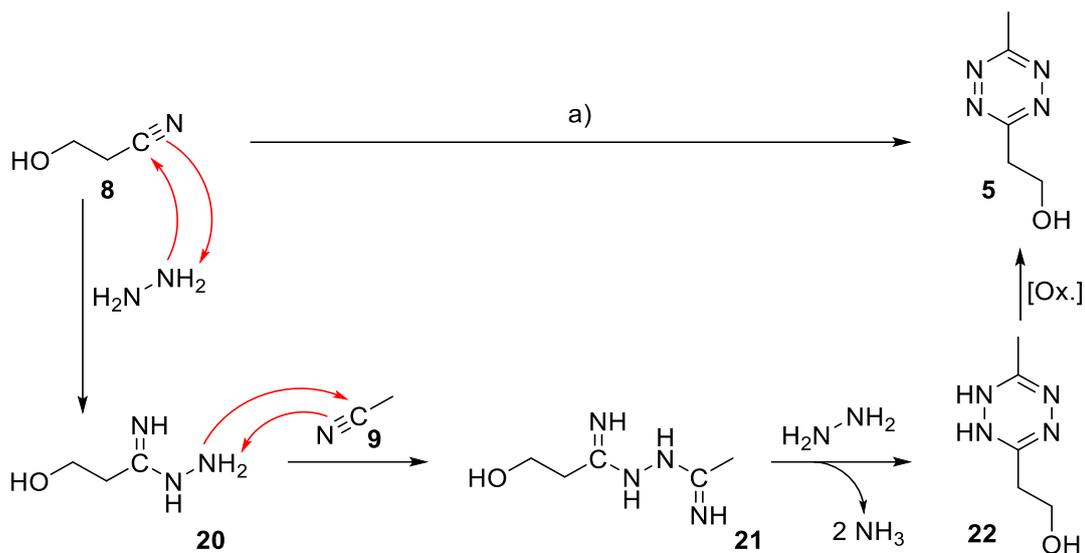


**Schema 2:** Übersicht zur Synthese der Farbstoffe **17-19** durch Variation der Indol- und Pyridinium-/Chinoliniumbausteine.

Durch Kombination von 5-Bromindol **10** und 1,2-Dimethylpyridinium **15**, sowie dem 1,4-Dimethylchinolinium **16** konnten die Cyanin-Styryl-Farbstoffe **17** und **18** hergestellt werden. Zusätzlich konnte durch das formylierte 4-Bromindol **14** mit 1,4-Dimethylpyridinium **12** der Farbstoff **19** synthetisiert werden, welcher für die Herstellung einer angewinkelten Variante der tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe dienen soll. Dabei ist die Methode so robust, dass alle Farbstoffe in sehr guten Ausbeuten von 79 – 88 % über drei Stufen erreicht werden konnten.

Die Wahl für den Tetrazinbaustein **5** erfolgte dabei unter Abwägung der Reaktivitäts-Stabilitäts-Beziehung der Tetrazinstruktur. Dabei bieten methylsubstituierte Tetrazine in der Literatur einen guten Kompromiss zwischen Stabilität und Reaktivität.<sup>[64]</sup> Während monosubstituierte Tetrazine in der Regel eine höhere Reaktivität als ihre methylsubstituierten Analoga zeigen, sind diese für die meisten Anwendungen zu labil, was besonders für die Verwendung von monosubstituierten Tetrazinen für fluorogene Farbstoffe von Nachteil ist.<sup>[111]</sup> Die Synthese des literaturbekannten methylsubstituierten-Tetrazinbausteins **5** erfolgte über zwei Stufen (Schema 3). Dabei

wurden die Synthesestrategien der Arbeitsgruppen KELE *et al.* und DEVARAJ *et al.* adaptiert und angepasst.<sup>[127,151]</sup>

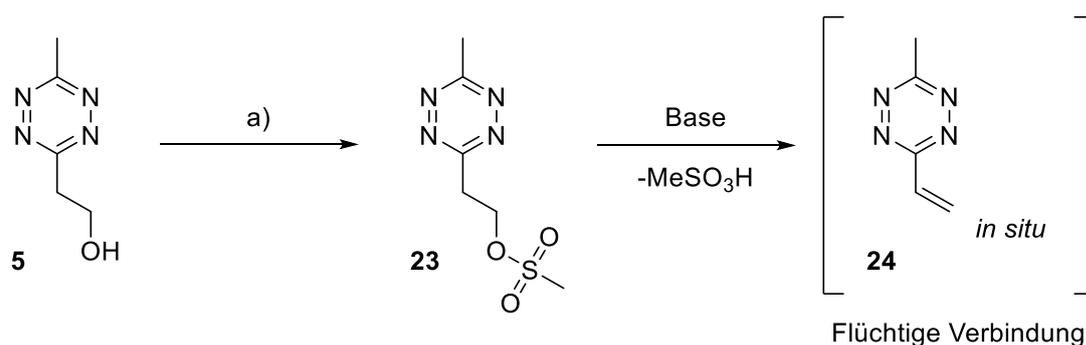


**Schema 3:** Synthese des Tetrazinbausteins **5**, ausgehend von 3-Hydroxypropionitril (**8**) (oben); **a**) 1.) ZnI<sub>2</sub>, MeCN (**9**), H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 60 °C, 18 h, 2.) NaNO<sub>2</sub>, 1 M HCl (pH = 3), 0 °C, 48 %. Postulierter Reaktionsmechanismus zur Bildung von Tetrazinen aus Nitrilen (unten). Die Verbindungen **20-22** wurden nicht isoliert.

Als Startverbindung wurde kommerziell erhältliches 3-Hydroxypropionitril (**8**) verwendet. Dabei wurde **8** zunächst mit Hydrazin-Monohydrat zum Amidrazon **20** umgesetzt. Anschließend kommt es durch nukleophilen Angriff des Amidrazons **20** am Nitrilkohlenstoff des Acetonitrils (**9**) zur Bildung der Tetrazin-Vorläuferverbindung **21**. Durch Umsatz eines weiteren Äquivalents Hydrazin-Monohydrat unter Anwesenheit eines Zink-Katalysators entsteht das Dihydrotetrazin **22**, welches anschließend unter oxidativen Bedingungen zum Tetrazinbaustein **5** weiterreagiert. Da die Reaktion zwischen zwei asymmetrischen Nitrilen stattfindet, entsteht beim Umsatz stöchiometrischer Mengen dieser Nitrile nennenswerte Mengen an Nebenprodukte in Form der korrespondierenden, symmetrischen Tetrazine. Aus diesem Grund wurde Acetonitril in einem Überschuss von 50 Äquivalenten zugesetzt, um das symmetrische Tetrazinprodukt aus zwei Einheiten des 3-Hydroxypropionitrils (**8**) zu minimieren und so die Bildung von **5** zu begünstigen. Des Weiteren wurde Zink(II)iodid als Katalysator eingesetzt, da durch Koordination der Vorläuferverbindung **21** an ein Zink-Kation ein effizienter Ringschluss des Tetrazins zum Dihydroprodukt **22** gewährleistet wird. Als Oxidationsmittel wurde Natriumnitrit

verwendet, welches unter Kühlung mit 1 M HCl versetzt wurde. Diese Methode gewährleistet eine schonende und kontrollierte Oxidation des empfindlichen Dihydropyridazins **22**. Auf diese Weise konnte der Tetrazinbaustein **5** mit einer, für diesen Reaktionstypus hohen Ausbeute von 48 % erhalten werden.

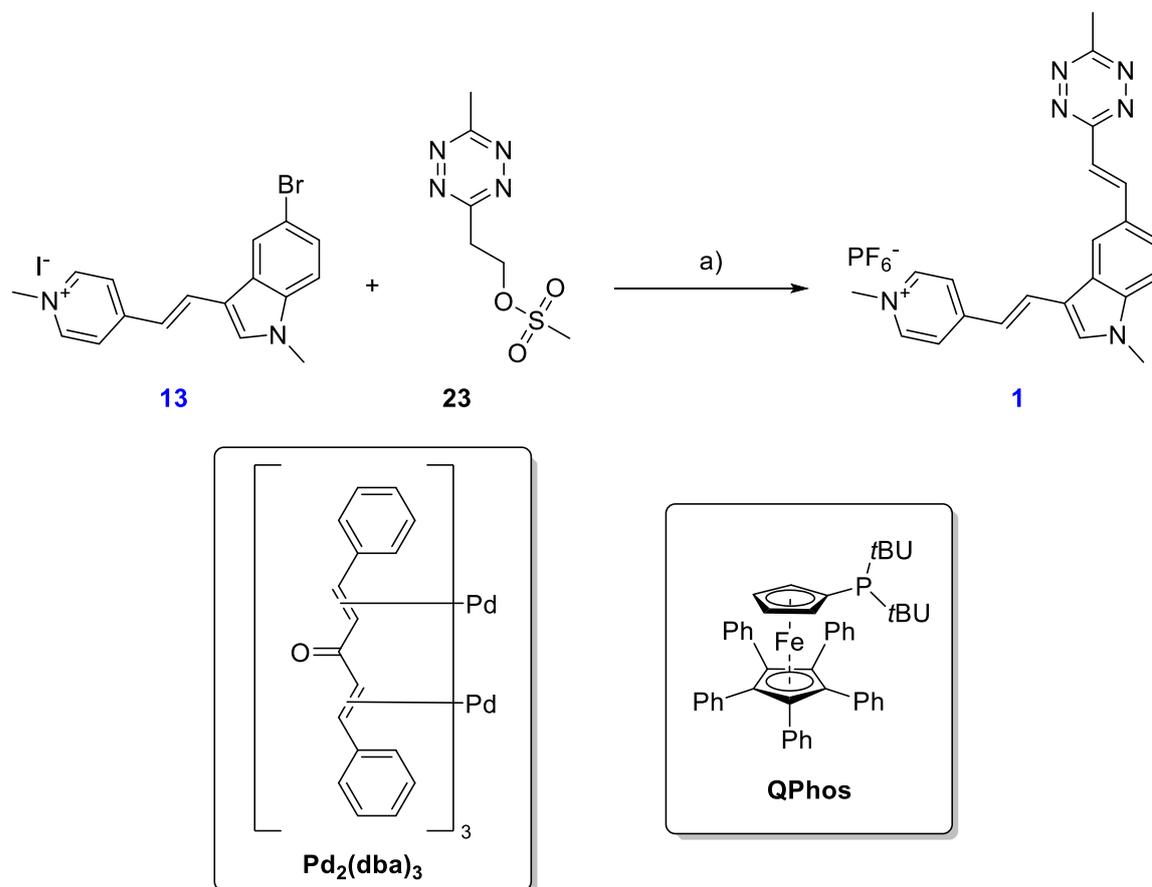
Da in nachfolgenden Reaktionen der Tetrazinbaustein **5** über eine Kreuzkupplung mit dem gewünschten Farbstoff verknüpft werden sollte, wurde das Tetrazin **5** weiter modifiziert. Hierfür eignet sich durch Verwendung der bromierten Variante der Cyanin-Styryl-Farbstoffe, eine Heck-Kupplung nach dem Vorbild von DEVARAJ *et al.*<sup>[127]</sup> Allerdings muss das Tetrazin dafür eine endständige Vinylfunktion tragen, was aufgrund der Flüchtigkeit dieser Verbindung nicht direkt zugänglich ist. Eine Lösung wurde dabei von DEVARAJ *et al.* entwickelt, indem sie die Hydroxy-Funktionalität durch eine Methansulfonylgruppe ersetzen, um eine gute Abgangsgruppe für eine spätere Eliminierung zur Erzeugung eines Vinyl-Tetrazins (**24**) unter basischen Bedingungen *in situ* zu schaffen.<sup>[127]</sup> Hierzu wurde Tetrazin **5** mit Triethylamin und Methansulfonylchlorid in einer nukleophilen Substitution zum mesylierten Tetrazin **23** mit einer Ausbeute von 91 % umgesetzt (Schema 4). Das so erhaltene Tetrazin **23** ist temperatur- und luftstabil und kann in Folge gezielt für die Synthese der tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophore eingesetzt werden.



**Schema 4:** Synthese des mesylierten Tetrazins **23** und anschließender Bildung des flüchtigen Vinyl-Analogons **24** *in situ*. **a)** Methansulfonylchlorid, Et<sub>3</sub>N, DCM, 25 °C, 30 min, 91 %.

Für die Umsetzung der Heck-Kupplung wurde eine modifizierte Synthesemethode von DEVARAJ *et al.* adaptiert.<sup>[127]</sup> Hierbei wurden als Katalysator und Liganden-Paar Tris-(dibenzylidenaceton)-dipalladium(0) (Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>) und 1,2,3,4,5-Pentaphenyl-1'-(di-*tert.*-butylphosphino)-ferrocen (Q-Phos) verwendet. Da freie Palladium-Kationen in der Lage sind, Tetrazine zu komplexieren und damit katalytisch zu deaktivieren, wird der sterisch

gehinderte Ligand Q-Phos verwendet, um einen räumlichen Abstand zu gewährleisten.<sup>[127,152,153]</sup> Die Heck-Kupplung ist am Beispiel der Synthese des tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophors **1** exemplarisch in Schema 5 dargestellt.



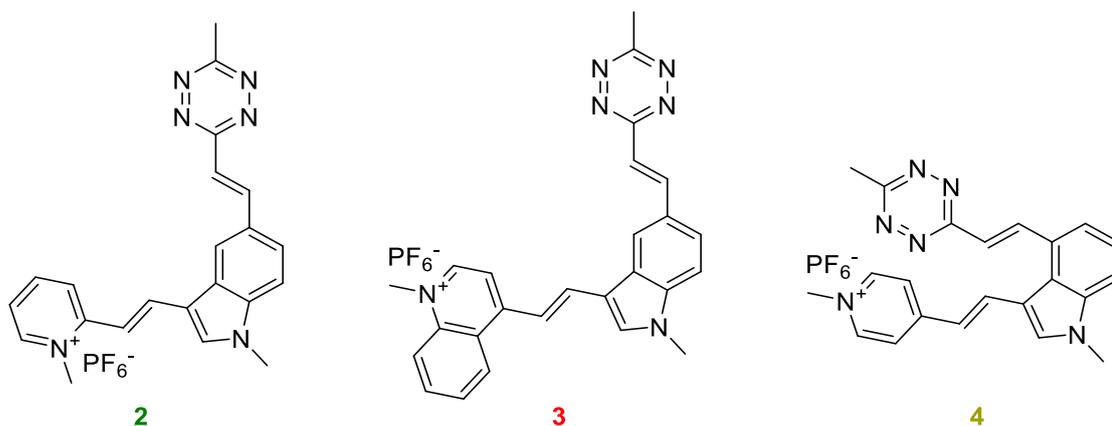
**Schema 5:** Synthese des tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophors **1** über eine Heck-Kupplung. **a)** 1.)  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , QPhos,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, 18 h, 100 °C, 2.)  $\text{KPF}_6$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$  (1:1 V/V%), RT, 30 min, 33 %.

Während der Reaktion kommt es zunächst zum Ligandenaustausch der dba-Liganden mit Q-Phos, welche die katalytisch wirksame Pd(0)-Spezies bilden. Da die Heck-Kupplung unter basischen Bedingungen stattfindet, bildet sich zudem während der Reaktion *in situ* die Vinyl-Tetrazinspezies **24**. Im Vergleich zu der in der Literatur angegebenen Methode wurde die Synthese der tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen in einigen Punkten modifiziert.

So wurde die Reaktionen von DEVARAJ *et al.* in eine Labormikrowelle bei Temperaturen um die 60 °C für 30–40 min durchgeführt. Bei der Adaption dieser Methodik konnte allerdings keine Bildung des Produkts **1** beobachtet werden. Gründe dafür könnten in der

niedrigen Reaktionstemperatur und den nicht luftdicht verschließbaren Mikrowellengefäßen, wodurch das leicht flüchtige Tetrazin **24** entweichen konnte, liegen. Um dem entgegenzuwirken, wurde die Reaktion in dicht verschließbaren *Crimp*-Gefäßen in einem Metallheizblock bei 100 °C durchgeführt. Auf diese Weise wurde zwar die Bildung des Produkts beobachtet, allerdings konnte durch den stark positiven Charakter des Produktes keine reine Fraktion isoliert werden. Da die von DEVARAJ *et al.* verwendete Base *N,N*-Dicyclohexylmethylamin nur eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweist, konnte diese nicht durch Waschen der organische Phasen entfernt werden, so dass die Base bei säulenchromatischer Aufreinigung stets zusammen mit dem Produkt **1** erhalten wurde. Eine Verbesserung konnte durch die Verwendung der wasserlöslichen Base Triethylamin erzielt werden. Um die Aufreinigung von **1** weiter zu optimieren, wurde nach der Heck-Kupplung ein Anionenaustausch von Iodid durch Hexafluorophosphat durchgeführt. Der Austausch stark kovalent-bindender Iodid-Ionen durch nur schwach koordinierende Hexafluorophosphat-Anionen führt zu einer verbesserten Löslichkeit des Produkts, was in einer einfacheren Aufarbeitung resultiert. Durch Inkorporation dieser Anpassungen in die Synthese konnte der tetrazinmodifizierte Cyanin-Styryl-Fluorophor **1** mit einer Ausbeute von 33 % erhalten werden.

Auf dieser Basis konnten durch Einsatz der Farbstoffe **17-19** unter den gleichen Bedingungen die entsprechenden tetrazinmodifizierten Fluorophore **2-4** hergestellt werden (Abbildung 23). Dabei wurden die Fluorophore **2** und **4** ebenfalls mit Ausbeuten von 33 %, bzw. 31% erhalten. Dies spricht für eine hohe Robustheit der Methode, welche unabhängig von der Position des Broms am Indol und der Methylfunktion am Pyridiniumion ist. Einzig die Synthese des Fluorophors **3** ergab eine deutlich geringere Ausbeute von 13 %. Gründe dafür liegen vor allem in dem erhöhten Aufwand bei der Aufarbeitung des Fluorophors. So konnte das Produkt erst nach mehrmaliger säulenchromatographischer Aufreinigung sauber erhalten werden.



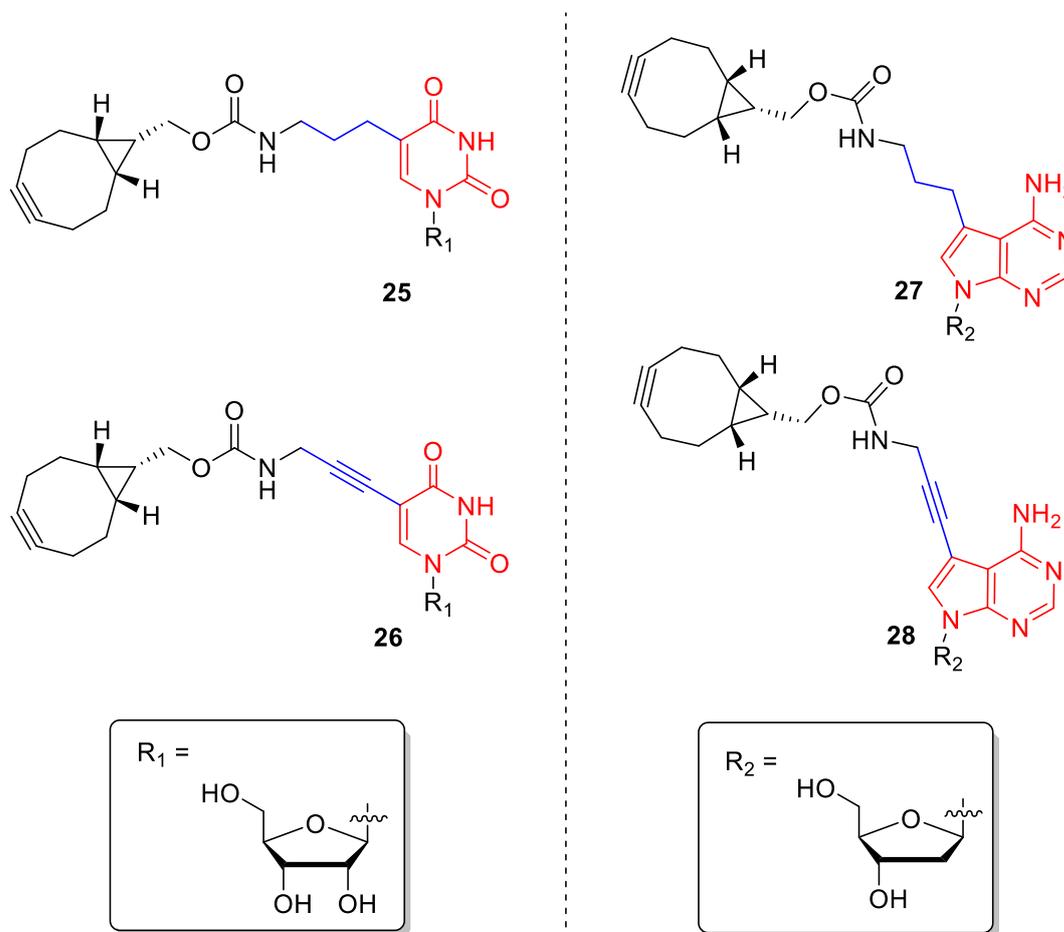
**Abbildung 23:** tetrazinmodifizierte Cyanin-Styryl-Fluorophore mit grüner (2), roter (3) und gelber (4) Fluoreszenz.

## 4.2. Synthese BCN-modifizierter Nukleoside

Die Reaktivität und der *Turn-on* tetrazinmodifizierter Fluorophore ist stark vom verwendeten Dienophil und dessen Substitutionsmuster abhängig. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit empirisch untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene Substitutionsmuster von BCN-modifizierten Nukleosiden auf die *iEDDA*-Reaktion mit den hergestellten Cyanin-Styryl-Fluorophoren haben.

Aufgrund seiner hohen Reaktivität wurde BCN für diese Versuche verwendet.<sup>[109]</sup> BCN und seine Derivate sind kommerziell erwerblich und somit für die synthetische Modifikation von Nukleosiden einfach zugänglich. Um ein effizientes Design dieser Dienophil-Nukleoside für biochemische Anwendungen zu entwerfen, wurden die Nukleoside an unterschiedlichen Positionen variiert. Dabei wurde unter anderem der Linker zwischen der Nukleobase und dem BCN-Dienophil betrachtet. Hierbei wurde vermutet, dass die Anzahl möglicher Freiheitsgrade sowie der räumliche Abstand des Dienophils zur Nukleobase einen unmittelbaren Einfluss auf die Reaktivität und die Fluoreszenzsteigerung in der *iEDDA*-Reaktion haben. Als Verknüpfung zwischen Linkersystem und der BCN-Funktion wurde eine Carbamatgruppe gewählt, um so die Elektronendichte am Dienophil zu erhöhen und die Reaktivität des Dienophils in der *iEDDA*-Reaktionen zu steigern. Weiterhin wurde ein Einfluss der Nukleobase auf die *iEDDA*-Reaktion mit tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophoren hinsichtlich ihrer Reaktivität und dem *Turn-on* erwartet. Hierbei sollen die Effekte von Purin- und

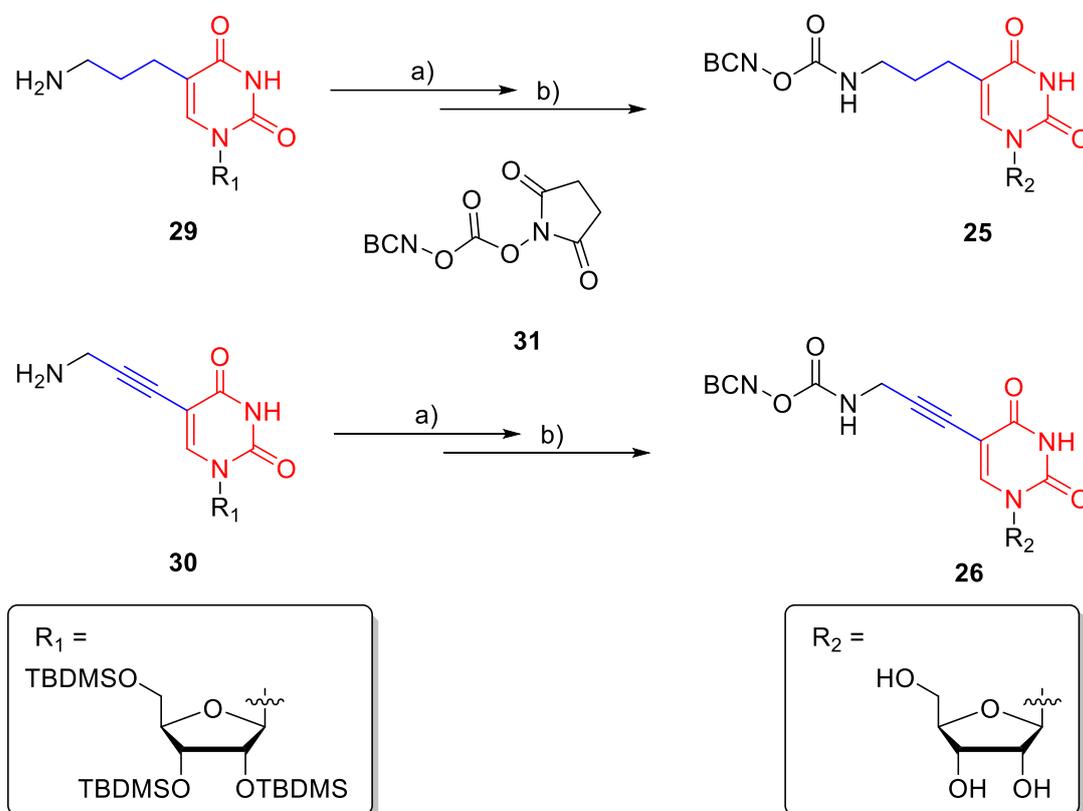
Pyrimidinbasen auf die *iEDDA*-Reaktion näher betrachtet werden. Als Basis hierfür dienten in der Literatur für biochemische Anwendungen häufig genutzte, in 5-Position modifizierte, 2'-Desoxyuridine und 7-Deaza-2'-desoxyadenosine. Eine Übersicht der anvisierten modifizierten Nukleoside ist in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten, BCN-modifizierten Nukleoside **25-28**. In rot sind die Nucleobasen Uracil und 7-Deaza-Adenin dargestellt. In blau ist die Variation der Alkyl linker zum Carbamat-verknüpften BCN abgebildet.

Die Synthesen der modifizierten Uridine sind im Arbeitskreis WAGENKNECHT etabliert und werden nach Standardprotokollen durchgeführt. Dabei werden die in 5-Position modifizierten Uridine mit freier Aminfunktion **29** und **30** in wenigen Schritten aus 5-Ioduridin dargestellt.<sup>[154,155]</sup> Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit dem kommerziell erhältlichen, aktivierten BCN-NHS-Ester **31** umgesetzt (Schema 6, Reaktion a). Die nukleophile Substitutionsreaktion wurde unter basischen Bedingungen und THF als aprotisches Lösemittel durchgeführt, um eine Protonierung der

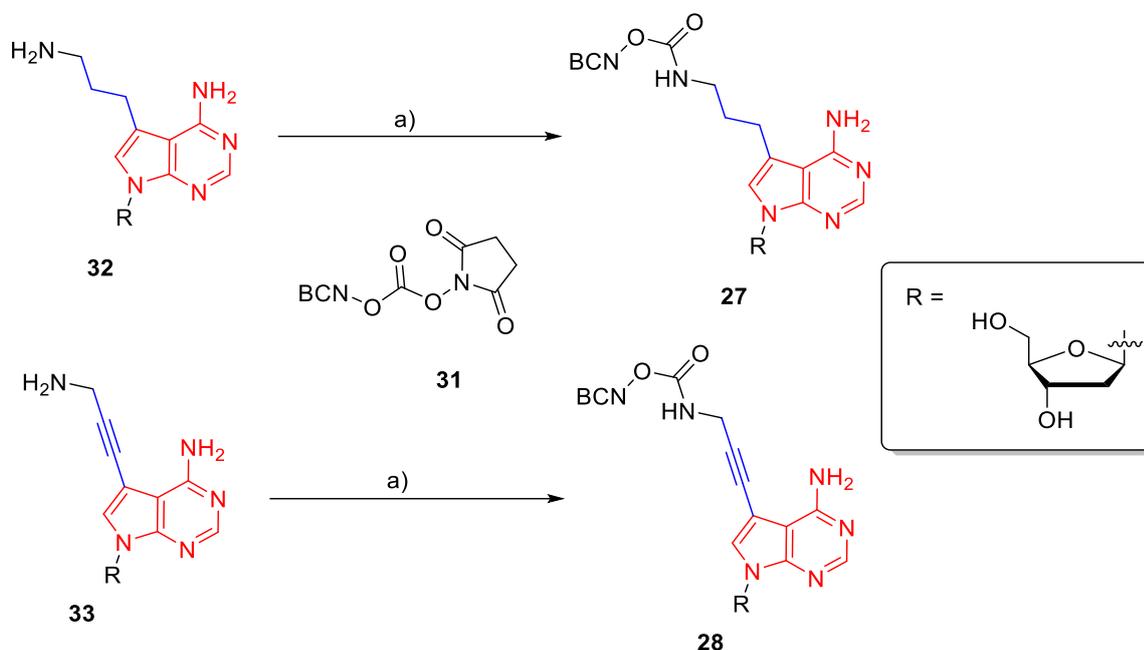
freien Aminfunktion auszuschließen. Dadurch konnten im Folgeschritt die *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppen (TBDMS) durch Zugabe von Triethylamintrihydrofluorid (TREAT-HF) abgespalten und so das BCN-modifizierte Nucleoside **25** mit einer Ausbeute von 29 % über zwei Stufen erhalten werden (Schema 6, Reaktion b). Das BCN-modifizierte Uridin mit starrem Linker **26** wurde analog von Eileen List im Zuge ihrer Masterarbeit synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



**Schema 6:** Übersicht zur Synthese der BCN-modifizierten Uridine mit flexiblen (**25**) und starrem (**26**) Linker. **a)** BCN-succinimidylcarbonat (**31**), Et<sub>3</sub>N, THF, RT, 19 h; **b)** Et<sub>3</sub>N·3 HF, THF, RT, 18 h, **25**: 29 %\*, **26**: 55 %\*. \*Erhaltene Ausbeute über zwei Stufen.

Die Synthesen der aminmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine **32** und **33** erfolgten ebenfalls nach literaturbekannten Verfahren. Anders als bei der Synthese der aminmodifizierten Uridine, wurde das 7-Deaza-2'-desoxyadenosin aus 2-Desoxyribose nach einer Methode von SEELA *et al.* aufgebaut und der Amin-Linker nach bekannten Methoden über die 7-Deaza-Position verknüpft.<sup>[154-156]</sup> Die Reaktionen zu den BCN-modifizierten Produkten **27** und **28** erfolgte anschließend nach derselben Syntheseroute wie die Synthese der Uridin-Analoga (Schema 7). Dadurch, dass für die Adenosin-Analoga

2-Desoxy-Zucker verwendet wurden, konnte hier auf die Verwendung von TBDMS-Schutzgruppen verzichtet werden. Die erzielten Ausbeuten der Kupplungsreaktion liegen im Bereich von 60 % (**27**) und 70 % (**28**) und sind mit den Ausbeuten der BCN-Kupplung der Uridine ohne Entschüttungsschritt vergleichbar.

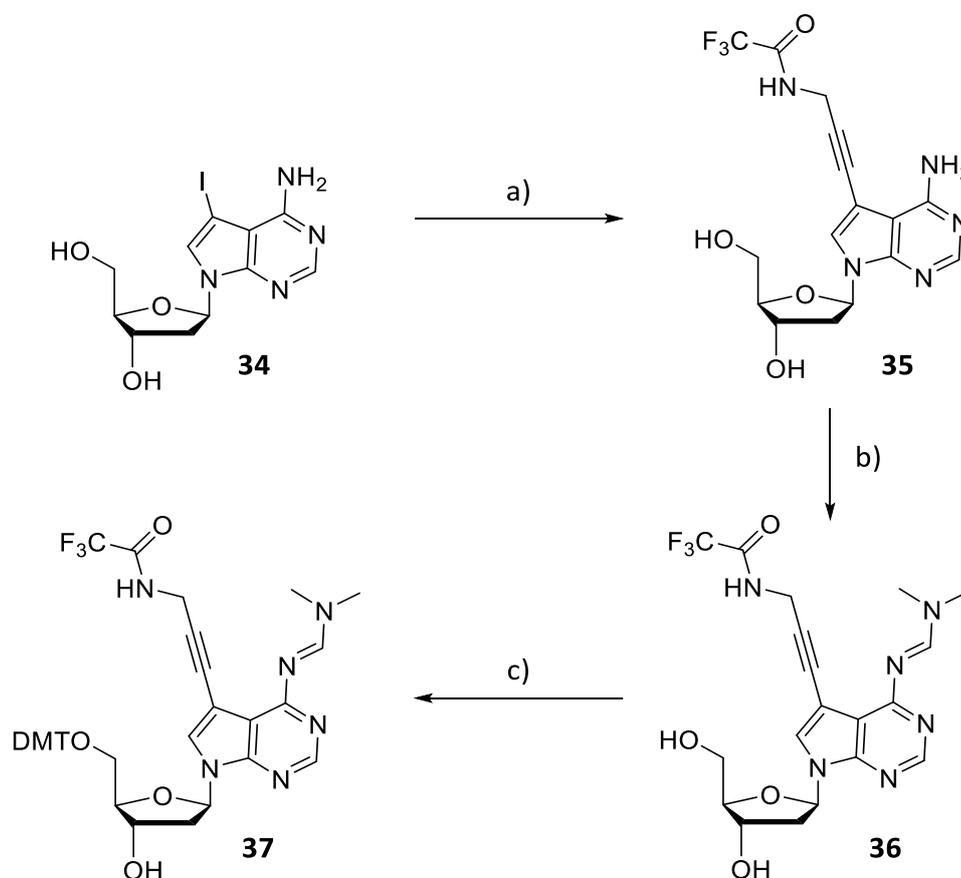


**Schema 7:** Übersicht zur Synthese der BCN-modifizierten Desoxyadenine mit flexiblen (**27**) und starrem (**28**) Linker. **a)** BCN-succinimidylcarbonat (**31**), Et<sub>3</sub>N, THF, RT, 19 h, **27**: 60 %, **28**: 70 %.

### 4.3. Synthese BCN-modifizierter Oligonukleotide

Um zu untersuchen, ob die hergestellten tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophore für biochemische Anwendungen mit Oligonukleotiden *in vivo* und *in vitro* verwendbar sind, wurde eine Auswahl an Oligonukleotiden hergestellt. Hierbei wurden die 7-Deaza-2'-desoxyadenosine **32** und **33** mit flexiblem- und starrem Linkersystem verwendet, um kurzkettige DNA-Einheiten von 17 Basenpaaren nach Standard-Festphasensynthese-Protokoll herzustellen.<sup>[157,158]</sup> Für dieses Syntheseprotokoll mussten die Bausteine zunächst durch Einführung einer Reihe an Schutzgruppen angepasst werden (Schema 8). Dabei wurde, ausgehend von 7-Deaza-7-iodo-2'-desoxyadenosin (**34**), zunächst ein trifluoressigsäure-geschützter Aminopropargyllinker über eine Sonogashira-Kupplung an der 7-Deaza-Position angebracht. Anschließend wurde das freie Amin der Purinbase mit einer Dimethylformamid-dimethylacetal-Gruppe (DMF-DMA) geschützt, da diese bei der

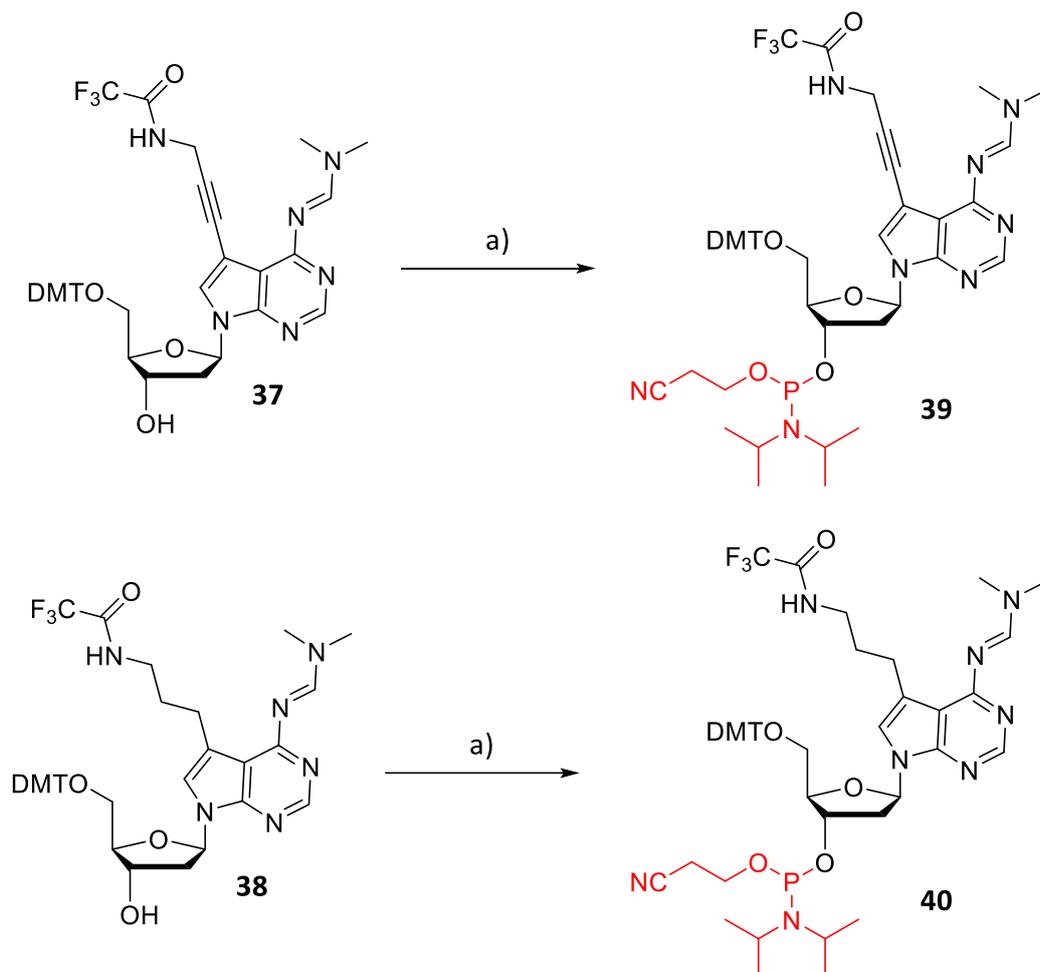
Abspaltung des Oligonukleotids von der Festphase, durch Zugabe einer starken Base wieder entfernt werden kann. Anschließend wurde eine Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) nach der Methode von SEELA *et al.* an der 5'-Position des Nucleosids **36** eingeführt.<sup>[156]</sup>



**Schema 8:** Synthese des geschützten Nucleosids **37** für den Einbau in Oligonucleotide. **a)** CuI, TFA-Aminpropargyl, Et<sub>3</sub>N, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DMF, RT, 24 h, 87 %; **b)** DMF-DMA, MeOH, 40 °C, 16 h, 67 %; **c)** DMT-Cl, Pyridin, MeOH, RT, 16 h, 29 %.

Nach dieser Syntheseroute konnten die geschützten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine mit starrem (**37**) und flexiblem (**38**) Linkersystem hergestellt werden. Im letzten Schritt vor der Festphasenreaktion wurden die 7-Deaza-2'-desoxyadenosine an der 3'-Hydroxygruppe durch Reaktion mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit mit DIPEA als Base in eine aktivierte Phosphoramiditgruppe umgesetzt (Schema 9). Die erhaltenen Phosphoramidite **39** und **40** wurden dabei jeweils in quantitativer Ausbeute erhalten. Aufgrund der geringen Stabilität der aktivierten Phosphoramiditgruppen

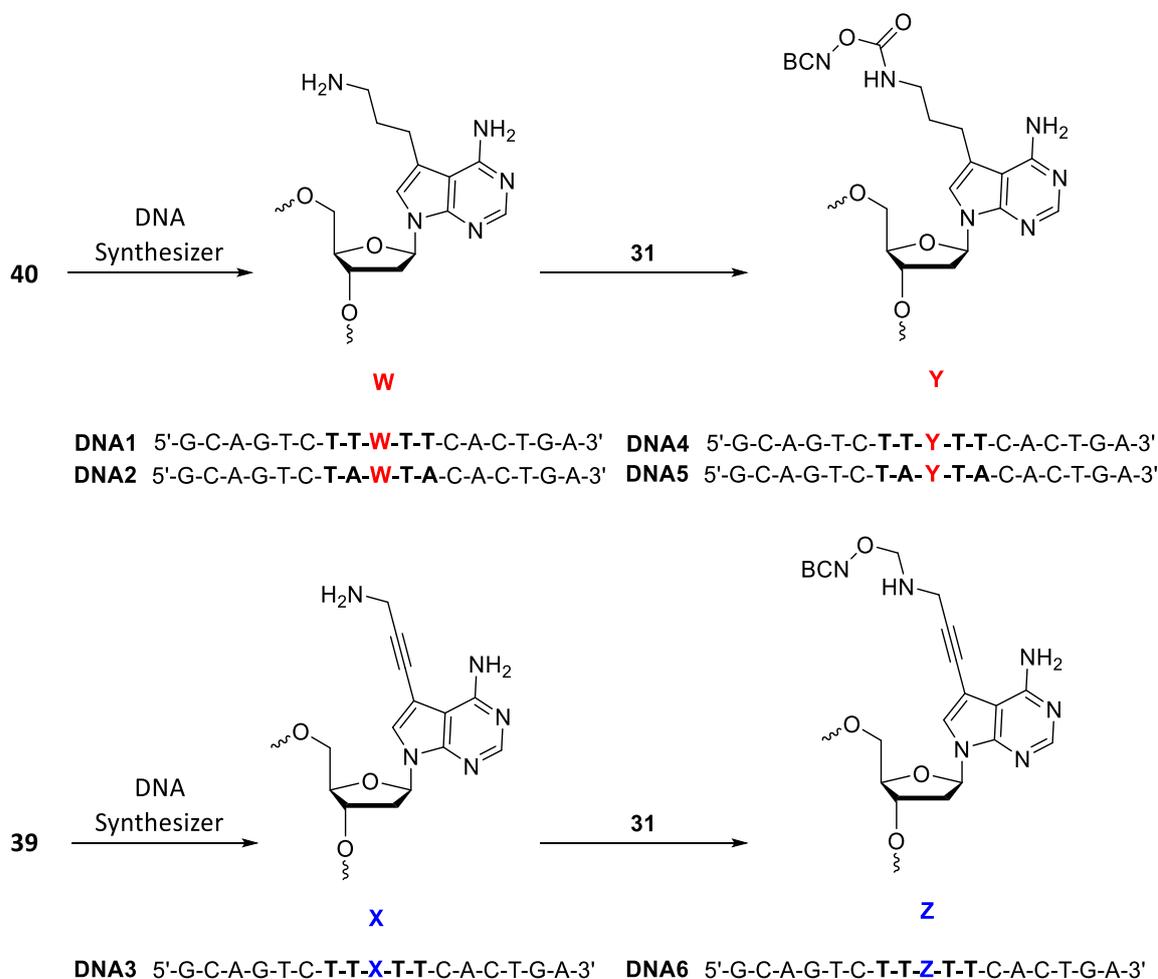
wurden die Phosphoramidite direkt umgesetzt, um einer längeren Lagerzeit entgegenzuwirken.



**Schema 9:** Synthese der aktivierten Phosphoramidite **39** und **40**; a) DCM, DIPEA, 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, RT, 3,5 h, **39**: quant., **40**: quant.

Nach der Synthese der Phosphoramidite **39** und **40** wurden die entsprechenden Oligonukleotide nach Standard-Festphasensynthese-Protokoll (siehe Kapitel 8.3) hergestellt (Schema 10).<sup>[157,158]</sup> Dabei wurden die für **ssDNA1** und **ssDNA3** verwendeten Sequenzen aus früheren Experimenten der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT übernommen.<sup>[159-161]</sup> Um eine Sequenzunabhängigkeit der *iEDDA*-Reaktion nachzuweisen, wurde die Sequenz jeweils an der linken und rechten Position der modifizierten Nucleobase variiert (**ssDNA2**). Die so hergestellten Oligonukleotide wurden anschließend von der Festphase abgespalten und mittels DMT-Affinitätssäulen aufgereinigt. Der Nachweis der Produkte erfolgte über MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Kapitel 8.3, Tabelle 6). Im nächsten

Schritt wurden die BCN-modifizierte Oligonukleotide postsynthetisch hergestellt (Schema 10). Dabei wurden die aminfunktionalisierten Oligonukleotide mit dem BCN-NHS-Ester **31** und DIPEA in DMSO umgesetzt und anschließend über Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) aufgereinigt (Kapitel 8.3, Tabelle 7).

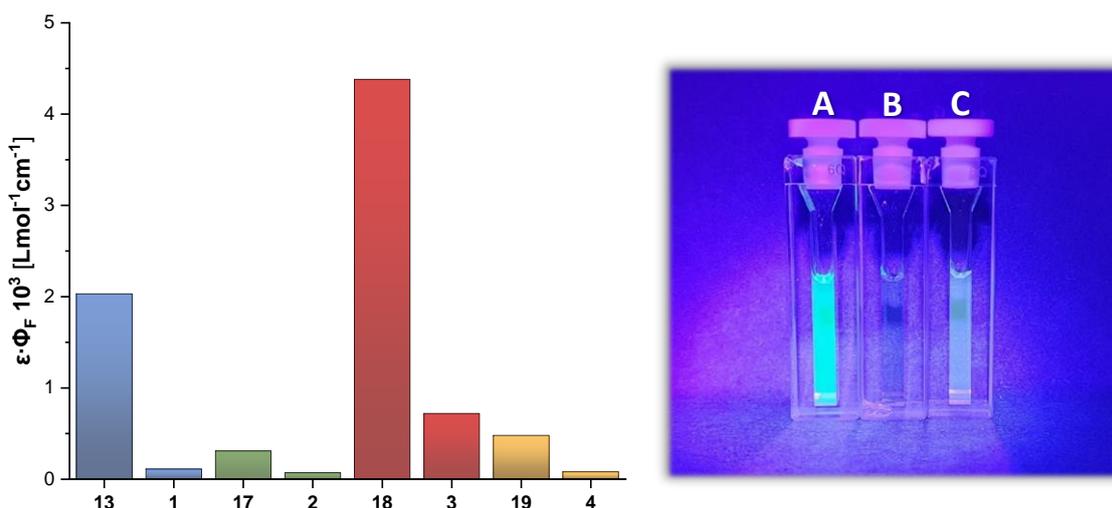


**Schema 10:** Synthese der aminfunktionalisierten Oligonukleotide nach Standard-Festphasensynthese mit anschließender Post-Synthese der aminfunktionalisierten Oligonukleotiden mit dem BCN-NHS-Ester **31** zu den BCN-modifizierten Oligonukleotiden **ssDNA4**, **ssDNA5** und **ssDNA6**.

Die Konzentration der aufgereinigten Oligonukleotide wurde *via* UV/Vis-Spektroskopie über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt. Um die *iEDDA*-Reaktion von tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophoren mit doppelsträngigen Oligonukleotiden zu untersuchen, wurden die postsynthetisch modifizierten Oligonukleotide mit ihren komplementären Gegensträngen hybridisiert. Der Erfolg der Hybridisierung über die Schmelztemperaturkurven der doppelsträngigen Oligonukleotide bestimmt (Kapitel 8.3, Tabelle 9).

## 5. Spektroskopische Untersuchungen

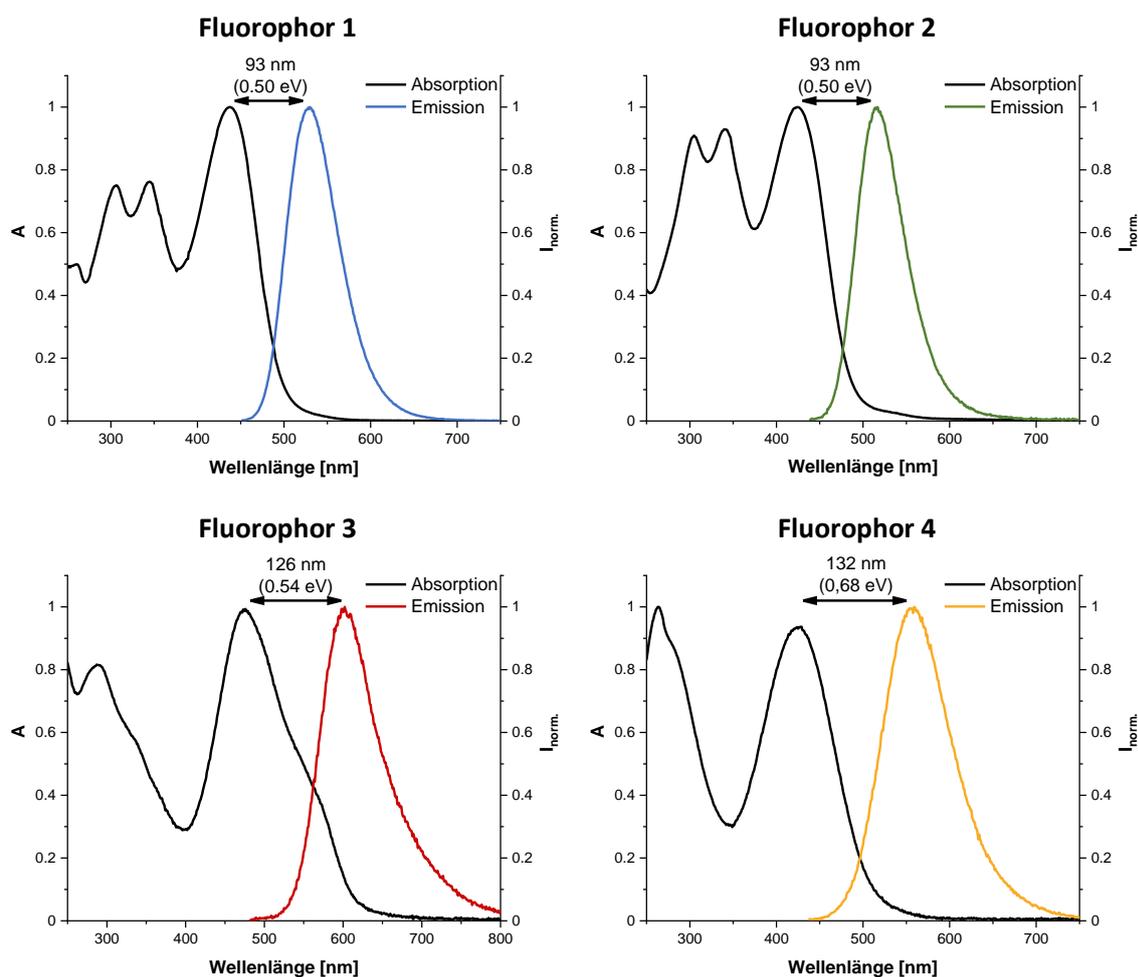
Um eine Basis für den Vergleich der spektroskopischen Daten nach der *iEDDA*-Reaktion zu schaffen, wurden zunächst die tetrazinmodifizierten Fluorophore und die Farbstoff-Analoga spektroskopisch charakterisiert. Hierbei wurde der dekadische Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum in trockenem DMSO bestimmt und nach dem Lambert-Beer-Gesetz ausgewertet (Kapitel 8.4, Tabelle 10). Die erhaltenen Werte liegen dabei alle im Bereich literaturbekannter Cyanin-Styryl-Farbstoffe.<sup>[139-141]</sup> Im Anschluss wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffe in DMSO bestimmt. Hierbei wird ersichtlich, dass die tetrazinmodifizierten Fluorophore deutlich niedrigere Fluoreszenz-quantenausbeuten aufweisen als deren Farbstoff-Analoga. Dies deckt sich mit dem Wissen aus der Literatur, in welchem Tetrazine fluoreszenzlöschende Eigenschaften aufweisen und so zu einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute führen.<sup>[133,162]</sup> Um die Effizienz der Farbstoffe bezüglich ihrer Fluoreszenz evaluieren zu können, wurde aus dem Produkt der Fluoreszenzquantenausbeute und dem dekadischen Extinktionskoeffizienten die Helligkeit bestimmt (Abbildung 25 links, auch: Kapitel 8.4, Tabelle 10).



**Abbildung 25:** Darstellung der Helligkeit der hergestellten Cyanin-Styryl-Farbstoffe und den tetrazinmodifizierten Fluorophore (links). Optische Betrachtung der Fluorophore bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm: **(A)** Cyanin-Styryl-Farbstoff **13**, **(B)** Tetrazinmodifiziertes Fluorophor **1** vor der *iEDDA*-Reaktion, **(C)** Tetrazinmodifiziertes Fluorophor **1** nach der *iEDDA*-Reaktion (rechts).

Bei der Betrachtung der Helligkeit der bromierten Farbstoffe, fällt zunächst die erhöhte Helligkeit des grünen Farbstoffs **13** und des roten Farbstoffs **18** auf. Das liegt nicht zuletzt an ihren vergleichsweise hohen Fluoreszenzquantenausbeuten von 7 % (**13**) und 13 % (**18**).<sup>[139]</sup> Nachdem die Farbstoffe mit dem Tetrazin konjugiert wurden, konnte eine signifikante Abnahme der Helligkeit, aufgrund der stark verringerten Fluoreszenzquantenausbeuten, beobachtet werden. Dieser Unterschied in der Helligkeit kann dabei auch optisch nachverfolgt werden (Abbildung 25, rechts). So zeigt der tetrazinmodifizierte Fluorophor **13** bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm nahezu keine Fluoreszenz (**B**), während das Farbstoff-Analogon deutlich grün fluoresziert (**A**). Erst nach der *iEDDA*-Reaktion mit einem Dienophil ist erneut eine grüne Fluoreszenz erkennbar (**C**). Diese Ergebnisse unterstreichen dabei das zugrundeliegende Prinzip der Fluorophore und bestätigen die potentielle Anwendung dieser Tetrazin-Farbstoff-Konjugate in biochemischen Versuchen.

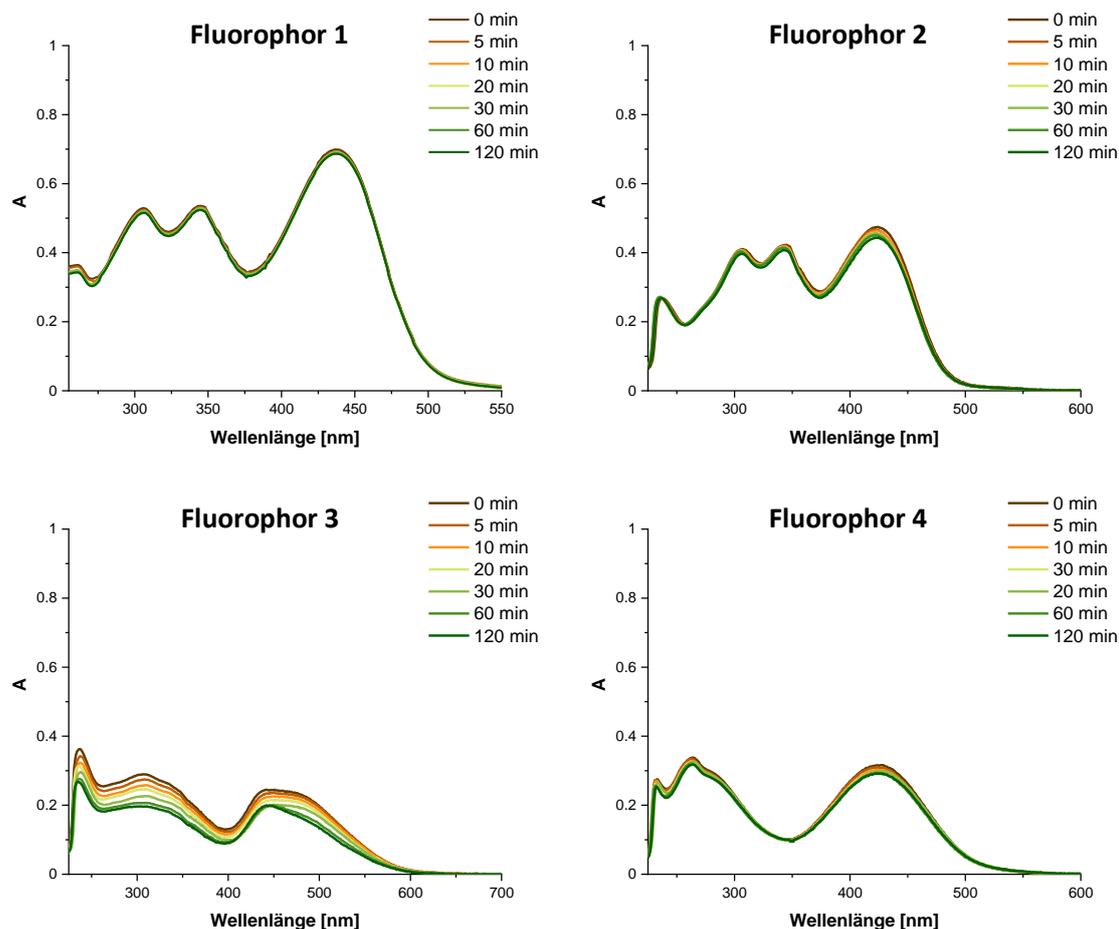
Da für eine biochemische Anwendung eine möglichst große Stokes-Verschiebung benötigt wird, um die Emissionsbande weit genug von der Anregungswellenlänge zu trennen, wurde zusätzlich die Stokes-Verschiebung der tetrazinmodifizierten Fluorophore bestimmt (Abbildung 26). Dabei konnte eine Stokes-Verschiebung von ca. 0,50 eV für die grünen und roten Fluorophore bestimmt werden. Die Stokes-Verschiebung des gelben Fluorophors zeigt, aufgrund seiner Substitution des Tetrazins in 4-Position mit 0,68 eV eine deutlich höhere Verschiebung. Damit weisen die tetrazinmodifizierten Fluorophore deutlich größere Stokes-Verschiebungen auf als bisher publizierte Tetrazinfluorophore. Während Coumarin-Analoga mit 50 nm noch eine der höchsten Verschiebungen aufweisen, erreichen von WEISSELER *et al.* hergestellte tetrazinmodifizierte BODIPY-Farbstoffe nur eine Stokes-Verschiebung von ungefähr 20 nm.<sup>[124]</sup> Von WOMBACHER *et al.* entwickelte Rhodamin-/ und Fluorescein-Fluorophore weisen mit einer Stokes-Verschiebung von ca. 20 nm ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen Anregungs-/ und Emissionswellenlängen auf.<sup>[137]</sup> Durch die hohe Stokes-Verschiebung der tetrazinmodifizierten Fluorophore **1-4**, sollte es möglich sein, eine ausreichende Trennung zwischen der Anregungs-/ und Emissionswellenlänge zu gewährleisten und so das Signal der Anregungswellenlänge zu minimieren.



**Abbildung 26:** Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren der tetrazinmodifizierten Fluorophore 1-4. Die Stokes-Verschiebung wurde über die Differenz zwischen dem jeweiligen Maximum der Absorption und der Emission bestimmt.

Eine weitere wichtige Eigenschaft zur Verwendung der Fluorophore in bioorthogonalen Anwendungen ist die Stabilität der Tetrazinfunktionalität in wässriger Lösung bzw. biologischer Umgebung. Insbesondere Tetrazine mit elektronenziehenden Substituenten sind dafür bekannt, sich langsam in wässriger Lösung zu zersetzen.<sup>[163,164]</sup> Aus diesem Grund wurde für die hier hergestellten Fluorophore eine Testreihe durchgeführt, um Aufschluss über deren Stabilität in wässriger Umgebung zu erhalten. Hierbei wurden von den tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophoren jeweils eine 30,0  $\mu\text{M}$  Lösung in einem Lösemittelgemisch aus  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  (99:1 V/V%) hergestellt. Die Menge an DMSO war hierbei vor allem nötig, um die komplette Löslichkeit der Fluorophore zu gewährleisten. Mit Blick auf mögliche biochemische Anwendungen wurde dabei versucht

den DMSO-Anteil, aufgrund seiner Zytotoxizität bei Konzentrationen über 1 %, gering zu halten und ein nahezu vollständig wässriges System zu erzeugen.<sup>[165]</sup> Diese Lösungen wurden anschließend über einen Zeitraum von zwei Stunden regelmäßig über Absorptionsspektroskopie gemessen, um eine mögliche Änderung des Fluorophors erkennen zu können (Abbildung 27). Da mögliche Abbaureaktionen nach exponentiellen Gesetzmäßigkeiten unterliegen, wurde für die Auswertung der Stabilität in Lösung eine Standzeit von zwei Stunden als ausreichend bewertet.



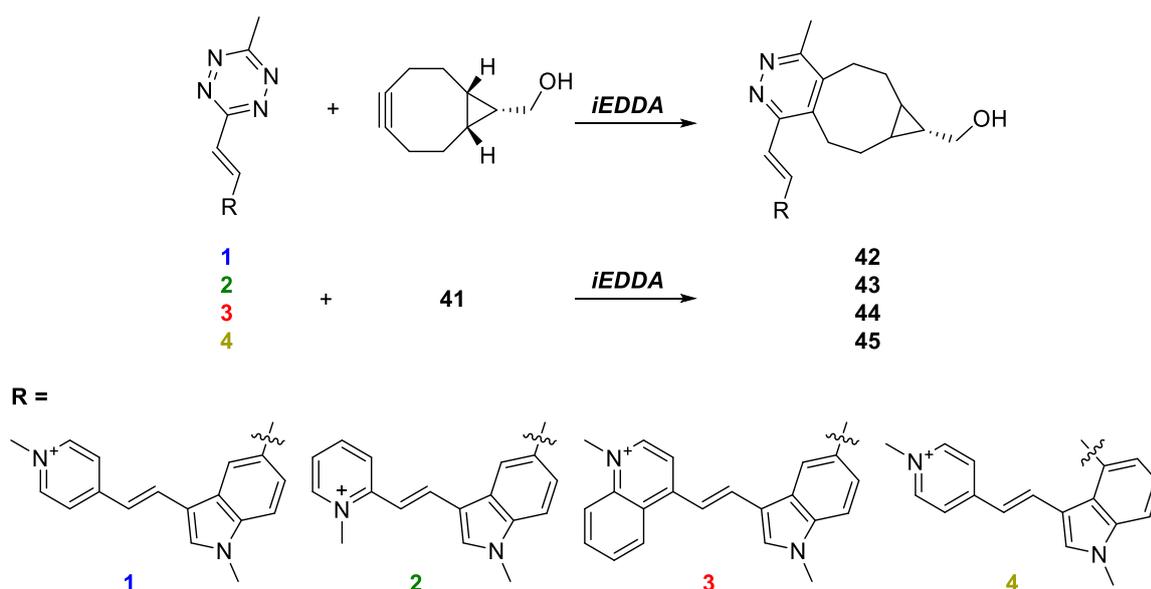
**Abbildung 27:** Stabilität der hergestellten, tetrazinmodifizierten Fluorophore 1-4. Die Messung wurde in einem Lösemittelgemisch aus H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%) mit einer Konzentration von 30 µM Fluorophor über den Zeitraum von zwei Stunden über Absorptionsspektroskopie beobachtet.

Bei der Messung der Stabilitäten konnte festgestellt werden, dass alle vier Fluorophore über einen Zeitraum von zwei Stunden ausreichend stabil in wässriger Lösung vorliegen und sich somit für bioorthogonale Anwendungen in biologischer Umgebung eignen. Die

Schwankungen des Fluorophors **3** lassen sich hierbei durch eine langsame Entmischung während der Standzeit erklären.

## 5.1. Optische Spektroskopie mit BCN-modifizierten Nucleosiden

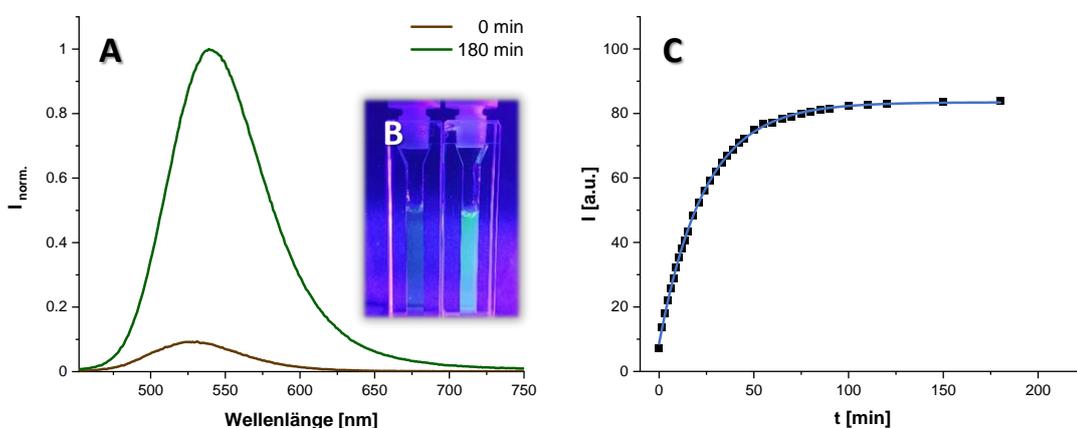
Um die erhaltenen Ergebnisse aus den *iEDDA*-Reaktionen zwischen tetrazinmodifizierten Fluorophoren und BCN-modifizierten Nucleosiden evaluieren zu können, wurden als Referenz zunächst die *iEDDA*-Reaktionen mit kommerziell erhältlichem BCN-OH (**41**) durchgeführt (Schema 11).



**Schema 11:** Übersicht der *iEDDA*-Reaktion der tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophore **1-4** mit kommerziell erhältlichem BCN-OH (**41**) zur Bildung der Klickprodukte **42-45**.

Um den Fortschritt der *iEDDA*-Reaktion über die Zeit zu verfolgen, wurde der durch Auflösung der Tetrazinstruktur erhaltene Fluoreszenzanstieg über Fluoreszenzspektroskopie gemessen. Aus diesen Messungen konnte anschließend die Reaktionsgeschwindigkeit und der *Turn-on* der *iEDDA*-Reaktion bestimmt werden. Dabei gilt für diesen Reaktionstyp eine Kinetik zweiter Ordnung. Um die Auswertung der Kinetik zu vereinfachen, wurde einer der beiden Reaktionspartner im Überschuss hinzugegeben, so dass eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen werden kann. Da die Kinetik über die Fluoreszenz bestimmt werden sollte, muss sichergestellt werden, dass potentiell alle Fluorophormoleküle umgesetzt werden können. Aus diesem Grund wurde das

Dienophil im Überschuss von fünf Äquivalenten hinzuzugeben. Um eine, für die Anwendung in biologischen Systemen, vergleichbare Umgebung für die Messung der Reaktionskinetik zu schaffen, wurden die *iEDDA*-Reaktionen in einer Lösung aus H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%) durchgeführt (Kapitel 8.5, Tabelle 14, Variante A). Ein solches System ist dabei insgesamt vorteilhaft, da *iEDDA*-Reaktionen in wässriger Umgebung schneller ablaufen, was besonders für biochemische Anwendungen von großer Bedeutung ist.<sup>[96]</sup> Als Anregungswellenlängen wurden dabei die Absorptionsmaxima der tetrazinmodifizierten Fluorophore in wässriger Lösung mit 1 % DMSO-Anteil verwendet (Kapitel 8.5, Tabelle 15) und die Emissionsspektren zwischen  $\lambda_{\text{ex}}+15$  nm bis 800 nm aufgenommen (Kapitel 8.5, Tabelle 13, Set-A). Abbildung 28 soll hier beispielhaft die Reaktion zwischen Fluorophor **1** und BCN-OH (**41**) zeigen.



**Abbildung 28:** (A) Anstieg der Fluoreszenzintensität während der *iEDDA*-Reaktion von Fluorophor **1** (20  $\mu\text{M}$ ) mit BCN-OH (**41**) (100  $\mu\text{M}$ , 5,0 Äq.) in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%) bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 437$  nm zwischen 452 - 750 nm. (B) Sichtbarer Anstieg der Fluoreszenz zwischen Fluorophor **1** zum Start der Reaktion (links) und nach vollständigem Umsatz mit BCN-OH (**41**) (rechts). (C) Zeitaufgelöste kinetische Darstellung der Fluoreszenzintensität der gemessenen Fluoreszenzen mit exponentieller Anpassungsfunktion:  $y = a + b \cdot \exp(-kx)$ .

Bei den erhaltenen Spektren lässt sich ein Fluoreszenzanstieg über einen Verlauf von 180 min sowohl spektroskopisch als auch optisch erkennen (Abbildung 28 A und B). Über das Verhältnis der Integrale der Fluoreszenz des nicht reagierten Fluorophors mit dem umgesetzten *iEDDA*-Produkt lässt sich der *Turn-on* bestimmen (Kapitel 8.5, Gl. 8.5.1). Durch Aufnahmen des Fluoreszenzanstiegs in regelmäßigen Zeitabständen kann die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_2$  berechnet werden, indem die integrierten

Flächen der Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen werden. Die Konstante  $k_2$  ergibt sich danach über die Krümmung der monoexponentiellen Ausgleichsfunktion (Kapitel 8.5, Gl. 8.5.2). Die erhaltenen Produkte aus den *iEDDA*-Reaktionen wurden anschließend durch Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) identifiziert. Tabelle 1 zeigt die erhaltenen Messergebnisse aus der *iEDDA*-Reaktion der tetrazinmodifizierten Fluorophore mit BCN-OH.

**Tabelle 1:** Photophysikalische Eigenschaften der tetrazinmodifizierten Fluorophore nach vollständigem Umsatz mit BCN-OH (**41**) in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%).

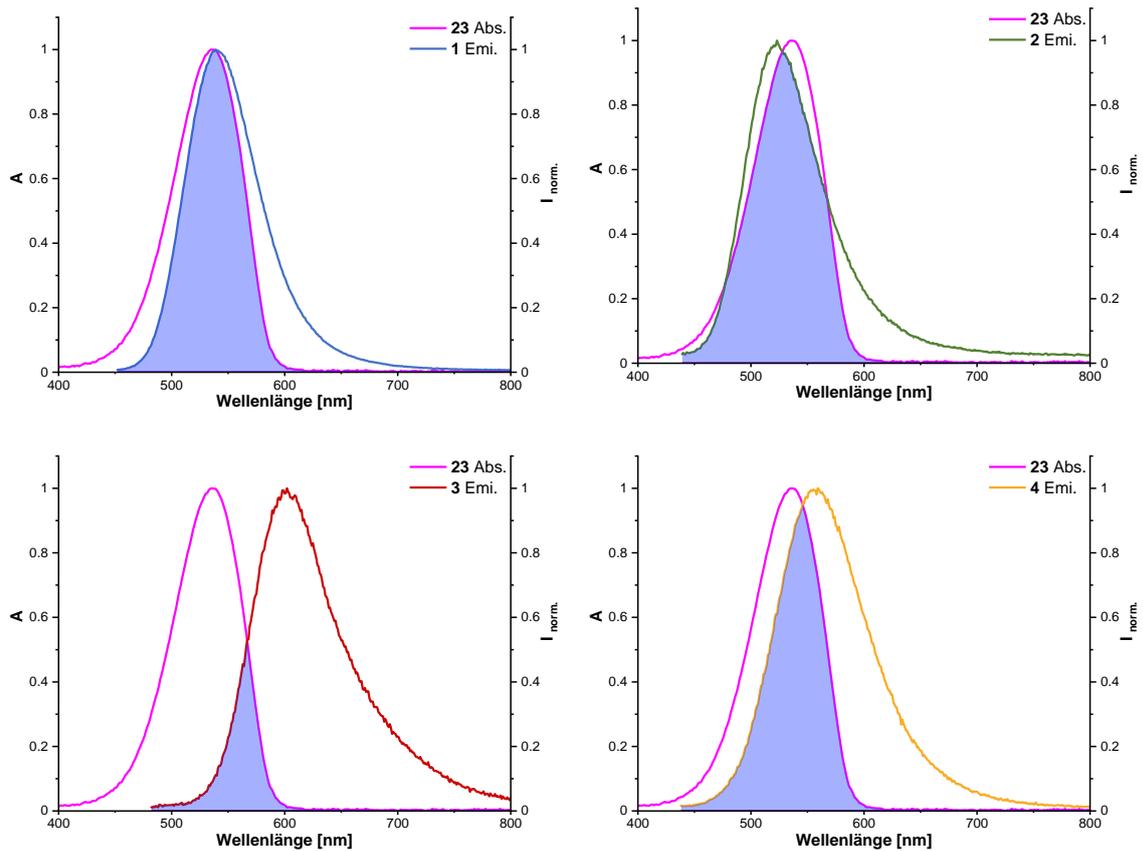
Fluorophor	Dienophil	Produkt	$\lambda_{em}$ [nm]	$\Delta\lambda^{[a]}$ [eV]	$\Phi_F^{[b]}$ [%]	Turn-on	$k_2$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>		<b>42</b>	539	0,54	1,3	12	7,0 ± 0,1
<b>2</b>	<b>41</b>	<b>43</b>	523	0,55	0,4	12	5,0 ± 0,1
<b>3</b>		<b>44</b>	602	0,59	0,5	3	1,8 ± 0,2
<b>4</b>		<b>45</b>	559	0,71	0,8	6	3,0 ± 0,1

[a] Stokes-Verschiebung, [b] Quantenausbeute, gemessen in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%).

Zunächst sollen die allgemeinen photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore nach der *iEDDA*-Reaktion betrachtet werden. Hierbei steigen die Stokes-Verschiebungen wegen des erweiterten  $\pi$ -Elektronensystems in Folge der *iEDDA*-Reaktion um ein geringes Maß an, behalten aber ihren Trend bei (siehe auch Abbildung 26). Bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten konnten nur geringe Werte bis 1,3 % gemessen werden. Gründe liegen dabei zum einen an den allgemein geringen Quantenausbeuten der tetrazinmodifizierten Fluorophore als auch an dem verwendeten Lösemittelgemisch. Hierbei wirkt der Wasseranteil als schwacher Fluoreszenzlöcher, welcher die Fluoreszenzquantenausbeuten senkt.<sup>[166]</sup> Dieser Effekt ist vor allem für rot emittierende Fluorophore besonders stark ausgeprägt.<sup>[167]</sup> Diese Beobachtung kann auch bei den hier gemessenen Proben beobachtet werden, wobei der rote Fluorophor **3** mit 3,3 % vergleichsweise hohe Fluoreszenzquantenausbeuten in DMSO zeigt (Kapitel 8.4, Tabelle 10), aber in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/DMSO (99: V/V%) mit 0,5 % die niedrigsten Quantenausbeuten nach der *iEDDA*-Reaktion aufweist.

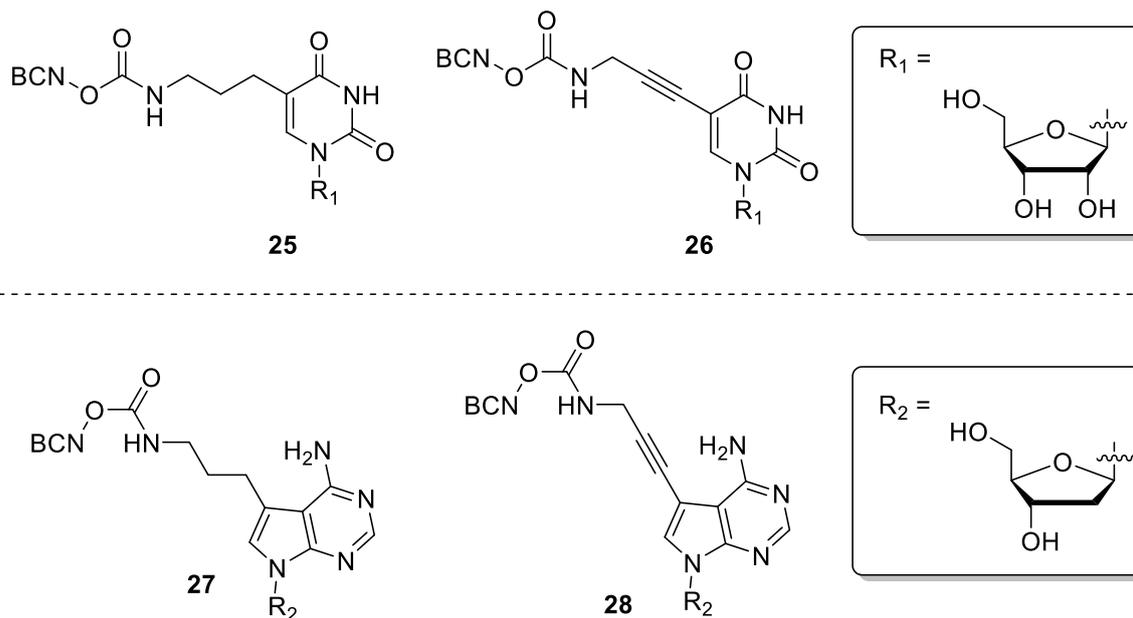
Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Fluorophore liegen bei der Reaktion mit BCN-OH (**41**) alle in einem Bereich von 2-7 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Dieser Wert bewegt sich damit im unteren Bereich

der für *iEDDA*-Reaktionen übliche Reaktionsgeschwindigkeiten, was vor allem auf die Verwendung der stabileren aber weniger reaktiven Methyltetrazin-Funktionalität zurückzuführen ist. Des Weiteren lassen sich die Unterschiede in der Reaktivität innerhalb der gemessenen Fluorophore durch den sterischen Anspruch des Farbstoffs, bzw. durch die Verknüpfung am Indolteil erklären. So zeigt der Fluorophor **3** aufgrund des Chinolingerüsts des Farbstoffs die geringste Reaktionsgeschwindigkeit, während der in 4-Position verknüpfte Fluorophor **4** durch seine gewinkelte Struktur ebenfalls geringere Reaktionsgeschwindigkeiten zeigt. In der weiteren Betrachtung liegt der Fluoreszenzanstieg der Fluorophore zwischen einem Faktor von 3-12 der ursprünglich gemessenen Anfangsfluoreszenz. Hierbei erreichen die grün fluoreszierenden Fluorophore mit einem *Turn-on* von 12 den höchsten Fluoreszenzanstieg, während der rot fluoreszierende Fluorophor **3** mit einem Wert von 3 den niedrigsten *Turn-on* besitzt. Dieser Trend wurde in der Literatur bereits beobachtet und lässt sich über Energieübertragungsmechanismen (*FRET*, *TBET*, *DET*), auf welchen die Löscheigenschaften des Tetrazins basieren, erklären.<sup>[137]</sup> Dabei korreliert der beobachtete *Turn-on* mit den Überlappungsintegralen der Absorptionsbande des Methyltetrazins bei 535 nm und den Emissionsbanden der Fluorophore (Abbildung 29). Größere Überlappungsbereiche kennzeichnen hierbei ähnliche Energieniveaus, wodurch es zu einer effizienteren Interkombination (*ISC*, engl.: „intersystem crossing“) vom Farbstoff-Donor auf dem Tetrazin-Akzeptor kommt und damit ein stärkerer fluoreszenzlöschender Effekt eintritt. Diese Überlappung ist dabei für die grün emittierenden Fluorophore **1** und **2** am größten.



**Abbildung 29:** Normierte Überlappungsintegrale der tetrazinmodifizierten Fluorophore **1-4** mit Tetrazin **23** gemessen in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%).

Es muss dabei erwähnt werden, dass ein hoher *Turn-on* nicht automatisch eine hohe Fluoreszenz suggeriert. Da die beobachtete Helligkeit des Fluorophors vor allem auf dem Produkt des Extinktionskoeffizienten und seiner Fluoreszenzquantenausbeute basiert, können auch schwach emittierende Fluorophore einen hohen Fluoreszenzanstieg besitzen. Der Fluoreszenzanstieg wird damit nur zur Bewertung der nach der *iEDDA*-Reaktion wiederhergestellten Fluoreszenz herangezogen und stellt einen Wert zur Quantifizierung der Effizienz des Fluorophorsystems dar.



**Abbildung 30:** Übersicht der BCN-modifizierten Nucleoside **25-28** für die *iEDDA*-Reaktion mit tetrazinmodifizierten Fluorophoren.

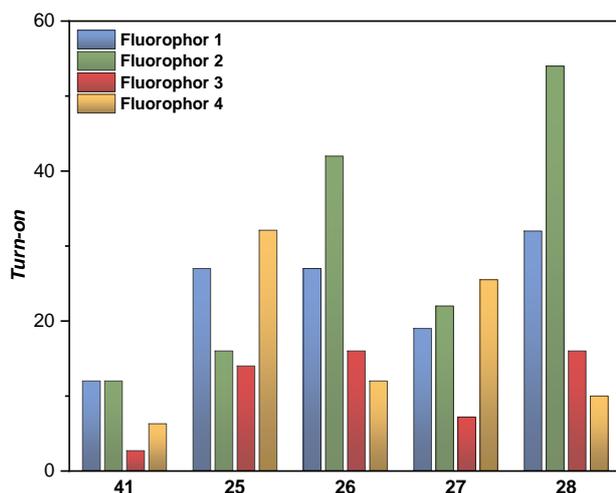
Nachdem mit der *iEDDA*-Reaktion zwischen den Fluorophoren **1-4** und BCN-OH (**41**) eine Vergleichsbasis geschaffen wurde, konnten im Anschluss die in Abschnitt 4.2 hergestellten BCN-modifizierten Nucleoside **25-28** nach der gleichen Methodik untersucht werden (Abbildung 30). Die photophysikalischen Eigenschaften dieser *iEDDA*-Reaktionen sind in Tabelle 2 angegeben.

**Tabelle 2:** Photophysikalische Eigenschaften der tetrazinmodifizierten Fluorophore nach vollständigem Umsatz mit den BCN-modifizierten Nucleosiden **25-28** in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%).

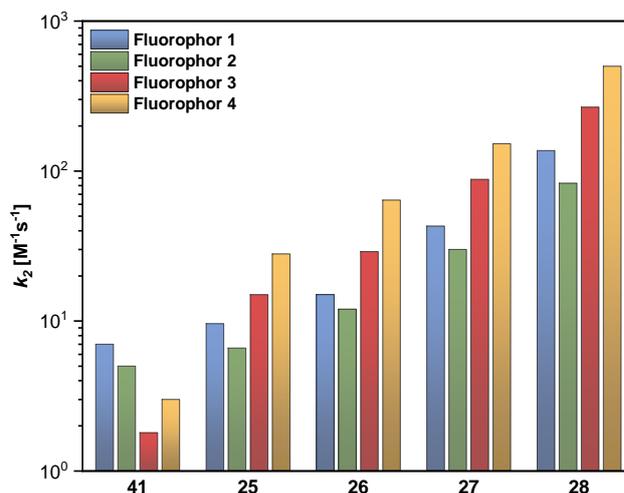
Fluorophor	Dienophil	Produkt	$\lambda_{em}$ [nm]	$\Delta\lambda^{[a]}$ [eV]	$\Phi_F^{[b]}$ [%]	Turn-on	$k_2$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	<b>25</b>	<b>46</b>	539	0,54	2,2	27	9,6 ± 0,3
	<b>26</b>	<b>50</b>	542	0,55	2,1	27	14,7 ± 0,4
	<b>27</b>	<b>54</b>	541	0,55	1,5	19	43,1 ± 0,7
	<b>28</b>	<b>58</b>	543	0,55	3,1	32	137 ± 4
<b>2</b>	<b>25</b>	<b>47</b>	529	0,58	1,2	16	6,6 ± 0,1
	<b>26</b>	<b>51</b>	533	0,60	2,1	42	11,6 ± 0,2
	<b>27</b>	<b>55</b>	529	0,58	1,1	22	30,3 ± 0,4
	<b>28</b>	<b>59</b>	537	0,62	3,3	54	83,0 ± 2,6
<b>3</b>	<b>25</b>	<b>48</b>	610	0,62	1,7	14	14,7 ± 0,3
	<b>26</b>	<b>52</b>	604	0,60	1,8	16	28,6 ± 0,4
	<b>27</b>	<b>56</b>	612	0,62	1,1	7	88,0 ± 1,6
	<b>28</b>	<b>60</b>	605	0,60	2,2	16	267 ± 11
<b>4</b>	<b>25</b>	<b>49</b>	559	0,71	2,9	32	27,6 ± 0,5
	<b>26</b>	<b>53</b>	557	0,70	1,3	12	63,9 ± 3,3
	<b>27</b>	<b>57</b>	567	0,74	2,1	26	152 ± 4
	<b>28</b>	<b>61</b>	564	0,73	1,1	10	500 ± 8

[a] Stokes-Verschiebung, [b] Quantenausbeute, gemessen in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%).

Wie bei den *iEDDA*-Reaktionen mit BCN-OH (**41**), liegen auch hier die Stokes-Verschiebungen in Bereichen zwischen 0,55 und 0,75 eV. Gleichzeitig konnte ungefähr eine Verdreifachung der Fluoreszenzquantenausbeute festgestellt werden. Dieser Wert korreliert, wie zu erwarten, mit dem allgemein beobachteten verstärkten Fluoreszenzanstieg bei der *iEDDA*-Reaktion mit BCN-modifizierten Nucleosiden. Für eine genauere Betrachtung des Fluoreszenzanstiegs und der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen BCN-OH (**41**) und den BCN-modifizierten Nucleosiden **25-28** wurden diese in Abbildung 31 und Abbildung 32 einander gegenübergestellt.



**Abbildung 31:** Gegenüberstellung des *Turn-ons* zwischen BCN-OH (**41**) und den modifizierten Nucleosiden **25-28**.



**Abbildung 32:** Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten zwischen BCN-OH (**41**) und den modifizierten Nucleosiden **25-28**.

Der Fluoreszenzanstieg nach der *iEDDA*-Reaktion mit den BCN-modifizierten Nucleosiden **25-28** ist bei allen verwendeten Fluorophoren um das Zwei- bis Vierfache höher als bei den Reaktionen mit BCN-OH (**41**) (Abbildung 31). Ein Grund für diesen erhöhten Fluoreszenzanstieg wird dabei im räumlichen Anspruch des Nucleosids vermutet. So verlieren Cyanin-Styryl-Fluorophore durch interne Rotation um die Doppelbindung ihre planare Struktur, wodurch die Photonen nach Anregung strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren können.<sup>[168]</sup> Durch einen erhöhten sterischen Anspruchs des Dienophils kann dabei diese vibronische Relaxation aus dem ersten angeregten Zustand eingeschränkt werden, indem die Rotation um die Doppelbindung verhindert wird.

Im nächsten Schritt wurden die BCN-modifizierten Nucleoside **25-28** untereinander verglichen. Dabei kann nur ein geringer Einfluss der Nucleobasen auf den Fluoreszenzanstieg festgestellt werden und ist als statisch irrelevant anzusehen. Auch die zusätzliche Hydroxyfunktion in 2'-Position des Uridins kann aufgrund seiner räumlichen Entfernung zum reaktiven Zentrum vernachlässigt werden. Des Weiteren zeigen die Fluorophore **1** und **3** bei der Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs auch keine direkte Abhängigkeit der Linkerstruktur. Einzig bei der Kombination eines flexiblen Linkers mit der Nucleobase 7-deaza-Adenosin **27** konnte für beide Fluorophore leicht erniedrigte *Turn-ons* festgestellt werden. Es ist dabei anzunehmen, dass die beiden Fluorophore, aufgrund

ihrer ähnlichen Strukturen, gleiche Abhängigkeitsbeziehungen aufweisen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Linkerstruktur und dem Fluoreszenzanstieg kann wiederum bei den Fluorophoren **2** und **4** beobachtet werden.

Diese unterscheiden sich zu den vorangegangenen Fluorophoren durch die Position des konjugierten Pyridinium-Kations (**2**) und der Position der konjugierten Tetrazinfunktionalität (**4**). Hierbei kann bei Fluorophor **2** ein um das 2,5-fache erhöhter Fluoreszenzanstieg bei der *iEDDA*-Reaktion mit starren Linkersystemen im Vergleich zu den Analoga mit flexiblen Linkern beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei dem Fluorophor **4** ein gegenläufiger Trend beobachtet werden. Dort weist der Fluoreszenzanstieg das 2,5-fache bei der *iEDDA*-Reaktion mit flexiblen Linkern auf. Es lässt sich also feststellen, dass die Einflüsse auf den Fluoreszenzanstieg grundsätzlich aus einer Kombination des sterischen Anspruchs zwischen den Linkerstrukturen des Dienophils und der Struktur des Fluorophors bestehen.

Im Anschluss wurden die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten miteinander verglichen (Abbildung 33). Hierbei zeigt sich im Vergleich zu BCN-OH (**41**) ein allgemeiner Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten, sobald die Fluorophore mit einem BCN-modifizierten Nukleosid reagieren. Ursachen dafür liegen zum einen in der Carbamat-Funktion, über welche das BCN mit dem Linker und der Nukleobase verknüpft ist. Diese erfüllt dabei den Zweck einer elektronenschiebenden Gruppe. Dadurch erhöht sich das HOMO-Energieniveau des Dienophils und dementsprechend die Reaktionsgeschwindigkeit der *iEDDA*-Reaktion. Ein weiterer Grund liegt in den Nukleobasen, welche die HOMO-LUMO-Lücken weiter verringern und so ebenfalls zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeiten beitragen.<sup>[169]</sup>

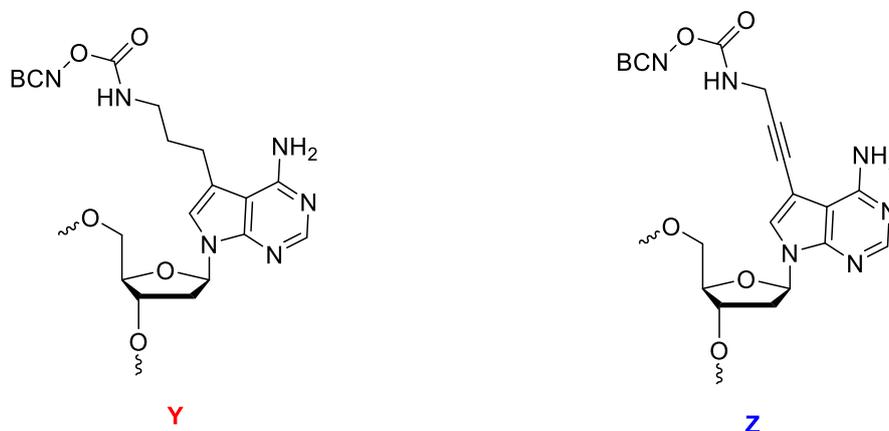
Interessant ist die Beobachtung, dass sowohl die Linkerstruktur, als auch die verwendete Nukleobase einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit zeigen. So steigt die Geschwindigkeitskonstante bei Nukleosiden mit starrem Linkersystem um das Zwei- bis Dreifache im Vergleich zu Analoga mit flexiblem Linkersystem an. Zusätzlich reagieren die Adenosine deutlich schneller als Uridine. Grund hierfür ist die bei Adenosinen geringere HOMO-LUMO-Lücke, welche die Reaktivität weiter verbessert.<sup>[169,170]</sup> Dabei sind die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu den Uridinen um das bis zu Zehnfache größer. Insgesamt betrachtet reagieren die BCN-



Kombination nur geringe Fluoreszenzanstiege aufweist, zeigen die anderen drei Fluorophore im Mittel hohe sehr hohe Fluoreszenzanstiege. Dieses Wissen soll weiterführend bei der Untersuchung von BCN-modifizierten Oligonukleotiden angewendet werden.

## 5.2. Optische Spektroskopie mit BCN-modifizierten Oligonukleotiden

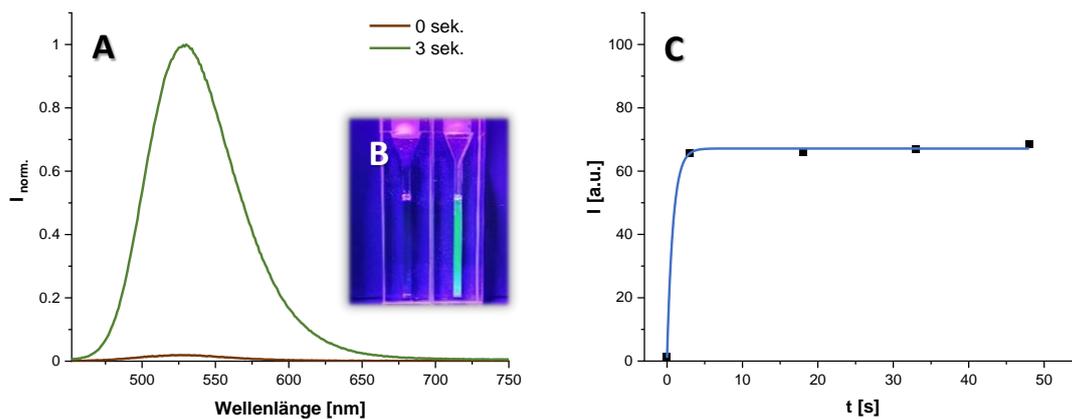
Für die Untersuchung von tetrazinmodifizierten Fluorophoren wurden die in Kapitel 4.3 hergestellten DNA-Sequenzen **DNA4**, **DNA5** und **DNA6** als Einzel- (ss) und Doppelstränge (ds) herangezogen (Abbildung 34).



**DNA4** 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**Y**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'    **DNA6** 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**Z**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'  
**DNA5** 5'-G-C-A-G-T-C-T-**A**-**Y**-T-**A**-C-A-C-T-G-A-3'

**Abbildung 34:** Übersicht der für die *iEDDA*-Reaktion mit tetrazinmodifizierten Fluorophore hergestellten DNA-Einzelstränge.

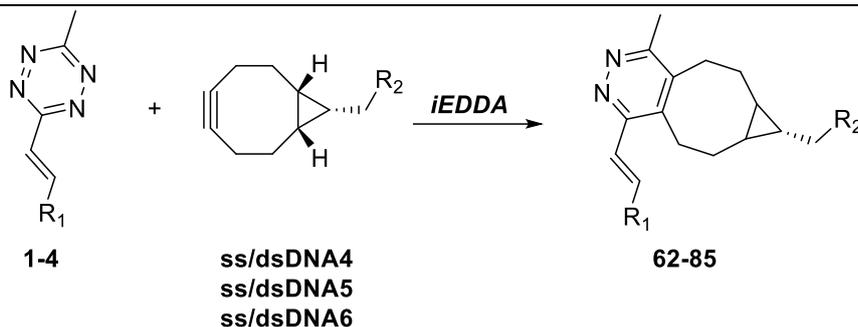
Da für die *iEDDA*-Experimente deutlich geringere Stoffmengen der DNA-Stränge zur Verfügung standen, mussten die Ansatzgrößen entsprechend angepasst werden. So wurden die Konzentrationen mit dem Faktor 1:10 verdünnt (Kapitel 8.5, Tabelle 15, Variante B). Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit den Nukleosid-Experimenten wurde darauf geachtet, die Verhältnisse zwischen Fluorophor und Dienophil bei einem Verhältnis von 1:5 zu belassen. Außerdem wurde der DMSO-Anteil, ebenso wie bei den Experimenten zuvor, auf 1 % festgelegt. Anschließend wurde die *iEDDA*-Reaktion mit angepassten Konzentrationen analog zu vorhergehenden Versuchen durchgeführt. Interessanterweise wurde bei diesen Parametern bereits nach drei Minuten (Min.) ein vollständiger Umsatz des *iEDDA*-Produktes festgestellt, so dass die Einstellung auf kürzere Messintervallen angepasst werden musste (Kapitel 8.5, Tabelle 13, Set B). Auf diese Weise ist es möglich, den Fortschritt der *iEDDA*-Reaktion drei Sekunden (Sek.) nach Reaktionsstart und danach im Verlauf von 15 Sek.-Intervallen abzubilden (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** (A) Anstieg der Fluoreszenzintensität während der *iEDDA*-Reaktion des Fluorophors **1** (2  $\mu\text{M}$ ) mit **ssDNA4** (10  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\text{\AA}$ q.) in  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  (99:1 V/V%) bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 437 \text{ nm}$  zwischen 452 - 750 nm. (B) Sichtbarer Anstieg der Fluoreszenz zwischen Fluorophor **1** zum Start der Reaktion (links) und nach vollständigem Umsatz mit **ssDNA4** (rechts). (C) Zeitaufgelöste kinetische Darstellung der Fluoreszenzintensität der gemessenen Fluoreszenzen mit exponentieller Anpassungsfunktion  $y = a + b \exp(-kx)$ .

Auch hier kann trotz verkürzter Messzeiten bereits nach drei Sek ein kompletter Umsatz festgestellt werden. Aus diesem Grund war es nicht möglich, exakte Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Stattdessen wurden diese Werte so angegeben, dass sie die unteren Grenzen der möglichen Geschwindigkeitskonstanten darstellen. Neben den hohen Geschwindigkeitskonstanten wird außerdem ein deutlich höherer Fluoreszenzanstieg als bei vergleichbaren Reaktionen mit Nukleosiden beobachtet. Des Weiteren wurde trotz einer Verdünnung der Konzentration von 1:10 ein deutlich helleres Fluoreszenzsignal wahrgenommen. Um diese Beobachtungen erklären zu können, wurden zunächst alle *iEDDA*-Reaktionen der einzel-/ und doppelsträngigen Oligonukleotiden photophysikalisch vermessen und in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Photophysikalische Eigenschaften der tetrazinmodifizierten Fluorophore **1-4** nach vollständigem Umsatz mit den BCN-modifizierten Oligonukleotiden **ssDNA4**, **ssDNA5** und **ssDNA6** in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%), sowie **dsDNA4**, **dsDNA5** und **dsDNA6** in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%, 250 μM NaCl, 10 mM K-Pi-Puffer).



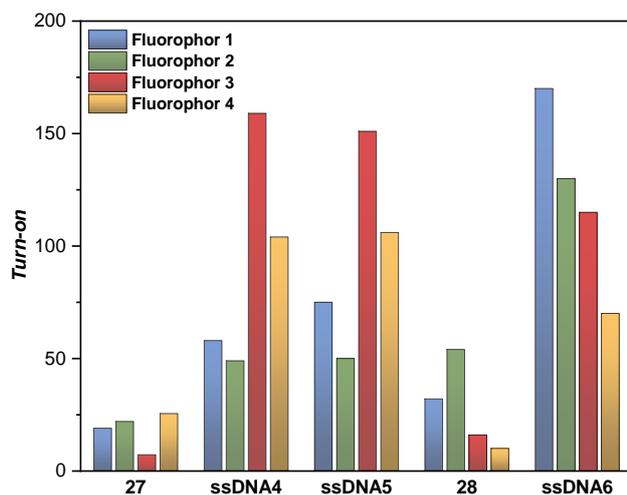
Fluorophor	Dienophil	Produkt	$\lambda_{em}$ [nm]	$\Delta\lambda$ <sup>[a]</sup> [eV]	$\Phi_F$ <sup>[b]</sup> [%]	Turn-on	$k_2 \cdot 10^5$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	ssDNA4	<b>62</b>	528	0,49	12,1	58	≥ 1,25
	dsDNA4	<b>66</b>	545	0,56	27,2	340	≥ 0,70
	ssDNA5	<b>70</b>	534	0,51	14,2	75	≥ 1,13
	dsDNA5	<b>74</b>	546	0,57	23,2	270	≥ 1,59
	ssDNA6	<b>78</b>	534	0,51	16,4	170	≥ 2,84
	dsDNA6	<b>82</b>	544	0,56	27,4	290	≥ 1,06
<b>2</b>	ssDNA4	<b>63</b>	513	0,51	2,7	49	≥ 1,10
	dsDNA4	<b>67</b>	527	0,57	15,4	490	≥ 1,05
	ssDNA5	<b>71</b>	515	0,52	3,0	50	≥ 1,34
	dsDNA5	<b>75</b>	524	0,56	11,0	310	≥ 1,86
	ssDNA6	<b>79</b>	519	0,54	4,9	130	≥ 2,21
	dsDNA6	<b>83</b>	526	0,57	19,6	560	≥ 1,10
<b>3</b>	ssDNA4	<b>64</b>	585	0,53	15,0	159	≥ 1,24
	dsDNA4	<b>68</b>	604	0,60	12,5	235	≥ 0,67
	ssDNA5	<b>72</b>	589	0,55	10,0	151	≥ 0,96
	dsDNA5	<b>76</b>	600	0,58	10,0	200	≥ 0,69
	ssDNA6	<b>80</b>	592	0,56	16,0	115	≥ 0,63
	dsDNA6	<b>84</b>	606	0,60	15,0	305	≥ 0,73
<b>4</b>	ssDNA4	<b>65</b>	556	0,70	5,0	104	≥ 2,03
	dsDNA4	<b>69</b>	573	0,77	19,0	138	≥ 1,38
	ssDNA5	<b>73</b>	556	0,70	10,6	106	≥ 1,90
	dsDNA5	<b>77</b>	575	0,77	14,0	142	≥ 1,19
	ssDNA6	<b>81</b>	555	0,70	4,0	70	≥ 2,80
	dsDNA6	<b>85</b>	574	0,77	16,0	222	≥ 0,99

[a] Stokes-Verschiebung, [b] Quantenausbeute, gemessen in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%).

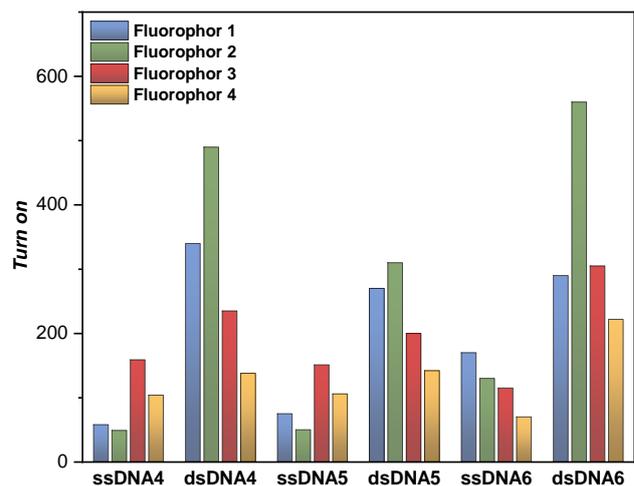
Auch im Fall der *iEDDA*-Reaktion mit Oligonukleotiden können große Stokes-Verschiebungen im Bereich von 0,50 bis 0,77 eV festgestellt werden. In diesem Zusammenhang ist es vor allem interessant, dass einzelsträngige DNA geringere Stokes-Verschiebungen aufweisen als deren doppelsträngigen Analoga. Die Quantität und der Trend der Verschiebungen ist dabei jedoch nahezu identisch mit den Werten, welche aus den *iEDDA*-Experimenten mit BCN-modifizierten Nucleosiden erhalten wurden. Damit eignen sich die tetrazinmodifizierten Fluorophore für die Anwendung in bioorthogonalen Reaktionen *in vivo*, in denen eine deutliche Separation der Anregungs- und Emissionsbanden vorausgesetzt wird.

Interessanterweise werden für die modifizierten Oligonukleotide deutlich höhere Fluoreszenzquantenausbeuten gemessen. So wird für die einzelsträngigen DNA-Sequenzen Quantenausbeuten gemessen, welche zwei- bis zehnmals größer sind als deren Nucleosid-Analoga. Die doppelsträngige DNA zeigt darüber hinaus ebenfalls nochmals zwei- bis dreimal höhere Fluoreszenzausbeuten im Vergleich zu den Einzelsträngen. Dieser bemerkenswerte Anstieg lässt sich hier, wie auch schon bei den modifizierten Nucleosiden, über den sterischen Anspruch des Dienophils erklären. Die DNA-Stränge führen hierbei dazu, dass die Rotationsfreiheit der Fluorophore durch Interkalation oder Anlagerung noch weiter eingeschränkt wird und so die vibronische Relaxation aus dem ersten angeregten Zustand nochmals weiter verringert wird. Neben der erhöhten sterischen Hinderung der Doppelstrang-DNA, haben auch hier die für die Hybridisierung hinzugegebenen Salze, wie NaCl, welche zu Stabilisierung der Stränge dienen, einen Einfluss auf die gemessenen Fluoreszenzquantenausbeuten. Dieser konnte bereits bei unmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen aus der Gruppe WAGENKNECHT beobachtet werden.<sup>[140]</sup> Die beobachtete Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute korreliert dabei mit der immensen Zunahme der gemessenen Fluoreszenzsteigerung bei den *iEDDA*-Reaktionen.

Im Nachfolgenden soll zunächst auf den Fluoreszenzanstieg der vier Fluorophore bei der Reaktion mit den hergestellten DNA-Strängen näher eingegangen und mit deren Nucleosid-Analoga verglichen werden (Abbildung 36 und Abbildung 37).



**Abbildung 36:** Gegenüberstellung des *Turn-ons* zwischen BCN-modifizierten Nukleosiden **27** und **28** und den modifizierten DNA-Einzelsträngen.



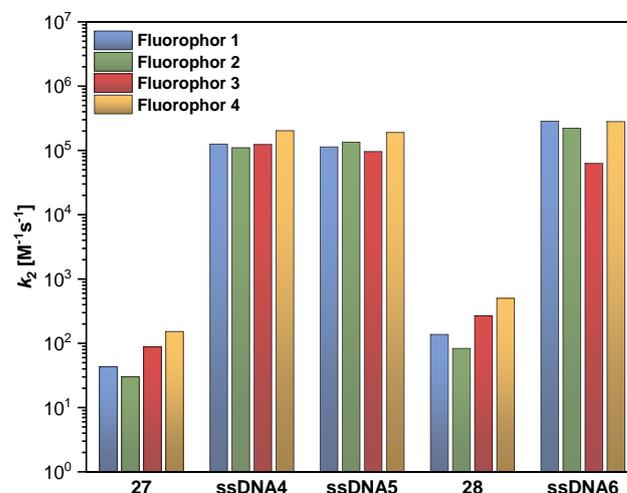
**Abbildung 37:** Gegenüberstellung des *Turn-ons* zwischen BCN-modifizierten Einzel- und Doppelsträngen.

Werden zunächst das BCN-modifizierte 7-Deaza-Adenosin mit flexiblem Linker **27** mit den beiden DNA-Einzelsträngen **ssDNA4** und **ssDNA5** verglichen, fällt der insgesamt hohe Fluoreszenzanstieg aller vier Fluorophore auf. Hierbei steigen die Fluoreszenzquantenausbeuten für die beiden grün-fluoreszierende Fluorophore **1** und **2** um das Zwei- bis Dreifache an. Ein noch stärkerer Anstieg wird bei den rot- und gelb-fluoreszierenden Fluorophoren **3** und **4** beobachtet. Hier werden um bis zu zwanzigfach höhere Fluoreszenzanstiege im Vergleich zu den modifizierten Nukleosiden gemessen. Bei diesen beiden Fluorophoren zeigt sich ein größerer Einfluss der räumlichen Einschränkung durch die DNA-Stränge. Dies kann auf die sterisch gehinderte Struktur durch die Chinolinium-Gruppe (**3**) oder der in 4-Position konjugierten Tetrazinfunktionalität (**4**) zurückgeführt werden. Des Weiteren kann für die *iEDDA*-Reaktion keine Sequenzabhängigkeit festgestellt werden, da für beide Einzelstränge **ssDNA4** und **ssDNA5** nahezu identische Werte erhalten werden.

Eine andere Beobachtung lässt sich bei dem Vergleich des 7-Deaza-Adenosins mit starrem Linker **28** und dem entsprechenden Oligonukleotid **ssDNA6** treffen. Hier steigen die Floreszenzen für die grün-emittierenden Fluorophore wesentlich stärker an, während der gelb-fluoreszierende Fluorophor wiederum niedrigere Werte zeigt. Die Ergebnisse korrelieren dabei mit den Beobachtungen der BCN-modifizierten Nukleoside. So kann davon ausgegangen werden, dass das Linkersystem ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss bei *iEDDA*-Reaktionen mit Oligonukleotiden hat.

In Übereinstimmung mit den Fluoreszenzquantenausbeuten zeigt sich bei der *iEDDA*-Reaktion mit den DNA-Doppelsträngen ein nochmals deutlich erhöhter Fluoreszenzanstieg um das Zwei- bis Zehnfache. Interessanterweise sind in diesem Fall die Trends zwischen den Fluorophoren gleich. Hierbei zeigen Fluorophor **1** und **2** den stärksten Anstieg, während Fluorophor **3** und **4** nur moderat höhere Fluoreszenzen aufweisen. Wie im Fall der Fluoreszenzquantenausbeuten sind die Gründe hier im sterischen Anspruch der DNA-Doppelstränge und in der Salzkonzentration zu suchen. Hierbei zeigt sich vor allem die Affinität der tetrazinmodifizierten Fluorophore, welche bei der *iEDDA*-Reaktion mit Oligonukleotiden aufgrund der zusätzlichen Einschränkung der Rotationsfreiheit wesentlich stärkere Fluoreszenzsignale generieren. Zusammen mit der Auflösung der Tetrazinfunktionalität, lässt sich hierüber eine zweistufige Fluoreszenzerhöhung formulieren. Dadurch kann vor allem bei Experimenten *in vivo*, in denen modifizierte Nucleoside metabolisch eingebaut werden sollen, gut zwischen eingebauten und nicht eingebauten Nucleosiden unterschieden werden.

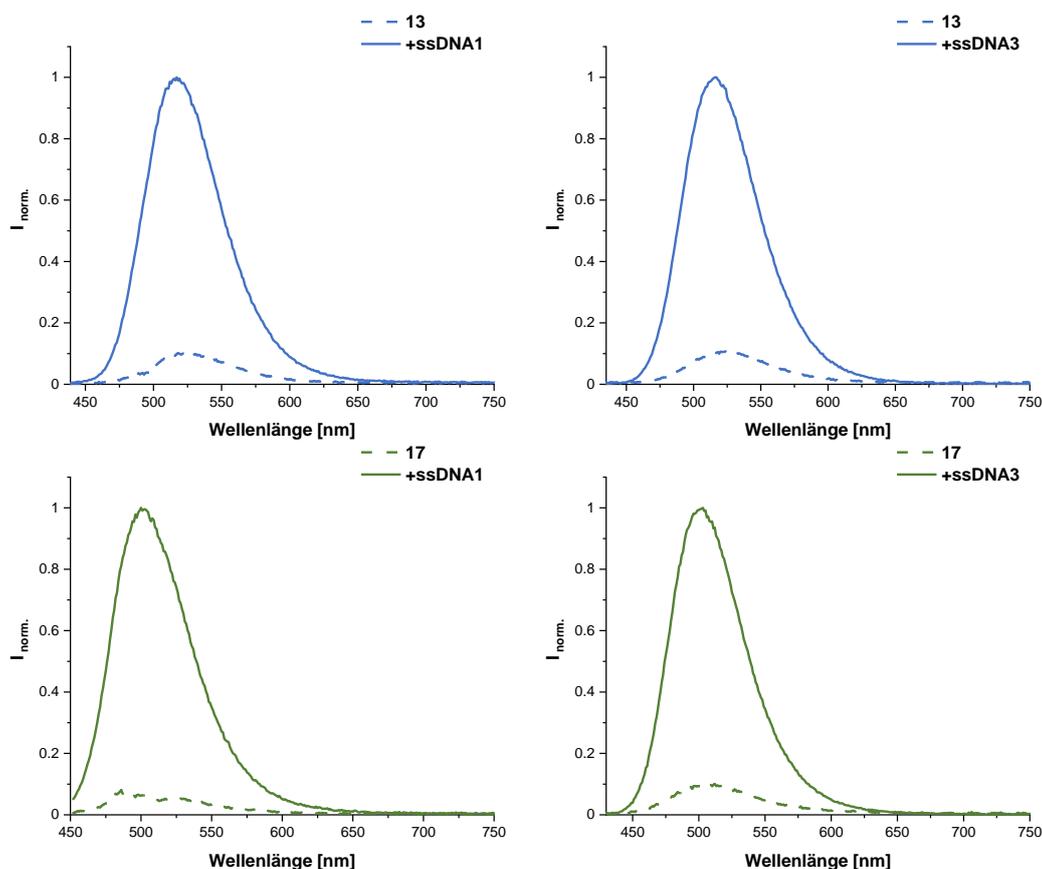
Im nächsten Schritt wurden die Geschwindigkeitskonstanten der 7-Deaza-Adenosine **27** und **28** mit den entsprechenden Oligonukleotiden **ssDNA4-6** verglichen (Abbildung 38). Hierbei kann für alle Fluorophore ein vollständiger Umsatz bei der Reaktion mit modifizierten Oligonukleotiden nach weniger als drei Sek. festgestellt werden.



**Abbildung 38:** Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten zwischen den BCN-modifizierten Nucleosiden **27** und **28** und den modifizierten DNA-Einzelsträngen.

Da es nicht möglich war, die Messintervalle zu verkürzen oder die Konzentration der Fluorophore weiter zu verringern, da ansonsten kein Fluoreszenzsignal mehr detektiert werden konnte, wurden die Geschwindigkeitskonstanten als unteren Grenzwert angegeben. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Geschwindigkeitskonstanten wesentlich höher sind und sich im Bereich von  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bewegen. Im Vergleich zu den *iEDDA*-Reaktionen mit den BCN-modifizierten 7-Deaza-Adenosinen **27** und **28** zeigen die Oligonukleotid-Analoga einen mindestens 1000-fachen Anstieg der Geschwindigkeitskonstante. Ein zusätzlicher Vergleich zu den DNA-Doppelsträngen ist dabei nicht zielführend, da auch hier ein vollständiger Umsatz nach weniger als drei Sek. zu beobachten ist.

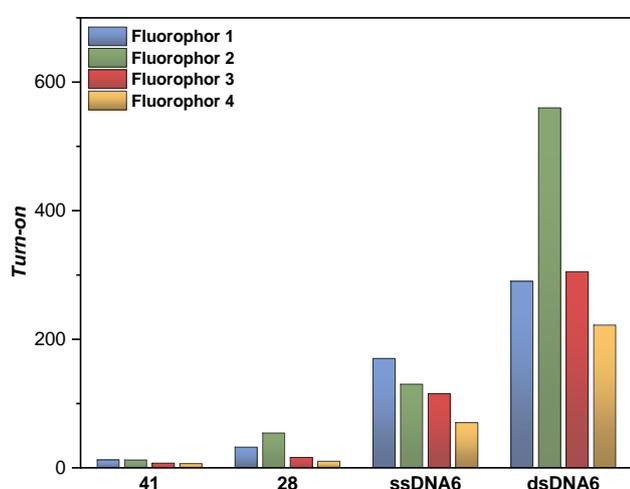
Aufgrund der hohen Geschwindigkeitskonstanten, wurde eine DNA-templatisierte Vorkoordination vermutet. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die Änderung der Fluoreszenzintensitäten der unmodifizierten Einzelstränge **ssDNA1** und **ssDNA3** jeweils mit den Cyanin-Styryl-Farbstoffen **13** und **17** (Abbildung 39) verfolgt.



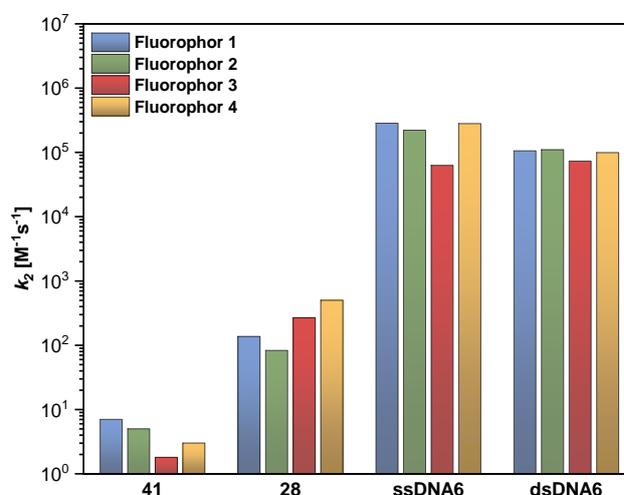
**Abbildung 39:** Templatisierung der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **13** und **17** und der unmodifizierten DNA-Einzelstränge **ssDNA1** und **ssDNA3**.

Dabei wurde angenommen, dass die nicht-kovalente Vorkoordination der positiv geladenen Farbstoffe mit dem negativ geladenen DNA-Einzelstrang der *iEDDA*-Reaktionen vorausgeht und die zusätzliche räumliche Einschränkung durch die DNA zu einer leichten Erhöhung der Fluoreszenz führt. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass alle getesteten Farbstoff-DNA-Kombinationen innerhalb von zwei Minuten einen ca. zehnfachen Fluoreszenzanstieg zeigen. Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme, wurden die gleichen Experimente ebenfalls mit den DNA-Doppelsträngen **dsDNA1** und **dsDNA3** durchgeführt (Kapitel 9, Abbildung 52). Hierbei wurde ebenfalls eine Zunahme der Fluoreszenz erwartet. Diese müsste aber aufgrund der hohen NaCl-Konzentration wesentlich niedriger ausfallen, da die Na-Kationen die negativen Ladungen des DNA-Rückgrades besetzt. Auf diese Weise bestehen nur noch wenige elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Cyanin-Styryl-Farbstoffen und den DNA-Doppelsträngen. Auch diese Theorie konnte mit Blick auf die erhaltenen Daten bestätigt werden, was auf die Bildung von Fluorophor-DNA-Templaten hindeutet.

Abschließend können die erhaltenen Werte für die Fluoreszenzsteigerung und die Geschwindigkeitskonstante über alle getesteten Dienophile verglichen werden. Dabei sind für doppelsträngige Oligonukleotide immense Steigerungen festzustellen (Abbildung 40 und Abbildung 41).

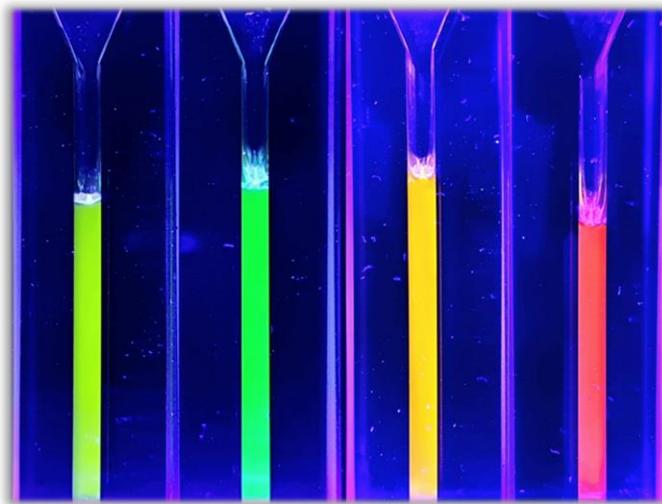


**Abbildung 40:** Gegenüberstellung des *Turn-ons* der getesteten, BCN-modifizierten Dienophile.



**Abbildung 41:** Gegenüberstellung der Geschwindigkeitskonstanten der getesteten, BCN-modifizierten Dienophile.

So können von BCN-OH bis zum modifizierten DNA-Doppelstrang 20-fach größere Fluoreszenzsteigerungen beobachtet werden. Dies führt im Maximum zu Werten von 560-fach höheren Floreszenzen im Vergleich zum nicht reagierten tetrazinmodifizierten Fluorophor. Durch die damit einhergehende Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeuten, können sehr hell-fluoreszierende, oligonukleotidspezifische Sonden erhalten werden, welche nach dem Prinzip einer Zwei-Faktor-Fluorogenität funktionieren (Abbildung 42).<sup>[171]</sup>



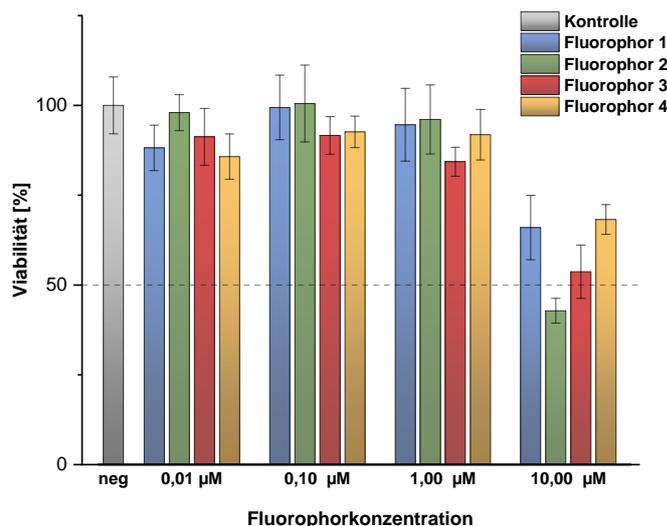
**Abbildung 42:** Optisch wahrnehmbare Fluoreszenz der tetrazinmodifizierten Fluorophore **1-4** nach vollständigem Umsatz mit **dsDNA6** bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 395 nm. Von links nach rechts: **1, 2, 4** und **3**.

Gleichzeitig konnten ebenfalls stark erhöhte Geschwindigkeitskonstanten bei der *iEDDA*-Reaktion mit Oligonukleotiden gemessen werden. Hierbei wurden mindestens Steigerungen um das bis zu 1000-fache im Vergleich zu den Nukleosid-Analoga gemessen. Zusammenfassend zeigen die hergestellten, tetrazinmodifizierten Fluorophore eine sehr starke Affinitätsbeziehung in der *iEDDA*-Reaktion mit Oligonukleotiden. Gepaart mit den großen Stokes-Verschiebungen können diese Fluorophore effizient für die Fluoreszenzmarkierung in lebenden Zellen eingesetzt werden, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu minimieren.

## 6. Zellbiologische Untersuchungen

### 6.1. Zytotoxizität der tetrazinmodifizierten Fluorophore

Alle im folgenden aufgeführten Zellexperimente wurden zusammen mit Dr. Franziska Rönicke durchgeführt und evaluiert. Um die Zytotoxizität der Fluorophore für die weiteren zellbiologischen Untersuchungen in Erfahrung zu bringen, wurden diese zunächst über einen MTT-Test überprüft. Der Test beruht auf der intrazellulären Reduktion des gelben Tetrazolsalzes zu blauem Formazan, deren Intensität absorptionspektrometrisch bei 595 nm bestimmt wird. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Absorption und der Zellviabilität, da die Reaktion nur in lebenden Zellen stattfinden kann. Für die Untersuchung wurden HeLa-Zellen mit Konzentrationen der jeweiligen tetrazinmodifizierten Fluorophore zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 0,01  $\mu\text{M}$  über 72 h inkubiert (siehe Kapitel 8.6). Der Konzentrationsbereich wurden dabei so gewählt, dass er die für Fluorophore üblichen Mengen für zellbiologische Anwendungen abbildet. In Abbildung 43 sind die prozentualen Zellviabilitäten in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration nach 72 h dargestellt.

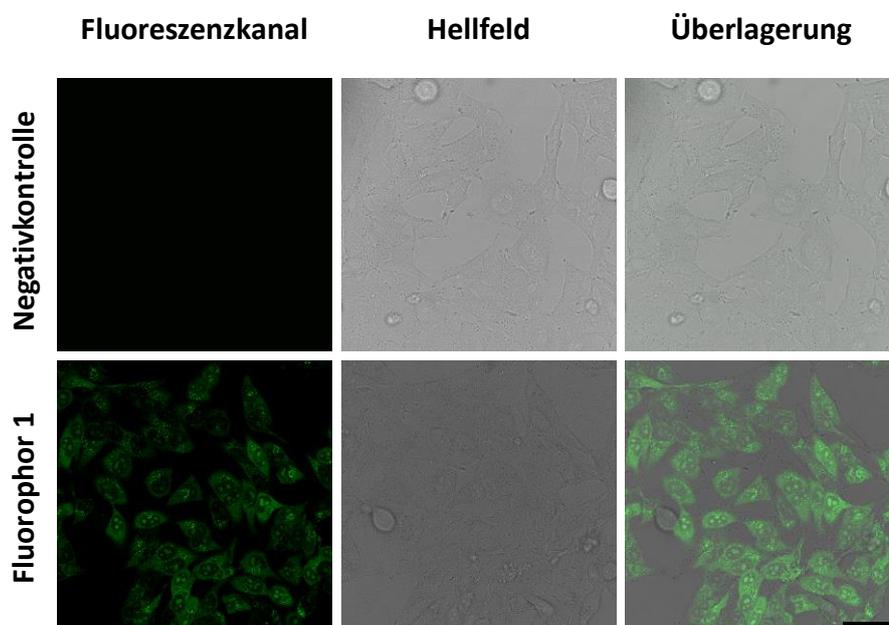


**Abbildung 43:** Prozentuale Zellviabilität der mit tetrazinmodifizierten Fluorophore **1**, **2**, **3** und **4** behandelten HeLa-Zellen in Abhängigkeit der jeweils eingesetzten Konzentration nach 72 h. Alle MTT-Tests wurden achtmal wiederholt und als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Unbehandelte HeLa-Zellen (grau) wurden als Negativkontrolle mitgeführt.

Bei der Betrachtung der Zellviabilitäten ist ersichtlich, dass die getesteten Fluorophore **1-4** ähnlich geringe Zytotoxizitäten aufweisen. Die mittlere lethale Dosis ( $LD_{50}$ ) wurde bei allen Fluorophoren bei einer Konzentration  $\geq 10 \mu\text{M}$  festgestellt. Mit Hinblick auf die vergleichsweise lange Inkubationszeit der Fluorophore in den HeLa-Zellen, lässt sich daraus schließen, dass alle vier Fluorophore unter zellbiologischen Bedingungen bis zu einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  nicht zytotoxisch und daher für *in vivo* Anwendungen geeignet sind.

## 6.2. Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst sollte die Membrangängigkeit der Fluorophore überprüft werden. Diese ist neben der Zytotoxizität ebenfalls ein wichtiges Kriterium für die späteren bioorthogonalen „Click“-Experimente in der Zelle. Hierfür wurden mit der Unterstützung von Dr. Franziska Rönicke HeLa-Zellen ausgesät und anschließend der grün fluoreszierende Fluorophor **1** mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und über Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 44). Zur Überprüfung wurde zusätzlich eine Negativkontrolle, welche nur HeLa-Zellen enthält, mitgeführt.



**Abbildung 44:** Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen der lebenden HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Fluorophor **1** ( $c = 5\mu\text{M}$ , unten) und der Negativkontrolle (oben). Vor der Aufnahme wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen.  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  (20 % Intensität),  $\lambda_{\text{em.}} = 500\text{-}580 \text{ nm}$  (PMT-Detektor). Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ .

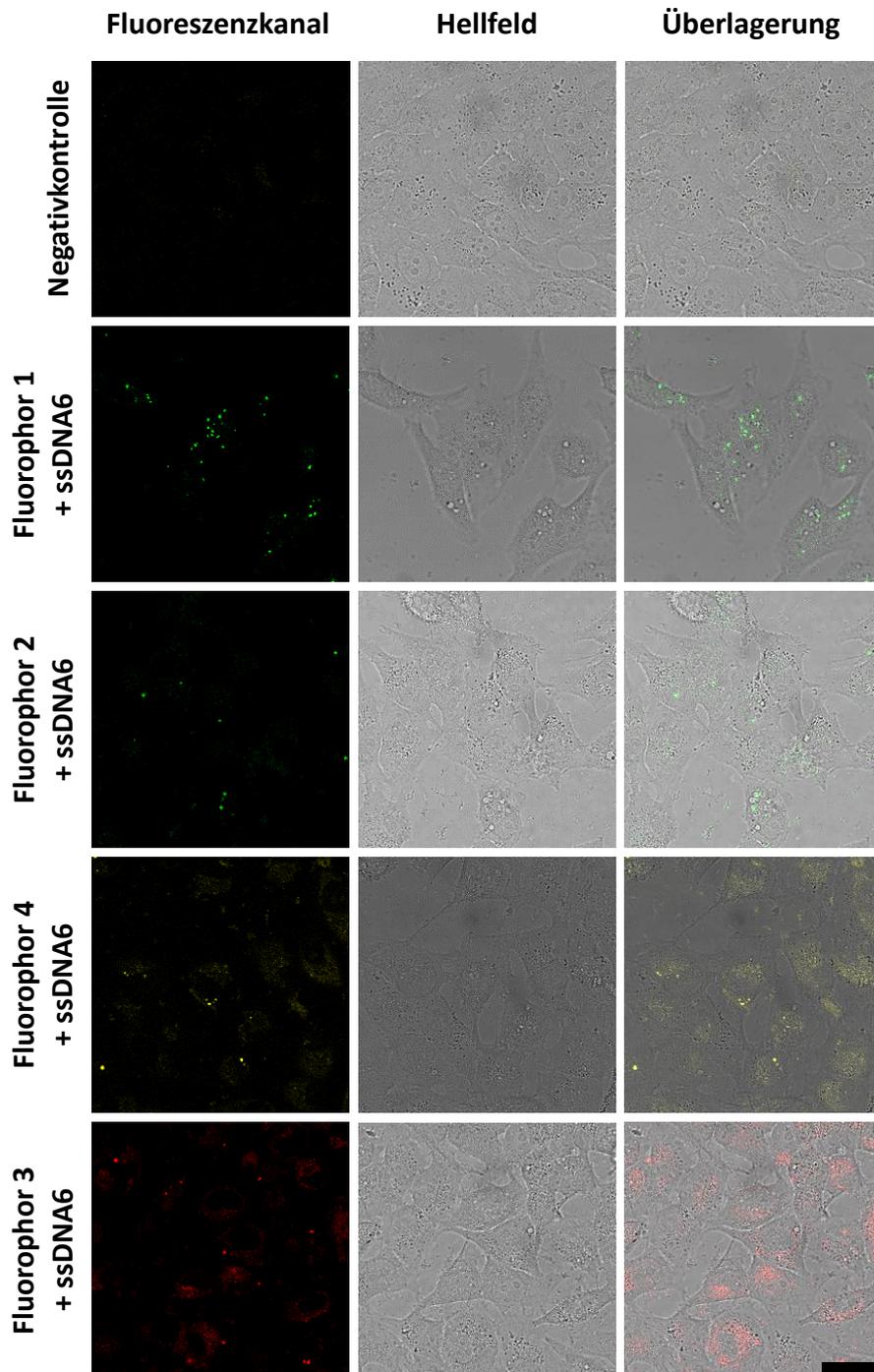
Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung des Experiments konnte bei den mit Fluorophor **1** behandelten HeLa-Zellen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, während die Negativkontrolle unter den gleichen Messbedingungen keine Autofluoreszenz aufweist. Dies lässt auf eine Membrangängigkeit des tetrazinmodifizierten Fluorophors schließen. Es kann dabei angenommen werden, dass die vergleichsweise kleinen

Fluorophore durch ihre positive Ladung die Zellmembran ungehindert durchschreiten und in das Zytoplasma gelangen können. Außerdem wird eine Ansammlung des Fluorophors im Zytoplasma und dem Nukleolus beobachtet, was auf eine Templatisierung der Fluorophore mit Oligonukleotiden zurückgeführt werden kann. Ebenso können die punktförmigen Fluoreszenzen in der Zelle auf endosomale Vesikel zurückgeführt werden. Anzumerken ist an dieser Stelle die trotz der hohen, eingesetzten Konzentration an Fluorophor benötigte starke Anregung, um die Fluorophore in der Zelle detektieren zu können. Dies ist auf die fluorogenen Eigenschaften der Fluorophore zurückzuführen und zeigt, dass auch in einer Zellumgebung *in vivo* die fluoreszenzlöschenden Eigenschaften des Farbstoffs gegeben sind. Dadurch wird erneut das Potential der Fluorophore für spätere Anwendungen *in vivo* deutlich, insbesondere die intrazelluläre Verfügbarkeit der Reaktionspartner.

Nachdem die Membrangängigkeit der Fluorophore bestätigt werden konnte, wurden die Fluorophore auf ihre Eigenschaft hin untersucht, *iEDDA*-Reaktionen *in vivo* einzugehen. Dazu wurde der Einzelstrang **ssDNA6** in HeLa-Zellen transfiziert, bevor der jeweilige Fluorophor hinzugegeben und nach der Inkubationszeit ohne zusätzliche Waschschrte in lebenden Zellen untersucht wurde (Abbildung 45). Zunächst wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, um eine Autofluoreszenz der Zellen auszuschließen. Anschließend wurde eine Positivkontrolle erstellt. Hierzu wurde das *iEDDA*-Produkt aus Fluorophor **1** und **ssDNA6** außerhalb der Zelle hergestellt und anschließend unter den gleichen Bedingungen in die HeLa-Zellen transfiziert (Kapitel 9, Abbildung 54). Diese Positivkontrolle wurde dann mit der *in vivo* durchgeführten *iEDDA*-Reaktion verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Fluoreszenzsignal der Positivkontrolle, dem der „Click“-Experimente entspricht. Somit kann sämtliche, in der Zelle beobachtete, Fluoreszenz auf die Fluoreszenzsteigerung im Zuge der *iEDDA*-Reaktion zwischen dem Fluorophor und dem transfizierten Einzelstrang **ssDNA6** zurückgeführt werden.

Bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenzsignale in Abbildung 45 ist zu erkennen, dass diese nur punktförmig im Zytoplasma zu beobachten sind. Eine Erklärung dafür ist, dass der transfizierte Einzelstrang **ssDNA6** nicht in die DNA der Zelle eingebaut wird und sich daher im gesamten Zytoplasma der Zelle befindet. Außerdem ist es möglich, dass die

endosomale Flucht von **ssDNA6** nur teilweise erfolgt und die modifizierte DNA daher mit den tetrazinmodifizierten Fluorophoren im Endosom reagieren.

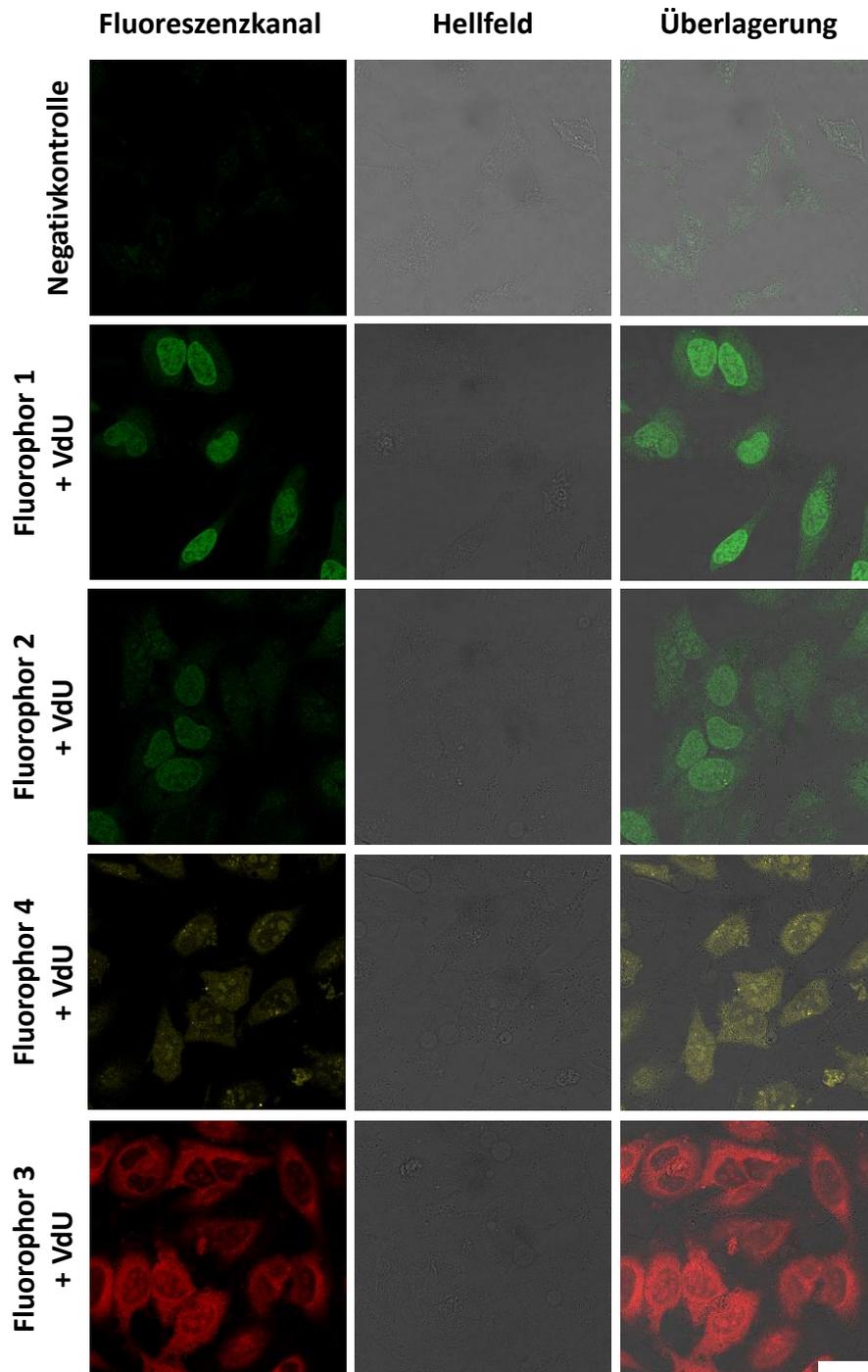


**Abbildung 45:** Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen von **ssDNA6** ( $c = 75 \text{ nM}$ ) transfizierten, lebenden HeLa-Zellen nach 1 h Inkubation der Fluorophore **1-4** ( $c = 150 \text{ nM}$ ) unter waschfreien Bedingungen, sowie eine Negativkontrolle, welche nur HeLa-Zellen enthält (oben).  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  (30 % Intensität),  $\lambda_{\text{em.}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$  (Fluorophor **1** und **2**),  $\lambda_{\text{em.}} = 550\text{-}600 \text{ nm}$  (Fluorophor **4**),  $\lambda_{\text{em.}} = 600\text{-}650 \text{ nm}$  (Fluorophor **3**) (PMT-Detektor). Maßstab:  $30 \mu\text{m}$ .

Obwohl der DNA-Einzelstrang und die Fluorophore in üblichen Konzentrationen in die Zelle transfiziert und mit hoher Laserintensität angeregt wurden, sind die beobachteten Fluoreszenzsignale gering. Eine mögliche Ursache besteht in der Transfektionseffizienz des DNA-Einzelstrangs. So ist es möglich, dass nur ein Bruchteil der modifizierten DNA in die Zelle gelangt, wodurch weniger Fluorophore in der Zelle mit der DNA reagieren und zu einem deutlicheren Fluoreszenzsignal führen können. Dennoch zeigt dieses Experiment die erfolgreiche *iEDDA*-Reaktion in lebenden HeLa-Zellen, ohne das zusätzliche Waschschriffe nach der Zugabe des Fluorophors erfolgen müssen. Bemerkenswert ist zudem das Ausbleiben von störender Hintergrundfluoreszenz, so dass in dieser qualitativen Untersuchung bereits von einer merklichen Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ausgegangen werden kann. Weiterhin fällt beim Vergleich der vier eingebrachten Fluorophore auf, dass die beobachtete Helligkeit des Fluoreszenzsignals stark mit den gemessenen Fluoreszenzquantenausbeuten in den spektroskopischen Untersuchungen korreliert. So wurde von Fluorophor **1** bei der *iEDDA*-Reaktion mit **ssDNA6** die höchste Quantenausbeute gemessen und besitzt auch nach der Reaktion in der Zelle die höchste wahrnehmbare Helligkeit. Die übrigen Fluorophore mit niedrigeren Quantenausbeuten weisen hingegen erkennbar schwächere Fluoreszenzsignale auf. Somit zeigen sich die selben Trends in den *in vivo* Experimenten, wie sie auch in Experimenten außerhalb der Zelle beobachtet werden.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die tetrazinmodifizierten Fluorophore membrandurchgängig sind. Außerdem konnten die *iEDDA*-Reaktionen erfolgreich in lebenden HeLa-Zellen durchgeführt und ohne nachfolgenden Waschschriffe detektiert werden. Daher sollte in einem weiterführenden Experiment festgestellt werden, ob die Fluorophore in der Lage sind, mit metabolisch in DNA eingebauten, modifizierten Nukleosiden in fixierten HeLa-Zellen zu reagieren. Als modifiziertes Nukleosid wurde das in *iEDDA*-Reaktionen weniger reaktive, aber aufgrund seiner hervorragenden Einbauraten in metabolischen Markierungen oft verwendete **VdU** gewählt.<sup>[57,172,173]</sup> Dieses Experiment wurde mit Unterstützung von Dr. Franziska Röncke nach einer Methode von Dr. Dorothee Ganz durchgeführt (siehe Kapitel 8.6).<sup>[174]</sup> Zusätzlich wurden HeLa-Zellen, welche nicht mit **VdU** inkubiert wurden, als Negativkontrolle mitgeführt. Die Zugabe der tetrazinmodifizierten Fluorophore erfolgte

dabei nach der Fixierung der HeLa-Zellen. Nach Inkubation der Fluorophore wurden die Zellen ohne nachfolgende Waschschrirte direkt über Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In Abbildung 46 sind dabei die iEDDA-Reaktionen der tetrazinmodifizierten Fluorophore mit metabolisch eingebautem **VdU** in fixierten HeLa-Zellen dargestellt.



**Abbildung 46:** Fluoreszenzmikroskopische-Aufnahmen von fixierten HeLa-Zellen, 24 h inkubiert mit **VdU** ( $c = 250 \mu\text{M}$ ), fixiert und für 40 min mit dem jeweiligen Fluorophore ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) behandelt. Negativkontrolle: unbehandelte HeLa-Zellen.  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  (10 % Intensität),  $\lambda_{\text{em.}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$  (Fluorophor **1** und **2**),  $\lambda_{\text{em.}} = 550\text{-}600 \text{ nm}$  (Fluorophor **4**),  $\lambda_{\text{em.}} = 600\text{-}650 \text{ nm}$  (Fluorophor **3**) (PMT-Detektor). Maßstab:  $30 \mu\text{m}$ .

Wie auch in den Transfektionsexperimenten zeigt sich für Fluorophor **1** ein sehr deutliches Fluoreszenzsignal, während die übrigen Fluorophore deutlich geringere Helligkeiten aufweisen. Zusätzlich ist für die grün fluoreszierenden Fluorophore **1** und **2** eine Lokalisierung der Fluoreszenz im Zellkern zu erkennen. Diese Beobachtung war nach dem metabolischen Einbau von **VdU** in die DNA der HeLa-Zellen zu erwarten. Die beiden Fluorophore **3** und **4** zeigen hingegen Fluoreszenzsignale im Zellkern und im Zytoplasma. Eine mögliche Ursache kann sein, dass die beiden Fluorophore die Zellmembran zwar ungehindert durchschreiten können, aber nur begrenzt in den Zellkern gelangen. Für eine abschließende Evaluierung sollten diese Experimente mit optimierten Methoden überprüft werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die hergestellten tetrazinmodifizierten Fluorophore die Bandbreite an fluoreszenten Sonden für Anwendungen *in vivo* sinnvoll erweitern. Die Fluorophore sind membrangängig und zeigen eine große Affinität in der bioorthogonalen *iEDDA*-Reaktion mit modifizierten Oligonukleotiden. Gleichzeitig können Markierungsexperimente in lebenden HeLa-Zellen ohne Waschschrte mit niedrigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis durchgeführt werden. Vor allem der Fluorophor **1** zeigt dabei durch seine hohe Helligkeit und Lokalisierung das größte Potential für zukünftige bioorthogonale Anwendungen *in vivo*.

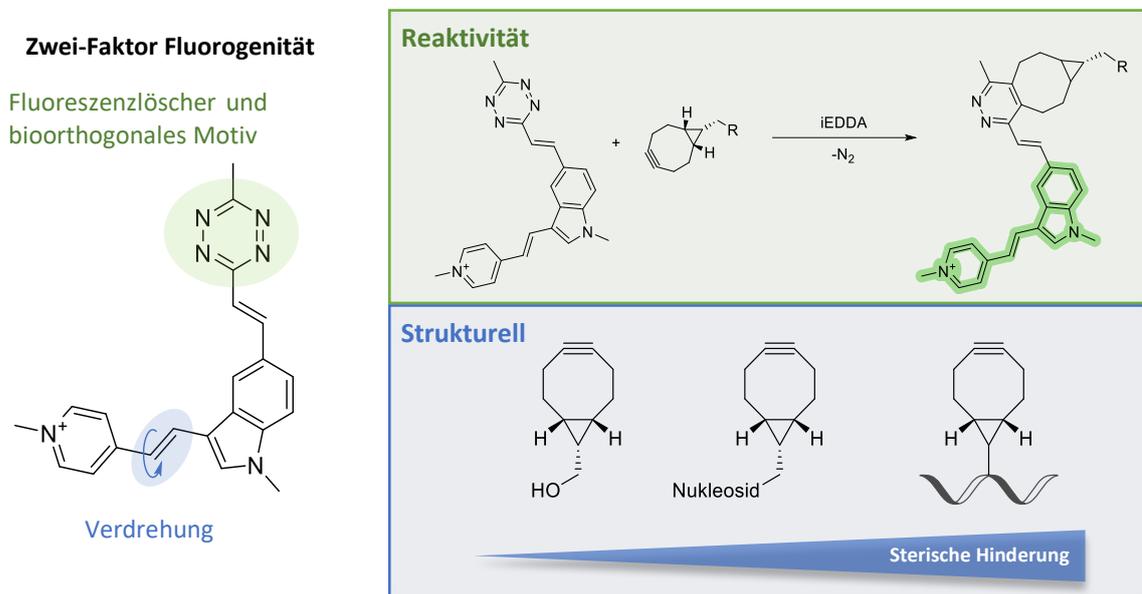
## 7. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit konnten vier neuartige Fluorophore mit grüner, gelber und roter Fluoreszenz hergestellt und charakterisiert werden. Diese basieren auf im Arbeitskreis WAGENKNECHT entwickelten Cyanin-Styryl-Farbstoffen, welche mit einer Methyltetrazin-funktion über eine Ethenylbrücke verbunden wurden. Als grundlegende Eigenschaften zeigen die Cyanin-Styryl-Farbstoffe sehr hohe Photostabilitäten<sup>[19,140,148]</sup> und hohe Stokes-Verschiebungen von bis zu 0,77 eV, wodurch sie gut geeignet sind, um die Anregungswellenlänge von der Emissionsbande zu trennen.

Des Weiteren konnten die aus der *iEDDA*-Reaktionen mit verschiedenen Dienophilen resultierenden Fluoreszenzsteigerung und deren Kinetik bestimmt werden. Dabei wurde als Ausgangspunkt die *iEDDA*-Reaktion zwischen den tetrazinmodifizierten Fluorophoren mit der reaktiven Gruppe Bicyclo[6.1.0]non-4-in als Alkoholkonjugat betrachtet. Hierbei konnte die generelle Abhängigkeit der Fluoreszenzsteigerung von der Donor-Akzeptor-Beziehung des Energieübertrags zwischen dem Tetrazin und dem Cyanin-Styryl-Farbstoff bestätigt werden. Dabei zeigen grün fluoreszierende Fluorophore die höchsten Fluoreszenzsteigerungen, während rot fluoreszierende Fluorophore den geringsten Fluoreszenzanstieg verzeichnen. Anschließend konnte über die Einführung von BCN-modifizierten Nucleosiden eine allgemeine Verbesserung des Fluoreszenzanstiegs und der Kinetik erreicht werden. Durch Variation der Nucleobase und der Linkerstruktur zwischen der Nucleobase und der BCN-Funktionalität wurden die Einflüsse dieser Struktur motive auf die Effizienz des Fluoreszenzanstiegs und der Reaktionsgeschwindigkeit untersucht. Dadurch konnte durch die Verwendung von BCN-modifizierten 7-Deazaadenosinen, welche über ein starres Linkersystem miteinander verknüpft wurden, Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von bis zu  $k_2 = 500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und Fluoreszenzsteigerungen von bis zu 54 erreicht werden.

Diese Reaktionen werden weiterhin durch DNA mit modifizierter BCN-Nucleotid-Einheit deutlich beschleunigt. Dabei konnten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von  $k_2 \geq 284\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und ein *Turn-on* von bis zu 170 bestimmt werden. Es besteht also eine klare Korrelation zwischen der Struktur der BCN-Modifikation und der *iEDDA*-Reaktion mit tetrazinmodifizierten Fluorophoren. Weiterhin konnte durch Hybridisierung der DNA-

Einzelstränge mit den entsprechenden Gegensträngen der *Turn-on* auf das 560-fache erhöht werden. Diese Beobachtung ist das Ergebnis einer Zwei-Faktor-Fluorogenität (Abbildung 47). Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität wird dabei zum einen durch die Umwandlung des Tetrazins zum Diazin durch die *iEDDA*-Reaktion erreicht, während Nukleosid- und DNA-Bindungen zu einer strukturellen Fluorogenität führen.



**Abbildung 47:** Zweifaktor-Fluorogenität der tetrazinmodifizierten Fluorophore. Die Tetrazinfunktion dient hierbei gleichzeitig als bioorthogonal-reaktive Gruppe und als Fluoreszenzlöcher. Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität wird bei der Umwandlung zum Diazin durch die *iEDDA*-Reaktion erreicht. Nukleosid- und DNA-Bindung führen außerdem zu einer struktureller Fluorogenität.

Durchgeführte Experimente deuten darauf hin, dass die Fluorophore in der Lage sind, durch Templatisierung mit Oligonukleotiden eine Vorkoordination einzugehen. Dadurch werden die Geschwindigkeitskonstanten um den Faktor 1000 erhöht und der Fluoreszenzanstieg um knapp das Zehnfache im Vergleich zum Nukleosid-Analogon verstärkt. Damit zeigen die tetrazinmodifizierten Fluorophore eine starke Affinität gegenüber modifizierten Oligonukleotiden und sind in diesem Kontext sehr interessant für die fluoreszente Bildgebung in lebenden Zellen. Allerdings sollte sich der *Turn-on* der Fluorophore weiter verbessern lassen, indem die Ethenylbrücke zwischen dem Cyanin-Styryl-Farbstoff und des Tetrazins entfernt wird. Hierdurch kann nach XIAOGANG *et al.* und PARK *et al.* eine weitaus effizientere Fluoreszenzlöschung nach dem Modell einer *ICDS*

generiert werden.<sup>[134,138]</sup> Dieser Ansatz sollte sich auf die hier vorliegenden tetrazinmodifizierten Fluorophore übertragen lassen. Dazu könnte die Tetrazinfunktion über ein Indol-5-Carbonitril oder über einen bereits nitrilmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoff direkt synthetisiert werden. Ein alternativer Weg würde sich über eine Suzuki-Kupplung eines Indol-5-borans mit einem angepassten Tetrazinbaustein nach Fox *et al.* anbieten.<sup>[175]</sup>

In nachfolgenden Experimenten in lebenden HeLa-Zellen konnte bewiesen werden, dass die hergestellten Fluorophore selbst in niedrigen Konzentrationen membrandurchgängig sind und bei Konzentrationen von bis zu 1  $\mu\text{M}$  in der Zelle praktisch keine Toxizität aufweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die tetrazinmodifizierten Fluorophore in der Lage sind, *iEDDA*-Reaktionen mit BCN-modifizierter DNA in der intrazellulären Umgebung lebender HeLa-Zellen einzugehen. Zusätzlich konnte die DNA fixierter HeLa-Zellen nach metabolischem Einbau von **VdU** durch die in dieser Arbeit entwickelten Fluorophore markiert werden. Die Fluorogenität dieser Fluorophore ermöglicht dadurch die Abbildung von Oligonukleotiden in lebenden Zellen mit einem so stark verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis, das Waschverfahren vor der Zellabbildung nicht erforderlich sind. Dies ist ein großer Vorteil für künftige Anwendungen bei der Bildgebung von DNA und RNA in lebenden Zellen. Daher sollten die Bedingungen der Markierungsexperimente weiter optimiert werden, um die hier synthetisierten Fluorophore auch in realen Anwendungen einsetzen zu können.

## 8. Experimentaltteil

### 8.1. Geräte, Materialien und Methoden

#### Reagenzien und Lösungsmittel

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, ACROS ORGANICS, ALFAR AESAR, CARBOLUTION, CARL ROTH, FISHER SCIENTIFIC, FLUKA, JENA BIOSCIENCE, SIGMA ALDRICH, TCI, THERMOFISHER und VWR bezogen. Diese wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Kontrolle des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel entsprachen mindestens der Stufe „*pro analysis*“ (p.a.). Trockene Lösungsmittel wurden dabei von ACROS ORGANIC bezogen und über Molekularsieb sowie unter Argonatmosphäre mit Septumverschluss gelagert. Die technischen Lösungsmittel Cyclohexan, n-Hexan und Dichlormethan wurden vor der Nutzung vordestilliert. Für HPLC-Anwendungen wurden hochreine Lösungsmittel (HPLC *grade*) sowie doppelt deionisiertes Wasser aus einer MERCK *Milli-Q Direct 8* Entsalzungsanlage verwendet. Deuterierte Lösungsmittel wurden von EURISOTOP bezogen.

#### Reaktionsführung

Für wasser- und/oder luftempfindliche Reaktionen wurden die Reaktionen unter Argonatmosphäre (Argon 5.0; 99,999%) durchgeführt. Die für die Reaktionen verwendete Glasgeräte wurden im Vorfeld im Vakuum ausgeheizt und anschließend mindestens dreimal mittels Schlenk-Technik mit Argon geflutet. Feststoffe wurden dabei unter Argon-Gegenstrom hinzugegeben und unter Vakuum getrocknet, bevor das Reaktionsgefäß erneut mit Argon geflutet wurde. Flüssigkeiten wurden mittels Kunststoffspritzen und Edelstahlkanülen über ein Septum hinzugegeben und durch zehnmütiges durchströmen mit Argon entgast. Für Reaktionen, welche bei 0 °C durchgeführt wurden, wurde ein Eiswasserbad verwendet. Für Kühlfallen wurde eine Kältemischung von Trockeneis in Isopropanol ( $T = -78\text{ °C}$ ) verwendet.

## Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit 60 F<sub>254</sub> Kieselgel beschichtete (Schichtdicke: 0,25 mm) Aluminium-Platten der Firma MERCK verwendet. Die Detektion der Spezies erfolgte mit Hilfe von UV-Lampen mit Wellenlängen von 254 nm, 366 nm oder 395 nm. Zur weiteren Auswertung wurden Färbelösungen verwendet, in welche die DC-Platten eingetaucht und anschließend durch Erhitzen entwickelt wurden:

- Kaliumpermanganat-Lösung (1,0 g KMnO<sub>4</sub>, 2,5 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 g NaOH, 100 mL H<sub>2</sub>O) für oxidierbare Spezies.
- Ninhydrin-Lösung (3,0 g Ninhydrin in 200 mL EtOH) für Amine.

## Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung von Rohprodukten wurde Kieselgel der Firma SIGMA-ALDRICH (Porengröße: 60 Å, Korngröße: 40-63 µm) als stationäre Phase verwendet. Die stationäre Phase wurde im jeweils unpolaren Lösemittel aufgeschlämmt und auf der Chromatographiesäule verdichtet. Anschließend wurde der Startgradient bis zur Equilibrierung (mind. drei Säulenvolumen) über die Säule gegeben. Alle zu trennenden Produktgemische wurden im Elutionsmittel zunächst gelöst und anschließend flüssig (*wet load*) auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde Seesand (reinst, gereinigt mit HCl) auf die stationäre Phase gegeben. Die Trennung der unterschiedlichen Produkte erfolgt jeweils bei leichtem Überdruck, welcher mittels einer Handpumpe erzeugt wurde.

## Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Untersuchung von *iEDDA*-Reaktionen über HPLC wurde das System *UltiMate 3000* der Firma FISHER SCIENTIFIC verwendet. Die Trennung erfolgte dabei bei einer Temperatur von 30 °C mit einer analytischen *reversed-phase* Chromatographiesäule von VDSPHER (OptiBio PUR 300 S18-SE; 250 x 4,6 mm, 5 µM). Die Analyten wurden, sofern nicht anders angegeben mit einem Injektionsvolumen von 10,0 µL und einer Flussrate von 1,00 mL min<sup>-1</sup> auf die Säule gegeben. Als Eluent diente ein Lösungsmittelgradient von

Acetonitril und bidestilliertem Wasser (Tabelle 4). Bei „Click“-Reaktionen mit Tetrazinderivaten wurden den Lösemitteln zusätzlich 0,1 % TFA zugesetzt. Die Signale wurden mit einem UV-Diodenarray-Detektor bei den Wellenlängen 265 nm und 295 nm gemessen und einzelne Produktfraktionen im Anschluss über Massenspektrometrie analysiert.

**Tabelle 4:** Verwendete Elutionsgradienten zur HPLC-Analyse der *iEDDA*-Reaktionen der Dienophilen und den tetrazinmodifizierten Fluorophoren.

Zeit [min]	MeCN + 0,1 % TFA [%]
0,000	0
30,000	30
40,000	30
40,001	90
50,000	90
50,001	0
60,000	0

### NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanz)

Die hergestellten Substanzen wurden per Kernspinresonanzspektroskopie analysiert. Die Überprüfung erfolgte an einem *BRUKER ADVANCE 400* (400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR, 101 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR) oder *BRUKER ADVANCE 500* (500 MHz:  $^1\text{H}$ -NMR, 126 MHz:  $^{13}\text{C}$ -NMR). Dabei wurde die Substanz in ca. 400  $\mu\text{L}$  deuteriertem Lösungsmittel der Firma EURISOTOP gelöst und in Probenröhrchen mit 5 mm Durchmesser gemessen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wurde in *parts per million* (ppm) relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben. Zur Kalibrierung wurden folgende Signale der unvollständig deuterierten Lösungsmittel verwendet:

$\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta = 7.26$  ppm       $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta = 77.16$  ppm

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

Methanol- $d_4$ :  $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta = 3.31$  ppm       $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta = 49.00$  ppm

Die Kopplungskonstante  $J$  wurde in Hz angegeben und für die Beschreibung der Multiplizität wurden folgende Abkürzungen verwendet: br (breites Singulett), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett) und m (Multipllett).

### **Massenspektrometrie (MS)**

Die Massenspektren wurden an einem *Q Exactive Orbitrap* sowie einem *LTQ Orbitrap XL* von THERMO FISHER SCIENTIFIC mit *electron spray ionisation* (ESI) aufgenommen. Die Signale wurden im Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) angegeben und das Molekülion als  $[M]^+$  oder in protonierter Form als  $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^+$  im Positivmodus dargestellt.

Für Aufnahmen von MALDI-ToF-Massenspektren („*Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry*“) wurde ein AXIMA Confidence Spektrometer der Firma SHIMADZU verwendet. Als Target wurde eine Standardprobenplatte aus Edelstahl der Firma BRUKER mit 386 Auftragungspunkten verwendet. Die zu untersuchende Probe wurde anschließend in einem geeigneten Lösemittel gelöst und zusammen mit einer Matrixlösung von 6-Aza-2-thiothymin (ATT) in Acetonitril aufgetragen.

### **Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS)**

LC/MS-Messungen wurden über eine analytische *reversed-phase* Chromatographiesäule von VDSPHER (OptiBio PUR 300 S18-SE; 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ M) mit einem Lösungsmittelgradient aus Acetonitril und bidestilliertem Wasser (Tabelle 4) aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch charakterisiert.

### **Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden**

Die isolierten ss- und dsDNA-Stränge wurden zur Konzentrationsbestimmung in wässriger Lösung an einem *ND-100 Spectrophotometer* der Firma NANODROP™ untersucht. Hierfür wurde im Modus „*Nucleic Acid*“ die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Probenvolumen wurde 1  $\mu$ L aufgetragen und die Konzentrationsberechnung erfolgte unter Verwendung des LAMBERT-BEER'SCHEN-Gesetzes.

## Optische Spektroskopie

Die optische Untersuchung der hergestellten Substanzen erfolgte in Quarzglasküvetten der Firma STARNA (Schichtdicke 1 cm, Probenvolumen 1 mL oder 0,5 mL) bei einer Temperatur von 20 °C. Dabei wurden alle Spektren mithilfe eines Blindwertes basislinienkorrigiert.

## UV/Vis-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden an einem *Cary 100 Bio* Spektrometer der Firma VARIAN mit Temperaturregler (*Cary 100 Temperature Controller*) unter Verwendung der Software *Cary WinUV Scan Application* aufgenommen (Durchschnittszeit: 0,1 s, Datenintervall: 1,0 nm, Scangeschwindigkeit: 600 nm/min, Lampenwechsel bei 350 nm).

Für die Schmelzpunktmessungen von Oligonukleotiden wurde die Absorption bei 260 nm in einem Temperaturbereich von 10 – 90 °C (Heiz- bzw. Kühlrate: 0,5 °C/min, Datenintervall: 0,5 °C) unter Verwendung der Software *Thermal* gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert aus den Messungen der Aufheizungsserie verwendet und über die erste Ableitung der Wendepunkt der Schmelzpunktkurve ermittelt.

## Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-4* Spektrofluorometer der Firma HORIBA-SCIENTIFIC mit *LFI-3751* Peltier-Element von *Wavelength Electronics* bzw. mit *AC 2000* Thermostat von THERMOFISHER SCIENTIFIC unter Verwendung der Software *Fluorescence V3.5* aufgenommen. Dabei wurde für die Bestimmung der Fluoreszenz generell zwei verschiedene Parametersets verwendet:

### A: Messungen der Reaktionskinetik von modifizierten Nukleosiden

- Inkremente: 1,0 nm
- Inkrementzeit: 0,20 s
- Integrationszeit: 0,10 s
- Spaltbreiten: 3,0 nm
- Temperatur: 20,0 °C

## **B: Messungen der Reaktionskinetik der modifizierten Oligonukleotide**

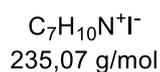
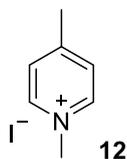
- Inkremente: 2,0 nm
- Inkrementzeit: 0,20 s
- Integrationszeit: 0,05 s
- Spaltbreiten: 3,0 nm
- Temperatur: 20,0 °C

### **Fluoreszenzquantenausbeuten**

Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden mit einem *Quantaaurus QY C11347* der Firma HAMAMATSU in 5 mL Quarzglasküvetten gemessen. Dabei wurde die Küvette zur Messung mit 2 mL an Probe-/ oder Blindlösung befüllt.

## 8.2. Synthesevorschriften

### Verbindung 12



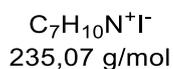
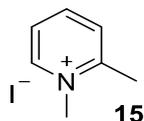
In einem Rundkolben wurde eine Mischung aus 4,85 mL 2-Methylpyridin (4,66 g, 50,0 mmol, 1,00 Äq.) und 9,35 mL Methyljodid (21,3 g, 150 mmol, 3,00 Äq.) in 15 mL Aceton ( $c = 3,33 \text{ mol/L}$ ) für 90 min unter Reflux gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und drei Mal mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Produkt als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 11,4 g (49,0 mmol, 97 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 8.86 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 2H, arom.), 7.97 (d,  $J = 6.4 \text{ Hz}$ , 2H, arom.), 4.30 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 2.59 (s, 3H, C- $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 158.1, 144.3, 127.8, 47.2, 21.3.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}^+$ ) = 108,0808  $[\text{M}]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 108.0812  $[\text{M}]^+$ .

## Verbindung 15



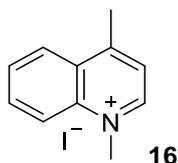
In einem Rundkolben wurde eine Mischung aus 4,96 mL 2-Methylpyridin (4,66 g, 50,0 mmol, 1,00 Äq.) und 9,35 mL Methyljodid (21,3 g, 150 mmol, 3,00 Äq.) in 15 mL Aceton ( $c = 3,33$  mol/L) für 90 Minuten unter Reflux gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und drei Mal mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 12,0 g (50,8 mmol, quant.) erhalten.

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 9.03 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, arom.), 8.51 – 8.42 (m, 1H, arom.), 8.08 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, arom.), 7.95 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H, arom.), 4.27 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.81 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>).

$^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 155.7, 145.7, 144.8, 129.0, 125.0, 45.8, 20.3.

HR-ESI-MS:  $m/z$  (berechnet für  $C_7H_{10}N^+$ ) = 108,0808[M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 108,0811[M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 16



$C_{11}H_{12}N^+I^-$   
285,13 g/mol

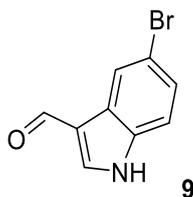
In einem Rundkolben wurde eine Mischung aus 6,76 mL 4-Methylchinolin (7,16 g, 50,0 mmol, 1,00 Äq.) und 9,35 mL Methyljodid (21,3 g, 150 mmol, 3,00 Äq.) in 15 mL Aceton ( $c = 3,33$  mol/L) für 90 Minuten unter Reflux gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und drei Mal mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde als intensiv gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 14,3 g (50,0 mmol, quant.) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 9.41 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H, arom.), 8.53 – 8.46 (m, 2H, arom.), 8.25 (ddd,  $J = 8.7, 7.0, 1.4$  Hz, 1H, arom.), 8.08 – 8.01 (m, 2H, arom.), 4.59 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.99 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 158.0, 148.8, 137.5, 134.8, 129.5, 128.3, 126.7, 122.3, 119.4, 45.1, 19.7.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_{11}H_{12}N^+$ ) = 158,0964[M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 158,0964[M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 9



$C_9H_6BrNO$   
224,06 g/mol

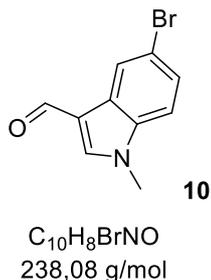
Unter Argon wurden 4,50 g 5-Bromindol (**6**) (23,0 mmol, 1.00 Äq.) und 5,78 mL  $POCl_3$  (9,50 g, 62,0 mmol, 2,70 Äq.) in je 2,5 mL trockenem DMF gelöst. Die Lösung wurde bei 0 °C zur  $POCl_3$ -Lösung gegeben und zwei Stunden lang gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in 40 mL Eiswasser gegeben. Mit 2 M NaOH wurde ein neutraler bis leicht basischer pH-Wert eingestellt (bis zu pH 9). Die Lösung wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als schwach gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 4,80 g (21,4 mmol, 93 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 12.30 (s, 1H,  $R_2$ -NH), 9.93 (s, 1H, R-CHO), 8.33 (s, 1H, arom.), 8.23 (s, 1H, arom.), 7.49 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, arom.), 7.38 (dd,  $J = 8.6, 2.0$  Hz, 1H, arom.).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 185.1, 139.2, 135.8, 126.1, 125.9, 123.0, 117.5, 114.9, 114.6.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_9H_7^{79}BrNO^+$ ) = 223,9706  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 223,9705  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  (berechnet für  $C_9H_7^{81}BrNO^+$ ) = 225,9685  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 225,9685  $[M+H]^+$ .

## Verbindung 10



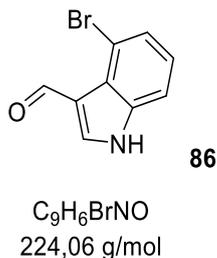
In einen Rundkolben wurden 4,80 g des formylierten Indols **9** (21,4 mmol, 1,00 Äq.) und 3,26 g  $K_2CO_3$  (23,6 mmol, 1,10 Äq.) in 24 mL trockenem DMF suspendiert. Anschließend wurden 7,21 mL Dimethylcarbonat (7,72 g, 85,7 mmol, 4,00 Äq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde 19 h lang bei 130 °C gerührt. Nach Abkühlen, wurde die Suspension auf 50 mL Eiswasser gegossen und die wässrige Lösung dreimal mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mehrfach mit Wasser gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Danach wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde dabei als beigefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 4,96 g (20,8 mmol, 97 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 9.87 (s, 1H, R-CHO), 8.27 (s, 1H, arom.), 8.21 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, arom.), 7.52 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, arom.), 7.43 (dd,  $J$  = 8.7, 2.0 Hz, 1H, arom.), 3.86 (s, 3H, N- $CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 184.5, 142.2, 136.4, 126.2, 126.0, 123.0, 116.2, 115.3, 113.1, 33.5.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_{10}H_9^{79}BrNO^+$ ) = 237,9862  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 237,9861  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  (berechnet für  $C_{10}H_9^{81}BrNO^+$ ) = 239,9842  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 239,9840  $[M+H]^+$ .

## Verbindung 86



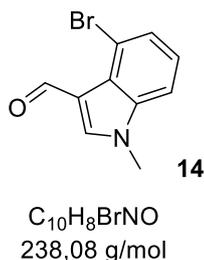
Unter Argon wurden 1,30 mL 4-Bromindol (2,00 g, 10,2 mmol, 1.00 Äq.) und 2,60 mL  $POCl_3$  (4,22 g, 27,5 mmol, 2,70 Äq.) in je 2 mL trockenem DMF gelöst. Die Lösung wurde bei 0 °C zur  $POCl_3$ -Lösung gegeben und zwei Stunden lang gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in 40 mL Eiswasser gegeben. Mit 2 M NaOH wurde ein neutraler bis leicht basischer pH-Wert eingestellt (pH 9). Die Lösung wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als schwach gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 2,18 g (9,73 mmol, 95 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 12.57 (s, 1H,  $R_2$ -NH), 10.68 (s, 1H, R-CHO), 8.31 (s, 1H, arom.), 7.57 (dd,  $J = 8.1, 0.8$  Hz, 1H, arom.), 7.47 (dd,  $J = 7.7, 0.7$  Hz, 1H, arom.), 7.16 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, arom).

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_9H_7^{79}BrNO^+$ ) = 223,9706  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 223,9702  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  (berechnet für  $C_9H_7^{81}BrNO^+$ ) = 225,9685  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 225,9682  $[M+H]^+$ .

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[176]</sup>

## Verbindung 14



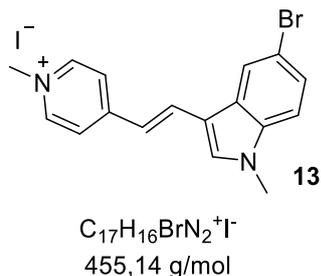
In einen Rundkolben wurden 2,00 g des formylierten Indols **86** (8,93 mmol, 1,00 Äq.) und 1,36 g  $K_2CO_3$  (9,82 mmol, 1,10 Äq.) in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Anschließend wurden 3,00 mL Dimethylcarbonat (3,22 g, 35,7 mmol, 4,00 Äq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde 19 h lang bei 130 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur, wurde das Gemisch auf 50 mL Eiswasser gegossen und die wässrige Lösung dreimal mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mehrfach mit Wasser gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Danach wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde dabei als orangefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 1,84 g (7,73 mmol, 86 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 10.66 (s, 1H, R-CHO), 8.32 (s, 1H, arom.), 7.63 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, arom.), 7.50 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, arom.), 7.22 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, arom.), 3.90 (s, 3H, R- $CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 184.0, 138.7, 137.2, 126.2, 125.0, 123.6, 116.6, 112.3, 111.0, 33.6.

**HR-ESI-MS:** m/z (berechnet für  $C_{10}H_9^{79}BrNO^+$ ) = 237,9862  $[M+H]^+$ ; m/z (gefunden) = 237,9859  $[M+H]^+$ , m/z (berechnet für  $C_{10}H_9^{81}BrNO^+$ ) = 239,9842  $[M+H]^+$ ; m/z (gefunden) = 239,9838  $[M+H]^+$ .

### Verbindung 13



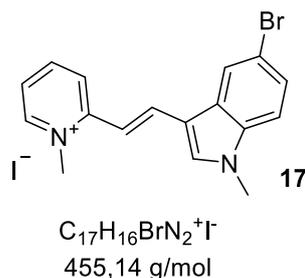
Unter Argonatmosphäre wurde 1,00 g 1,4-Dimethylpyridiniumiodid (**12**) (4,25 mmol, 1,00 Äq.) in einem Rundkolben in 40 mL Ethanol suspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten lang gerührt. Anschließend wurden 1,52 g des Indols **10** (6,38 mmol, 1,50 Äq.) und 2,10 mL Piperidin (21,3 mmol, 5,00 Äq.) zu der Suspension gegeben und über Nacht bei 80 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde Diethylether zugegeben, bis kein Feststoff mehr ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, dreimal mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als orangefarbenes Pulver mit einer Ausbeute von 1,70 g (3,74 mmol, 88 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 8.69 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, arom.), 8.32 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, arom.), 8.17 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.12 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 2H, arom.), 8.01 (s, 1H, arom.), 7.52 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, arom.), 7.40 (td,  $J$  = 8.7, 1.8 Hz, 1H, arom.), 7.20 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 4.19 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 153.8, 144.1, 136.5, 135.5, 134.4, 127.2, 125.3, 122.4, 121.8, 117.4, 114.3, 112.9, 112.0, 46.3, 33.3.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_{17}H_{16}^{79}BrN_2^+$ ) = 327,0491 [M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 327,0491 [M]<sup>+</sup>,  $m/z$  (berechnet für  $C_{17}H_{16}^{81}BrN_2^+$ ) = 329,0471 [M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 329,0469 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 17



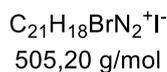
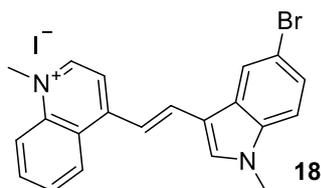
Unter Argonatmosphäre wurde 1,00 g 1,2-Dimethylpyridiniumiodid (**15**) (4,25 mmol, 1,00 Äq.) in einem Rundkolben in 40 mL Ethanol suspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten lang gerührt. Anschließend wurden 1,52 g des Indols **10** (6,38 mmol, 1,50 Äq.) und 2,10 mL Piperidin (21,3 mmol, 5,00 Äq.) zu der Suspension gegeben und über Nacht bei 80 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde Diethylether zugegeben, bis kein Feststoff mehr ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, dreimal mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als orangefarbenes Pulver mit einer Ausbeute von 1,91 g (4,20 mmol, 98 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 8.75 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, arom.), 8.54 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, arom.), 8.31 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 2H, arom.), 8.28 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, arom.), 8.22 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H R-CH=CH-R), 7.72 – 7.65 (m, 1H, arom.), 7.52 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, arom.), 7.39 (dd,  $J$  = 8.7, 1.9 Hz, 1H, arom.), 7.20 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 4.30 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 153.3, 145.0, 142.8, 136.2, 136.2, 135.2, 127.6, 125.3, 123.4, 122.8, 122.0, 114.3, 112.9, 111.9, 110.9, 56.0, 45.7, 33.5, 18.5.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_{17}H_{16}^{79}BrN_2^+$ ) = 327,0491 [M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 327,0485 [M]<sup>+</sup>,  $m/z$  (berechnet für  $C_{17}H_{16}^{81}BrN_2^+$ ) = 329,0471 [M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 329,0463 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung **18**



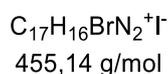
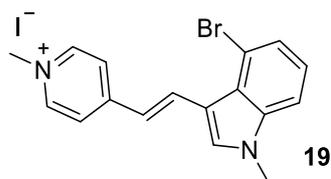
Unter Argonatmosphäre wurde 1,10 g 1,4-Dimethylchinoliniumiodid (**16**) (3,86 mmol, 1,00 Äq.) in einem Rundkolben in 40 mL Ethanol suspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten lang gerührt. Anschließend wurden 1,38 g des Indols **10** (5,79 mmol, 1,50 Äq.) und 1,91 mL Piperidin (19,3 mmol, 5,00 Äq.) zu der Suspension gegeben und über Nacht bei 80 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde Diethylether zugegeben, bis kein Feststoff mehr ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, dreimal mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als dunkelgrüner Feststoff mit einer Ausbeute von 1,85 g (3,67 mmol, 95 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 9.10 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, arom.), 8.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, arom.), 8.52 – 8.39 (m, 3H, arom., R-CH=CH-R), 8.33 (s, 1H, arom.), 8.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, arom.), 8.22 – 8.13 (m, 1H, arom.), 8.02 – 7.88 (m, 2H, arom., R-CH=CH-R), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, arom.), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, arom.), 4.42 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 153.2, 146.5, 138.6, 136.4, 136.1, 135.2, 134.5, 128.4, 128.1, 126.0, 125.4, 125.3, 122.0, 118.9, 114.4, 113.8, 113.7, 112.9, 43.9, 33.6.

**HR-ESI-MS:** *m/z* (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>18</sub><sup>79</sup>BrN<sub>2</sub><sup>+</sup>) = 377,0648 [M]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 377,0651 [M]<sup>+</sup>, *m/z* (berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>18</sub><sup>81</sup>BrN<sub>2</sub><sup>+</sup>) = 379,0627 [M]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 379,0630 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 19



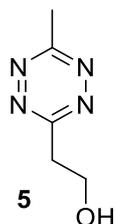
Unter Argonatmosphäre wurde 329 mg 1,4-Dimethylpyridiniumiodid (**12**) (1,40 mmol, 1,00 Äq.) in einem Rundkolben in 40 mL Ethanol suspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten lang gerührt. Anschließend wurden 500 mg des Indols **14** (2,10 mmol, 1,50 Äq.) und 0,69 mL Piperidin (596 mg, 7,00 mmol, 5,00 Äq.) zu der Suspension gegeben und über Nacht bei 80 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde Diethylether zugegeben, bis kein Feststoff mehr ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, dreimal mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als orangefarbenes Pulver mit einer Ausbeute von 637 mg (1,40 mmol, quant.) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 8.75 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, arom.), 8.34 (s, 1H, arom.), 8.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, arom.), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, arom.), 7.43 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, arom.), 7.19 (t, 1H, arom.), 7.18 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 4.21 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 153.0, 144.6, 138.5, 133.4, 132.5, 125.5, 124.0, 123.5, 122.0, 117.9, 113.0, 112.4, 110.9, 46.5, 33.6.

**HR-ESI-MS:** *m/z* (berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>16</sub><sup>79</sup>BrN<sub>2</sub><sup>+</sup>) = 327,0491 [M]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 327,0492 [M]<sup>+</sup>, *m/z* (berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>16</sub><sup>81</sup>BrN<sub>2</sub><sup>+</sup>) = 329,0471 [M]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 329,0470 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 5



$C_5H_8N_4O$   
140,15 g/mol

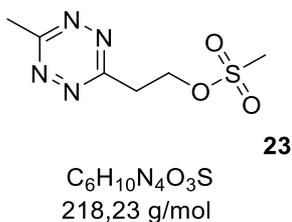
Unter Argonatmosphäre wurden 190  $\mu$ L 3-Hydroxypropionitril (**8**) (0,200 g, 2,81 mmol, 1,00 Äq.), 269 mg Zinkiodid (0,844 mmol, 0,30 Äq.) und 730  $\mu$ L MeCN (**9**) (0,578 g, 14,1 mmol, 5,00 Äq.) wurden in 5,00 mL 1,4-Dioxan suspendiert. Anschließend wurde 6,97 mL Hydrazin-Monohydrat (7,04 g, 141 mmol, 50,0 Äq.) zu dieser Suspension gegeben und das Reaktionsgemisch 23 h lang bei 60 °C gerührt. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurde zunächst 500 mg  $NaNO_2$  (7,25 mmol, 2,57 Äq.) in 10 mL eiskaltem  $H_2O$  gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. 1 M HCl wurde zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war (pH = 3). Die rosa Lösung wurde dreimal mit 600 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Schichten über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und durch Säulenchromatographie mit Kieselgel (Hexan/EtOAc 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als dunkelrotes Öl mit einer Ausbeute von 190 mg (1,35 mmol, 48 %) erhalten.

**$^1H$  NMR** (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) = 4.25 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H,  $R_2-CH_2$ ), 3.56 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 2H,  $R_2-CH_2$ ), 3.05 (s, 3H, R- $CH_3$ ), 2.50 (br, 1H, R-OH).

**$^{13}C$  NMR** (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) = 168.4, 168.0, 60.1, 37.5, 21.3.

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für  $C_5H_9N_4O^+$ ) = 141,0771  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 141,0771  $[M+H]^+$ .

## Verbindung 23



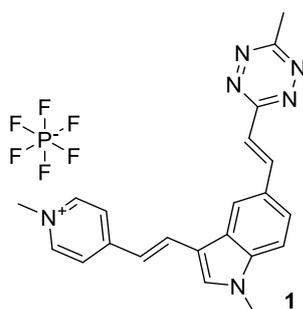
In einem Rundkolben wurden unter Argonatmosphäre 461 mg des Tetrazins **5** (3,29 mmol, 1,00 Äq.) in 15 mL trockenem DCM gelöst und mit 640  $\mu$ L trockenem Triethylamin (466 mg, 4,61 mmol, 1,40 Äq.) versetzt. Anschließend wurden 360  $\mu$ L Methansulfonylchlorid (533 mg, 4,61 mmol, 1,40 Äq.) unter Rühren hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 15 mL Dichlormethan verdünnt, zweimal mit Wasser gewaschen und die organische Phase über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Kieselgel aufgereinigt (Hexan/EtOAc: 1:1). Das Produkt wurde als pinkfarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 654 mg (3,00 mmol, 91 %) erhalten.

$^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) = 4.87 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $R_2-CH_2$ ), 3.76 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $R_2-CH_2$ ), 3.08 (s, 3H, R- $CH_3$ ), 3.02 (s, 3H, R- $CH_3$ ).

$^{13}C$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) = 168.3, 166.2, 66.1, 37.7, 34.7, 21.3.

HR-ESI-MS:  $m/z$  (berechnet für  $C_6H_9N_4O_3S^+$ ) = 217,0390  $[M-H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 217,0397  $[M-H]^+$ .

## Verbindung 1



$C_{22}H_{21}F_6N_6P$   
514,42 g/mol

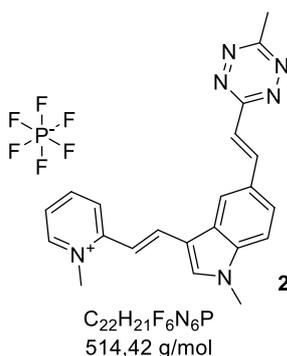
In ein 10 mL *Crimp*-Gefäß wurden 106 mg des Farbstoffs **13** (0,232 mmol, 1,00 Äq.), 12,0 mg  $Pd_2(dba)_3$  (0,012 mmol, 5mol%) und 34,0 mg QPhos (0,048 mmol, 20mol%) gegeben und unter Hochvakuum getrocknet. Der Feststoff wurde dann mit 1,00 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 1,00 mL einer 0,24 M Tetrazin-Stammlösung von **23** (50,6 mg, 0,232 mmol, 1,00 Äq.) und 160  $\mu$ L trockenes  $Et_3N$  (118 mg, 1,16 mmol, 5,00 Äq.) zu der Lösung gegeben. Die Reaktion wurde 18 h lang in einem Metallheizblock bei 80 °C gerührt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie mit einem Überschuss an gesättigter, wässriger  $KPF_6$ -Lösung versetzt und 15 Min. lang kräftig gerührt. Danach wurde das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Lösung wurde dann mit DCM verdünnt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH: 95:5) gereinigt. Das Produkt konnte als orangefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 40,0 mg (78,0  $\mu$ mol, 33 %) als Hexafluorophosphat-Salz erhalten werden.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 8.72 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, arom.), 8.62 (s, 1H, arom.), 8.47 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.23 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.17 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, arom.), 8.00 (s, 1H, arom.), 7.94 (dd,  $J$  = 8.7, 1.5 Hz, 1H, arom.), 7.71 (t,  $J$  = 16.3 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 7.68 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, arom.), 7.41 (t,  $J$  = 16.3 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 4.19 (s, 3H, R- $CH_3$ ), 3.92 (s, 3H, R- $CH_3$ ), 2.96 (s, 3H, R- $CH_3$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 165.9, 164.5, 154.0, 144.3, 141.1, 138.9, 136.3, 134.9, 128.7, 125.7, 122.1, 121.9, 118.7, 117.7, 113.3, 111.8, 46.3, 33.3, 20.8.

**HR-ESI-MS:** m/z (berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>) = 369,1822 [M]<sup>+</sup>; m/z (gefunden) = 369,1817 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 2



In ein 10 mL *Crimp*-Gefäß wurden 106 mg des Farbstoffs **17** (0,232 mmol, 1,00 Äq.), 12,0 mg  $Pd_2(dba)_3$  (0,012 mmol, 5mol%) und 34,0 mg QPhos (0,048 mmol, 20mol%) gegeben und unter Hochvakuum getrocknet. Der Feststoff wurde dann mit 1,00 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 1,00 mL einer 0,24 M Tetrazin-Stammlösung von **23** (50,6 mg, 0,232 mmol, 1,00 Äq.) und 160  $\mu$ L trockenes  $Et_3N$  (118 mg, 1,16 mmol, 5,00 Äq.) zu der Lösung gegeben. Die Reaktion wurde 18 h lang in einem Metallheizblock bei 80 °C gerührt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie mit einem Überschuss an gesättigter, wässriger  $KPF_6$ -Lösung versetzt und 15 Min. lang kräftig gerührt. Danach wurde das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Lösung wurde dann mit DCM verdünnt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH: 95:5) gereinigt. Das Produkt konnte als orangefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 40,0 mg (78,0  $\mu$ mol, 33 %) als Hexafluorophosphat-Salz erhalten werden.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 8.79 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.54 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.47 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H), 8.40 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.28 (d,  $J$  = 15.8 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.74 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.71 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J$  = 90.0, 15.8 Hz, 1H), 4.38 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 2.96 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 165.9, 164.5, 153.6, 145.3, 143.1, 141.1, 138.7, 136.7, 136.1, 128.7, 126.0, 123.4, 123.0, 122.7, 121.5, 118.8, 113.2, 111.8, 111.2, 54.9, 45.7, 33.4, 20.8.

**HR-ESI-MS:** m/z (berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>) = 369,1822 [M]<sup>+</sup>; m/z (gefunden) = 369,1816 [M]<sup>+</sup>.

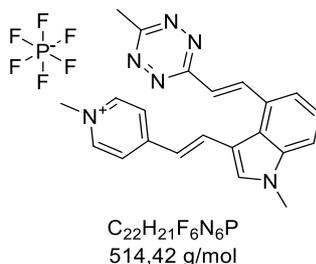


arom.), 8.25 – 8.21 (m, 1H, arom.), 8.10 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.06 – 8.02 (m, 1H, arom.), 7.93 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, arom.), 7.71 (d,  $J = 15.9$ , 1H, R-CH=CH-R), 7.68 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, arom.), 4.46 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.97 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 2.97 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 165.9, 164.5, 153.6, 146.8, 141.2, 138.8, 138.7, 136.9, 136.2, 134.7, 128.9, 128.7, 126.5, 126.3, 125.6, 122.7, 121.6, 119.1, 118.8, 114.3, 113.8, 113.8, 111.8, 44.0, 33.6, 20.8.$

**HR-ESI-MS:**  $m/z$  (berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>) = 419,1979 [M]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 419,1977 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 4



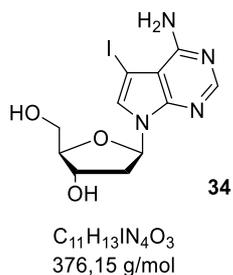
In ein 10 mL *Crimp*-Gefäß wurden 212 mg des Farbstoffs **19** (0,464 mmol, 1,00 Äq.), 24,0 mg  $Pd_2(dba)_3$  (0,026 mmol, 5mol%) und 68,0 mg QPhos (0,096 mmol, 20mol%) gegeben und unter Hochvakuum getrocknet. Der Feststoff wurde dann mit 1,00 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 2,00 mL einer 0,24 M Tetrazin-Stammlösung von **23** (112 mg, 0,464 mmol, 1,00 Äq.) und 320  $\mu$ L trockenes  $Et_3N$  (236 mg, 2,33 mmol, 5,00 Äq.) zu der Lösung gegeben. Die Reaktion wurde 18 h lang in einem Metallheizblock bei 80 °C gerührt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie mit einem Überschuss an gesättigter, wässriger  $KPF_6$ -Lösung versetzt und 15 Min. lang kräftig gerührt. Danach wurde das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Lösung wurde dann mit DCM verdünnt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das erhaltene Rohprodukt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel (Gradient: DCM/MeOH: 95:1, 98:2, 95:5) gereinigt. Das Produkt konnte als orangefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 74,6 mg (0,145 mmol, 31 %) als Hexafluorophosphat-Salz erhalten werden.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 8.94 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.67 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, arom.), 8.32 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 8.21 (s, 1H, arom.), 7.96 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H, arom.), 7.75 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, arom.), 7.66 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, arom.), 7.57 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 7.38 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, arom.), 7.14 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H, R-CH=CH-R), 4.20 (s, 3H, R- $CH_3$ ), 3.93 (s, 3H, R- $CH_3$ ), 3.00 (s, 3H, R- $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 166.1, 164.2, 153.1, 144.4, 138.2, 138.0, 135.0, 133.4, 128.6, 124.3, 122.8, 122.2, 122.0, 120.3, 118.9, 112.8, 112.7, 46.4, 33.4, 20.9.

**HR-ESI-MS:** m/z (berechnet für  $C_{22}H_{21}N_6^+$ ) = 369,1822 [M]<sup>+</sup>; m/z (gefunden) = 369,1817 [M]<sup>+</sup>.

## Verbindung 34



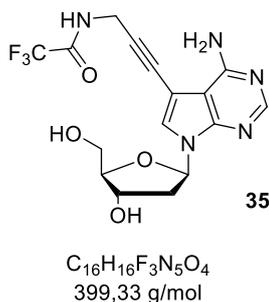
Unter Argonatmosphäre wurden 3.60 g 6-Chlor-7-iod-7-deazapurin (12,9 mmol, 1,00 Äq.) in 70 mL trockenem MeCN gelöst und mit 1.82 g fein gemörsertem KOH (32,4 mmol, 2,51 Äq.) und 206  $\mu$ L Tris(2-(2-methoxy-ethoxy)ethyl)amin (**TDA-I**) (208 mg, 0,644 mmol, 5 mol%) versetzt. Die Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 5,51 g des Chlorzuckers (14,2 mmol, 1,10 Äq.) hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit heißem Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in  $NH_3$  in MeOH (7 M) gelöst und in ein Druckgefäß aus Borosilikatglas überführt. Anschließend wurde die Lösung 24 h bei 120 °C gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde in einen Rundkolben überführt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Kieselgel (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt. Das Produkt wurden als rosafarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 2,00 g (5.32 mmol, 41 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.09 (s, 1H, arom.), 7.65 (s, 1H, arom.), 6.66 (br, 2H, R-NH<sub>2</sub>), 6.48 (dd,  $J$  = 8.1, 6.0 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 5.25 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, R-OH), 5.03 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, R-OH), 4.32 (dq,  $J$  = 6.1, 2.6 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 3.80 (dd,  $J$  = 4.3, 2.5 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 3.59 – 3.49 (m, 2H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.47 – 2.41 (m, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.20 – 2.12 (m, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**$^{13}C$ -NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 157.2, 151.9, 149.7, 126.7, 103.1, 87.4, 82.9, 70.9, 61.9, 51.8, 39.8.

**HR-ESI-MS**:  $m/z$  (berechnet für  $C_{11}H_{14}IN_4O_3^+$ ) = 377,0105 [M+H]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 377,0097 [M+H]<sup>+</sup>.

## Verbindung 35



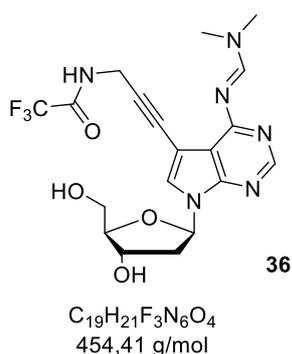
Unter Argon wurden 2,00 g des Nucleosids **34** (5,32 mmol, 1,00 Äq.), 2,41g 2,2,2-trifluoro-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamid (15,9 mmol, 3,00 Äq.), 225 mg CuI (1,17 mmol, 22 mol%) und 1.47 mL Triethylamin (1,07 g, 10,6 mmol, 2,00 Äq.) in 30 mL trockenem DMF gelöst. Die Lösung wurde mit Argon entgast und anschließend 376 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,536 mmol, 10 mol%) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in 50 mL MeOH gelöst, mit ca. 300 mg Amberlite IRA 403 Bicarbonat versetzt und für 30 min gerührt. Nach Filtration des Feststoffes wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als ockerfarbener Schaum mit einer Ausbeute von 1.85 g (4,63 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.08 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, R<sub>2</sub>-NH), 8.12 (s, 1H, arom.), 7.75 (s, 1H, arom.), 6.47 (dd, *J* = 7.9, 6.1 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 5.26 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 5.06 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, R-OH), 4.34 (dd, *J* = 6.2, 2.6 Hz, 1H, R-OH), 4.31 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.09 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H, R-NH<sub>2</sub>), 3.82 (q, *J* = 4.2 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 3.61 – 3.47 (m, 2H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.48 – 2.42 (m, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.17 (ddd, *J* = 13.1, 6.0, 2.7 Hz, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 157.5, 156.5, 156.1, 152.7, 149.2, 126.6, 117.2, 114.4, 94.1, 87.5, 86.8, 83.2, 76.3, 70.9, 61.8, 48.6, 30.0.

**HR-ESI-MS:** *m/z* (berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>) = 400,1227 [M+H]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 400,1219 [M+H]<sup>+</sup>.

## Verbindung 36



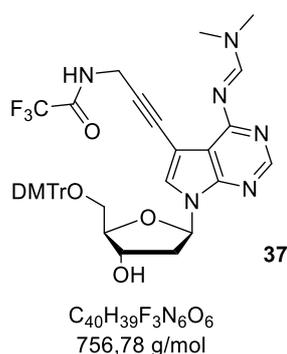
In einen ausgeheizten Kolben wurden 1,00 g des Nucleosids **35** (2,50 mmol, 1,00 Äq.) in 20 mL trockenem MeOH gelöst. Es wurden 5,63 mL DMF-DMA (5,08 g, 42,3 mmol, 17,0 Äq.) hinzugegeben und über Nacht bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 760 mg (1,67 mmol, 67 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 10.06 (s, 1H, R<sub>2</sub>-NH), 8.79 (s, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 8.33 (s, 1H, arom.), 7.84 (s, 1H, arom.), 6.53 (dd,  $J$  = 7.9, 6.1 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 5.27 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 1H, R-OH), 5.05 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, R-OH), 4.37 – 4.32 (m, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 4.28 (s, 2H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.83 (q,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 3.61 – 3.48 (m, 2H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.18 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.12 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.19 (ddd,  $J$  = 13.0, 5.8, 2.5 Hz, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 160.8, 156.5, 156.2, 152.0, 150.7, 128.5, 110.1, 108.9, 96.0, 87.5, 85.8, 84.6, 83.1, 77.3, 71.0, 61.9, 40.4, 39.9, 34.5, 29.6.

**HR-ESI-MS**:  $m/z$  (berechnet für  $C_{19}H_{21}F_3N_6O_4^+$ ) = 455,1649 [M+H]<sup>+</sup>;  $m/z$  (gefunden) = 455,1640 [M+H]<sup>+</sup>.

## Verbindung 37



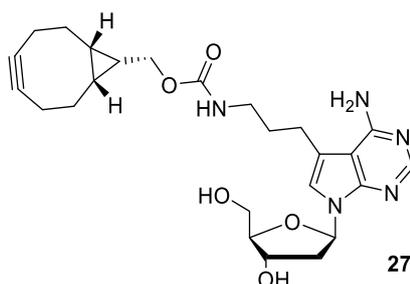
680 mg des Nucleosids **36** (1,50 mmol, 1,00 Äq.) wurden lyophilisiert und in 10,2 mL trockenem Pyridin gelöst. Es wurden 588 mg DMT-Cl (1,74 mmol, 1,16 Äq.) hinzugegeben und die Lösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Am Folgetag wurden erneut 236 mg (0,45 Äq.) DMT-Cl zugegeben und für eine Stunde gerührt. Im Anschluss wurden 5,0 mL MeOH hinzugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH + 0.1 %Et<sub>3</sub>N 100:1-20:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als rosafarbener Schaum mit einer Ausbeute von 328 mg (433 µmol, 29 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 10.04 (s, 1H, R<sub>2</sub>-NH), 8.79 (s, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 8.32 (s, 1H, arom.), 7.69 (s, 1H, arom.), 7.36 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, arom.), 7.29 – 7.19 (m, 7H, arom.), 6.82 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 4H, arom.), 6.55 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 5.33 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, R-OH), 4.36 (dq, *J* = 8.5, 4.2 Hz, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 4.27 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.96 – 3.89 (m, 1H, R<sub>3</sub>-CH), 3.72 (s, 6H, R-CH<sub>3</sub>), 3.18 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.15 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.12 (s, 3H, R-CH<sub>3</sub>), 3.11 – 3.07 (m, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.62 (dt, *J* = 13.2, 6.6 Hz, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.25 (ddd, *J* = 13.1, 6.2, 4.2 Hz, 1H, R<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 160.8, 158.0, 156.5, 156.2, 152.1, 150.9, 145.0, 135.6, 135.5, 129.7, 129.7, 128.4, 127.8, 127.7, 126.6, 114.4, 113.1, 110.1, 96.2, 85.4, 85.4, 84.7, 82.8, 77.2, 70.7, 64.2, 64.2, 55.0, 40.4, 39.1, 34.5, 29.6.

**HR-ESI-MS:** *m/z* (berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>) = 757,2956 [M+H]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 757,2940 [M+H]<sup>+</sup>.

## Verbindung 27



$C_{25}H_{33}N_5O_5$   
483,57 g/mol

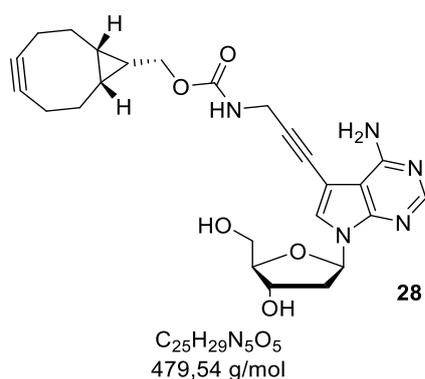
In einen Rundkolben wurden 37 mg des entschützten Nucleosids **32** (121  $\mu$ mol, 1,00 Äq.) in 2,0 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 67,0  $\mu$ L Triethylamin (49,0 mg, 484  $\mu$ mol, 4,00 Äq.) und 53,0 mg BCN-NHS-Ester **31** (182  $\mu$ mol, 1,50 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50,0 mL Methanol gelöst, ca. 50,0 mg Amerblite IRA 402 Bicarbonat hinzugegeben und für 30 min gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch mit Kieselgel (DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 35,0 mg (72,4  $\mu$ mol, 60 %) erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz, Methanol- $d_4$ ):  $\delta$  = 8.11 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.52 – 6.42 (m, 1H), 4.51 (dt,  $J$  = 5.3, 2.3 Hz, 1H), 4.33 – 4.27 (m, 1H), 4.15 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 3.99 (q,  $J$  = 3.3 Hz, 1H), 3.82 – 3.68 (m, 2H), 3.19 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.81 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.70 – 2.62 (m, 3H), 2.29 (dd,  $J$  = 5.7, 2.4 Hz, 1H), 2.24 (s, 1H), 2.21 (s, 1H), 2.18 (s, 1H), 2.14 (s, 1H), 1.86 (dt,  $J$  = 13.0, 6.0 Hz, 2H), 1.61 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 1H), 1.52 – 1.46 (m, 1H), 1.37 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 1.29 (s, 1H), 1.00 – 0.92 (m, 3H).

**$^{13}C$ -NMR** (101 MHz, Methanol- $d_4$ ):  $\delta$  = 159.2, 151.9, 151.2, 130.6, 121.4, 116.5, 104.4, 99.5, 88.9, 86.3, 73.1, 68.7, 63.8, 63.7, 41.2, 41.0, 40.4, 40.3, 31.7, 30.2, 21.9, 21.4, 19.0, 14.4, 11.4.

**HR-ESI-MS**:  $m/z$  (berechnet für  $C_{25}H_{34}N_5O_5^+$ ) = 484,2554  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 484,2551  $[M+H]^+$ .

## Verbindung 28



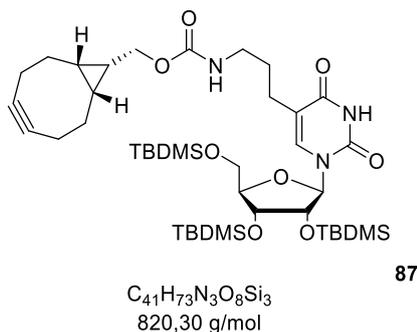
In einen Rundkolben wurden 71,0 mg des entschützten Nucleosids **33** (233  $\mu$ mol, 1,00 Äq.) in 6,0 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 130  $\mu$ L Triethylamin (94,0 mg, 933  $\mu$ mol, 4,00 Äq.) und 102 mg BCN-NHS-Ester **31** (350  $\mu$ mol, 1,50 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50,0 mL Methanol gelöst, ca. 100 mg Amerblüte IRA 402 Bicarbonat hinzugegeben und für 30 min gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch mit Kieselgel (DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 79,0 mg (165  $\mu$ mol, 70 %) erhalten.

**$^1$ H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.10 (s, 1H), 7.71 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 2H), 6.50 – 6.43 (m, 1H), 5.35 – 5.21 (m, 1H), 5.08 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 1H), 4.34 (s, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 3H), 4.02 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 3.87 – 3.78 (m, 1H), 3.54 (dtd,  $J$  = 20.8, 11.4, 4.4 Hz, 2H), 3.17 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 3H), 2.47 – 2.41 (m, 1H), 2.23 – 2.11 (m, 5H), 1.55 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 2H), 1.29 (p,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 0.86 (t,  $J$  = 9.7 Hz, 2H).

**$^{13}$ C-NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 157.5, 156.6, 152.7, 149.2, 125.9, 102.3, 99.0, 94.6, 89.3, 87.5, 83.2, 75.3, 71.0, 62.0, 61.9, 48.6, 39.9, 30.9, 28.6, 20.9, 19.6, 17.6.

**HR-ESI-MS**:  $m/z$  (berechnet für  $C_{25}H_{30}N_5O_5^+$ ) = 480,2242  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  (gefunden) = 480,2241  $[M+H]^+$ .

## Verbindung **87**



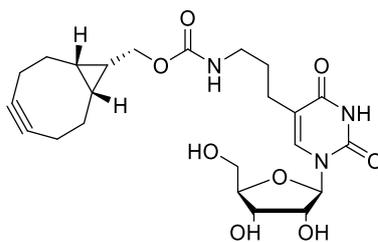
In einen Rundenkolben wurden 130 mg des geschützten Nucleosids **29** (0,202 mmol, 1,00 Äq.) und 112  $\mu$ L Et<sub>3</sub>N (81,8 mg, 0,808 mmol, 4,00 Äq.) in 5,0 mL trockenem DMF gelöst. Dazu wurden 88,0 mg des BCN-NHS-Esters **31** (0,303 mmol, 1,50 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und 30 min lang mit 50,0 mg Amberlite IRA 402 Bicarbonat gerührt. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH 50:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 95,5 mg (113  $\mu$ mol, 57 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 11.43 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 5.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.33 – 4.21 (m, 2H), 4.12 – 4.04 (m, 4H), 3.95 – 3.90 (m, 1H), 3.16 (d, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.15 (d, *J* = 14.5 Hz, 8H), 1.57 – 1.48 (m, 4H), 1.25 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.00 – 0.78 (m, 27H), 0.20 – -0.21 (m, 16H).

**HR-ESI-MS:** *m/z* (berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>74</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>3</sub><sup>+</sup>) = 820,4778 [M+H]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 820,4775 [M+H]<sup>+</sup>.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[177]</sup>

## Verbindung 25



25

$C_{23}H_{31}N_3O_8$   
477,21 g/mol

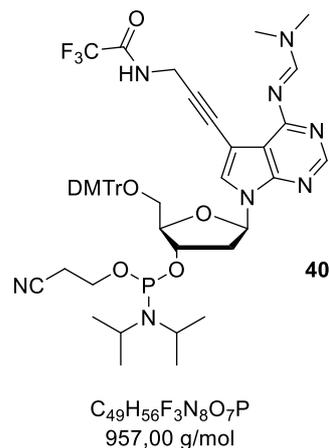
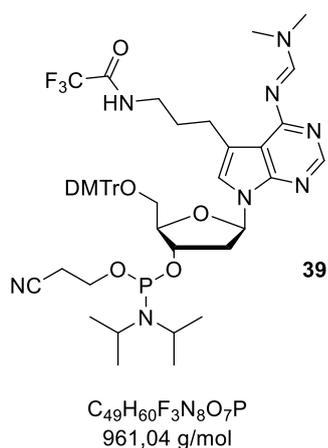
In einen Rundkolben wurden unter Argonatmosphäre 78,0 mg des geschützten Nukleosids **87** (0,116 mmol, 1,00 Äq.) in 5,0 mL trockenem THF aufgelöst. Danach wurden 567  $\mu$ L Et<sub>3</sub>N·3 HF (556  $\mu$ L, 1,16 mmol, 10,0 Äq.) langsam unter Rühren zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/MeOH 6:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als rosafarbener Schaum mit einer Ausbeute von 28,0 mg (58,6  $\mu$ mol, 51 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 11.29 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.10 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.77 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.12 – 5.03 (m, 2H), 4.04 (s, 1H), 3.97 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.82 (q, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.67 – 3.52 (m, 3H), 2.96 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.26 – 2.13 (m, 7H), 1.53 (dt, *J* = 14.8, 7.5 Hz, 4H), 1.27 (dt, *J* = 17.1, 8.4 Hz, 2H), 0.97 – 0.82 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 163.4, 156.4, 150.6, 136.6, 129.5, 113.0, 99.0, 87.6, 84.7, 73.3, 69.9, 61.3, 60.9, 28.6, 28.3, 23.7, 20.9, 19.5, 17.7, 13.9, 10.9.

**HR-ESI-MS**: *m/z* (berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>) = 478,2184 [M+H]<sup>+</sup>; *m/z* (gefunden) = 478,2186 [M+H]<sup>+</sup>.

## Verbindung **39** und **40**



Unter Argonatmosphäre wurden 100 mg des geschützten Nucleosids **37** bzw. **38** (131  $\mu$ mol, 1,00 Äq.) in 5,00 mL trockenem DCM gelöst. Es wurden 67,1  $\mu$ L DIPEA (49,8 mg, 394  $\mu$ mol, 3,00 Äq.) und 58,6  $\mu$ L 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit (62,2 mg, 263  $\mu$ mol, 2,00 Äq.) zugegeben und 3,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann direkt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel (DCM/Aceton 1:1 + 0,1% Et<sub>3</sub>N) gereinigt. Das Produkt **39** bzw. **40** wurde als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 120 mg (131  $\mu$ mol, quant., **39**) oder 126 mg (132  $\mu$ mol, quant., **40**) erhalten.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 147.54, 147.00, 13.89.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[177]</sup>

### 8.3. Oligonukleotide

#### Automatisierte Festphasensynthese der Oligonukleotide

Die automatisierten Festphasensynthesen der Oligonukleotide wurden an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE unter Argon-Schutzgas durchgeführt. Als Festphase wurde CPG (*Controlled Pore Glass*) der Firma SIGMA-ALDRICH mit einer Beladung von 1  $\mu\text{mol}$  (500 Å) verwendet. Die verwendeten, gewerblich erhältlichen Phosphoramidite und Reagenzien wurden von den Firmen CHEMGENES und GLENRESEARCH bezogen. Die erworbenen, natürlichen Phosphoramidite wurden für in MeCN gelöst (Phosphoramidite der natürlichen Nukleotide (67 mM). Die Phosphoramidite **39** und **40** wurden in MeCN (67 $\mu\text{M}$ ) gelöst.

Die für das Kupplungsverfahren benötigten Reagenzien wurden unter Argonatmosphäre hergestellt. Für die Oxidationslösung wurden 4 % I<sub>2</sub> in THF/Pyr/H<sub>2</sub>O 8:1:1 (734 mg, 16 mL THF, 2,0 mL Pyr, 2,0 mL H<sub>2</sub>O) gelöst. Als Co-Oxidationslösung wurde Et<sub>3</sub>N/THF/H<sub>2</sub>O 8:1:1 verwendet. Adamantoylcarbonylchlorid in MeCN/Pyr 1:1 (0.17 M) wurde als Aktivatorlösung verwendet.

#### Kupplungsprotokoll

Die Syntheseyklen wurden nach dem folgenden Kupplungsprotokoll durchgeführt. Die Bezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen. Zur vereinfachten Aufreinigung wurden das Protokoll im Modus „DMT-on“ durchgeführt.

**Tabelle 5:** Standardkupplungsprotokoll für die Synthese von Oligonukleotiden.

Schritte	Zeit [0,1 s]	Reagenzien	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>Entschützung</b>						
1	4	TCA	COL			
2	30	TCA	TRM	ON		
3				ON		
4					15	
5	25	TCA	TRM	ON		
6				ON		
7					15	
8	25	TCA	TRM	ON		

9				ON		
10					15	
11	25	TCA	TRM	ON		
12				ON		
13					15	
14	25	TCA	TRM	ON		
15				ON		
16					15	
17	30	GAS	TRM			
18	10	ACN	M_W			
19	20	ACN	COL	ON		
20				ON		
21					4	
22	30	GAS	COL			
23	2	ACN	M_W			
24	20	ACN	COL	ON		
25				ON		
<b>Kupplung</b>						
1	15	GAS	COL		2	
2	2	TET	COL	ON		
3				ON		
4					2	1
5	10	ACN	M_W		50	
6	10	ACN	COL	ON		
7				ON		
8	35	GAS	COL			
9	20	GAS	M_W			
<b>Branch</b>						
1	4	TET	COL	ON		
2	8	AMD +TET	COL			
3				ON		
4					10	
5	6	AMD + TET	COL	ON		
6				ON		
7					5	
8	10	ACN	M_W			
9	10	GAS	M_W			
<b>Capping</b>						
1	20	CP_A + CP_B	COL	ON		
2				ON		
3					15	
4	10	CP_A + CP_B	COL	ON		
5				ON		
6					15	
7	20	GAS	COL			
8	2	ACN	M_W			
9	12	ACN	COL	ON		

<b>10</b>				ON	
<b>11</b>	10	GAS	M_W		2
<b>12</b>	30	GAS	COL		
<b>Oxidation</b>					
<b>1</b>	35	OXI	COL	ON	
<b>2</b>				ON	
<b>3</b>	10	ACN	M_W		9
<b>4</b>					9
<b>5</b>		WTH			150
<b>6</b>		WTH			150
<b>7</b>	30	GAS	COL		
<b>8</b>	2	ACN	M_W		
<b>9</b>	16	ACN	COL	ON	
<b>10</b>				ON	
<b>11</b>	20				
<b>12</b>	30	GAS	COL		
<b>13</b>	2	ACN	M_W		
<b>14</b>	15	ACN	COL	ON	
<b>15</b>				ON	
<b>16</b>	40				
<b>17</b>	15	ACN	COL	ON	
<b>18</b>				ON	
<b>19</b>	50				
<b>20</b>	10	GAS	M_W		
<b>21</b>	30	GAS	COL		

Schritte	Zeit [0,1 s]	Reagenzien	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
<b>Branch</b>						
<b>1</b>	4	TET	COL	ON		
<b>2</b>	4	AMD + TET	COL			
<b>3</b>				ON		
<b>4</b>					60	
<b>5</b>					60	
<b>6</b>					60	
<b>7</b>					60	
<b>8</b>	4	AMD+TET	COL	ON		
<b>9</b>				ON		
<b>10</b>					60	
<b>11</b>					60	
<b>12</b>					60	
<b>13</b>					60	
<b>14</b>	4	TET	COL	ON		
<b>15</b>				ON		
<b>16</b>	20	ACN	M_W			
<b>17</b>	20	GAS	M_W			

## **Abspaltungsprotokoll**

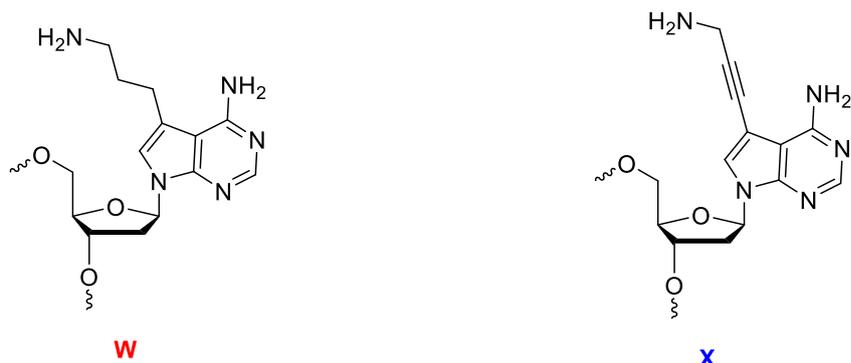
Zur Aufreinigung der hergestellten, modifizierten Oligonukleotide wurden die CPG-Säulen zunächst unter Hochvakuum vollständig getrocknet. Anschließend wurden die Oligonukleotide von der Festphase abgespalten. Dazu wurde das Säulenmaterial in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 700 µL einer 25%igen Ammoniumhydroxid-Lösung übergossen. Die Suspension wurde bei 55 °C über Nacht ruhen gelassen. Im Anschluss wurde der Ammoniak bei 100 mbar und 35 °C im Verlauf von 35 min entfernt. Der zurückbleibender Überstand wurde abgenommen und in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß gegeben und der Rückstand dreimal mit je 100 µL doppelt destilliertem Wasser gewaschen und mit dem zuvor abgenommen Überstand gegeben. Die kombinierten wässrigen Phasen wurden dann bei 0,1 mbar und 25 °C über Nacht lyophilisiert.

## **Aufreinigung der modifizierten DNA**

Die abgespaltenen, modifizierten Oligonukleotide wurden über DMT-Affinitätssäulen der Firma GLEN RESEACH (*Glen-pak™ DNA Purification Cartridges*) aufgereinigt. Dabei wurde folgendes Aufreinigungsprotokoll verwendet:

Die Affinitätssäule wurde mit einer Tropfrate von etwa 1 Tropfen pro Sekunde zunächst mit 0,5 mL MeCN und anschließend mit 1,0 mL 2 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 7) vorbehandelt. Das Oligonukleotid wurde in 1,0 mL doppelt destilliertem Wasser gelöst und mit 1,0 mL einer NaCl-Lösung (100 mg/mL) verdünnt. Danach wurde die Lösung auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 1,0 mL einer Salzwashlösung (100 mg/mL NaCl-Lösung mit 5% MeCN) gewaschen. Danach wurden zweimal 1,0 mL TFA-Lösung (2 % in Wasser) hinzugegeben und die Säule zweimal mit 1,0 mL doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Das Oligonukleotid wurde mit 1,5 mL Elutionslösung (0.5 % Ammoniumhydroxid in MeCN/Wasser 1:1) von der Säule gespült und anschließend unter Vakuum bei 0,1 mbar und 25°C über Nacht bis zur Trockene eingedampft.

Die erhaltenen modifizierten Oligonukleotide sind in Abbildung 48 aufgeführt.



**DNA1** 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**W**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'    **DNA3** 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**X**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'  
**DNA2** 5'-G-C-A-G-T-C-T-A-**W**-T-A-C-A-C-T-G-A-3'

**Abbildung 48:** Modifizierte Oligonukleotide **ssDNA1**, **ssDNA2** und **ssDNA3** nach der Aufreinigung.

Um die erhaltenen Sequenzen zu überprüfen wurden diese über MALDI-TOF mit einer 3-HPA Matrix auf ihre Masse untersucht (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Berechnete und gefundene Massen nach der Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide **ssDNA1**, **ssDNA2** und **ssDNA3**.

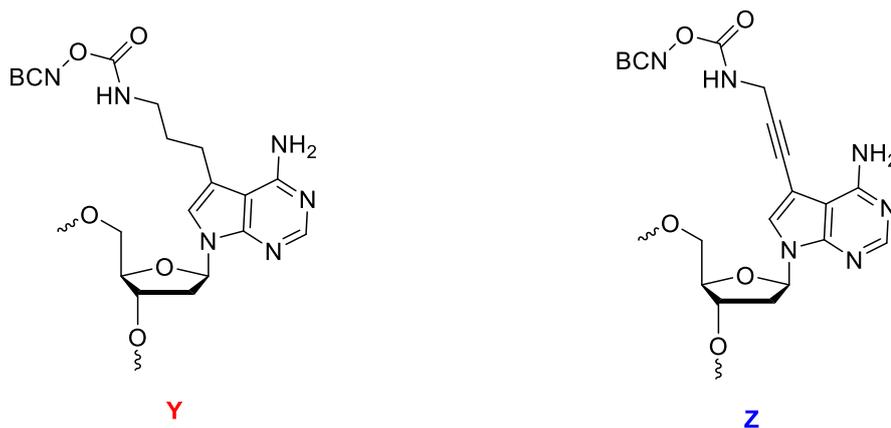
Oligonukleotid	Berechnete Masse m/z	Gefundene Masse m/z
<b>ssDNA1</b>	5214 [M] <sup>+</sup>	5214 [M+H] <sup>+</sup>
<b>ssDNA2</b>	5232 [M] <sup>+</sup>	5234 [M+H] <sup>+</sup>
<b>ssDNA3</b>	5210 [M] <sup>+</sup>	5210 [M+H] <sup>+</sup>

### Postsynthetische Modifikation der Oligonukleotide

Zur weiteren Umsetzung der hergestellten, mit einem Amin-linker modifizierten, Oligonukleotide, wurden ungefähr 1 µmol des Oligonukletids in 300 µL trockenem DMSO gelöst. Im Anschluss wurden 2,00 mg des BCN-NHS-Esters **31** in 100 µL trockenem DMSO gelöst und zu dem Oligonukleotid hinzugegeben. Die Lösung wurde dann mit 5,00 µL Triethylamin versetzt und für 16 h auf einem Laborschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum bei 0,1 mbar und 25 °C über Nacht entfernt.

## Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide

Zur Aufreinigung der postsynthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden eine semipräparative RP-HPLC durchgeführt. Die Trennung erfolgte an einer *Dionex Ultimate3000* mit Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS Fluoreszenzdetektor und Fraktionssammler der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC unter Verwendung der Software *Chromeleon 7*. Zur semi-präparativen Trennung wurde eine *VDSphere OptiBio PUR 300 C18-SE*-Säule (250 x 10 mm, 5 µm) der Firma VDS OPTILAB mit einer Flussrate von 1,0 mL/min bei einer Temperatur von 40 °C verwendet. Dabei diente ein Gradient aus 0-20 % Acetonitril und 0,1 M NH<sub>4</sub>OAc über 30 min als mobile Phase. Das modifizierte Oligonukleotid wurde in 600 µL Wasser aufgenommen und über den Autosampler mit einem Injektionsvolumen von 300 µL injiziert. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm konnte das Oligonukleotid detektiert und fraktionsweise gesammelt werden. Die erhaltenen Sequenzen **ssDNA4**, **ssDNA5** und **ssDNA6** sind in Abbildung 49 dargestellt und wurden im Anschluss durch MALDI-TOF mit einer 3-HPA Matrix auf ihre Masse untersucht (Tabelle 7).



**DNA4** 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**Y**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'    **DNA6** 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**Z**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'  
**DNA5** 5'-G-C-A-G-T-C-T-**A**-**Y**-T-A-C-A-C-T-G-A-3'

**Abbildung 49:** Postsynthetisch modifizierte Oligonukleotide **ssDNA4**, **ssDNA5** und **ssDNA6** nach der Aufreinigung.

**Tabelle 7:** Berechnete und gefundene Massen nach der Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide **ssDNA4**, **ssDNA5**, und **ssDNA6**.

Oligonukleotid	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
<b>ssDNA4</b>	5390 [M] <sup>+</sup>	5393 [M+H] <sup>+</sup>
<b>ssDNA5</b>	5408 [M] <sup>+</sup>	5408 [M+H] <sup>+</sup>
<b>ssDNA6</b>	5386 [M] <sup>+</sup>	5389 [M+H] <sup>+</sup>

### Konzentrationsbestimmung der postsynthetisch modifizierten DNA

Die Konzentration der postsynthetisch modifizierten Oligonukleotide wurden über die Absorption an einem *NS-1000 Spektrophotometer* der Firma NANODROP im Nukleinsäuremodus bestimmt. Dabei ergibt sich die Konzentration aus dem LAMBERT-BEER-Gesetz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des Oligonukleotids  $\epsilon$  bei 260 nm. Dieser ergibt sich unter Berücksichtigung der Wechselwirkung der benachbarten Nukleotide im Oligonukleotid nach:

$$\epsilon_{260} = (dA_n \times \epsilon_A + dT_n \times \epsilon_T + dC_n \times \epsilon_C + dG_n \times \epsilon_G) \times 0.9 + dX_n \times \epsilon_Z \quad (\text{Gl. 8.3.1})$$

$\epsilon_x$ : molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm (siehe Tabelle 8)

$dX_n$ : Anzahl der Nukleotide (A, T, C, G), bzw. des modifizierten Nukleotids (**dZ** bzw. **dY**)

**Tabelle 8:** Extinktionskoeffizienten der verwendeten Nukleotide und den DNA-Sequenzen bei 260 nm.

(Oligo-)Nukleotide	$\epsilon_{260}$ [L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
<b>dA</b>	15.400
<b>dT</b>	8.800
<b>dC</b>	7.300
<b>dG</b>	11.700
<b>dY</b>	4.300
<b>dZ</b>	4.300
<b>ssDNA4</b>	151.300
<b>ssDNA5</b>	151.300
<b>ssDNA6</b>	163.200

## Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde das postsynthetisch modifizierte Oligonukleotid (10  $\mu$ M) zusammen mit 1.20 Äq. des entsprechenden komplementären Oligonukleotids in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPi, pH 7) und 250 mM NaCl-Lösung für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Um den Erfolg der Hybridisierung zu überprüfen wurden Schmelztemperaturkurven der hybridisierten Oligonukleotide angefertigt (Tabelle 9, siehe auch Kapitel 9 Abbildung 53).

**Tabelle 9:** Schmelztemperaturen der hybridisierten Oligonukletide.

Oligonukleotid	Smp. [°C]
dsDNA4	69,5
dsDNA5	69,5
dsDNA6	68,0

## 8.4. Optische Charakterisierung der Fluorophore

Um eine Basis für den Vergleich der spektroskopischen Daten nach der *iEDDA*-Reaktion zu schaffen, wurden die tetrazinmodifizierten Fluorophore und die Farbstoff-Analoga spektroskopisch charakterisiert. Hierbei wurde der dekadische Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum in trockenem DMSO bestimmt und nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ausgewertet (Tabelle 10). Die Bestimmung wurde dabei pro Farbstoff über neun Konzentrationen zwischen 5,0 und 40,0  $\mu\text{mol/L}$  aus drei unterschiedlichen Einwaagen durchgeführt, um den Messfehler gering zu halten. Von sämtlichen hergestellten Lösungen wurde ein Absorptionsspektrum von 200 bis 800 nm bei 20 °C aufgezeichnet. Anschließend wurden die am Absorptionsmaximum gemessenen Absorbanzen in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen und der Extinktionskoeffizient über die Steigung der Ausgleichsgeraden bestimmt (Kapitel 9, Abbildung 50 und Abbildung 51).

Anschließend wurde die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe in trockenem DMSO gemessen. Hierfür wurden die Farbstoffe in einem Probenvolumen von 2,0 mL und einer Konzentration von 20  $\mu\text{mol/L}$  an einem *Quantaaurus QY C11347* der Firma HAMAMATSU in einer Mehrfachbestimmung untersucht. Die Anregungswellenlänge wurde entsprechend an das Absorptionsmaximum der hergestellten Farbstoffe angepasst. Als Referenz dienten 2,0 mL einer Lösung aus trockenem DMSO. Die Helligkeit der Farbstoffe wurde dann als Produkt aus dem dekadischen Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenzquantenausbeute des entsprechenden Farbstoffs errechnet. Dieser Wert gibt dabei an, wie effizient sich die Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffs darstellt.

**Tabelle 10:** Überblick über dekadischen Extinktionskoeffizienten, Fluoreszenzquantenausbeuten ( $\Phi_F$ ) und der Helligkeit ( $\epsilon \Phi_F$ ) der hergestellten Fluorophore.

Verbindung	$\lambda_{\text{max}}^{[a]}$ [nm]	$\epsilon$ [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	$\Phi_F^{[b]}$ [%]	$\epsilon \Phi_F^{[c]}$ [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
<b>13</b>	430	25.700	7,9	2030
<b>17</b>	419	23.900	1,3	310
<b>18</b>	497	34.800	12,6	4380
<b>19</b>	436	15.500	3,1	480
<b>1</b>	449	26.400	0,4	110
<b>2</b>	436	23.200	0,3	70
<b>3</b>	509	21.900	3,3	720
<b>4</b>	439	21.100	0,4	80

[a] Absorptionsmaximum in DMSO. [b] Fluoreszenzquantenausbeute in DMSO gemessen. [c] Helligkeit.

## 8.5. *In vitro* „Click“-Experimente

### HPLC-Analytik der „Click“-Reaktion

Um die „Click“-Experimente zwischen den tetrazinmodifizierten Farbstoffen und den entsprechenden Dienophilen abzusichern, wurden ausgewählte *iEDDA*-Reaktionen zusätzlich über HPLC-Analytik untersucht. Die Reaktion wurde in doppelt deionisiertem Wasser mit einem Endgehalt von 1 % DMSO durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Lösemittel vorgelegt und im Anschluss die in DMSO gelösten tetrazinmodifizierten Fluorophore und das Dienophil hinzugegeben (Tabelle 11). Nach Zugabe der Reaktanden wurde das Reaktionsgemisch für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mittels RP-HPLC analysiert (siehe Kapitel 8.1, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie).

**Tabelle 11:** Eingesetzte Mengen der Reagenzien für die Durchführung der „Click“-Experimente. Das Gesamtvolumen der Reaktionslösung: 500  $\mu$ L.

Bezeichnung	Äq.	Konz. [mM]	n [ $\mu$ mol]	Vol. [ $\mu$ L]
1	1,00	0,50	0,25	62.5
2	1,00	0,50	0,25	62.5
26	4,00	2,00	1,00	50.0

### LC-MS-Untersuchungen

Ein Nachweis entstandener, ausgewählter „Click“-Produkte erfolgte durch Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrischer-Kopplung. Die Analysen wurden von der analytischen Abteilung des KIT durchgeführt. Als interner Standard wurde Thymidin verwendet. Dieser interne Standard wurde als 0,25 mM Stammlösung in DMSO angesetzt und zur Reaktionslösung zugegeben. Die „Click“-Reaktion wurde in doppelt deionisiertem Wasser durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktanten nacheinander zugegeben, die Reaktionslösung gut durchmischt und über Nacht inkubiert. Für die „Click“-Reaktionen wurde ein Verhältnis von Dienophil zu tetrazinmodifizierten Farbstoff von 1:1 (0,5 mM:0,5 mM) und ein Gesamtvolumen der Reaktionslösung von 100  $\mu$ L gewählt. Die für die Auftrennung mittels HPLC verwendete Trennmethode ist dem Kapitel

8.1 zu entnehmen. Die jeweils berechneten und gefundenen Massen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12:** Massenspektroskopische Daten der „Click“-Reaktion sowie der entstandenen „Click“-Produkte.

Bezeichnung	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
<b>1</b>	369,1822 [M] <sup>+</sup>	369,1820 [M] <sup>+</sup>
<b>2</b>	369,1822 [M] <sup>+</sup>	369,1820 [M] <sup>+</sup>
<b>26</b>	473.1798 [M] <sup>+</sup>	474,1873 [M+H] <sup>+</sup>
<b>50</b>	814,3559 [M] <sup>+</sup>	814,3558 [M] <sup>+</sup>
<b>51</b>	814,3559 [M] <sup>+</sup>	814,3558 [M] <sup>+</sup>
<b>42</b>	491,2805 [M] <sup>+</sup>	491,2808 [M] <sup>+</sup>
<b>43</b>	491,2805 [M] <sup>+</sup>	491,2808 [M] <sup>+</sup>

### Reaktionskinetik und Fluoreszenzanstieg durch Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem Fluoromax-4 Spektrofluorometer der Firma HORIBA-SCIENTIFIC mit einem Peltier-Element zur Temperaturregelung aufgenommen. Die Messungen wurden gegen die Raman-Streuung des jeweiligen Lösungsmittels korrigiert. Für die Messung wurden Küvetten aus Quarz der Firma STARNA GmbH mit einer Schichtdicke von 10 mm und einem Probenvolumen von 1,00 mL, bzw. 0,50 mL verwendet.

Für die Bestimmung der Reaktionskinetik wurden grundsätzlich zwei verschiedene Parameter-Sets verwendet. Diese wurden wie folgt eingeteilt: **(A)** Fluoreszenzmessungen mit dienophil-modifizierten Nukleosiden und **(B)** Fluoreszenzmessungen mit dienophil-modifizierten Oligonukleotiden. Die verwendeten Parameter sind Tabelle 13 zu entnehmen.

**Tabelle 13:** Verwendete Parameter bei der Messung der Fluoreszenzintensitäten bei den „Click“-Reaktionen.

Parameter	Set A	Set B
Inkrement [nm]	1,00	2,00
Integrationszeit [s]	0,10	0,05
Spaltbreite Anregung [nm]	3,00	3,00
Spaltbreite Emission [nm]	3,00	3,00
Temperatur [°C]	20,0	20,0

Um den Fluoreszenzanstieg der „Click“-Reaktionen mit dienophil-modifizierten Nucleosiden verfolgen zu können, wurden die Reaktionslösungen aus Stammlösungen der dienophilmodifizierten Nucleoside (20 mM) in DMSO sowie Stammlösungen der tetrazinmodifizierten Farbstoffe (4,0 mM) in DMSO erstellt. Hierfür wurden jeweils 5,00 µL der Stammlösungen mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 1,00 mL eingestellt (**Variante A**). Für die Messung von dienophil-modifizierten Oligonucleotiden wurden die Ansätze aufgrund geringerer vorhandenen Mengen an Oligonucleotiden angepasst. Hier wurde die Stammlösung der Oligonucleotide in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und die Konzentration wie in Kapitel 8.1 mittels NANODROP bestimmt. Die Stammlösung der tetrazinmodifizierten Farbstoffe wurde um den Faktor 1:10 mit DMSO verdünnt, so dass mit einer Konzentration von 400 µM gearbeitet wurde (**Variante B**).

Dadurch ergab sich im „Click“-Ansatz eine Konzentration von 100 µM Nucleosid zu 20 µM tetrazinmodifizierter Farbstoff in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1) (**A**), bzw. von 10 µM Oligonucleotid zu 2,0 µM tetrazinmodifizierter Farbstoff in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1) (**B**). So ergab sich für beide Varianten ein Verhältnis von Fluorophor/Dienophil von 1:5. Eine Übersicht der Ansatzprotokolle ist in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14:** Übersicht der Proben zur Bestimmung der Reaktionskinetik.

Variante A	CNukleosid [ $\mu\text{M}$ ]	CTz-Fluorophor [ $\mu\text{M}$ ]	V <sub>Ges.</sub> [ $\mu\text{L}$ ]	Variante B	COligonukleotid [ $\mu\text{M}$ ]	CTz-Fluorophor [ $\mu\text{M}$ ]	V <sub>Ges.</sub> [ $\mu\text{L}$ ]
<b>Probe</b>	100	20,0	1000	<b>Probe</b>	10	2,0	500
<b>t<sub>0</sub></b>	0,0	20,0	1000	<b>t<sub>0</sub></b>	0,0	2,0	500
<b>Blank<sub>t<sub>0</sub></sub></b>	0,0	0,0	1000	<b>Blank<sub>t<sub>0</sub></sub></b>	0,0	0,0	500
<b>Blank<sub>Click</sub></b>	100	0,0	1000	<b>Blank<sub>Click</sub></b>	10	0,0	500

Die Messwerte wurden zusätzlich gegen zwei Blindwerte (*Blank<sub>t<sub>0</sub></sub>* und *Blank<sub>Click</sub>*). Hierbei diente *Blank<sub>t<sub>0</sub></sub>* zur Korrektur der Startfluoreszenz, in welcher neben dem Farbstoff nur Lösemittel vorhanden war, während *Blank<sub>Click</sub>* zusätzlich den Überschuss an Dienophil in der Reaktionslösung berücksichtigen sollte.

Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei deren Absorptionsmaximum (Tabelle 15). Die Emissionsspektren wurde mit  $\lambda_{\text{exc.}} + 15 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$  gemessen, um die Fluoreszenz aus der Eigenanregung zu minimieren.

**Tabelle 15:** Übersicht verwendeter Anregungswellenlängen in H<sub>2</sub>O/DMSO (99:1 V/V%) für die Fluoreszenzspektroskopie.

Farbstoff/Fluorophor	Anregungswellenlänge [nm]
<b>13</b>	423
<b>17</b>	419
<b>18</b>	459
<b>19</b>	431
<b>1</b>	437
<b>2</b>	424
<b>3</b>	467
<b>4</b>	423

Um den Fluoreszenzanstieg während der Reaktion zu verfolgen, wurden die Fluoreszenzspektren einer „Click“-Reaktionen in regelmäßigen Zeitabständen aufgenommen, bis kein weiterer Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen war. Um den *Turn-on* der „Click“-Reaktionen zu bestimmen, wurden die korrigierten

Fluoreszenzspektren der Anfangs- und Endfluoreszenz normiert und im Bereich von  $\lambda_{\text{exc.}} + 15 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$  integriert, um alle emittierten Photonen zu berücksichtigen. Der Fluoreszenzanstieg wurde durch das Bilden von Verhältnissen ermittelt.

$$\text{TO} = \frac{\text{Fläche}(I_f)}{\text{Fläche}(I_0)} \quad (\text{Gl. 8.5.1})$$

TO            *Turn-on*

$I_f$             Fluoreszenzintensität nach vollständigem Umsatz

$I_0$             Fluoreszenzintensität zu Beginn der Reaktion

Über den Fluoreszenzanstieg ist es möglich die Reaktionskinetik zu bestimmen. Dazu wurden die Messwerte über mehrere Zeitintervalle aufgenommen. Die erhaltenen Emissionsspektren wurden korrigiert, normiert und anschließend über die Wellenlängen  $\lambda_{\text{exc.}} + 15 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$  integriert. Aus den erhaltenen Werten wurde ein Punktdiagramm erstellt und über eine Monoexponentialfunktion (Gl. 8.5.2) angepasst. Aus der Krümmung  $k_{\text{obs}}$  lässt sich die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  berechnen. Die Geschwindigkeitskonstante wird in  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  angegeben

$$y = a + be^{-k_{\text{obs}}x} \quad (\text{Gl. 8.5.2})$$

## Massenspektrometrie zur Produktkontrolle

Zur Kontrolle der *iEDDA*-Produkte, wurden diese nach Ende der Reaktion direkt aus der Reaktionslösung über ESI-MS (< 1000 M/z) oder MALDI-TOF-MS (> 1000 M/z) untersucht. Dabei gibt die Gesuchte Masse das in der *iEDDA*-Reaktion entstehende Produkt an.

**Tabelle 16:** Massenspektroskopische Daten entstandenen *iEDDA*-Produkte.

<i>iEDDA</i> -Produkt	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
42	491,2805	491,2808
43	491,2805	491,2808
44	541,2962	541,2962
45	491,2805	491,2805
46	818,3872	818,3874
47	818,3872	818,3876
48	868,4028	868,4212
49	818,3872	818,3862
50	814,3559	814,3558
51	814,3559	814,3558
52	864,3715	864,3713
53	814,3559	814,3542
54	824,4242	824,4237
55	824,4242	824,4238
56	874,4399	874,5422
57	824,4242	824,4234
58	820,3929	820,3924
59	820,3929	820,3929
60	870,4086	870,4071
61	820,3929	820,3892
62	5731	5730
63	5731	5732

## 8.6. Zellexperimente

### Allgemeines

Alle Zellexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Geräte, sowie Schutzhandschuhe wurden vor dem Arbeiten mit einer 80%igen Ethanol-Lösung desinfiziert. Die Zellexperimente mit tetrazinmodifizierten Farbstoffen wurden allesamt mit wild type HeLa Zellen des humanen Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) der Firma ATCC durchgeführt.

### Zellkultivierung

Für Transfektionsexperimente wurden menschliche Zervixkarzinomzellen (HeLa, ATCC) unter sterilen Bedingungen in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium ([+] 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, [+] Pyruvat, DMEM, Gibco™), ergänzt mit 10 % fötalem Kalbsserum (HI FBS, Gibco™) und 1 U/mL Penicillin-Streptomycin (Gibco™) verwendet. Diese Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Für Experimente zur metabolischen Markierung wurde das Medium durch eine Variante ausgetauscht, welche weder Glutamin, noch Nukleoside beinhaltet (ROTI™Cell Eagle's MEM-Alpha, „No/No“-Medium). Die Zusätze und Kultivierungsbedingungen blieben unverändert.

Bei einer Konfluenz von ca. 60 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden diese mit 1,0 mL 0,25 % Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Trypsinierungsvorgang wurde durch die Zugabe von 9,0 mL Medium gestoppt und die Zellen in der Lösung suspendiert. Im Anschluss wurde ca. 1,0 mL der Zellsuspension in ein neues Zellkulturgefäß überführt, mit Medium verdünnt und erneut bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert.

### **Metabolische Markierung der DNA mit modifizierten Nucleosiden**

Zur metabolischen Markierung von Nucleinsäuren wurden HeLa Zellen aus einer *No/No*-Medium-Kultur verwendet und  $1 \cdot 10^4$  HeLa-Zellen in einem Volumen von 200  $\mu\text{L}$  in ein IBIDI ( $\mu$ -Slide 8 well ibiTreat, IBIDI) überführt. Das Medium wurde entfernt und durch neues Medium mit der entsprechenden Konzentration an modifiziertem Nucleosid ersetzt. Die Verdünnung wurde aus einer 1,0 M Stammlösung in DMSO erstellt, so dass die DMSO-Konzentration unter 1 % lag. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen, um extrazelluläres modifiziertes Nucleosid zu entfernen.

### **Zellproliferations-Test (MTT-Test)**

Für MTT-Tests wurden  $1,0 \cdot 10^4$  HeLa Zellen/Well in einer „96-Well Plate“ in 100  $\mu\text{L}$  DMEM ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Toxizität der tetrazinmodifizierten Farbstoffe wurde bei den Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,10  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  und einer Inkubationszeit von 72 h getestet. Pro Konzentration wurde jeweils eine Achtfachbestimmung durchgeführt. Für eine Positivkontrolle wurden alle Zellen mit 5  $\mu\text{L}$  20 % Triton-X-100 versetzt und für 15 min inkubiert um alle Zellen abzutöten. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Zu den Wells wurden jeweils 15  $\mu\text{L}$  MTT-Lösung zugegeben und für drei Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Lysepuffer (*Solubilization buffer*) wurde die Reaktion von MTT zu Formazan gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h konnte die Absorption des entstandenen Formazans quantifiziert werden. Die Messung erfolgte mit einem Photometer (CLARIOstar plus) bei einer Absorption von 595 nm. Die Viabilität der Zellen wurde nach Abzug der Positivkontrolle und dem relativen Vergleich zur Negativkontrolle in Prozent ermittelt.

### **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie transfizierter, markierter Oligonucleotide**

Für Transfektionsexperimente wurden  $6,0 \cdot 10^4$  Zellen/Well in einem Volumen von 200  $\mu\text{L}$  in ein IBIDI ( $\mu$ -Slide 8 well ibiTreat, IBIDI) ausgesät und gleichzeitig das Oligonucleotid mit Lipofectamine (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen) transfiziert. Dazu wurde eine

Lipofectamine™-Lösung mit 0,15 µL Lipofectamine™ und 4,85 µL Opti-MEM™/Well (serumreduziertes Medium, Gibco™) mit 15 pmol des Oligonukleotids (bzw. außerhalb der Zelle umgesetzten Oligonukleotid-tetrazin-fluorophor-konjugates (verdünnt in Opti MEM™) vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so entstandene Lipoplexlösung wurde anschließend mit der entsprechenden Zellsuspension, zusammen mit 2 µL Endo-Porter/Well (GENE TOOL) vermengt, bevor diese mit einem Endvolumen von 200 µL/Well auf den IBIDI-Slides ausgesät wurde. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium entfernt und 30 pmol des tetrazinmodifizierten Fluorophors (8,0 µM Stammlösung in DMSO, verdünnt in DMEM) zugegeben. Nach einer Stunde wurden die lebenden Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines Leica DMI8, TCS SP8 Inversmikroskops mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv abgebildet. Die Bildaufnahme erfolgte bei einer lateralen Auflösung von 2760 x 2760 Pixeln und 8 Bit Tiefe mit der Software LAS-AF 1.1.0.12420. Die gebildeten Fluorophor-Konjugate wurden mit einem 488 nm Laser (30 % Intensität) angeregt, und die Fluoreszenzmission zwischen 500-550 nm (grün fluoreszente Farbstoffe), 550-600 nm (gelb fluoreszente Farbstoffe) und 600-650 nm (rot fluoreszente Farbstoffe) gemessen. Die Messung wurde zusätzlich durch eine Aufnahme im Hellfeld ergänzt.

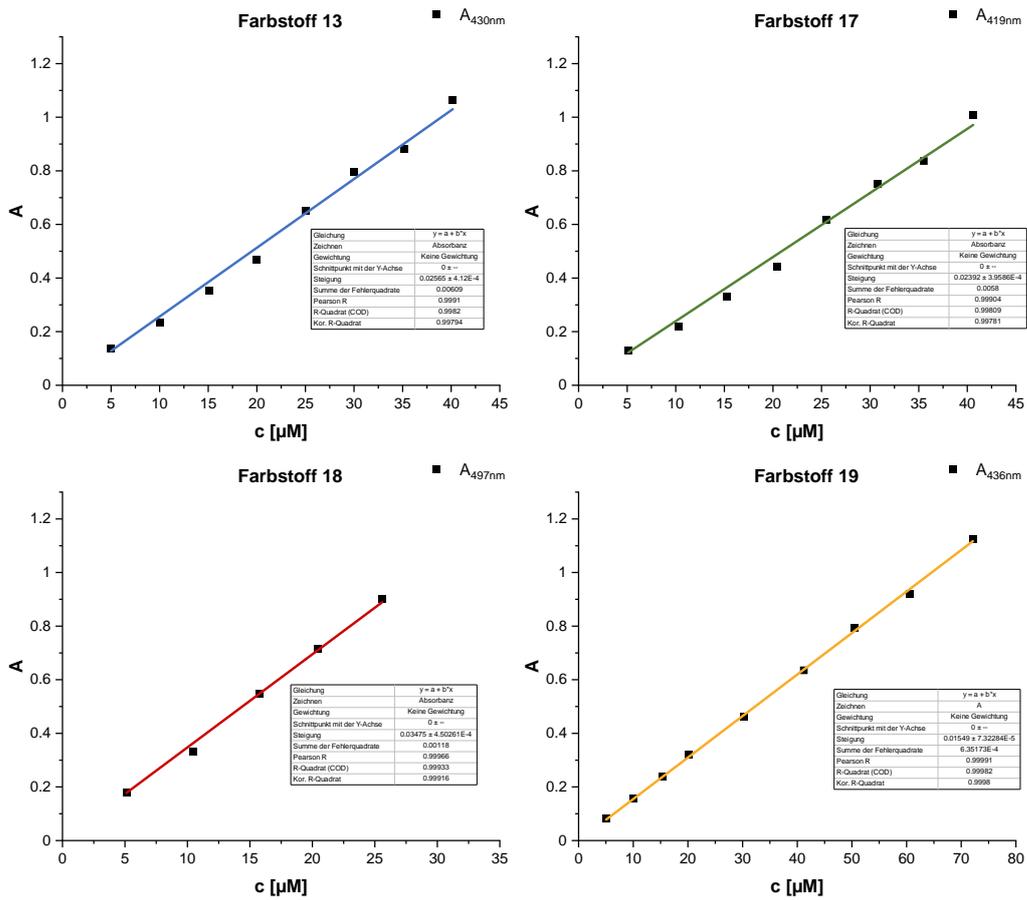
### **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie metabolisch markierter RNA**

Für die metabolische Markierung wurden  $2,0 \cdot 10^4$  HeLa Zellen/Well aus einer Kultur in *No/No*-Medium in einem Volumen von 200 µL in ein IBIDI (µ-Slide 8 well ibiTreat, IBIDI) ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das *No/No*-Medium mit einem Zusatz von 250 µM modifiziertem Nukleosid erneuert. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS-Puffer (-/-) gewaschen und mit 4 % PFA in PBS-Puffer (-/-) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierung wurde durch Entfernen des PFAs gestoppt. Daraufhin wurde ein PBS-Puffer (-/-) mit 50 mM Glycin, sowie 50 mM NH<sub>4</sub>Cl hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

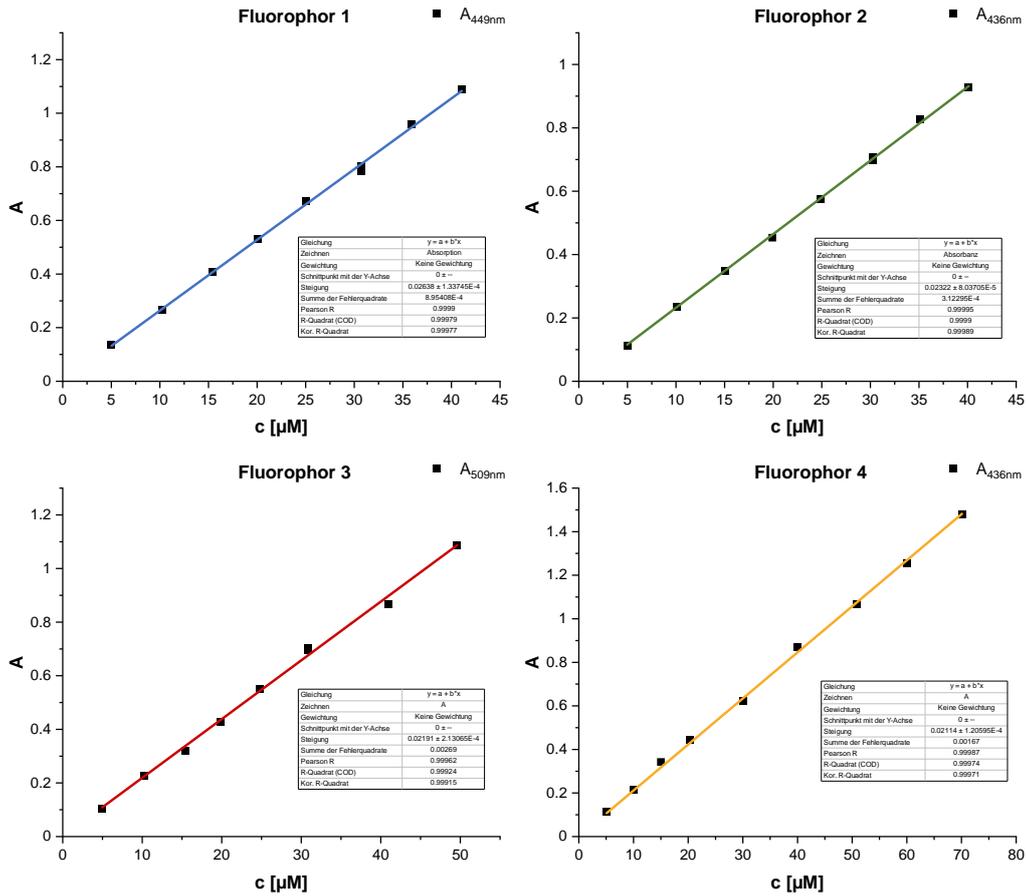
Anschließend wurde der tetrazinmodifizierten Fluorophor mit einer Konzentration von 1 µM/Well hinzugegeben und für 40 Min. inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS-Puffer (-/-) gewaschen. Die Visualisierung erfolgte am Konfokalmikroskop (LEICA TCS

SP8) mit der Leica Application Suit (LAS-AF) Software und dem ACS APO 63x/1.30 OIL Objektiv. Die Fluorophor-konjugate wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Ionen Laser (Intensität 10%) angeregt. Die Emission wurde für die Fluorophore bei 500-550 nm (**1** und **2**), 550-600 nm (**4**) und 600-650 nm (**3**) detektiert. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln und einer Scangeschwindigkeit von 700 Hz aufgenommen. Die Messung wurde zusätzlich durch eine Aufnahme im Hellfeld ergänzt.

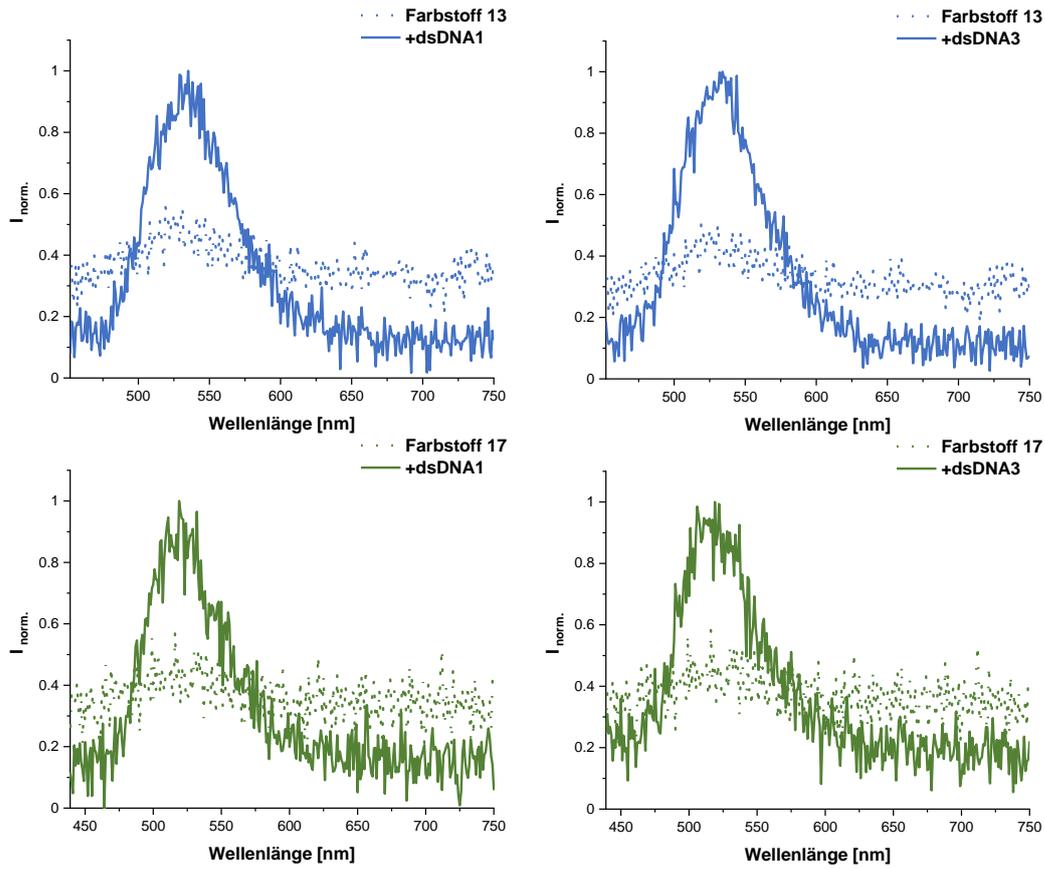
## 9. Ergänzende Spektren



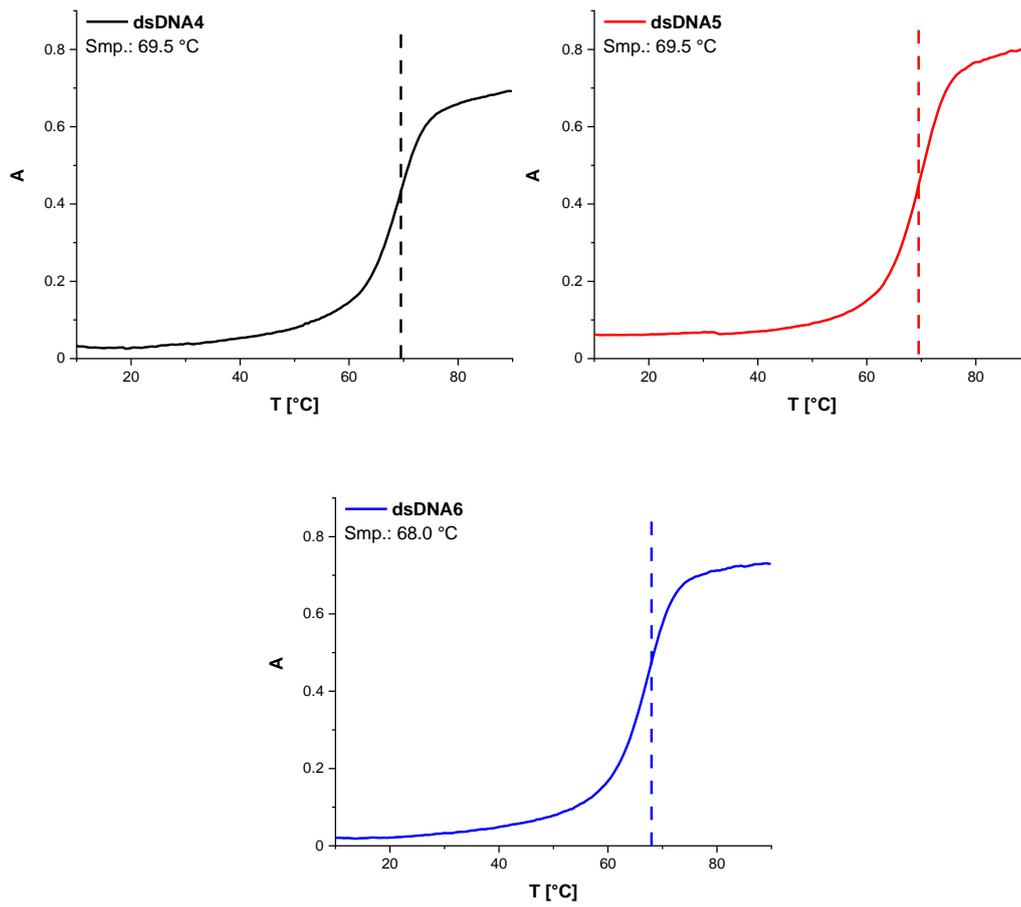
**Abbildung 50:** Lineare Regression zur Bestimmung der molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **13**, **17**, **18** und **19**.



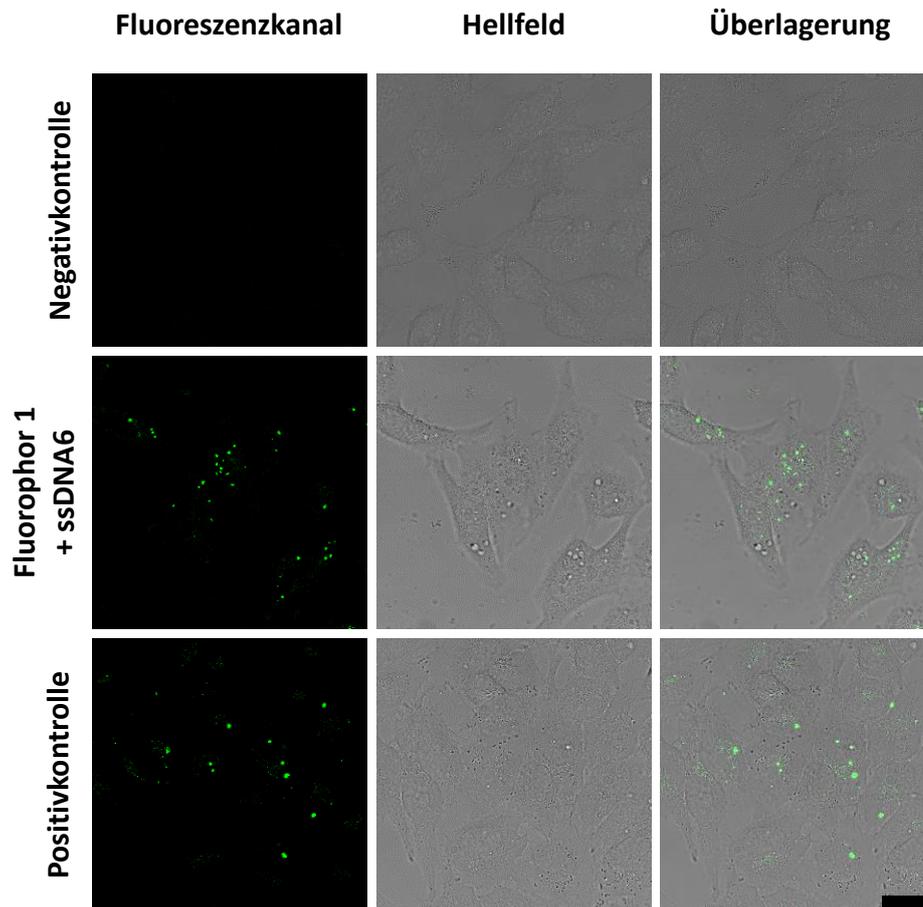
**Abbildung 51:** Lineare Regression zur Bestimmung der molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten der tetrazinmodifizierten Fluorophore 1-4.



**Abbildung 52:** Templatisierung der Cyanin-Styryl-Farbstoffe **13** und **17** und der unmodifizierten DNA-Doppelstränge **dsDNA1** und **dsDNA3**.



**Abbildung 53:** Schmelztemperaturkurven der hergestellten DNA-Doppelstränge **dsDNA4**, **dsDNA5** und **dsDNA6**.



**Abbildung 54:** Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen mit **ssDNA6** transfizierter, lebenden HeLa-Zellen nach 1 h Inkubation des Fluorophors **1** ( $c = 150 \text{ nM}$ , mitte) unter waschfreien Bedingungen. Gleichzeitig wurde eine Negativkontrolle, welche nur HeLa-Zellen enthielt, mitgeführt (unten). Zur Überprüfung wurde eine Positivkontrolle durchgeführt, indem das *iEDDA*-Produkt aus Fluorophor **1** und **ssDNA6** außerhalb der Zelle hergestellt und anschließend in die HeLa-zellen transfiziert wurden.  $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$  (30 % Intensität),  $\lambda_{\text{em.}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$  (PMT-Detektor). Maßstab:  $30 \mu\text{m}$ .

## 10. Literaturverzeichnis

- [1] M. Roser, E. Ortiz-Ospina, H. Ritchie, in *Our world in data*, <https://ourworldindata.org/world-population-growth>, **aufgerufen am 03.03.2023**.
- [2] United Nations - World Population Prospects, <https://www.macrotrends.net>, **aufgerufen am 04.03.2023**.
- [3] M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio, P. Boffetta, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri, *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 781-787.
- [4] M. C. White, D. M. Holman, J. E. Boehm, L. A. Peipins, M. Grossman, S. J. Henley, *Am. J. Prev. Med.* **2014**, *46*, S7-S15.
- [5] M. C. Power, E. Mormino, A. Soldan, B. D. James, L. Yu, N. M. Armstrong, K. J. Bangen, L. Delano-Wood, M. Lamar, Y. Y. Lim, *Ann. Neurol.* **2018**, *84*, 10-22.
- [6] A. Ott, M. M. Breteler, F. v. Harskamp, T. Stijnen, A. Hofman, *Am. J. Epidemiol.* **1998**, *147*, 574-580.
- [7] Nation Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>, **aufgerufen am 03.03.2023**.
- [8] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802-805.
- [9] C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007-11022.
- [10] H. C. Kolb, M. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [11] Web of Science, <https://www.webofscience.com>, **aufgerufen am 05.03.2023**.
- [12] J. Zaia, *Anal. Bioanal. Chem.* **2023**, 1-6.
- [13] C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. Seidel, *Chemphyschem.* **2005**, *6*, 791-804.
- [14] J. C. Waters, *Methods Cell Biol.* **2007**, *81*, 115-140.
- [15] R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioconj. Chem.* **2021**, *32*, 2457-2479.
- [16] L. G. Meimetis, J. C. Carlson, R. J. Giedt, R. H. Kohler, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7661-7664.
- [17] G. Knorr, E. Kozma, J. M. Schaart, K. Németh, G. r. Török, P. Kele, *Bioconj. Chem.* **2018**, *29*, 1312-1318.
- [18] B. Oliveira, Z. Guo, G. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [19] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 044003.
- [20] J. Chen, A. Tsai, S. E. O'Leary, A. Petrov, J. D. Puglisi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 804-814.
- [21] S. Ray, J. R. Widom, N. G. Walter, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4120-4155.

- [22] M. Vera, J. Biswas, A. Senecal, R. H. Singer, H. Y. Park, *Annu. Rev. Genet.* **2016**, *50*, 267-291.
- [23] D. R. Larson, R. H. Singer, D. Zenklusen, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 630-637.
- [24] H. Chen, D. R. Larson, *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1796-1810.
- [25] L. Schermelleh, A. Ferrand, T. Huser, C. Eggeling, M. Sauer, O. Biehlmaier, G. P. Drummen, *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 72-84.
- [26] C. Coltharp, J. Xiao, *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 1808-1818.
- [27] K. Rau, A. Rentmeister, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 701-707.
- [28] F. Toneguzzo, A. Hayday, A. Keating, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 703-706.
- [29] A. A. Stepanenko, H. H. Heng, *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* **2017**, *773*, 91-103.
- [30] D. Karra, R. Dahm, *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 6171-6177.
- [31] P. Washbourne, A. K. McAllister, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 566-573.
- [32] J. A. Kim, K. Cho, M. S. Shin, W. G. Lee, N. Jung, C. Chung, J. K. Chang, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1353-1360.
- [33] J. Olofsson, K. Nolkranz, F. Ryttsén, B. A. Lambie, S. G. Weber, O. Orwar, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 29-34.
- [34] S. Ohashi, T. Kubo, T. Kishida, T. Ikeda, K. Takahashi, Y. Arai, R. Terauchi, H. Asada, J. Imanishi, O. Mazda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1530-1535.
- [35] B. S. Yoo, M. M. Ahn, S. J. Park, Y. H. Kim, T. W. Um, I. S. Kang, *Analyst* **2018**, *143*, 5785-5791.
- [36] M. Van den Hoff, A. Moorman, W. H. Lamers, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2902.
- [37] P. J. Canatella, J. F. Karr, J. A. Petros, M. R. Prausnitz, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 755-764.
- [38] B. Jakstys, M. Jakutaviciute, D. Uzdavinyte, I. Satkauskiene, S. Satkauskas, *Bioelectrochemistry* **2020**, *135*, 107550.
- [39] J. J. Sherba, S. Hogquist, H. Lin, J. W. Shan, D. I. Shreiber, J. D. Zahn, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1-9.
- [40] A. J. Butcher, I. Torrecilla, K. W. Young, K. C. Kong, S. C. Mistry, A. R. Bottrill, A. B. Tobin, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17147-17156.
- [41] A. Masotti, G. Mossa, C. Cametti, G. Ortaggi, A. Bianco, N. Del Grosso, D. Malizia, C. Esposito, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2009**, *68*, 136-144.
- [42] S. Dokka, D. Toledo, X. Shi, J. Ye, Y. Rojanasakul, *Int. J. Pharm.* **2000**, *206*, 97-104.
- [43] A. A. Almulathanon, E. Ranucci, P. Ferruti, M. C. Garnett, C. Bosquillon, *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 1-12.
- [44] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14846-14851.

- [45] V. Ntziachristos, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 1-33.
- [46] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [47] R. Xie, S. Hong, X. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 747-752.
- [48] D. W. Stacey, M. Hitomi, *Cytometry A* **2008**, *73*, 270-278.
- [49] R. J. De Boer, A. S. Perelson, *J. Theor. Biol.* **2013**, *327*, 45-87.
- [50] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 20404-20409.
- [51] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 2415-2420.
- [52] S. Diermeier-Daucher, S. T. Clarke, D. Hill, A. Vollmann-Zwerenz, J. A. Bradford, G. Brockhoff, *Cytom., : j. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2009**, *75*, 535-546.
- [53] H. H. Ross, M. Rahman, L. H. Levkoff, S. Millette, T. Martin-Carreras, E. M. Dunbar, B. A. Reynolds, E. D. Laywell, *J. Neurooncol.* **2011**, *105*, 485-498.
- [54] A. B. Neef, F. Samain, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1750-1753.
- [55] G. L'abbe, *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 345-363.
- [56] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789-793.
- [57] U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9168-9172.
- [58] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638-18643.
- [59] A. Hashimoto, K. Suenaga, A. Gloter, K. Urita, S. Iijima, *Nature* **2004**, *430*, 870-873.
- [60] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [61] H. W. Shih, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 103-111.
- [62] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
- [63] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [64] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [65] R. K. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, *46*, 1589-1600.
- [66] K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764-4806.
- [67] P. C. Trippier, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 190-203.
- [68] P. V. Robinson, C. T. Tsai, A. E. de Groot, J. L. McKechnie, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10722-10725.
- [69] M. H. Wright, B. Clough, M. D. Rackham, K. Rangachari, J. A. Brannigan, M. Grainger, D. K. Moss, A. R. Bottrill, W. P. Heal, M. Broncel, R. A. Serwa, D. Brady, D. J. Mann, R. J. Leatherbarrow, R. Tewari, A. J. Wilkinson, A. A. Holder, E. W. Tate, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 112-121.

- [70] I. Nikic, T. Plass, O. Schraidt, J. Szymanski, J. A. Briggs, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 2245-2249.
- [71] K. Lang, J. W. Chin, ACS Publications, **2014**.
- [72] J. Balcar, G. Chrisam, F. Huber, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1481-1484.
- [73] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.
- [74] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [75] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [76] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168-3178.
- [77] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Forkin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [78] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [79] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- [80] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. J. Fokin, *Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- [81] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570-14576.
- [82] P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7-17.
- [83] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [84] D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*.
- [85] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [86] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285-2287.
- [87] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155-4158.
- [88] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2832-2835.
- [89] Y. Wu, G. Guo, J. Zheng, D. Xing, T. Zhang, *ACS Sens.* **2019**, *4*, 44-51.
- [90] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10752-10756.
- [91] A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, J. M. Fox, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770-3776.
- [92] O. Diels, K. Alder, *Liebigs Ann.* **1928**, *460*, 98-122.
- [93] D. L. Boger, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 781-793.
- [94] J. Sauer, H. Wiest, *Angew. Chem.* **1962**, *74*, 353.

- [95] A. C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131-5142.
- [96] A. Meijer, S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8989-8994.
- [97] M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1541-1553.
- [98] J. Balcar, G. Chrisam, F. X. Huber, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1481-1484.
- [99] R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [100] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- [101] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconj. Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [102] J. Alvarez-Builla, J. J. Vaquero, J. Barluenga, *Mod. Heterocycl. Chem., Vol. 4*, Wiley Online Library, **2011**.
- [103] M.-A. Hiebel, F. Suzenet, *Prog. Heterocycl. Chem.* **2020**, pp. 505-531.
- [104] Z. C. Wu, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 16388-16397.
- [105] H. Wu, B. T. Cisneros, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17942-17945.
- [106] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298-304.
- [107] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [108] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646-9649.
- [109] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1736-1738.
- [110] M. Handula, K. T. Chen, Y. Seimbille, *Molecules* **2021**, *26*.
- [111] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [112] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2885-2896.
- [113] F. Thalhammer, U. Wallfahrer, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851-6854.
- [114] F. Liu, Y. Liang, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11483-11493.
- [115] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646-9649.
- [116] M. Vrabel, P. Kolle, K. M. Brunner, M. J. Gattner, V. Lopez-Carrillo, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Chemistry (Easton)* **2013**, *19*, 13309-13312.
- [117] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Commun. (Camb)* **2012**, *48*, 1736-1738.

- [118] D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H. W. Shih, K. N. Houk, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13680-13683.
- [119] A. C. Knall, M. Hollauf, C. Slugovc, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4763-4766.
- [120] R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. Volders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3375-3378.
- [121] J. Yang, Y. Liang, J. Seckute, K. N. Houk, N. K. Devaraj, *Chemistry (Easton)* **2014**, *20*, 3365-3375.
- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869-2872.
- [125] G. Knorr, E. Kozma, A. Herner, E. A. Lemke, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 8972-8979.
- [126] A. Wieczorek, T. Buckup, R. Wombacher, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4177-4185.
- [127] H. Wu, J. Yang, J. Šečkutè, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5915-5919.
- [128] G. B. Cserep, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042001.
- [129] Y. Hori, K. Kikuchi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 644-650.
- [130] X. Ji, K. Ji, V. Chittavong, R. E. Aghoghovbia, M. Zhu, B. Wang, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 1471-1476.
- [131] C. Y. Zhou, S. C. Alexander, N. K. Devaraj, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7169-7173.
- [132] Y. Chen, K. Tsao, J. W. Keillor, *Can. J. Chem.* **2015**, *93*, 389-398.
- [133] W. Chi, L. Huang, C. Wang, D. Tan, Z. Xu, X. Liu, *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5*, 7012-7021.
- [134] T. Shen, W. Zhang, P. Yadav, X. W. Sun, X. Liu, *Mater. Chem. Front.* **2023**, *7*, 1082-1092.
- [135] B. Pinto-Pacheco, W. P. Carbery, S. Khan, D. B. Turner, D. Buccella, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 22140-22149.
- [136] S. Hassoon, H. Lustig, M. B. Rubin, S. Speiser, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 6367-6374.
- [137] A. Wieczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506-1510.
- [138] Y. Lee, W. Cho, J. Sung, E. Kim, S. B. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 974-983.
- [139] P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 044003.
- [140] P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.

- [141] H. K. Walter, P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- [142] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *Chemistry (Easton)* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [143] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7547-7551.
- [144] P. Bohländer, Dissertation, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., **2015**.
- [145] N. Ishibashi, T. Ogawa, T. Imasaka, M. Kunitake, *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 2096-2099.
- [146] A. Schmitt, B. Hinkeldey, M. Wild, G. Jung, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 755-758.
- [147] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [148] C. Schwechheimer, F. Rönicke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 6557-6563.
- [149] C. Schwechheimer, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., **2019**.
- [150] H. Ott, U. Pieper, D. Leusser, U. Flierler, J. Henn, D. Stalke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2978-2982.
- [151] E. Kozma, G. Estrada Girona, G. Paci, E. A. Lemke, P. Kele, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6696-6699.
- [152] Z. Hubicki, M. Wawrzekiewicz, A. Wołowicz, *Chem. Anal.(Warsaw)* **2008**, *53*, 759-784.
- [153] W. Kaim, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *230*, 127-139.
- [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] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538.
- [156] F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1781-1790.
- [157] D. Krois, *Organisch-chemische Methoden: in Biochemie, Biologischer Chemie, Molekularbiologie und Medizinischer Chemie* **2017**, 85-105.
- [158] S. Roy, M. Caruthers, *Molecules* **2013**, *18*, 14268-14284.
- [159] K. Krell, B. Pfeuffer, F. Rönicke, Z. S. Chinoy, C. Favre, F. Friscourt, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 16093-16097.
- [160] B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7579-7582.
- [161] S. Arndt, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14580-14582.
- [162] A. Kormos, A. Egyed, J. M. Olvany, Á. Szatmári, A. Biró, Z. Csorba, P. Kele, K. Németh, *Chemosensors* **2022**, *10*, 37.
- [163] R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14362-14366.

- [164] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [165] S. T. Nguyen, H. T.-L. Nguyen, K. D. Truong, *Biomed. Res. Ther.* **2020**, *7*, 3855-3859.
- [166] A. Fürstenberg, *Chimia* **2017**, *71*, 26-26.
- [167] J. Maillard, K. Klehs, C. Rumble, E. Vauthey, M. Heilemann, A. Fürstenberg, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 1352-1362.
- [168] F. Hövelmann, O. Seitz, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 714-723.
- [169] M. Kubota, S. Nainar, S. M. Parker, W. England, F. Furche, R. C. Spitale, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 1698-1707.
- [170] H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederwieser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827-10829.
- [171] P. Geng, E. List, F. Röncke, H. A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, 8, e202203156.
- [172] A. Spampinato, E. Kužmová, R. Pohl, V. Sýkorová, M. Vrábel, T. s. Kraus, M. Hocek, *Bioconj. Chem.* **2023**.
- [173] M. O. Loehr, N. W. Luedtke, *Angew. Chem.* **2022**, *134*, e202112931.
- [174] D. Ganz, P. Geng, H.-A. Wagenknecht, *ACS Chem. Biol.* **2023**, *18*, 5, 1054-1059.
- [175] W. D. Lambert, Y. Fang, S. Mahapatra, Z. Huang, C. W. Am Ende, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17068-17074.
- [176] M. Somei, K. Kizu, M. Kunimoto, F. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3696-3708.
- [177] J. Steinmeyer, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., **2018**.

# 11. Appendix

## 11.1. Publikationsliste

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.*, **2023**, 18, 5, 1054-1059.

Two-Factor Fluorogenicity of Tetrazine-Modified Cyanine-Styryl Dyes for Bioorthogonal Labelling of DNA

P. Geng, E. List, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, **2023**, 29, 8, e202203156.

Selective release of a potent anticancer agent from a supramolecular hydrogel using green light

J. Karcher, S. Kirchner, A.-L. Leistner, C. Hald, P. Geng, T. Bantle, P. Gödtel, J. Pfeifer, Z. L. Pianowski, *RSC Adv.*, **2021**, 11, 8546-8551

## 11.2. Konferenzen und Posterbeiträge

10/2020 Deutsche Nukleinsäurechemiegesellschaft e.V. (DNG), VI. Doktoranden-seminar in Bad Herrenalb (Vortrag).

„Two-Factor-Quenched Tetrazine-Modified Cyanine-Styryl Dyes for Bioorthogonal and Fluorogenic Labelling of DNA.“

10/2020 Deutsche Nukleinsäurechemiegesellschaft e.V. (DNG), V. Doktoranden-seminar in Bad Herrenalb (Posterbeitrag).