

Cyclopropene für die duale bioorthogonale Markierung von DNA

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Nicola Seul

1. Referent: Prof. Hans-Achim Wagenknecht
2. Referentin: Prof. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2024

Die vorgelegte Arbeit wurde unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Institut für organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie im Zeitraum von Februar 2021 bis April 2024 angefertigt.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

Karlsruhe, den 11. März 2024

Nicola Seul

KURZFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten hat sich die bioorthogonale Markierung zu einem wertvollen Instrument für unser Verständnis von Lebewesen und deren biologischen Prozessen entwickelt, da sie es ermöglicht Biomoleküle *in vivo* zu visualisieren. Aufgrund der enormen Komplexität von biologischen Systemen ist jedoch für deren Untersuchung die Verfolgung eines einzelnen Biomoleküls häufig nicht ausreichend. Stattdessen ist die simultane Visualisierung mehrerer Zielmoleküle nötig. Die Durchführung von zwei oder mehreren bioorthogonalen Markierungen in der gleichen Umgebung bleibt jedoch aufgrund von unerwünschten Kreuzreaktionen eine Herausforderung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode für die duale bioorthogonale Markierung von DNA in der Zelle mit Hilfe zwei isomerer Cyclopropene als chemische Reporter entwickelt. Hierbei wurde zunächst eine kleine Bibliothek 1-methylcyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynukleoside mit unterschiedlicher Linkerstruktur synthetisiert und diese in einer bioorthogonalen Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf angewendet. Diese Reaktion konnte anschließend orthogonal zu einer Photoclick-Reaktion von 3-methylcyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynukleosiden mit einem Tetrazol durchgeführt und so eine Grundlage für die Anwendung zur dualen Markierung *in vitro* erarbeitet werden. Es wurden anschließend die entsprechenden cyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynukleosid-triphosphate synthetisiert und diese in Primerverlängerungsexperimenten eingesetzt. Hierbei konnten sowohl 1- als auch 3-methylcyclopropenmodifizierte Derivate von den getesteten Polymerasen akzeptiert und enzymatisch in DNA eingefügt werden. Eine nachfolgende postsynthetische Markierung des 1-methylcyclopropenmodifizierten Oligonukleotids durch Reaktion mit einem Cyanin-Styryl-Tetrazin-Konjugat ließ sich innerhalb von Minuten erzielen. Abschließend wurde die Fluoreszenzmarkierung von genomischer DNA in HeLa-Zellen über die beiden unterschiedlichen bioorthogonalen Reaktionen nach metabolischer Inkorporation der cyclopropenmodifizierten Substrate von den zelleigenen Enzymen demonstriert. Durch Kombination aller nötigen intrazellulären Transport- und Markierungsschritte konnte abschließend auch erstmals die duale bioorthogonale Markierung der zellulären DNA über orthogonale Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf und Photoclick-Reaktion gezeigt werden. Das hierbei erarbeitete Protokoll stellt eine Grundlage für die Entwicklung neuer Markierungsstrategien dar, welche zukünftig die Untersuchung von Funktionsweise und auch der Interaktion von Nukleinsäuren auf molekularer Ebene *in vivo* ermöglichen kann.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Bioorthogonale Markierung	5
2.2 Bioorthogonale Reaktionen.....	8
2.2.1 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf	10
2.2.2 Photoclick-Reaktion.....	15
2.3 Duale bioorthogonale Markierung	19
2.4 Cyclopropene als chemische Reporter	23
2.5 Herstellung bioorthogonal reaktiver DNA <i>in vitro</i>	27
2.6 Markierung von DNA <i>in vivo</i>	30
3. Themenstellung	33
4. Ergebnisse und Diskussion.....	35
4.1 Design cyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynukleoside mit orthogonaler Reaktivität.....	35
4.1.1 Synthese 1-methylcyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynukleoside.....	37
4.1.2 Charakterisierung der iEDDA-Reaktion	43
4.1.3 Orthogonale Reaktivität von 1- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden	50
4.2 Untersuchung cyclopropenbasierter dualer Markierung von DNA <i>in vitro</i>	57
4.2.1 Inkorporation und Markierung 1-MCP-modifizierter Nukleotide.....	58
4.2.2 Untersuchung der Markierung 3-MCP-modifizierter DNA.....	65
4.3 Untersuchung cyclopropenbasierter metabolischer Markierung von DNA <i>in</i> <i>vivo</i> 70	
4.3.1 Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion.....	71
4.3.2 Metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion	81
4.3.3 Duale Markierung mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktion	83
5. Zusammenfassung	87
6. Experimenteller Teil	91
6.1 Materialien, Methoden und Geräte	91
6.2 Synthesevorschriften	101
6.3 Allgemeine Durchführung der iEDDA- und Photoclick-Experimente <i>in vitro</i> .	118
6.3.1 Reaktionsverfolgung der iEDDA-Reaktion	118
6.3.2 Bestimmung der Reaktionskinetik der iEDDA-Reaktion.....	118

6.3.3	Untersuchung der orthogonalen Reaktivität.....	119
6.3.4	Nachweis der Produkte über LC-MS.....	120
6.4	Primerverlängerung und DNA-Markierung <i>in vitro</i>	121
6.4.1	Template und Primer	121
6.4.2	Primerverlängerungsexperimente.....	121
6.4.3	Postsynthetische Markierung der DNA mittels iEDDA-Reaktion.....	122
6.4.4	Postsynthetische Markierung der DNA mittels Photoclick-Reaktion ...	123
6.5	Zellkultur	124
6.5.1	Standardisierte Arbeitsbedingungen in der Zellkultur	124
6.5.2	Kultivierung der Zellen.....	124
6.5.3	MTT-Test.....	124
6.5.4	Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion.....	125
6.5.5	Metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion	125
6.5.6	SNTT-Transporter Experimente	126
6.5.7	Duale metabolische Markierung	126
7.	Anhang	129
8.	Abkürzungsverzeichnis	143
9.	Abbildungsverzeichnis	147
10.	Tabellenverzeichnis	157
11.	Literaturverzeichnis	159
Anlagen	167

VORWORT

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Rahmen dieser Arbeit und darüber hinaus unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Hans-Achim Wagenknecht für das interessante und auch fordernde Thema und die Aufnahme in den Arbeitskreis. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich während meiner Promotion die Möglichkeit hatte viele unterschiedliche Methoden und Forschungsbereiche kennenzulernen und auch die Freiheit hatte meine eigenen Ideen umzusetzen.

Danke auch an Prof. Ute Schepers für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Graduiertenkolleg 2039 für den wertvollen interdisziplinären wissenschaftlichen Austausch, die finanzielle Unterstützung meiner Promotion und die zahlreichen Weiterbildungsmöglichkeiten bedanken.

Danke außerdem an Prof. Jennifer Prescher für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts in ihrer Arbeitsgruppe an der University of California, Irvine und ihre Unterstützung von fachlicher Seite, aber auch darüber hinaus. Zusätzlicher Dank gilt dem Karlsruhe House of Young Scientists für die finanzielle Förderung meines Auslandsaufenthalts.

Außerdem möchte ich meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen für die großartige Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die unvergessliche Zeit im AKW bedanken

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

Claudia Sommer und Pinar Sancar für die Unterstützung in organisatorischen Dingen jeglicher Art sowie Anette Hochgesand und Lara Hirsch für das Messen zahlreicher Masse-Proben, die vielen Bestellungen und die Hilfe, insbesondere wenn es auch mal eilig war.

Eileen List, Lisa Rieger, Maren Schrödter und Ilona Wagner für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke, dass ihr euch die Zeit genommen habt mich zu unterstützen, auch wenn ihr selbst viel zutun hattet.

Meinem Bachelorstudenten Petko Stoychev für seine Begeisterung und seine Arbeit, die auch einen wichtigen Beitrag zu dieser Dissertation geleistet hat.

Meinem Labor 204, in jeglicher Besetzung. Obwohl wir so viele Menschen sind, waren wir immer sehr harmonisch. Unstimmigkeiten gab es höchsten darüber wie viele Versionen desselben Kinderlieds man anhören muss oder wie viele Baden-Flaggen man aufhängen sollte. Zusammen haben wir uns immer unterstützt, viel diskutiert und noch mehr gelacht, Danke dafür!

Fabian, Sven, Eileen und Madeleine aus Labor 203. Trotz der komischen Gerüche die häufig aus eurem Labor kommen habe ich immer gerne bei euch vorbeigeschaut. Danke Sven, dass du immer gute Stimmung verbreitest und Madeleine, dass man sich auf dein Organisationstalent immer verlassen kann.

Labor 205 mit Lisa, Rita und Basti dafür, dass bei euch eigentlich immer gute Laune gab (es sei denn Basti hat gerade sein NMR-Röhrchen verloren). Falls ich mal Lust auf Malle-Hits hatte, hatte ich bei euch immer eine sichere Anlaufstelle. Danke Basti für deine positive Art und dafür, dass du immer dabei bist, wenn es etwas zu feiern gibt.

Maren als beste Sitznachbarin. Auch wenn wir die Hälfte der Zeit nicht verstanden haben, was der andere sagt, hatten wir trotzdem immer Spaß. Danke auch, dass du die Musik in 204 endlich zum Guten gewendet hast.

Meine Zell-Partnerin Eileen. Ohne dich wäre die Zeit im Zelllabor nur halb so gut gewesen! Danke für deine herzliche Art und deine Bereitschaft anderen zu helfen, auch wenn du selbst zu viel zutun hast und danke natürlich auch dafür, dass du uns immer auf dem neusten Stand im Bereich Trash-TV hältst.

Lisa dafür, dass ich auf dich immer zählen kann. Danke, dass du es immer schaffst mich für neue Dinge zu begeistern, egal ob im Sport oder im Urlaub. Es gibt nicht viele Leute mit denen ich nachts auf einen Vulkan klettern würde!

Rita dafür, dass wir die die gesamte Promotion gemeinsam durch- und überleben konnten. Dank dir sogar die Schreibphase erträglich. Deine offene Art und dein Humor können mich immer zum Lachen bringen. Danke auch dafür, dass du mich insbesondere in der letzten Zeit so unterstützt hast!

Danke an meine Freunde für die schönen und lustigen Erlebnisse und die Abwechslung, die sie in den Promotionsalltag bringen. Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund danken, die mich sowohl in der Promotion als auch in allen anderen Bereichen immer unterstützen und auf die ich immer zählen kann, in guten und in schwierigen Momenten.

1. EINLEITUNG

Als im Jahr 2001 erstmals das menschliche Genom vollständig entschlüsselt werden konnte¹, dachten viele WissenschaftlerInnen, dass damit die Antworten auf alle offenen Fragestellungen der Humangenetik und der Grundlage des Lebens geliefert würden. Dies war jedoch nicht der Fall, stattdessen eröffnete sich eine Aneinanderreihung von circa 2,9 Milliarden Basenpaaren deren genaues Zusammenspiel und Funktionsweise bis heute nicht aufgeklärt ist. Zusätzlich besitzt DNA eine Vielzahl epigenetischer Prägungen, die nicht in der Nukleotidsequenz kodiert, jedoch ebenfalls vererbt werden. Diese sind an der Kontrolle der Genexpression einer Zelle beteiligt und dadurch entscheidend für deren Entwicklung.^{2, 3} Das Zusammenspiel von Genetik und Epigenetik resultiert jedoch in komplexen Regulationsmechanismen die ebenfalls zu einem großen Teil noch unverstanden sind. Auch Fragen in medizinischem Kontext, wie beispielsweise Ursachen oder Behandlungen vieler genetischer Defekte, können aktuell nicht beantwortet werden.

„Unmet needs in biological sciences and medicine drive the development of new innovations in chemistry“

Diese Worte verwendete CAROLYN BERTOZZI, die Pionierin auf dem Feld der bioorthogonalen Chemie, in ihrer Nobelpreis-Rede auf die Frage, was sie zur Entwicklung einer neuen biochemischen Methode motiviert hatte.⁴ Die bioorthogonale Chemie stellt in der heutigen Zeit ein entscheidendes Werkzeug dar, welches bei der Lösung offener Fragestellung der Biologie, aber auch der Medizin unterstützen kann. Sie setzt es sich zum Ziel, Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung zu markieren, um so biologische Prozesse auf molekularer Ebene *in vivo* untersuchen und verstehen zu können. Grundlage der Methode ist es chemische Reaktionen so anzupassen, dass diese in einem lebenden Organismus ablaufen können, ohne diesen zu beeinflussen bzw. zu stören. Dies ist auch für die zugrundeliegende Chemie keine triviale Aufgabe, da ein Großteil etablierter organischer Synthesen toxische Ausgangsstoffe, hohe Temperaturen, organische Lösungsmittel, oder auch den vollständigen Ausschluss von Luftsauerstoff benötigt. In einem lebenden Organismus gibt jedoch dieser die Reaktionsbedingungen vor. Zusätzlich sind Lebewesen in ihrer Komplexität kaum zu übertreffen. Trotz der hohen Anforderungen konnten seit der Einführung der bioorthogonalen Chemie im Jahr 2003 eine Reihe chemischer Reaktionen entwickelt werden, welche sich für die Anwendung in Lebewesen eignen. So war es möglich unterschiedliche Klassen an Biomolekülen *in vivo* zu visualisieren und deren Funktionen in Zellen zu beleuchten (Abbildung 1).⁵⁻⁹

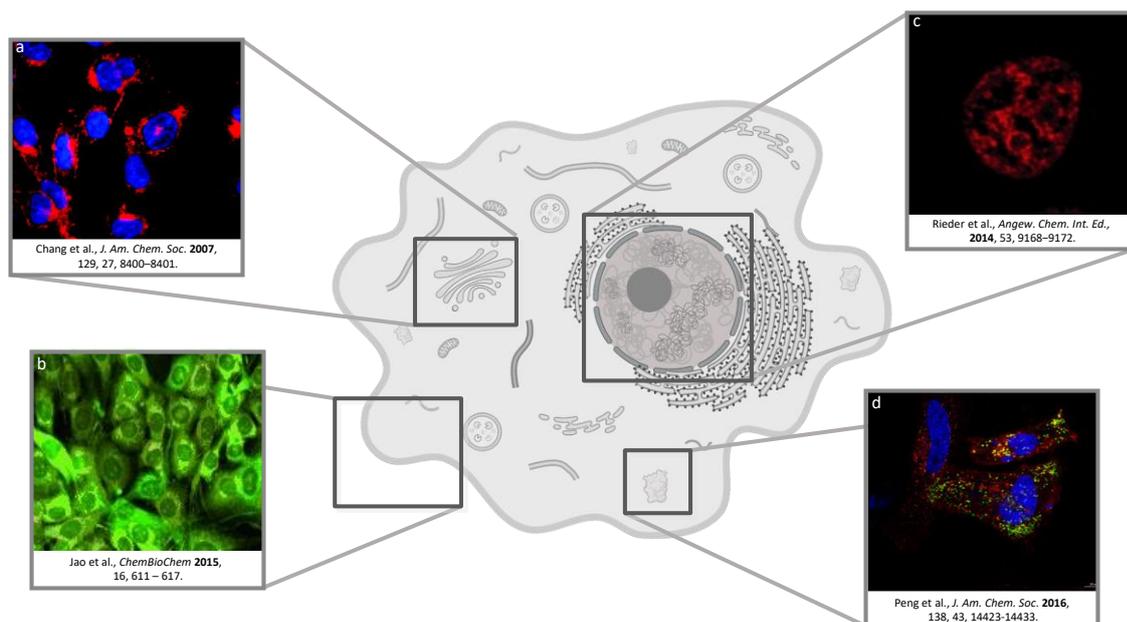


Abbildung 1: Visualisierung unterschiedlicher Biomoleküle wie beispielsweise Glykane (a), Lipide (b), DNA (c) und Proteine (d) in der Zelle über bioorthogonale Chemie, wobei: a) Übernommen mit Genehmigung von P. Chang et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 27, 8400–8401. Copyright 2024 American Chemical Society; b) Übernommen mit Genehmigung von C. Jao et al. *ChemBioChem* 2015, 16, 4, 611–617. Copyright 2024 John Wiley and Sons; c) Übernommen mit Genehmigung von Rieder et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 9168–9172. Copyright 2024 John Wiley and Sons; d) Übernommen mit Genehmigung von T. Peng et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 43, 14423–14433. Copyright 2024 American Chemical Society.

Die Bedeutsamkeit der bioorthogonalen Chemie für die Wissenschaft und auch darüber hinaus wurde 2022 offiziell anerkannt, als CAROYLN BERTOZZI gemeinsam mit BARRY SHARPLESS und MORTEN MELDAL der Nobelpreis der Chemie verliehen wurde. Mittlerweile beschränkt sich die Anwendung der Methode nicht mehr nur auf den Einsatz als ausschließlich bildgebendes Werkzeug.^{5, 10} Bioorthogonale Reaktionen werden beispielsweise für die gezielte Übermittlung von pharmakologischen Wirkstoffen, unter anderem in der Krebstherapie, verwendet.¹¹ Auch für die Freisetzung von Wirkstoffen an einem spezifischen Wirkungsort konnten bioorthogonale Reaktionen eingesetzt werden.¹²

Bei Betrachtung der Verteilung der Publikationszahlen von 2010 bis 2020 im Forschungsgebiet der bioorthogonalen Chemie auf die unterschiedlichen Klassen an Biomolekülen fällt jedoch auf, dass bioorthogonale Methoden und Anwendungen zum Großteil für Proteine entwickelt werden (Abbildung 2).¹⁰ Das Publikationsvolumen für andere Biomoleküle ist deutlich geringer. Die Anzahl der Publikation zu Nukleinsäuren entspricht dabei nur etwa einem Fünftel der Publikationen zu Proteinen.

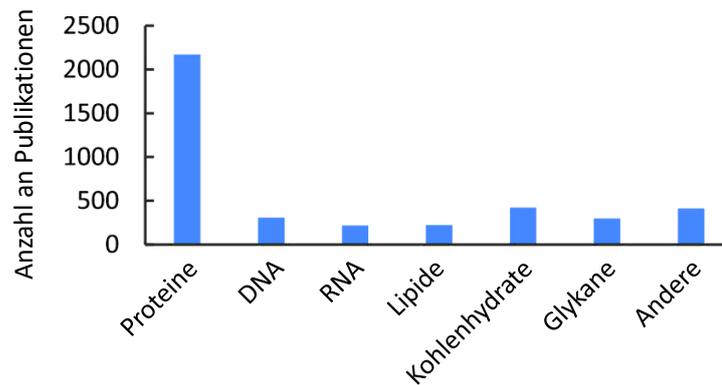


Abbildung 2: Verteilung der Publikationen im Bereich der bioorthogonalen Chemie von 2010 bis 2020 auf die verschiedenen Arten an Biomolekülen. Entnommen und übersetzt aus R. Bird et al. *Bioconjugate Chem.* 2021, 32, 2457–2479, lizenziert unter Creative Common CC-BY 4.0.

DNA nimmt als Träger der genetischen Information jedoch eine Schlüsselposition für alle Lebewesen ein. Auch RNA wird in Zellen vielseitig in unterschiedlichen Aufgabenbereichen und Positionen eingesetzt. Darüber hinaus hat unter anderem die Vorstellung eines mRNA-Impfstoffs in der COVID-19 Pandemie das Potential von Nukleinsäuren in der medizinischen Anwendung gezeigt. Dennoch bleiben Fragen in Bezug auf Funktionen und Wirkungsweise von Genen und auch RNA-Transkripten bisher unerklärt.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Entwicklung einer neuen Methode der bioorthogonalen Markierung von DNA. Hierbei liegt der Fokus insbesondere auf einer dualen bioorthogonalen Markierung. Die meisten biologischen Prozesse werden durch die Interaktion von Biomolekülen angetrieben, so auch im Fall der DNA. Um diese, häufig sehr komplexen Interaktionen zu verstehen, ist die Verfolgung eines einzelnen Biomoleküls meist nicht ausreichend. Eine duale bioorthogonale Markierung ermöglicht die Untersuchung und das Verständnis von Wechselwirkungen in der biologischen Umwelt, die mit einer einzigen Markierung nicht zugänglich sind. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher eine Methode für die duale bioorthogonale Markierung von DNA entwickelt werden.

2. THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Bioorthogonale Markierung

Der Begriff ‚orthogonal‘ wurde im chemischen Kontext ursprünglich 1977 von G. BARANY und R.B. MERRIFIELD zur Beschreibung unterschiedlicher Schutzgruppen in der Peptidsynthese verwendet. Hier wurde ein orthogonales System als eine Menge unabhängiger Klassen von Schutzgruppen definiert, welche in beliebiger Reihenfolge und in Anwesenheit der jeweils anderen Klasse abgespalten werden können.^{13, 14} Im Jahr 2003 wandelte CAROLYN BERTOZZI den Begriff zur Charakterisierung von chemoselektiven Reaktionen in Lebewesen ab und bezeichnet damit erstmals ein neues Forschungsgebiet: die bioorthogonale Chemie.^{15, 16} Als bioorthogonal werden hierbei Reaktionen bezeichnet, die in der Zelle ablaufen können, ohne deren biologische Prozesse zu beeinflussen oder zu stören. Ziel dieser Methode ist es, Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung und Funktion spezifisch kennzeichnen und untersuchen zu können.

Um eine Markierung bioorthogonal durchzuführen, wird sich einer zweistufigen Strategie bedient (Abbildung 3).^{15, 17} Im ersten Schritt wird eine funktionelle Gruppe, der chemische Reporter, in das zu analysierende Biomolekül eingefügt. Dies erfolgt idealerweise durch metabolische Inkorporation eines modifizierten Substrates über die zelleigenen Enzyme. Alternativ kann der chemische Reporter auch über nicht natürliche Biosynthesewege eingefügt werden, wie beispielsweise im Fall von DNA mittels Transfektion.¹⁸ Die Größe des chemischen Reporters ist dabei entscheidend um die native Struktur und Funktionalität des Zielmoleküls beizubehalten. Viele Biomoleküle reagieren empfindlich auf die Einführung von Modifikationen, sodass kleine funktionelle Gruppen in dieser Hinsicht einen entscheidenden Vorteil bieten.^{19, 20} Im zweiten Schritt wird der chemische Reporter kovalent mit einem entsprechenden Reaktionspartner verknüpft. Dieser trägt eine Sonde, anhand derer das Biomolekül anschließend verfolgt werden kann. In Abhängigkeit der Anwendung handelt es sich bei der Sonde um einen Fluorophor oder einen Affinitäts-Tag. Der Schritt wird auch als bioorthogonale Reaktion bezeichnet.¹⁵

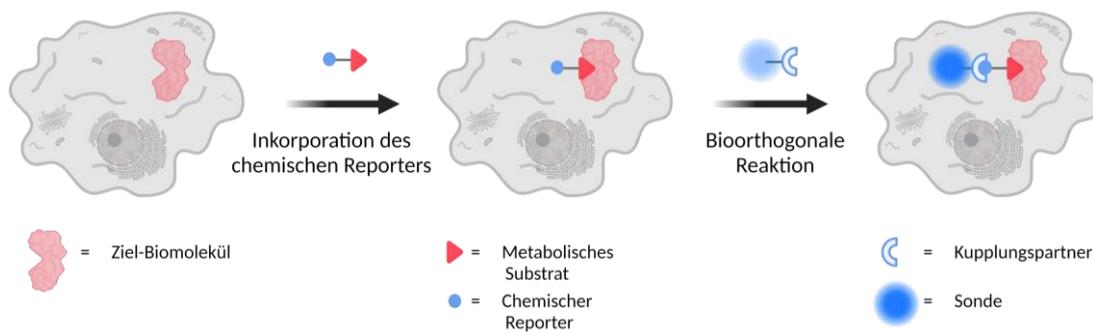


Abbildung 3: Zweistufige Strategie der bioorthogonalen Markierung. Das zu betrachtende Biomolekül wird im ersten Schritt mit einem chemischen Reporter ausgestattet. Im zweiten Schritt wird an diesem mit Hilfe eines komplementären Kupplungspartners eine Sonde angebracht.

Um die namensgebende Bioorthogonalität zu gewährleisten, muss die Reaktion jedoch spezielle Anforderungen erfüllen. Zum einen muss sie unter den vom Organismus vorgegebenen physiologischen Rahmenbedingungen in Bezug auf Temperatur, Druck, pH-Wert und wässrigem Medium ablaufen.^{15, 19, 21} Zum anderen werden hohe Ausbeuten bei niedriger Konzentration an Reaktanden benötigt, um die Beeinträchtigung der natürlichen Funktionen so gering wie möglich zu halten. Dabei ist außerdem wichtig, dass keine der Komponenten toxisch auf die Zelle bzw. den Organismus wirkt.¹⁵ Da die betrachteten biologischen Prozesse meist mit hoher Geschwindigkeit ablaufen, muss sich auch die Kinetik der bioorthogonalen Reaktion in dieser Größenordnung bewegen.^{15, 19} Eine hohe Geschwindigkeitskonstante ermöglicht es außerdem, die Konzentration der Reaktanden innerhalb des Organismus gering zu halten. Des Weiteren müssen für eine erfolgreiche Markierung die Reaktionspartner, aber auch das entstandene Produkt, ausreichend stabil in zellulären Medium sein.^{15, 21} Die vermutlich größte Anforderung, die an bioorthogonale Reaktionen gestellt wird, ist jedoch die der Chemoselektivität. In einer komplexen zellulären Umgebung, mit einer übermäßigen Anzahl verschiedenster funktioneller Gruppen in großem Überschuss, müssen die bioorthogonalen Reaktionspartner selektiv mit dem jeweils anderen reagieren, ohne unspezifische Nebenreaktionen einzugehen. Nur auf diese Weise ist eine gezielte Verfolgung eines einzelnen, definierten Biomoleküls möglich.^{22, 23}

Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften ermöglicht die bioorthogonale Markierung Anwendungen, die mit anderen etablierten Markierungsmethoden nicht zugänglich sind. Während häufig eingesetzte genomische Methoden wie fluoreszente Protein-Fusionen²⁴ meist nur für die Betrachtung von Proteinen geeignet sind, können mittels bioorthogonaler Markierung alle Klassen von Biomolekülen, wie Nukleinsäuren, Glykane oder auch kleine Metabolite visualisiert werden.^{21, 25-27} Im Vergleich zu Antikörperkonjugaten sind bioorthogonale Sonden deutlich kleiner, sodass die Zielmoleküle besser in ihrer natürlichen Umgebung betrachtet werden können.²⁸ Die zweistufige Strategie minimiert zusätzlich den Einfluss auf das Biomolekül, da zunächst nur eine kleine Funktionalität eingeführt wird und das modifizierte

Substrat so von den zelleigenen Stoffwechselwegen besser toleriert wird.^{15, 29} Des Weiteren kann die an den Kupplungspartner angebrachte Sonde beliebig gewählt werden und die Markierungsart der gewünschten Anwendung angepasst werden, ohne dass eine neue Methode erarbeitet werden muss.^{30, 31}

Die bioorthogonale Markierung bildet daher eine wichtige Erweiterung der bildgebenden Methoden. Die größte Limitierung war es jedoch zunächst chemische Reaktionen zu finden, welche den hohen Anforderungen der Bioorthogonalität gerecht werden.¹⁷ Im Zuge der letzten zwei Jahrzehnte wurden eine Reihe von chemischen Transformationen vorgestellt, welche durch neue Innovationen und iterative Optimierungen bekannter Reaktionen eine Anwendung *in vivo* ermöglichen. Auf diese soll im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen werden.

2.2 Bioorthogonale Reaktionen

Bioorthogonale Chemie setzt es sich zum Ziel chemische Reaktionen, die ursprünglich in einem Labor entwickelt wurden, innerhalb eines lebenden Organismus durchzuführen. Dadurch verändern sich auch die Anforderungen an die Eigenschaften dieser Reaktion. Im Labormaßstab steht meist die Herstellung möglichst großer Mengen einer Verbindung im Vordergrund und die Reaktionsbedingungen können entsprechend angepasst werden. Bei einer Anwendung *in vivo* ist hingegen insbesondere die Selektivität und Adaptivität der Reaktion an festgelegte Bedingungen entscheidend. In den Anfängen der bioorthogonalen Chemie standen polare Reaktionen, wie die Staudinger-Ligation, im Vordergrund, im späteren Verlauf geht der Trend hingegen zu Cycloadditionen. Ein zeitlicher Überblick über die wichtigsten bioorthogonalen Reaktionen ist in Abbildung 4 gegeben.

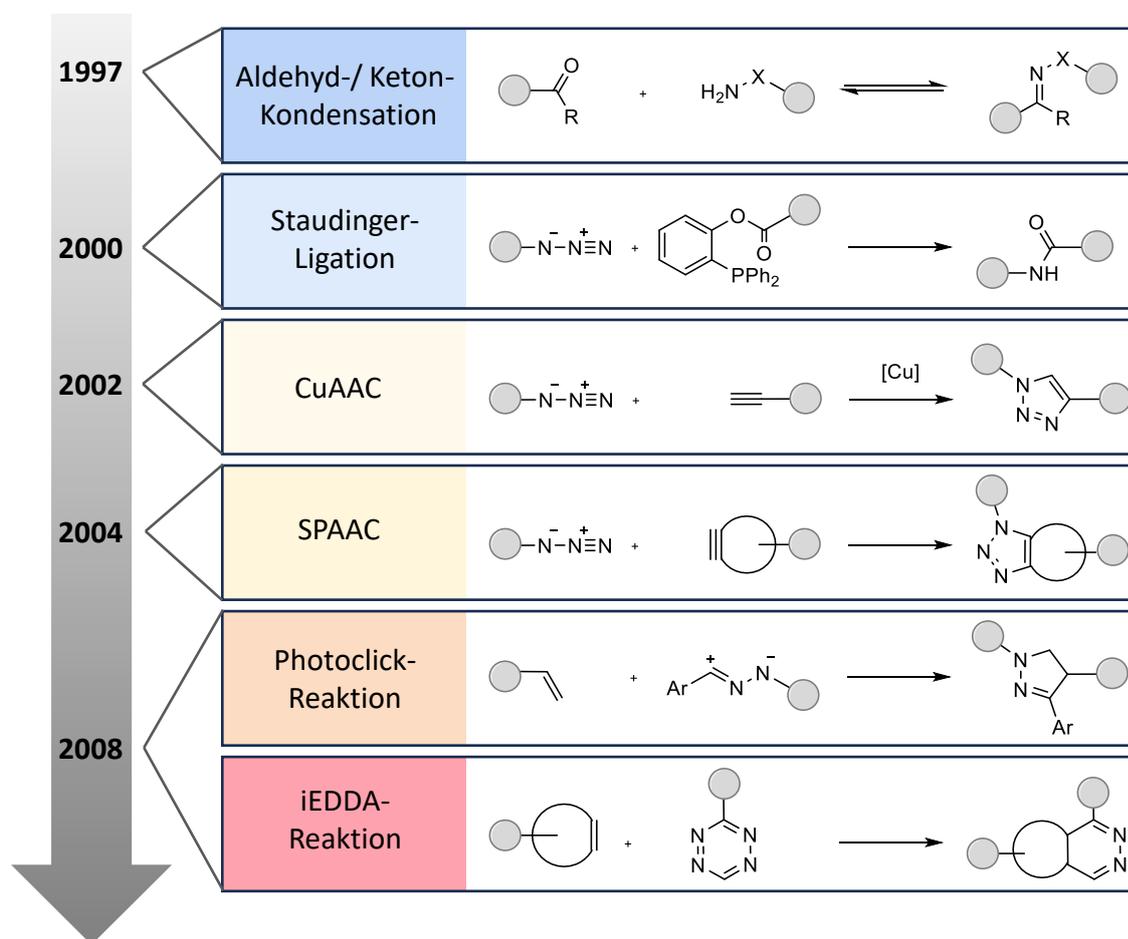


Abbildung 4: Zeitlicher Überblick über die wichtigsten bioorthogonalen Reaktionen.³² (CuAAC: Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, SPAAC: strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)

Als Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer bioorthogonaler Reaktionen werden häufig funktionelle Gruppen als chemischer Reporter gewählt, die in lebenden Organismen nicht oder

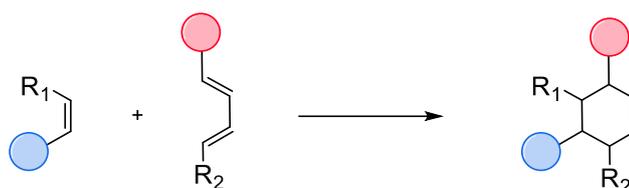
nur in geringen Mengen vorliegen und so eine Orthogonalität zu erzeugen. Ketone oder Aldehyde sind beispielsweise auf der Zelloberfläche kaum vorhanden, sodass MAHAL *et al.* diese erstmals 1997 durch Kondensation eines Ketons mit einem Hydrazin-Derivat modifizieren konnten.³³ Da innerhalb der Zelle Keton- und Aldehyd-Gruppen jedoch häufig in Metaboliten wie beispielsweise freien Zucker oder Pyruvaten zu finden sind und die Kondensationsreaktion azide Bedingungen sowie lange Reaktionszeiten benötigt, kann die Reaktion nur bedingt als bioorthogonal bezeichnet werden.^{32, 33} Azid-Gruppen sind ebenfalls kaum in zellulärer Umgebung zu finden und zeichnen sich zusätzlich durch ihre geringe Größe und Inertheit gegenüber vieler funktioneller Gruppen aus. BERTOZZI *et al.* nutzten im Jahr 2000 erstmals die Reaktion von Aziden mit Triarylphosphanen in einer bioorthogonalen Staudinger-Ligation zur Markierung von Glykokonjugaten auf der Zelloberfläche.³⁴ Es handelt sich hierbei um eine Abwandlung der von H. STAUDINGER im Jahr 1919 entwickelten Staudinger-Reduktion von Aziden zu primären Aminen mit Triphenylphosphan, bei der das intermediär entstehende Phospha-Aza-Ylid durch ein benachbartes Elektrophil abgefangen und so eine Verknüpfung erzeugt wird.^{34, 35} Die Reaktion lässt sich mit hoher Selektivität bei physiologischen Bedingungen durchführen und konnte daher erfolgreich für die Markierung einer Vielzahl von Biomolekülen eingesetzt werden.^{34, 36, 37} Sie wurde unter anderem auch als erste Reaktion in lebenden Mäusen durchgeführt und war in dieser Hinsicht ein Vorreiter für alle nachfolgend bioorthogonalen Transformationen und prägend für den Erfolg der bioorthogonalen Chemie in seinen Anfängen.³⁸ Im Laufe der Entwicklung zeigten sich jedoch einige Schwächen der Staudinger-Ligation. Neben der Oxidationsanfälligkeit der Phosphane in zellulärem Medium erwies sich vor allem die langsame Reaktionskinetik als problematisch.^{8, 32} Einen entscheidenden Fortschritt in der Suche nach neuen bioorthogonalen Reaktionen brachte die Einführung der Click-Chemie durch SHARPLESS *et al.* im Jahr 2001, da die Kriterien für Click-Chemie und bioorthogonale Chemie in vielen Punkten übereinstimmen.³⁹ Das bekannteste Beispiel der Click-Reaktionen, die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), lässt sich bei Raumtemperatur in Wasser innerhalb weniger Minuten selektiv durchführen und ist im Vergleich zur Staudinger-Reaktion circa 25-mal schneller.⁴⁰⁻⁴² Zusätzlich sind neben den Aziden auch die eingesetzten Ethinyl-Gruppen von geringer Größe und kaum vorhanden in zellulärer Umgebung. Das größte Hindernis für die Anwendung dieser Reaktion *in vivo* ist jedoch die Zytotoxizität des Kupfer-Katalysators, da dieser reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle generieren kann.^{43, 44} Es wurden verschiedenen Ansätze entwickelt, um dies zu unterbinden und so die Toxizität zu reduzieren. Beispielsweise wurden wasserlösliche Liganden für die Kupferatome eingeführt, wodurch die Markierung lebender Zellen und Zebrafisch-Embryos mittels CuAAC möglich wurde.⁴⁵⁻⁴⁷ Jedoch lässt sich auch mit dieser Methodik die Zytotoxizität nicht vollständig eliminieren. In der Suche nach geeigneten Alternativen gelang 2004 BERTOZZI *et al.* ein wichtiger Meilenstein mit der Einführung der ringspannungsgetriebenen Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).⁴⁸ Es handelt sich hierbei um

eine modifizierte Variante der CuAAC, die auf den Einsatz des Kupfer-Katalysators verzichtet und die Reaktion stattdessen durch eine Ringspannung der Alkin-Komponente aktiviert.⁴⁸ Als Alkin-Derivat verwendeten sie zunächst das kleinste stabile Cycloalkin, Cyclooctin. Da jedoch die Kinetik dieser Reaktion im Bereich der Staudinger-Ligation liegt, richtete sich der Fokus zunächst auf die Synthese reaktiverer Cyclooctin-Derivate.^{5, 32} Der meistgenutzte Ansatz hierbei war es die HOMO_{Azid}-LUMO_{Alkin} Lücke durch Erhöhung des sp²-Charakters des Rings zu modulieren und so die Aktivierungsenergie der Reaktion herabzusetzen, beispielsweise durch den Einsatz von Fluorsubstituenten⁴⁹ oder die Anknüpfung annullierter Ringe an das Cyclooctingerüst.^{50, 51} Diese Derivate ermöglichten wichtige neue Anwendungen bioorthogonaler Chemie in Lebewesen, wie beispielsweise die Untersuchung zeitaufgelöster Expression von Glykanen in Zebrafisch-Embryos oder die Visualisierung von Sialinsäuren im Gehirn von Mäusen.^{52, 53} Trotz Innovation lassen sich mit den reaktivsten bekannten Cyclooctinen Geschwindigkeitskonstanten von maximal $k_2 = 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erzielen, was für einige biologische Prozesse nicht ausreichend ist.^{21, 54} Zusätzlich ist die hohe Lipophilie und die verhältnismäßig große sterische Hinderung der Cyclooctin-Derivate in Bezug auf die Bioorthogonalität problematisch. Mit der erstmaligen Anwendung der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf *in vivo* im Jahr 2008⁵⁵ wurde die bisher schnellste bioorthogonale Reaktion eingeführt, die die Geschwindigkeit aller bisher bekannten Reaktionen um mehrere Größenordnungen übertrifft.⁵⁶ Zusätzlich wurden neue Methoden der bioorthogonalen Markierung entwickelt, wie beispielsweise die Photoclick-Reaktion, welche mit Hilfe von Licht aktiviert werden kann und so sowohl eine zeitliche als auch eine örtliche Kontrolle der bioorthogonalen Markierung erlaubt.⁵⁷

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der hohen Anforderungen, die eine Markierung *in vivo* stellt, eine Auswahl verschiedener bioorthogonaler Reaktionen entwickelt werden konnte. Die Reaktionen erfüllen die grundlegenden Kriterien der Bioorthogonalität, unterscheiden sich jedoch in Reaktionsgeschwindigkeit, Selektivität und Stabilität der eingesetzten Gruppen.^{19, 21, 32}

2.2.1 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

Im Rahmen der bioorthogonalen Chemie wurde die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf erstmals im Jahr 2008 zeitgleich von FOX und HILDERBRAND *et al.* eingeführt.^{55, 58} Die zugrunde liegende Reaktion wurde bereits 1928 von O. DIELS und K. ALDER beschrieben⁵⁹, jedoch konnte ihr Potential für eine Anwendung *in vivo* erst 80 Jahre später erkannt und effektiv genutzt werden. Bei der Diels-Alder-Reaktion handelt es sich um eine pericyclische [4+2]-Cycloaddition zwischen einem Dien (4π-Elektronen-System) und einem Dienophil (2π-Elektronen-System) zu einem Cyclohexen-System (Schema 1).⁵⁹



Schema 1: Reaktionsschema der Diels-Alder-Reaktion, einer [4+2]-Cycloaddition eines Diens mit einem Dienophil.

Basierend auf der Art der wechselwirkenden Grenzorbitale lässt sich die Reaktion als eine Diels-Alder-Reaktion mit normalem oder inversem Elektronenbedarf klassifizieren. Das Energieniveau der Grenzorbitale von Dien und Dienophil kann durch die elektronischen Effekte der Substituenten beeinflusst werden. Während elektronenziehende Substituenten (EWG) zu einer Absenkung der HOMO- bzw. LUMO-Energien führen, haben elektronenschiebende Gruppen (EDG) einen gegenteiligen Effekt.^{56, 60} Im Fall einer Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf trägt das Dien typischerweise elektronenschiebende und das Dienophil elektronenziehende Substituenten, sodass es zu einer Überlappung des LUMOs des Dienophils mit dem HOMO des Diens kommt. Bei einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) wird die elektronische Situation umgekehrt. Hier ist das Dien elektronenarm, während das Dienophil eine hohe Elektronendichte besitzt und es dadurch zu einer Wechselwirkung von $LUMO_{\text{Dien}}$ und $HOMO_{\text{Dienophil}}$ kommt.^{56, 60} Die entsprechenden Substituenten-Effekte und Molekülorbitalschemata der Grenzorbitale einer normalen Diels-Alder-Reaktion und der iEDDA-Reaktion sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

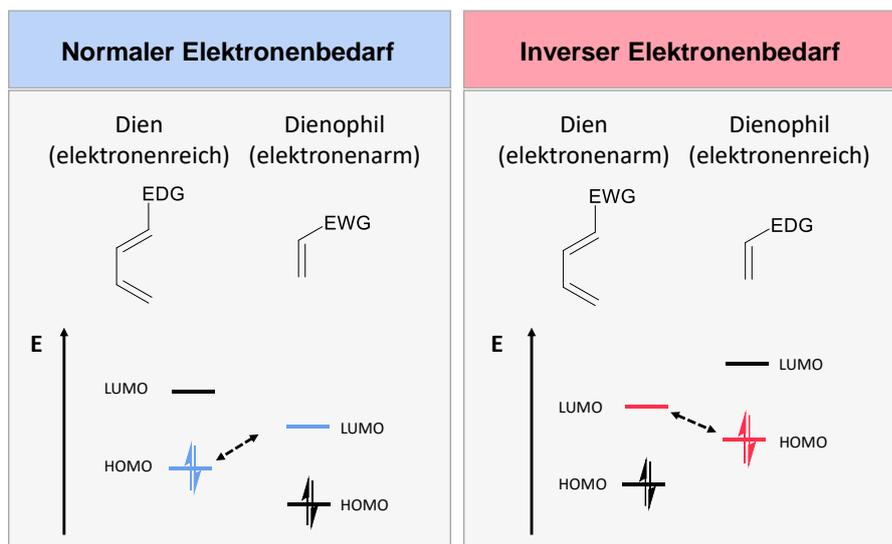


Abbildung 5: Molekülorbitalschemata der wechselwirkenden Grenzorbitale bei einer normalen Diels-Alder-Reaktion (blau) und einer iEDDA-Reaktion (rot).⁶⁰

Sowohl die normale Diels-Alder-Reaktion als auch die mit inversem Elektronenbedarf können in wässriger Umgebung bei milden Bedingungen mit hoher Ausbeute und insbesondere mit hoher Chemoselektivität durchgeführt werden und erfüllen damit wichtige Kriterien der Bioorthogonalität. Die elektronenarmen Diene der normalen Variante sind jedoch typischerweise Michael-Akzeptoren und werden leicht von Nukleophilen angegriffen, sodass es in komplexer zellulärer Umgebung zu Nebenreaktionen kommen kann. Es hat sich daher hauptsächlich die iEDDA-Reaktion als bioorthogonale Reaktion etabliert.^{61, 62}

Neben der guten Biokompatibilität hebt sich die iEDDA-Reaktion besonders durch ihre hohe Reaktionsgeschwindigkeit von anderen bioorthogonalen Reaktionen ab. Die Reaktion erreicht Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ist damit etwa 100 000-mal schneller als die CuAAC und schneller als jede andere bisher bekannte bioorthogonale Reaktion.^{56, 63} Ein Vergleich der Kinetik der bekanntesten bioorthogonalen Reaktionen ist in Abbildung 6 gezeigt. Zusätzlich führt die Verwendung polarer Lösungsmittel wie Wasser zu einer Beschleunigung der iEDDA-Reaktion was für eine Anwendung *in vivo* von Vorteil ist.⁶⁴

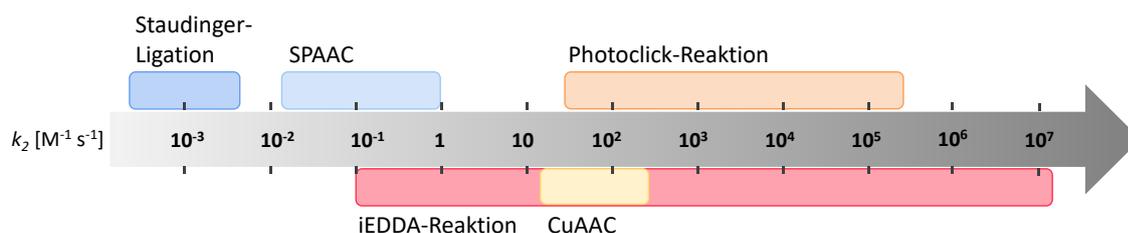
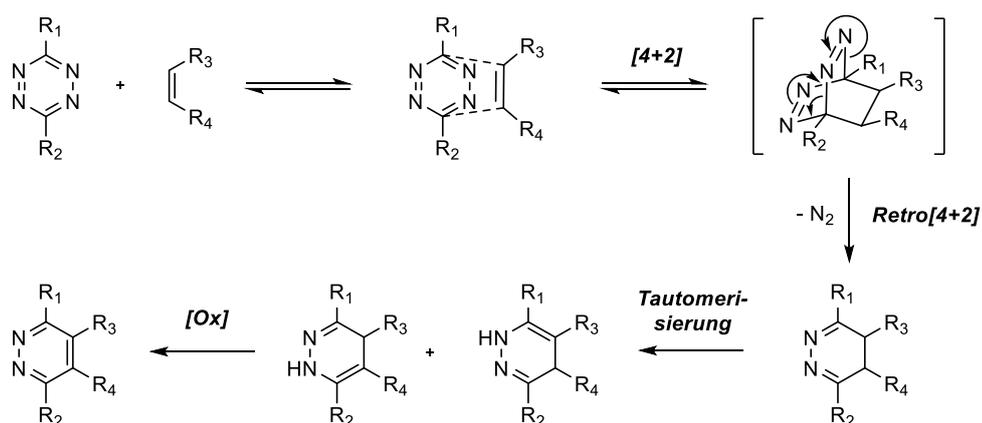


Abbildung 6: Überblick über die Geschwindigkeitskonstanten k_2 bekannter bioorthogonaler Reaktionen.^{26, 54, 56, 63, 65}

Die Kinetik der iEDDA-Reaktion wird durch die Energiedifferenz zwischen $\text{LUMO}_{\text{Dien}}$ und $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}$ bestimmt, wobei eine Angleichung der Energien in einer schnelleren Reaktion resultiert.^{56, 60} Die Reaktion lässt sich daher durch Absenkung der LUMO-Energie beschleunigen, beispielsweise durch die Einführung von Heteroatomen wie Stickstoff oder Sauerstoff in das π -System. Diese haben im Vergleich zu Kohlenstoff energetisch tieferliegende p-Orbitale.⁶⁶ Der Einsatz von Tetrazinen als stark elektronenarme Diene in einer iEDDA-Reaktion wurde erstmals 1959 von LINDSEY *et al.* beschrieben und ist heute die meistgenutzte Variante der Reaktion zur bioorthogonalen Markierung.^{61, 67}

Mechanistisch hat die Verwendung von 1,2,4,5-Tetrazinen einen entscheidenden Vorteil, da es durch die Cycloaddition zur Bildung eines instabilen bicyclischen Systems kommt, welches sofort eine Retro-Diels-Alder-Reaktion eingeht und im Zuge derer ein Stickstoffmolekül eliminiert. Die Reaktion wird dadurch irreversibel und energetisch begünstigt. Das entstandene 4,5-Dihydropyridazin kann anschließend zu den entsprechenden 1,4-Dihydro-Derivaten isomerisieren und das aromatische System durch Oxidation wieder hergestellt werden (Schema 2).⁶⁸⁻⁷⁰



Schema 2: Allgemeiner Mechanismus der iEDDA-Reaktion eines 1,2,4,5-Tetrazins mit einem Dien.⁵⁶

Die Reaktivität des Tetrazins und damit auch die Geschwindigkeit der iEDDA-Reaktion lässt sich durch die Wahl der Substituenten und Substitutionsmuster gezielt beeinflussen. Entsprechend des zuvor beschriebenen MO-Diagramms führen stärker elektronenziehende Substituenten zu einer Beschleunigung der Reaktion, was unter anderem SAUER *et al.* in einer Reaktivitätsstudie experimentell bestätigen konnten.⁷¹⁻⁷³ So zeigen beispielsweise Dialkyltetrazine im Vergleich zu Tetrazinen mit stark elektronenziehenden Pyridyl-Substituenten deutlich kleinere Geschwindigkeitskonstanten.⁷¹ Neben den elektronischen Effekten hat auch die sterische Hinderung der Substituenten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Monosubstituierte Tetrazine sind im Vergleich zu disubstituierten Derivaten deutlich reaktiver.⁷¹ Für eine Anwendung *in vivo* ist es jedoch nicht immer förderlich, ein möglichst reaktives Tetrazin zu wählen, da dies meist auch mit einer verringerten Stabilität einhergeht.⁶¹ ROBILLARD *et al.* konnten beispielsweise mit einem dipyridylsubstituierten Tetrazin Tumorzellen in lebenden Mäusen markieren.⁷⁴ Für die Markierung von DNA konnten WAGENKNECHT *et al.* Nucleoside mit einem disubstituierten Tetrazin modifizieren und diese nach Einbau in DNA mittels iEDDA-Reaktion markieren. Jedoch konnten hierbei nur Markierungsausbeuten von maximal 40 % erhalten werden.⁷⁵

Der Einsatz von Tetrazinen als chemischer Reporter für Nucleinsäuren ist außerdem aufgrund deren Instabilität gegenüber den harschen Bedingungen der Festphasen-Synthese häufig problematisch. Es wird daher meist das Dienophil als chemischer Reporter in die Nucleinsäure eingefügt.^{25, 76} Wird das Tetrazin als komplementärer Kupplungspartner an die Sonde geknüpft, kann eine weitere interessante Eigenschaft dieser funktionellen Gruppe genutzt werden. Tetrazine können auf Fluorophore als Quencher wirken und bieten somit die Möglichkeit zum Design fluorogener Sonden. Bei diesen speziellen Fluoreszenzmarkern wird die Fluoreszenz erst durch eine Transformation aktiviert. Für eine Anwendung *in vivo* ist dies von enormem Vorteil, da keine zusätzlichen Waschschrte zur Entfernung von unreaktiertem Farbstoff benötigt

werden und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wird.^{31, 77, 78} WAGENKNECHT *et al.* entwickelten tetrazinmodifizierte Cyanin-Styryl-Farbstoffe speziell für die Markierung von Nucleinsäuren. Diese Moleküle zeigen zusätzlich zu dem Fluoreszenzanstieg durch Entfernung des Quenchers (Abbildung 7, rot) einen weiteren Anstieg aufgrund der eingeschränkten Rotation des Farbstoffs bei Interkalation in die DNA-Helix (Abbildung 7, blau).^{79, 80}

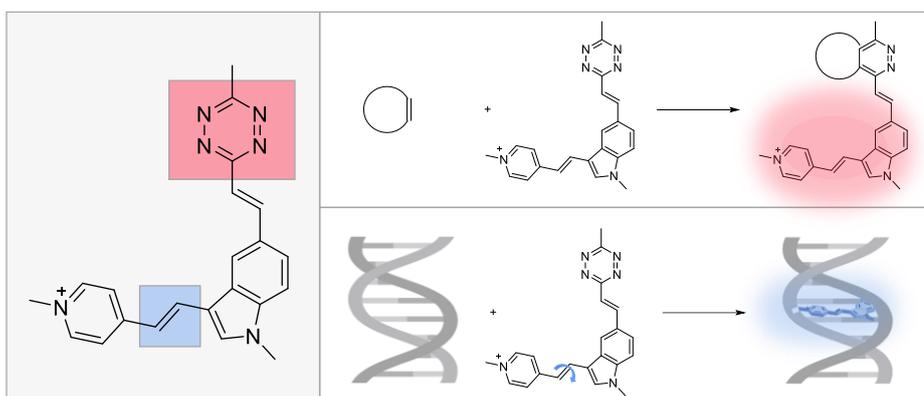


Abbildung 7: Zwei-Faktor-Fluorogenität eines tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffs. Ein Fluoreszenzanstieg wird durch Umsatz des als Quencher wirkenden Tetrazins (rot) und Einschränkung der Rotation bei Interkalation in die DNA-Helix (blau) erzielt.⁷⁹

Neben dem Dien hat auch die Wahl des Dienophils einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit und die Anwendungsmöglichkeiten der iEDDA-Reaktion zur bioorthogonalen Markierung. Häufig werden hier gespannte Alkene bzw. Alkine verwendet (Abbildung 8). Auch Vinyl-Gruppen können mit Tetrazinen reagieren, jedoch nur mit geringen Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $k_2 = 10^{-3}$ bis $10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^{56, 81} Trotzdem sind sie aufgrund ihrer geringen Größe attraktive chemische Reporter und konnten bereits in lebenden Zellen angewendet werden.⁸¹ Am entgegengesetzten Ende des Spektrums befinden sich *trans*-Cyclooctene (TCO). Sie gehen mit Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $k_2 = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ die schnellsten bisher bekannten bioorthogonalen Reaktionen ein.^{56, 82} Es gibt erste Ansätze *trans*-Cyclooctene durch *trans*-Cycloheptene auszutauschen, mit welchen sich Konstanten von bis zu $k_2 = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erzielen lassen, jedoch sind diese nicht stabil in zellulärer Umgebung.⁶³ Auch für TCO-Derivate wird in zellulärer Umgebung unter anderem eine Isomerisierung zu weniger reaktiven *cis*-Derivaten beobachtet.⁵⁶ Bicyclo[6,1,0]nonin (BCN) ist im Vergleich zu TCO stabiler, jedoch mit Geschwindigkeitskonstanten von $k_2 = 10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ weniger reaktiv.^{51, 56} Während die hohen Geschwindigkeiten der BCN- und TCO-Derivate für viele Anwendungen von Vorteil sind, ist ihre große sterische Hinderung in Bezug auf die Biokompatibilität ein entscheidender Nachteil. Im Gegensatz dazu sind Cyclopropene deutlich kleiner und können daher besser in das biologische System integriert werden. Aufgrund ihrer Ringspannung können auch sie Geschwindigkeitskonstanten von $k_2 = 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreichen, sind aber gleichzeitig stabil in zellulärer Umgebung.⁸³⁻⁸⁵

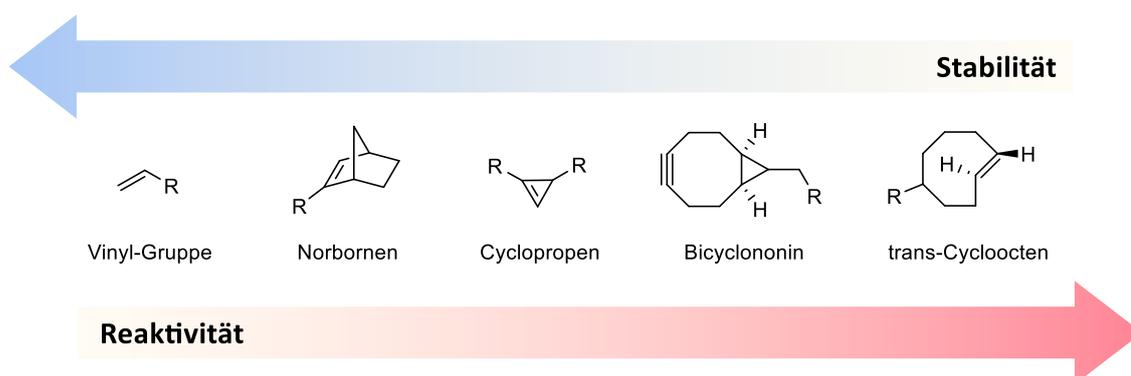


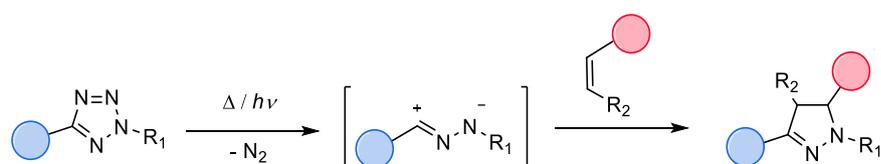
Abbildung 8: Überblick über die wichtigsten Dienophile für eine bioorthogonale iEDDA-Reaktion und deren Einordnung in Bezug auf Reaktivität und Stabilität.

Die iEDDA-Reaktion lässt sich durch die Vielzahl an Reaktionspartnern vielseitig an die jeweilige Anwendung anpassen. Die Kombination von herausragenden Reaktionsgeschwindigkeiten und hoher Selektivität macht sie dabei zu einer der bedeutendsten bioorthogonalen Reaktionen.

2.2.2 Photoclick-Reaktion

Photoaktivierbare bioorthogonale Reaktionen eröffnen eine neue Dimension der Markierung *in vivo*, da es nicht nur möglich ist spezifisch ein einzelnes Biomolekül zu betrachten, sondern auch zu einem definierten Zeitpunkt und Ort. Dies ist insbesondere für die Untersuchung von dynamischen biologischen Prozessen von enormem Vorteil. Bekannte photoaktivierbare Reagenzien sind unter anderem Tetrazole, 9,10-Phenanthrenechinone, Diarylsydone, Cyclopropenone oder Tetrazine.⁸⁶

Aus dieser Gruppe ist die Tetrazol-En-Reaktion bzw. Photoclick-Reaktion das etablierteste System, das bereits die meisten Anwendungsmöglichkeiten gefunden hat.^{86, 87} Tetrazole selbst sind kaum reaktiv, werden sie jedoch Wärme oder Strahlung einer geeigneten Wellenlänge ausgesetzt, kommt es zur Abspaltung von Stickstoff und Entstehung eines hochreaktiven Nitrilimins. Dieses kann mit einem Dipolarophil eine 1,3-Cycloaddition eingehen, wobei sich ein Pyrazolin als Addukt bildet. (Schema 3).⁸⁸



Schema 3: Reaktionsschema der Photoclick-Reaktion eines Alkens mit einem Nitrilimin zu einem Pyrazolin. Das Nitrilimin wird zunächst *in situ* aus dem entsprechenden Tetrazol durch Wärme- bzw. Lichteinwirkung generiert.⁸⁸

Im Jahr 2008 zeigten LIN *et al.* erstmals die Anwendung dieser Reaktion als bioorthogonale Markierungsmethode, indem sie tetrazolmodifizierte Proteine zunächst in Zelllysaten und später auch in *E. coli* photoinduziert markierten.^{89,90} Sie nutzten dabei die intrinsische Fluoreszenz des entstehenden Pyrazolins zur Detektion des markierten Biomoleküls. ZHANG *et al.* konnten 2019 die Anwendung *in vivo* weiter ausbauen, indem sie erstmals die Markierung von DNA in Zebrafisch Embryos mittels Photoclick-Reaktion demonstrierten.⁹¹

Neben der Photoaktivierbarkeit zeichnet sich die Photoclick-Reaktion auch durch ihre hohen Reaktionsgeschwindigkeiten aus. In Abhängigkeit von Reaktionspartnern und -bedingungen konnten bereits Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $k_2 = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden.^{65,92,93} Als Dipolarophile werden gespannte Alkene bzw. Alkine wie Cyclopropene oder BCN eingesetzt, aber auch aliphatische Alkene sind möglich.^{86,94} Das Dipolarophil ist bestimmend für die Kinetik des zweiten Schritts. Die Kinetik des ersten Schritts, die Photolyse des Tetrazols, wird unter anderem von der Lichtquelle sowie -intensität und dem ‚inner filter effect‘ der Reaktionslösung bestimmt.⁹⁵ Letzterer beschreibt die Abschwächung der Lichtintensität im Inneren der Probe durch die Absorption der Moleküle am Probenrand, wodurch sich eine ungleichmäßige Bestrahlung der Probe ergibt. Der Effekt ist zusätzlich abhängig von der Konzentration und Geometrie der Probe.⁹⁶

Die große Reaktivität des Nitrilimins ermöglicht zwar hohe Geschwindigkeiten, ist jedoch auch eine der Hauptherausforderungen für eine bioorthogonale Anwendung. Steht kein geeignetes Dipolarophil für eine Nachfolgereaktion zur Verfügung, kann es zu unerwünschten Nebenreaktionen wie nukleophilen Additionen kommen (Abbildung 9, grau).^{86,87,93,97,98} Eine Grundvoraussetzung der Bioorthogonalität ist jedoch Chemoselektivität. Es gibt derzeit zwei Ansätze die Reaktivität des Nitrilimins zu modellieren und so die Selektivität der Reaktion zu erhöhen. Ein Ansatz ist die Einführung sterisch hindernder Gruppen nahe des Nitrilimins, welche dieses vor einem nukleophilen Angriff schützen soll. LIN *et al.* entwickelten hierzu unter anderem ein Tetrazol mit zwei benachbarten *N*-Boc-Pyrryl-Gruppen (Abbildung 9, blau). Das entsprechende *in situ* generierte Nitrilimin weist eine Halbwertszeit von 102 s auf, während die des ungeschützten Derivats bei 7,5 s liegt.⁹⁹ Die zweite Methode ist es, das Nitrilimin elektrostatisch gegen angreifende Nucleophile abzuschirmen. YU *et al.* führten dazu zwei Trifluormethylgruppen, die eine negative Partialladung tragen, in ein Tetrazol-Derivat ein und konnten so die Selektivität signifikant verbessern (Abbildung 9, rot).¹⁰⁰

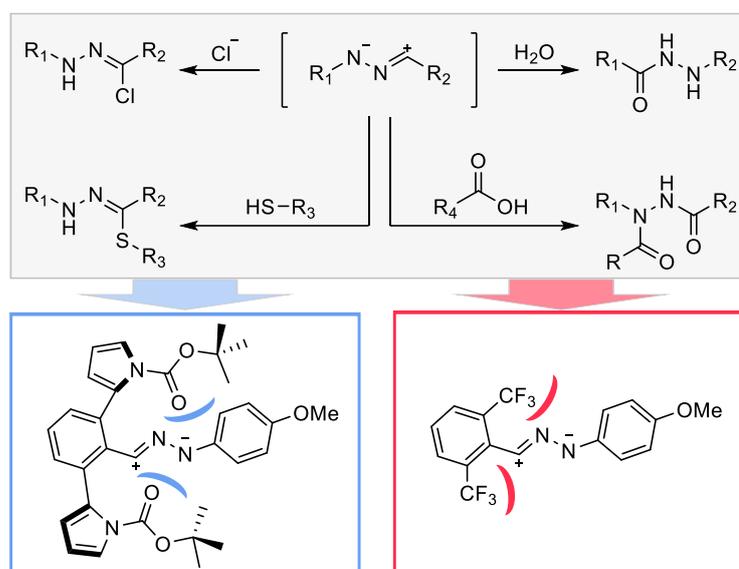


Abbildung 9: Überblick über die möglichen Nebenreaktionen eine Nitriliums mit verschiedenen Nucleophilen (grau) und Lösungsansätze durch sterische (blau) oder elektronische (rot) Abschirmung.

Neben der Optimierung der Selektivität ist auch die Modellierung der Aktivierungswellenlänge ein wichtiger Bestandteil aktueller Forschung im Bereich der Photoclick-Reaktion (Abbildung 10).^{57, 86} Die ersten bekannten Tetrazole lassen sich nur mit Strahlung im UV-Bereich aktivieren, was aufgrund der Phototoxizität dieser für eine *in vivo* Anwendung problematisch ist.^{86, 90} Zusätzlich kann kurzwelliges Licht kaum in tiefere Gewebeschichten eindringen, während beispielsweise Nahinfrarot-Strahlung verbesserte Gewebe- und Hautdurchdringung von einigen Millimetern zeigt.¹⁰¹ Eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge lässt sich unter anderem durch Einbettung des Tetrazol-Gerüsts in ein größeres aromatisches System erzielen. So synthetisierten LIN *et al.* beispielsweise naphthalinsubstituierte Tetrazole mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm.^{102, 103} Bei Verwendung von zwei Naphthyl-Substituenten war zudem eine Zwei-Photonen-Anregung mit einem 700 nm Femtosekunden-Laser möglich, dessen Anwendung auch in lebenden Säugetierzellen demonstriert werden konnte.¹⁰⁴ Im vergangenen Jahr konnten WAGENKNECHT *et al.* ein pyrensubstituiertes Tetrazol, welches sich mit sichtbarem Licht von 450 nm aktivieren lässt, zur Markierung von zellulärer DNA einsetzen.^{95, 105} Dieses Tetrazol ist vorteilhaft für eine Anwendung an Nucleinsäuren, da Pyren in den Basenstapel interkalieren kann und so die Reaktanden in räumliche Nähe gebracht werden.⁹⁵ WAGENKNECHT *et al.* konnten zudem erstmals tetrazolmodifizierte Nucleoside wie beispielsweise ein Thymidin, welches an 5-Position ein diarylsubstituiertes Tetrazol trägt, in einem DNA- bzw. RNA-Strang photoinduziert markieren.¹⁰⁶ Da zur Aktivierung jedoch UV-Strahlung benötigt wird und große Substituenten am Tetrazolgerüst zur bathochromen Verschiebung der Anregungswellenlänge problematisch in Bezug auf die Bioorthogonalität sind, wird bevorzugt das Dipolarophil als chemischer Reporter verwendet.²⁵

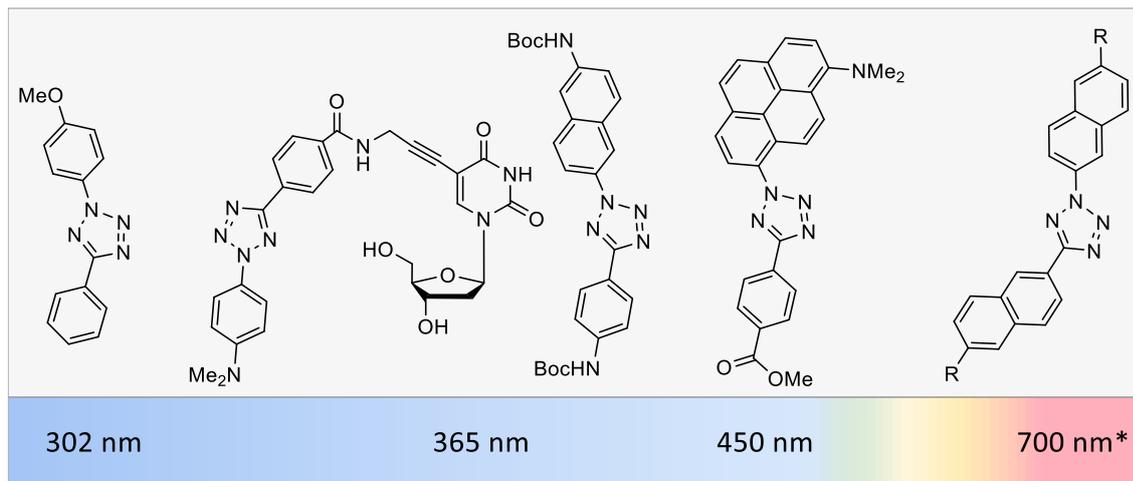


Abbildung 10: Überblick über bekannte Tetrazole für eine Photoclick-Reaktion und deren Anregungswellenlängen, wobei eine Aktivierung des dinaphthalinsubstituierten Derivats bei 700 nm nur über Zwei-Photonen-Anregung mit einem Femtosekunden-Laser möglich war.

Photoaktivierte Reaktionen sind eine wichtige Erweiterung der bioorthogonalen Chemie. Die Photoclick-Reaktion hat bei richtiger Optimierung von Reaktionspartnern und -bedingungen das Potenzial die orts- und zeitgesteuerte Markierung von Biomolekülen *in vivo* zu ermöglichen.

2.3 Duale bioorthogonale Markierung

Die bioorthogonale Chemie hat in den vergangenen Jahren entscheidende Beiträge zur Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher Biomoleküle in ihrer natürlichen Umgebung geleistet. Um ein Verständnis für biologische Netzwerke und biochemische Prozesse zu erhalten, die auf der Wechselwirkung unterschiedlicher Komponenten beruhen, ist es häufig jedoch nicht ausreichend, nur ein einzelnes Molekül verfolgen zu können. In komplexen biologischen Systemen wird die simultane Visualisierung zwei oder mehrerer Komponenten nötig. Mit Hilfe mehrerer Sonden in einem einzelnen Biomolekül könnten zudem Konformationsänderungen oder Moleküldynamiken verfolgt werden. Auch über biochemische Grundlagenforschung hinaus gibt es Bedarf an Mehrfachmarkierung, wie beispielsweise in der Krebsforschung. Hier gibt es Ansätze gleichzeitig diagnostische und therapeutische Funktionen in einen Wirkstoff einzuführen.^{107, 108}

Theoretisch ist es denkbar, mehrere bioorthogonale Reaktionen zur Mehrfachmarkierung im selben System zu verwenden. Um ein definiertes Ergebnis zu erzielen, müssen diese Reaktionen jedoch nicht nur bioorthogonal zur zellulären Umgebung, sondern auch orthogonal zueinander sein. In der praktischen Umsetzung ist dies eine große Herausforderung, da viele bioorthogonale Reaktionen nicht kompatibel miteinander sind und es zu einer Vielzahl möglicher Nebenreaktionen kommen kann.¹⁰⁹⁻¹¹¹ So werden beispielsweise in der SPAAC aber auch in der iEDDA-Reaktion gespannte Alkine als Ausgangsstoffe verwendet, wodurch es bei gemeinsamem Einsatz zu Kreuzreaktionen kommen kann. In den vergangenen Jahren wurde daher verstärkt auch an der Entwicklung von orthogonalen Paaren bioorthogonaler Reaktionen geforscht.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Es existieren verschiedene Ansätze, um orthogonale bioorthogonale Reaktionen zu identifizieren bzw. die Reaktanden so zu modifizieren, dass eine Orthogonalität erzeugt wird. Eine Möglichkeit Kreuzreaktionen zu vermeiden ist die Kombination von Reaktionen, die über unterschiedliche Mechanismen ablaufen. Des Weiteren kann die Einführung sterisch hindernder Gruppen in die Reaktanden oder unterschiedliche Kinetik der Reaktionen genutzt werden. Zusätzlich ist es möglich, dass eine der beiden Reaktionen erst durch einen externen Impuls aktiviert werden muss (Abbildung 11).^{110, 111}

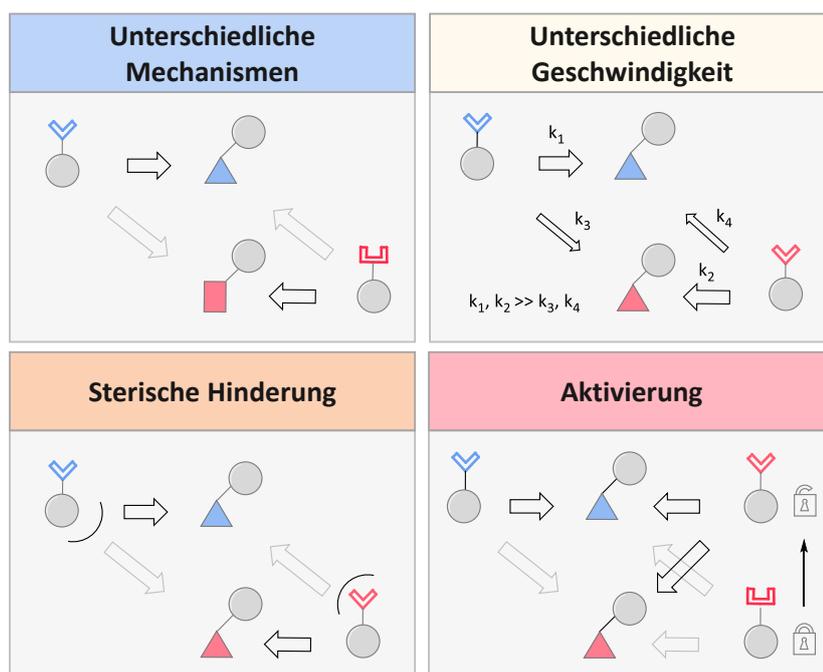


Abbildung 11: Überblick über bekannte Ansätze zu Erzeugung von Orthogonalität zwischen zwei bioorthogonalen Reaktionen. Schwarze Pfeile stehen für eine gewünschte und hellgraue Pfeile für eine unerwünschte Reaktion.

Zwei Reaktionen mit unterschiedlichem Mechanismus zu wählen, ist der direkteste Zugang zu dualer Bioorthogonalität. Die CuAAC und die iEDDA-Reaktion sind zwei Reaktionen, die sich für diesen Ansatz qualifizieren. Zwar handelt es sich in beiden Fällen um Cycloadditionen bei denen Alkine als Ausgangsstoffe eingesetzt werden, jedoch besitzen Alkine, die eine CuAAC eingehen, in der Regel niedrigliegende HOMOs, was im Gegenzug ungünstig für die iEDDA-Reaktion ist.¹¹² Diese Methode wurde unter anderem von CHIN *et al.* zur dualen Markierung einer cyclopropen- und einer ethinylmodifizierten Aminosäure in einem einzelnen Calmodulin genutzt.¹¹³ JAESCHKE *et al.* konnten im Jahr 2012 mittels orthogonaler CuAAC und iEDDA-Reaktion auch erstmals DNA *in vitro* dual markieren.¹¹² Die Kombinationsmöglichkeiten von mechanistisch unterschiedlichen Reaktionen sind jedoch begrenzt.

Bei Verwendung eines externen Auslösers kann die zweite Reaktion erst zu einem definierten Zeitpunkt gestartet und so die Möglichkeiten von Kreuzreaktionen minimiert werden. Die Photoclick-Reaktion wird beispielsweise erst durch Bestrahlung aktiviert und kann daher mit anderen Reaktionen kombiniert werden.¹¹⁴ Bei der CuAAC kann Glutathion als Aktivator wirken, da es die Oxidationsstufe des Kupferkatalysators kontrolliert. Durch gezielte Einstellung des Kupfer-Glutathion-Verhältnis kann die CuAAC im selben System mit einer SPAAC-Reaktion durchgeführt werden, was BURLEY *et al.* am Beispiel zweier Peptide demonstrierten.¹¹⁵ Diese Methodik eignet sich allerdings nur zur sequenziellen und nicht zur simultanen dualen Markierung.

Im Vergleich dazu sind Ansätze bei denen Orthogonalität erst durch elektronische oder sterische Effekte erzeugt wird flexibler. Gleichzeitig ergibt sich mit der großen Anzahl an möglichen Modifikationen auch die Schwierigkeit aus diesen die beste Kombination auszuwählen. Es werden daher häufig zunächst computerbasierte Modellierungen und DFT-Berechnungen durchgeführt, mit Hilfe welcher die Energien potenzieller Übergangszustände oder Geschwindigkeitskonstanten angenähert und verglichen werden können.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Houk *et al.* postulierten beispielsweise eine Orthogonalität zwischen iEDDA-Reaktion und ringspannungsgetriebener Cycloaddition bei Verwendung von Cyclopropenen und Sydonen anstelle von Aziden aufgrund der großen Unterschiede der Aktivierungsenergien. Diese konnte anschließend experimentell bestätigt und zur dualen Markierung zweier Proteine genutzt werden.¹¹⁷

Wie zuvor erwähnt kann Orthogonalität durch Einführung sterisch hindernder Gruppen in die Reaktanden erzeugt werden. HILDEBRAND *et al.* konnten beispielsweise ein orthogonales Paar aus iEDDA-Reaktion und SPAAC entwickeln, indem sie ein sterisch gehindertes Cyclooctin mit einem disubstituierten Tetrazin kombinierten. Die Geschwindigkeit der Nebenreaktion des Tetrazins und Cyclooctins wird dadurch so weit herabgesetzt, dass sie im Vergleich zu den beiden gewünschten Reaktionen kaum stattfindet (Abbildung 12, 1).^{118, 120} Während sie die Markierung zunächst nur in zellulärer Umgebung demonstrierten, übertrugen LIU *et al.* die Anwendung im vergangenen Jahr auch in medizinisch relevanten Kontext *in vivo*.¹⁰⁸ Sie inkorporierten eine Aminosäure, die sowohl mit einer Azid- als auch Tetrazin-Funktion ausgestattet war, in einen tumorspezifischen Antikörper. Diesen konnten sie simultan mit einem Radioisotopenmarker und einem Fluorophor über orthogonale SPAAC und iEDDA-Reaktion markieren. Nach Injektion des Antikörpers in tumortragende Mäuse wurden die Tumorzellen über die beiden Sonden in separaten Kanälen detektiert. Der Tumor konnte dadurch über Positronen-Emissions-Tomographie lokalisiert und fluoreszenzgeführt entfernt werden (Abbildung 12, 2).¹⁰⁸

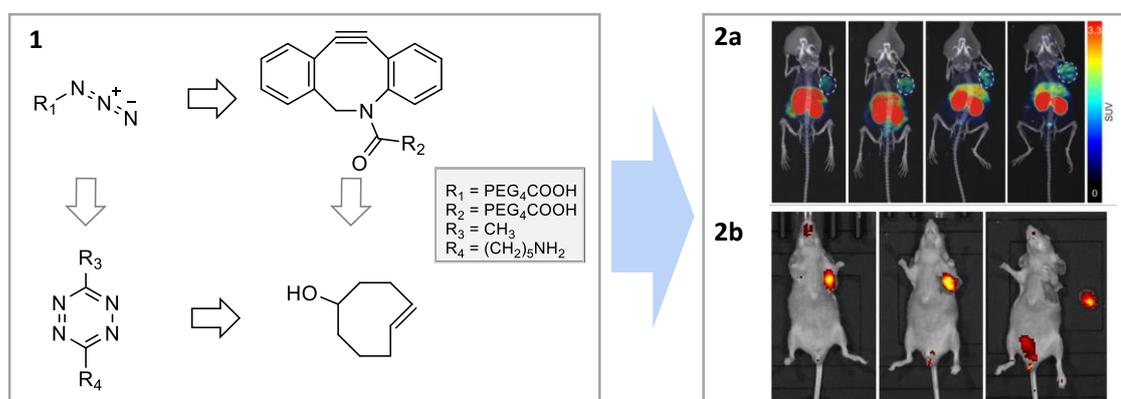


Abbildung 12: 1. Orthogonalität von SPAAC und iEDDA-Reaktion durch sterische Hinderung der Reagenzien 2. Anwendung dieses orthogonalen Pairs zu dualen Markierung von Tumorzellen in Mäusen. a) Mikro-PET-Aufnahmen von subkutanen Tumoren nach Markierung über SPAAC. b) Fluoreszenzgeführte Tumorentfernung nach Markierung über iEDDA-Reaktion. Entnommen aus Y. Wang *et al.* Nat. Commun., 2023, 14, 974, lizenziert unter CC-BY 4.0.

Im Vergleich zu Proteinen gibt es für Nucleinsäuren deutlich weniger Beispiele für duale bioorthogonale Markierung. Die meisten bekannten Anwendungen sind limitiert auf die sequentielle Zugabe der Reaktionspartner¹²¹ oder angewiesen auf die Verwendung zytotoxischer Kupfer-Katalysatoren^{112, 122-124}. In Erweiterung der dualen Markierung gibt es auch bereits erste Beispiele bei denen drei bioorthogonale Reaktionen miteinander kombiniert wurden.^{51, 125, 126} Unter anderem WITTMANN *et al.* veröffentlichten eine Dreifachmarkierung von Glykanen auf der Zelloberfläche mittels orthogonaler SPAAC, iEDDA- und Photoclick-Reaktion.¹¹⁴

Die duale bzw. mehrfache bioorthogonale Markierung stellt eine wichtige Erweiterung in der bioorthogonalen Chemie dar. Zwar bleibt der Einsatz von mehreren bioorthogonalen Reaktionen im gleichen System aufgrund von möglichen Nebenreaktionen herausfordernd, jedoch ist mit unterschiedlichen Ansätzen möglich eine Orthogonalität zu identifizieren bzw. zu erzeugen. Auch eine Anwendung *in vivo* ist mit verschiedenen orthogonalen Paaren möglich werden, diese beschränken sich jedoch zum Großteil auf die Markierung von Proteinen.

2.4 Cyclopropene als chemische Reporter

Cyclopropene sind die kleinsten bekannten Vertreter ungesättigter, cyclischer Verbindungen und sind daher von großem Interesse für die bioorthogonale Markierung. Wie bereits in unterschiedlichen Anwendungen gezeigt, ist die Größe des chemischen Reporters entscheidend dafür, ob das modifizierte Substrat von den Enzymen in der Zelle toleriert wird.^{9, 127} Ihre geringe Größe verschafft den Cyclopropenen einen entscheidenden Vorteil im Vergleich zu sterisch hindernder Gruppen wie TCO oder Norbornen. Zusätzlich besitzt das Cyclopropen eine Ringspannung von 55,2 kcal/mol¹²⁸, was mit einer hohen Reaktivität einhergeht, welche wiederum für schnelle bioorthogonale Transformation wünschenswert ist.²⁰ Die Reaktivität der Gruppe hängt dabei maßgeblich vom Substitutionsgrad und der Art der Substituenten ab. Unsubstituiertes Cyclopropen ist hochreaktiv und neigt schon bei Raumtemperatur zu Dimerisierung bzw. Polymerisation über einen En-Mechanismus (Abbildung 13).¹²⁹

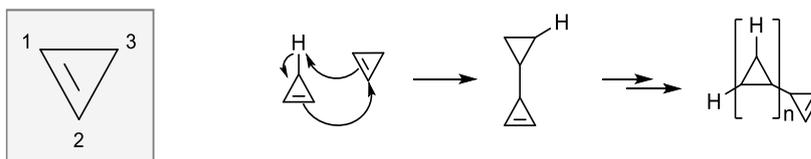


Abbildung 13: links: Cyclopropenstruktur mit der Nummerierung der Atome; rechts: Polymerisationsreaktion von unsubstituierten Cyclopropenen nach einem En-Mechanismus.

SAUER *et al.* demonstrierten im Jahr 1990 erstmals die Reaktion von unsubstituierten Cyclopropenen mit Tetrazinen und konnten dabei Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $k_2 = 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten.⁷³ Für eine Anwendung *in vivo* musste die Reaktivität jedoch zunächst moderiert werden, um die nötige Stabilität in zellulärer Umgebung zu gewährleisten. Den größten Einfluss auf die Stabilität des Cyclopropens haben Substituenten an der C-3-Position, da diese die initiale Deprotonierung der Polymerisation unterbinden. So lässt sich für ein 3,3-disubstituiertes Cyclopropen keine Dimerisierung mehr beobachten.⁷³ In einer Reaktivitätsstudie mit verschiedenen substituierten Derivaten zeigten DEVARAJ *et al.*, dass für eine iEDDA-Reaktion 1-methylsubstituierte Cyclopropene den besten Kompromiss aus Reaktivität und Stabilität darstellen.¹³⁰ Methylgruppen haben zusätzlich den Vorteil, dass sie die Struktur nicht entscheidend vergrößern.¹³⁰

Neben der Position ist auch die Art des Substituenten entscheidend für die Reaktivität des Cyclopropens. Im Fall der iEDDA-Reaktion führen, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, elektronenschiebende Substituenten zu erhöhter Reaktivität, während elektronenarme den partiell aromatischen Charakter des Cyclopropens stabilisieren und die Reaktivität senken.^{131, 132} Aus synthetischen Gründen wird die C3-Position bei Verwendung des Cyclopropens als chemischer Reporter häufig als Verknüpfungspunkt mit dem Biomolekül gewählt.^{20, 121, 130, 133} Bei

der Wahl des Linkers muss daher entsprechend der Anwendung auch auf dessen elektronische Eigenschaften geachtet werden. PRESCHER *et al.* verglichen in einer Reaktivitätsstudie unter anderem Carbamat- und Amid-Substituenten am Cyclopropenring. Die elektronenschiebende Wirkung des Carbamats führt dabei zu einer Beschleunigung der Reaktion von bis zu 100 Größenordnungen im Vergleich zu einem Amid.^{20, 83} Die Geschwindigkeitskonstanten der reaktivsten Derivate lagen bei $k_2 = 2,78 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.⁸³

Zwar liegen die erzielten Geschwindigkeitskonstanten der Cyclopropene unter denen anderer gespannter Cycloalkene wie TCO, jedoch haben cyclopropenbasierte iEDDA-Reaktionen bereits zahlreiche Anwendungen zur Markierung von Proteinen^{20, 134}, Glykanen^{135, 136} oder auch Lipiden^{84, 137} gefunden. Unter anderem konnten CHIN *et al.* eine cyclopropenmodifizierte Aminosäure in das Proteom von lebenden Taufliegen (*D. melanogaster*) inkorporieren und markieren.¹³⁸ Auch in der Nukleinsäurechemie konnten Cyclopropene bereits erfolgreich zur Markierung eingesetzt werden.^{25, 85} WAGENKNECHT *et al.* synthetisierten verschiedene 1-methylcyclopropenmodifizierte Nucleoside bei denen die Cyclopropen-Funktion über einen starren Propinyllinker an die Base angefügt wurde (Abbildung 14).¹³³

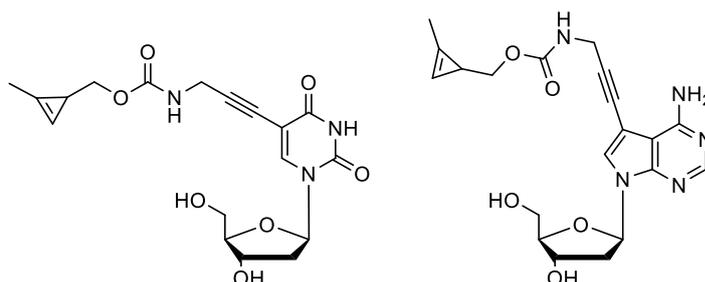


Abbildung 14: Bekannte 1-methylcyclopropenmodifizierte Nucleoside zur Markierung von DNA über iEDDA-Reaktion. Die Cyclopropen-Funktion wurde über einen Carbamat-Gruppe mit einem Propinyllinker angefügt.¹³³

Mit allen Verbindungen ließ sich anschließend eine iEDDA-Reaktion nachweisen. Zusätzlich konnten die Derivate in einen DNA-Strang eingebaut und dieser sowohl *in vitro* als auch in zellulärer Umgebung mit einem fluoreszenten Tetrazin markiert werden.^{18, 133} Es war außerdem in Kombination mit Triazinen als zweiter chemischer Reporter eine duale Markierung zweier DNA-Moleküle *in vitro* möglich.¹²¹ Allerdings ist diese Methode beschränkt auf eine sequenzielle Markierung. Im vergangenen Jahr konnten GUIANVARCH *et al.* den Einbau von Thymidinen mit einer 1-Methylcyclopropen-Modifikation an der 2'-Position der Ribose in DNA und deren Markierung demonstrieren. Eine Anwendung dieser Derivate *in vivo* steht jedoch noch aus.¹³⁹ Den Einsatz an RNA zeigten unter anderem KATH-SCHORR *et al.*, welche eine cyclopropenmodifizierte unnatürliche Base mittels In-vitro-Transkription sequenzspezifisch in einen RNA-Strang einfügten und markierten.¹⁴⁰

Neben der iEDDA-Reaktion können Cyclopropene auch als Dipolarophile in einer Photoclick-Reaktion wirken.⁸⁵ Das einzige Beispiel einer Anwendung der cyclopropenbasierten Photoclick-Reaktion *in vivo* stammt von LIN *et al.*, welche eine 3-methylcyclopropenmodifizierte Aminosäure mittels ‚genetic code expansion‘ in zelluläre Proteine inkorporierten und photoinduziert markierten.¹⁴¹ Für eine Anwendung zur Markierung von Nukleinsäuren haben WAGENKNECHT *et al.* 3-methylcyclopropenmodifizierte Nucleoside mit unterschiedlichen Linkern synthetisiert (Abbildung 15). Bisher konnte jedoch nur eine Markierung des freien Nucleosids in Lösung und nicht inkorporiert in einen DNA-Strang gezeigt werden.¹⁴²

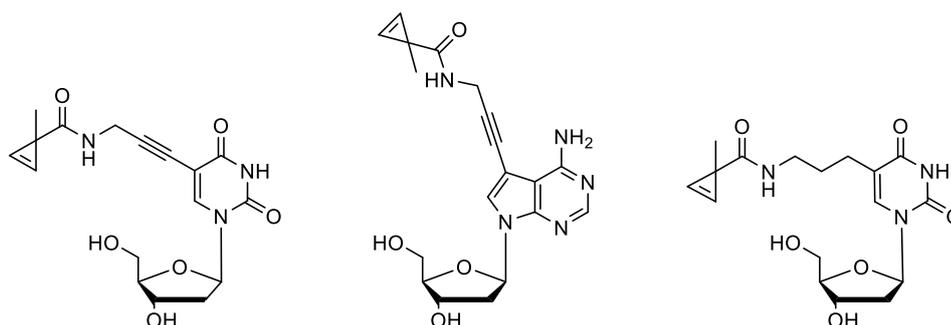


Abbildung 15: Bekannte 3-methylcyclopropenmodifizierte Nucleoside zur Markierung von DNA über Photoclick-Reaktion. Das Cyclopropen wurde über eine Amid-Gruppe und einem Propinyl- oder einen Propylenlinker angefügt.¹⁴²

Bezüglich der Reaktivität von methylsubstituierten Cyclopropenen machten PRESCHER *et al.* im Jahr 2014 eine interessante Beobachtung. Sie modulierten die Übergangszustände einer Photoclick- und iEDDA-Reaktion von 1,3-Dimethyl- bzw. 3,3-Dimethylcyclopropen. Eine daraus abgeleitete Näherung der Geschwindigkeitskonstanten ergab, dass die iEDDA-Reaktion mit 3,3-Dimethylcyclopropen circa fünf Größenordnungen langsamer abläuft als mit dem entsprechenden 1,3-Derivat. Dies ist auf die sterische Hinderung der zweiten Methylgruppe im Übergangszustand der iEDDA-Reaktion zurückzuführen, welche eine ungünstige Orbitalüberlappung zur Folge hat. Im Gegensatz dazu verläuft die Photoclick-Reaktion für beide Isomere mit näherungsweise gleicher Geschwindigkeit (Abbildung 16).⁸³

Photoclick-Reaktion

iEDDA-Reaktion

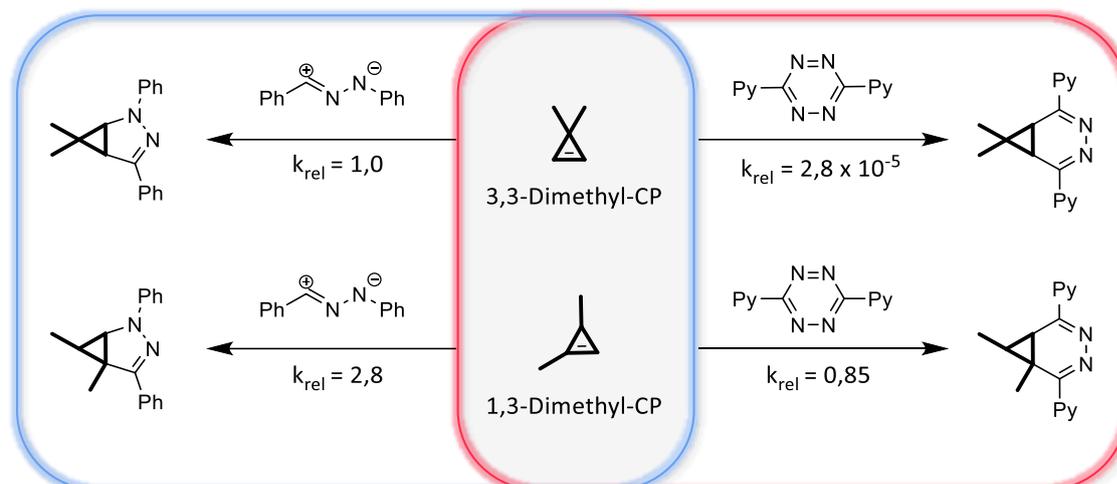


Abbildung 16: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten von 1,3- und 3,3-Dimethylcyclopropen mit einer diarylsubstituierten Nitrilimin (links) und einer diarylsubstituierten Tetrazin (rechts).

In der anschließenden experimentellen Überprüfung der Berechnungen ließ sich für 3,3-disubstituierte Cyclopropen-Derivate mit disubstituierten Tetrazinen auch bei längerer Reaktionsdauer und Wärmezufuhr keine Reaktion beobachten. Die Reaktivität zweier Cyclopropen-Isomere lässt sich folglich durch unterschiedliche Positionierung eines einzelnen Methylsubstituenten gezielt steuern. Dies eröffnet die Möglichkeit zur dualen Markierung zweier Biomoleküle mittels orthogonaler iEDDA- und Photoclick-Reaktion.⁸³ Bei sequenzieller Zugabe von Tetrazin und Tetrazol wird zunächst selektiv das 1-Methylcyclopropen über iEDDA-Reaktion markiert und anschließend das verbliebene 3-Methylcyclopropen mittels Photoclick-Reaktion. Die duale Markierung konnten PRESCHER *et al.* ebenfalls am Beispiel zweier cyclopropenmodifizierter Proteine erfolgreich demonstrieren.⁸³ In initialen Untersuchungen zur Anwendung des orthogonalen Paares zur Markierung von DNA konnte keine Reaktivität eines 1-methylcyclopropenmodifizierten 2'-Desoxyuridins gegenüber einem diphenylsubstituierten Tetrazols festgestellt werden.¹ Dies eröffnet die Möglichkeit einer dualen Markierung auch bei simultaner Zugabe der Reaktionspartner, was das Anwendungspotenzial der dualen Markierung zusätzlich vergrößert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Cyclopropene als chemische Reporter durch besondere Eigenschaften wie beispielsweise eine geringe sterische Hinderung oder hohe Reaktivität auszeichnen und damit für viele Anwendungen einen entscheidenden Vorteil bieten.

¹ Durchgeführt im Rahmen der Masterarbeit von N. Seul, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.

2.5 Herstellung bioorthogonal reaktiver DNA *in vitro*

Um eine Nukleinsäure über bioorthogonale Markierung visualisieren zu können, muss zunächst ein chemischer Reporter in das Biomolekül eingefügt werden. Hierzu können mit dem chemischen Reporter modifizierte Nucleoside synthetisiert und diese in die Nukleinsäure inkorporiert werden.^{25, 143} Da die Inkorporation und anschließende Markierung von modifizierten Nucleosiden in lebenden Organismen jedoch nicht trivial und von vielen Faktoren abhängig ist, wird häufig zunächst bioorthogonal reaktive DNA artifiziell hergestellt und deren Markierung untersucht.^{25, 143} *In vitro* kann der Einbau einer modifizierten Base in eine Oligonucleotid über zwei Methoden erfolgen: synthetisch über Festphasensynthese mit Nucleosid-Phosphoramiditen und enzymatisch mit Hilfe von Polymerasen in Form von Nucleosidtriphosphaten (Abbildung 17).²⁵

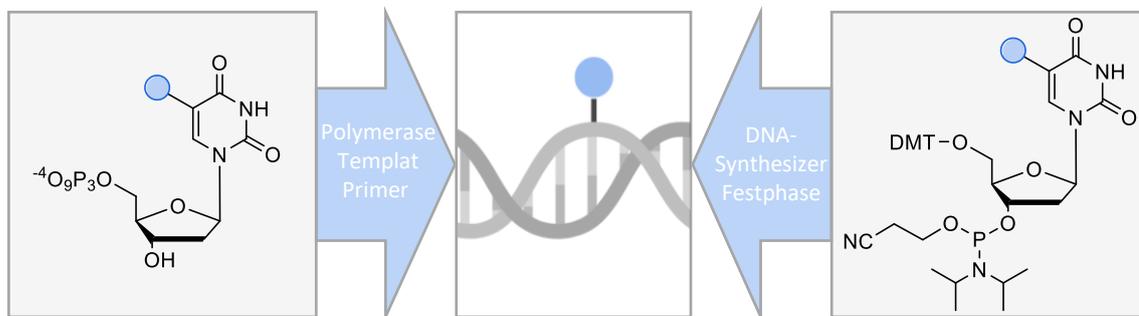


Abbildung 17: Einführung von modifizierten Nucleosiden in ein Oligonucleotid, enzymatisch mit Hilfe von Polymerasen in Form von Nucleosidtriphosphaten (links) oder synthetisch über DNA-Festphasensynthese mit Phosphoramiditen (rechts).

Bei der Festphasensynthese werden 2'-Desoxynucleoside als Phosphoramidite iterativ an den wachsenden Strang gekuppelt, welcher auf einem festen Trägermaterial angebracht ist.¹⁴⁴ Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Position des modifizierten Nucleosids in der Basensequenz exakt definiert werden kann.^{25, 144} Problematisch sind jedoch die harschen Bedingungen der einzelnen Syntheseschritte, wie beispielsweise die saure Abspaltung der Schutzgruppen, da viele bekannte chemische Reporter unter diesen Bedingungen nicht stabil sind.²⁵ Zwar gibt es Ansätze das Syntheseprotokoll an die Toleranz einzelner Gruppen anzupassen, wie GUIANVARC'H *et al.* am Beispiel eines Nucleosids mit einer Cyclopropen-Gruppe in 2'-Position zeigen konnten, jedoch wurden solche Protokolle nur in Ausnahmefällen entwickelt.¹³⁹

Die Alternative zur Festphasensynthese stellen enzymatische Methoden dar, bei welchen die modifizierten 2'-Desoxynucleoside in Form von Triphosphaten von Polymerasen in ein Oligonucleotid eingefügt werden. Wichtig bei der enzymatischen Synthese ist, dass die Modifikation des Nucleotids von der Polymerase toleriert wird. Prinzipiell können Modifikationen an der Riboseeinheit, dem Phosphatrückgrat oder der Base angebracht werden,

jedoch werden nur letztere von Polymerasen gut akzeptiert und führen zu einem effizienten Einbau.¹⁴⁵ Bei einer Modifikation der Base kommen nur Positionen in Frage, die nicht an der Watson-Crick-Basenpaarung beteiligt sind.¹⁴⁵ Für Pyrimidine wird dabei meist die C5-Position gewählt, da Modifikationen an dieser Stelle in die große Furche der DNA ragen und so deren helikale Struktur nicht verzerren.^{25, 145-147} Das Äquivalent bei den Purinen ist die N7-Position. Jedoch entsteht bei Funktionalisierung des Stickstoff-Atoms eine positive Ladung, welche eine Depurinierung begünstigt. Daher wird hier das Stickstoffatom meist durch ein Kohlenstoff ausgetauscht.^{25, 144, 147} Bezüglich der Art der verwendeten Polymerase gibt es zudem Selektivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Polymerasen-Familien. Die Zuteilung einer Polymerase zu einer bestimmten Familie beruht dabei auf dem strukturellen Aufbau des Enzyms. Es konnte gezeigt werden, dass Polymerasen der B-Familie im Vergleich zur der A-Familie toleranter gegenüber Modifikationen sind, was auf die strukturellen Unterschiede zwischen den Familien zurückzuführen ist.^{145, 148}

Der enzymatische Einbau der modifizierten Nukleotide kann in Form von Primerverlängerungs (PEX)-Experimenten durchgeführt werden.²⁵ Hierbei handelt es sich um eine verkürzte Version einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei der nur ein einzelner Zyklus durchlaufen wird. Benötigt werden ein Templat-Strang mit der gewünschten Sequenz und ein komplementärer, verkürzter Primer, dessen Ende der Ansatzpunkt der Polymerase ist. Nach Hybridisierung der beiden Stränge verlängert die Polymerase den Primer entsprechend der Basenabfolge des Templats. Sie verwendet dazu die natürlichen 2'-Desoxynukleotide, welche der Probenlösung zugefügt werden. Bei Austausch eines der natürlichen Triphosphate durch ein modifiziertes Nukleotid derselben Base wird letzteres an den jeweiligen komplementären Positionen eingebaut (Abbildung 18).



Abbildung 18: Schematische Darstellung eines PEX-Experiments. Templat und Primer werden hybridisiert und der Primer mit Hilfe einer Polymerase verlängert. Diese kann zu Elongation natürliche (dNTPs) oder modifizierte Nukleotide (◉-dNTP) verwenden, wodurch modifizierte Basen enzymatisch in den Strang eingefügt werden können.

Da auch die Polymerase von Beginn an in der Reaktionsmischung enthalten ist, werden analog zur PCR thermostabile Polymerasen verwendet, die auch bei den hohen Hybridisierungstemperaturen intakt bleiben. Um die Entfernung der modifizierten Base durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität bzw. *proof-reading* Funktion der Polymerase zu vermeiden, werden zudem Polymerasen gewählt, die diese nicht besitzen oder sie nachträglich entfernt

wurde.^{18, 121} Häufig eingesetzte Polymerasen sind unter anderen die Deep Vent (exo-), die HemoKlen Taq oder auch die KOD-DNA-Polymerase.^{106, 133, 149} Die Primerverlängerung ermöglicht es, modifizierte Nukleoside unter milden Bedingungen in DNA einzufügen. Es können zudem lange Oligonukleotide von über 100 Basenpaaren synthetisiert werden. Ein Hindernis hierbei ist jedoch, dass es insbesondere bei langen Sequenzen kaum möglich ist, nur eine einzelne modifizierte Base einzufügen, sondern diese wird entsprechend der Sequenz des Templats an allen Positionen mit der korrekten Basenpaarung inkorporiert.²⁵

Sowohl mit der enzymatischen als auch der synthetischen Methode ist es möglich modifizierte Nucleobasen in DNA einzufügen. Die beiden Methoden weisen dabei jedoch signifikante Unterschiede auf, unter anderem in Bezug auf die Art der Modifikationen, die toleriert werden oder auch die Genauigkeit der Modifikationsposition. Die Wahl der Methode muss daher individuell, basierend auf den jeweiligen Anforderungen getroffen werden.

2.6 Markierung von DNA *in vivo*

Zur Inkorporation des chemischen Reporters in ein Biomolekül *in vivo* ist die metabolische Markierung der eleganteste Weg, welcher der idealen bioorthogonalen Markierung am nächsten kommt. Hierbei wird dem Organismus ein modifiziertes Substrat verabreicht und dieses vom Organismus selbst metabolisiert und in das entsprechende Biomolekül eingefügt. Im Fall der bioorthogonalen Markierung von DNA bedeutet dies, dass der Zelle ein mit dem chemischen Reporter modifiziertes 2'-Desoxynucleosid zur Verfügung gestellt wird und sie dieses selbständig aufnimmt, phosphoryliert, in den Nucleus transportiert und dort in die genomische DNA einfügt. Anschließend kann eine bioorthogonale Markierung durchgeführt werden (Abbildung 19).¹⁴³

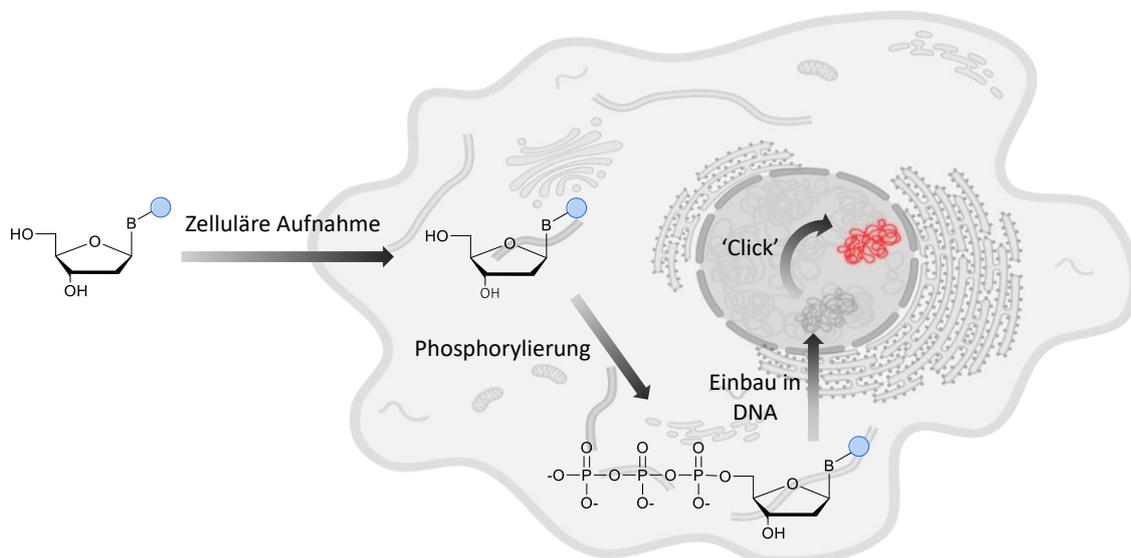


Abbildung 19: Schematische Darstellung der metabolischen Markierung von 2'-Desoxynucleosiden, die mit einem chemischen Reporter (blau) modifiziert sind.

Die Schwierigkeit dieser Methode besteht darin, dass das modifizierte Nucleosid nicht wie bei der Primerverlängerung nur von der Polymerase, sondern von allen an der Metabolisierung beteiligten Enzymen akzeptiert werden muss. Hierbei ist insbesondere die Nucleosidmonophosphat (NMP)-Kinase, welche für den ersten Phosphorylierungsschritt zuständig ist, aufgrund ihrer hohen Substratspezifität empfindlich gegenüber modifizierten Substraten.¹⁵⁰ Ähnlich zu vielen Polymerasen hat jedoch auch die Uridin-Cytidin-Kinase eine offene Tasche an der C5-Position der Base bzw. die Adenosin-Kinase an Position N7, was SPITALE *et al.* anhand einer Kristallstrukturanalyse zeigen konnten.¹⁵¹ Im Jahr 2008 demonstrierten SALIC und MITCHISON erstmals die bioorthogonale metabolische Markierung von DNA mittels CuAAC *in cellulo*.¹⁵² Sie verwendeten dazu ein 2'-Desoxyuridin, welches an der C5-Position mit einem terminalen Ethinylrest modifiziert wurde (EdU, Abbildung 20). Problematisch war aber neben

der Zytotoxizität des Kupferkatalysators auch die hohe Zytotoxizität von EdU, welches unter anderem Schäden an der DNA verursacht.¹⁵³ LUEDTKE *et al.* konnten mit einem 5-azidmodifizierten 2'-Desoxyuridin (AmdU, Abbildung 20) erstmals die metabolische Markierung in Kombination mit SPAAC zeigen.¹²⁴ Die große sterische Hinderung des Cyclooctins führte hierbei jedoch dazu, dass eine effiziente Markierung erst bei vorheriger Denaturierung der zellulären DNA möglich war. Eine mögliche Alternative stellt die iEDDA-Reaktion dar, welche wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben einige entscheidende Vorteile bietet. LUEDTKE *et al.* beschrieben im Jahr 2014 erstmals die metabolische Inkorporation von 5-Vinyl-2'-desoxyuridin (VdU, Abbildung 20) mit anschließender Markierung der zellulären DNA mittels iEDDA-Reaktion.¹²³ VdU ist im Vergleich zu EdU weniger toxisch, aber von ähnlicher räumlicher Ausdehnung und wird so von den metabolisierenden Enzymen hinreichend toleriert. Die Kinetik einer iEDDA-Reaktion mit VdU weist jedoch, wie auch die SPAAC, Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $k_2 = 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf, was zur Visualisierung hoch dynamischer Prozesse in der Zelle oft nicht ausreichend ist.¹²³

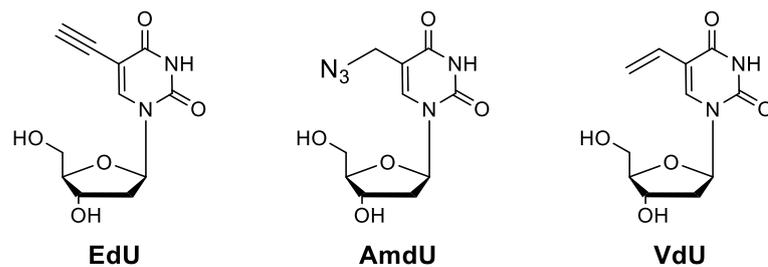


Abbildung 20: Überblick über modifizierte 2'-Desoxynukleoside, die über metabolische Markierung in zelluläre DNA eingefügt und visualisiert werden konnten.

Eine Beschleunigung der Reaktion könnte die Verwendung reaktiverer chemischer Reporter bewirken, jedoch sind größere funktionelle Gruppen aufgrund der hohen Substratspezifität der beteiligten Enzyme, insbesondere der NMP-Kinase problematisch. Eine Studie von WAGENKNECHT *et al.* zeigte, dass die Effizienz der metabolischen Markierung mit steigender Größe des chemischen Reporters abnimmt.⁹ Ein verbesserter Einbau konnte durch die Verwendung eines Zellmediums ohne den Zusatz natürlicher Nukleoside erzielt werden. Jedoch konnte auch so für sterisch hindernde Gruppen, wie Norbornene, keine effiziente Markierung erreicht werden.⁹ Es wird aktuell aktiv an Methoden gearbeitet, mit denen die metabolische Markierung auch mit größeren funktionellen Gruppen möglich ist.

Ein Ansatz ist es, einen oder mehrere Phosphorylierungsschritte, welche die Effizienz der Markierung maßgeblich beeinflussen, zu umgehen. Hierbei ist beispielsweise die Einführung von maskierten Triphosphaten eine verfolgte Methode.¹⁵⁴ KRAUS *et al.* stellten außerdem im Jahr 2018 einen synthetischen Nukleosid-Triphosphat-Transporter (SNTT) zum Transport von

Nukleotiden über die Zellmembran vor, welcher auch kommerziell verfügbar ist.¹⁵⁵ Nukleotide können anders als Nucleoside aufgrund ihrer hohen Polarität die Zellmembran nicht ohne ein Transportmittel überqueren. Der Transporter setzt sich zusammen aus einer Cyclodextrin-Einheit, welche selektiv Triphosphate einschließen kann und einer langen Arginin-Capronsäure-Kette als zellpenetrierendes Agens. Nach Passieren der Zellmembran kann das modifizierte Nucleotid im Komplex mit SNTT durch die in der Zelle im Überschuss vorliegenden natürlichen Nucleotide ausgetauscht und anschließend in die DNA inkorporiert werden (Abbildung 21).¹⁵⁵

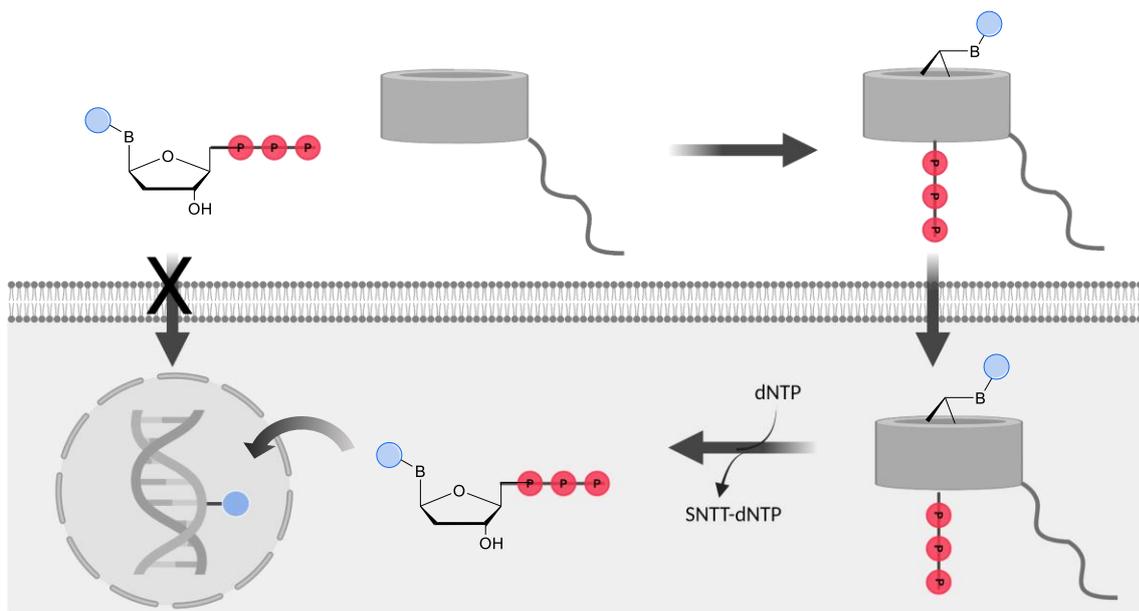


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Transports von modifizierten Nucleotiden über die Zellmembran mit Hilfe des SNTTs.

KRAUS *et al.* konnten mit Hilfe fluoreszenter Nucleotide den effizienten Transport mit SNTT in verschiedene Zelltypen und den Einbau in die naszierende DNA zeigen.¹⁵⁵ Zusätzlich war der Transport von TCO und BCN-modifizierten Nucleotiden möglich, welche mittels iEDDA-Reaktion in lebenden Zellen markiert werden konnten.¹⁵⁶ Limitierend ist hierbei allerdings, dass nur Nucleotide bei denen die Modifikation über einen langen Polyethylenglycollinker angebracht war effizient inkorporiert bzw. markiert werden konnten.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die metabolische Markierung mit Hilfe modifizierter Nucleoside eine vielsprechende Visualisierungsmethode von DNA *in vivo* darstellt. Aufgrund der hohen Substratspezifität der an der Metabolisierung beteiligten Enzyme ist die Art der Modifikation, die über diese Methode eingeführt werden können, jedoch derzeit noch limitiert. Die Suche nach Lösungen für diese Problematik ist ein wichtiger Bestandteil aktueller Forschung.

3. THEMENSTELLUNG

Diese Arbeit hat zum Ziel, die duale bioorthogonale Markierung von DNA mit Hilfe isomerer Cyclopropene zu ermöglichen. Cyclopropene als chemische Reporter bieten aufgrund ihrer geringen Größe einen entscheidenden Vorteil in Bezug auf Bioorthogonalität und stellen einen optimalen Kompromiss aus Reaktivität und Stabilität in zellulärer Umgebung dar. Aufgrund der Reaktivitätsunterschiede von 1- und 3-Methylcyclopropen, eignen sich diese auch zur dualen bioorthogonalen Markierung und können dadurch neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. In dieser Arbeit soll daher ein Konzept zur dualen Markierung mittels orthogonaler iEDDA- und Photoclick-Reaktion nach metabolischer Inkorporation cyclopropenmodifizierter Nukleoside als chemische Reporter in genomische DNA entwickelt werden (Abbildung 22).

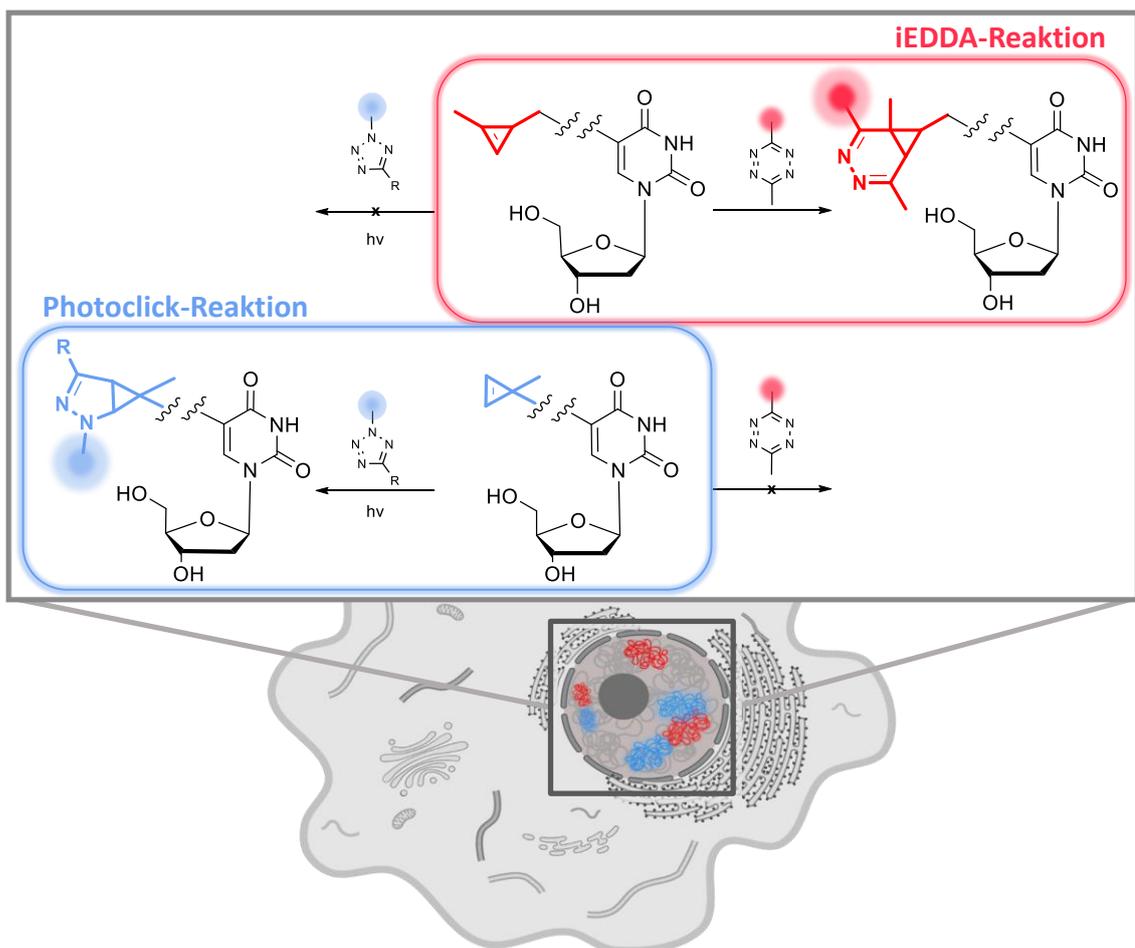


Abbildung 22: Duale bioorthogonale und orthogonale Markierung von DNA basierend auf 1- und 3-methylcyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynukleosiden als chemische Reporter.

Die orthogonale Anwendung der cyclopropenbasierten iEDDA- und Photoclick-Reaktion soll dabei zunächst anhand methylcyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynucleoside *in vitro* untersucht werden. Hierzu sollen 1-methylcyclopropenmodifizierte 2'-Desoxynucleoside mit unterschiedlicher Linkerstruktur und angeknüpfter Base synthetisiert und diese in Bezug auf Kinetik und Ausbeute in einer iEDDA-Reaktion charakterisiert werden. Die Reaktivität der Derivate kann anschließend mit bekannten 3-methylcyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynucleosiden verglichen und so eine Grundlage für eine spätere Anwendung zur dualen Markierung *in vivo* erarbeitet werden. Die optimierten 1- und 3-methylcyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynucleoside sollen anschließend in ein Oligonucleotid eingefügt und dieses mittels iEDDA- sowie Photoclick-Reaktion markiert werden. Hierbei sollen die beiden Reaktionen zunächst einzeln und anschließend nach Möglichkeit auch in Kombination durchgeführt werden, um so die Orthogonalität der Reaktionen auch auf DNA-Ebene zu untersuchen. Im letzten Teil des Projekts soll die Markierung in zellulärer Umgebung betrachtet werden. Hierzu sollen die cyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynucleoside metabolisch in die genomische DNA von Zellen inkorporiert und so deren Akzeptanz durch die zellulären Enzyme ermittelt werden. Die zelluläre DNA soll anschließend zunächst einzeln mittels Photoclick und iEDDA-Reaktion und final mit beiden Reaktionen dual markiert werden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Design cyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynukleoside mit orthogonaler Reaktivität

Im ersten Teil der Arbeit wurden 1-methylcyclopropenmodifizierte 2'-Desoxynukleoside entwickelt, welche sich für die bioorthogonale Markierung von DNA und auch eine duale Markierung mittels orthogonaler iEDDA- und Photoclick-Reaktion eignen. Der strukturelle Aufbau dieser 2'-Desoxynukleoside sollte sich dabei an der geplanten Anwendung orientieren.

Zur Verknüpfung von 1-Methylcyclopropen (1-MCP) mit dem 2'-Desoxynukleosid wurde eine elektronenreiche Carbamat- oder Harnstoff-Gruppe gewählt. Deren elektronenschiebende Wirkung kann sich, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, beschleunigend auf die Geschwindigkeit der iEDDA-Reaktion auswirken. Zusätzlich wurden unterschiedlich lange Alkylketten zwischen Cyclopropen-Funktion und DNA-Base eingefügt, wodurch der Einfluss unterschiedlicher Abstände von DNA und chemischem Reporter auf die bioorthogonale Markierung untersucht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu eine Methyl- und eine Propylgruppe gewählt. Um eine bestmögliche Akzeptanz des modifizierten 2'-Desoxynukleosids durch die zellulären Enzyme für eine spätere Anwendung *in vivo* zu erzielen, sollte die Modifikation an der 5-Position eines 2'-Desoxyuridins angebracht werden. Außerdem wurde die 7-Position von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin zu Modifizierung gewählt, wodurch der Einfluss der Base auf die Reaktionskinetik aber auch die Akzeptanz durch metabolisierende Enzyme untersucht werden kann.

Die iEDDA-Reaktion der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside soll orthogonal zu einer Photoclick-Reaktion bereits bekannter 3-Methylcyclopropen (3-MCP)-modifizierter 2'-Desoxynukleoside durchgeführt werden.¹⁴² Die 3-MCP Gruppe wurde hierbei über einen elektronenarmen Amid-Linker an die Base angefügt. Dieser ermöglicht eine effiziente Photoclick-Reaktion und senkt gleichzeitig die Reaktivität der Derivate in einer iEDDA-Reaktion. Die unterschiedlichen Bestandteile, die beim strukturellen Aufbau der 1- und 3- MCP modifizierten 2'-Desoxynukleoside berücksichtigt wurden, resultieren in den Zielmolekülen dieser Arbeit **1 – 5** sowie den 3-MCP-modifizierten Derivaten **6**¹ und **7**¹⁴² (Abbildung 23).

¹ Synthetisiert im Rahmen der Masterarbeit von M. Mijic, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.

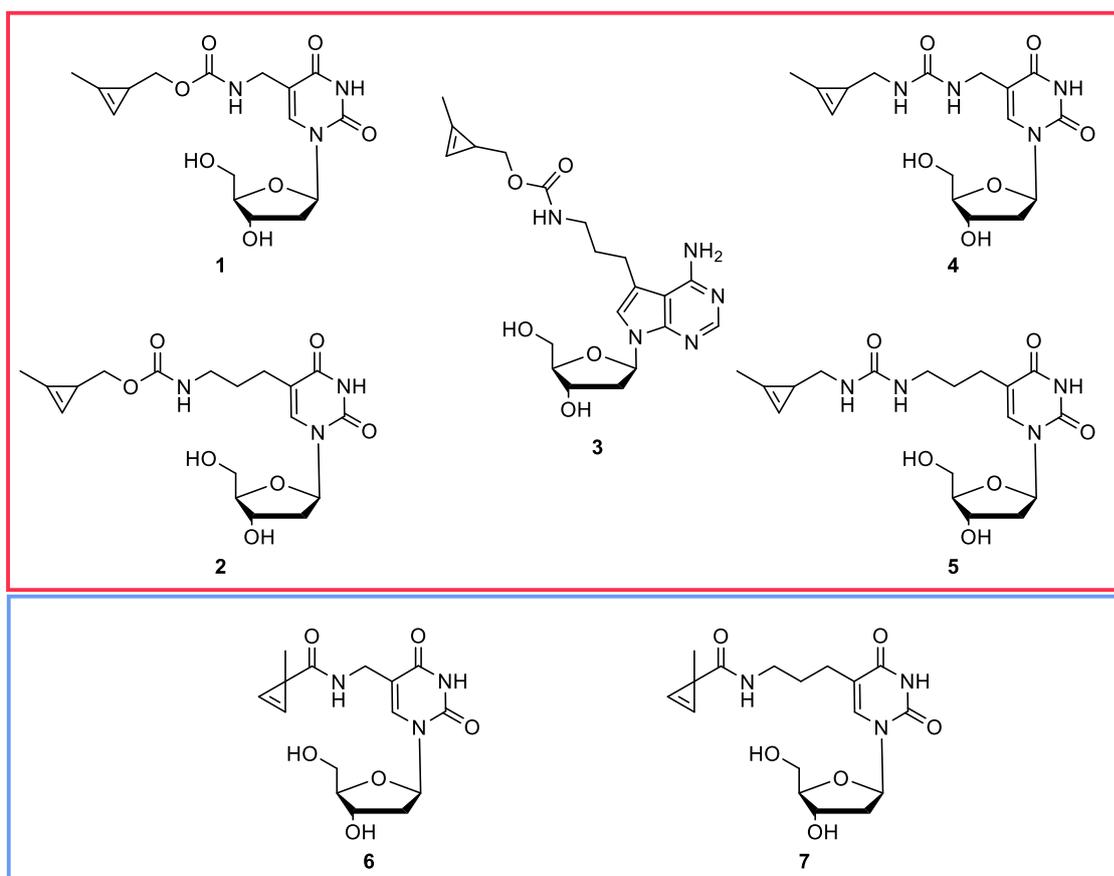
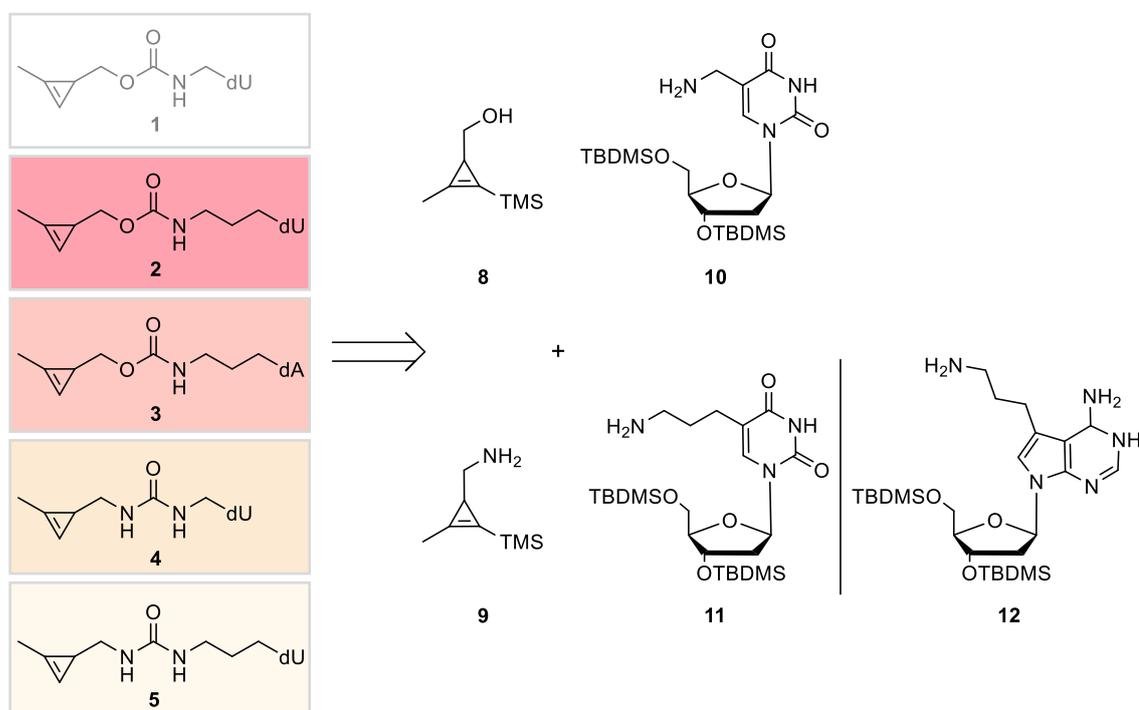


Abbildung 23: 1-Methylcyclopropenmodifizierte 2'-Desoxynukleoside **1** – **5**, welche im Rahmen dieser Arbeit für die bioorthogonale Markierung von DNA mittels iEDDA-Reaktion eingesetzt werden sollen, sowie bekannte¹⁴² 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside **6** und **7** für eine Markierung über Photoclick-Reaktion.

4.1.1 Synthese 1-methylcyclopropenmodifizierter 2'-Desoxynucleoside

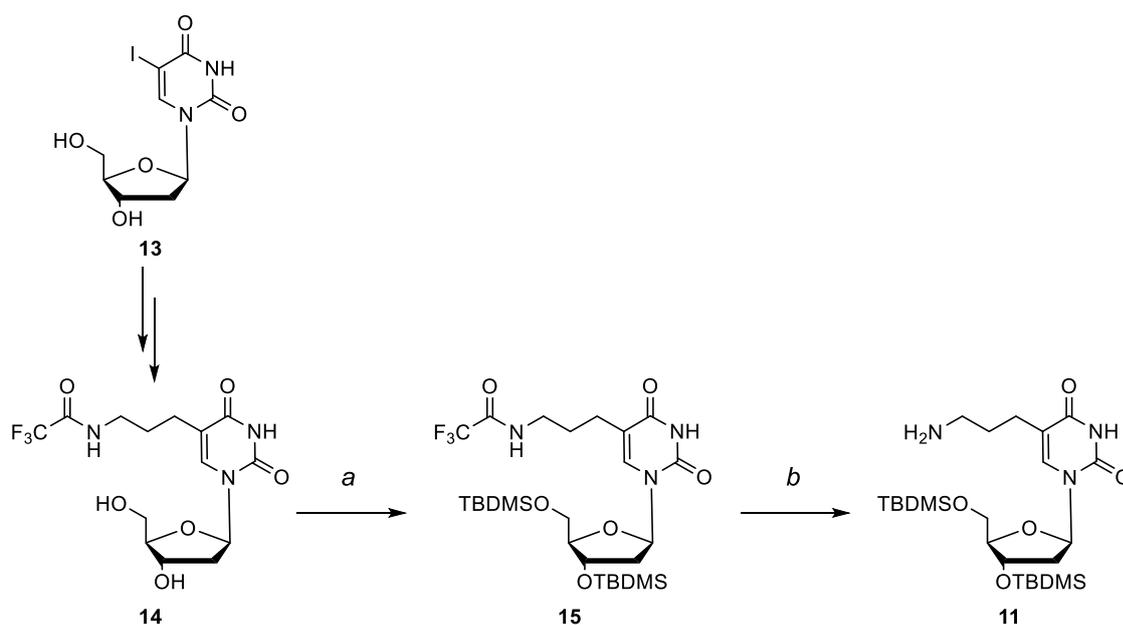
Der modulare Aufbau der angestrebten 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **1** – **5** ermöglicht die Synthese ausgehend von den fünf Grundbausteinen **8** – **12** (Schema 4). Die Cyclopropen-Funktion wurde in Form des Cyclopropenylalkohols **8** oder des Cyclopropenylamins **9** eingeführt, je nachdem ob eine Carbamat- oder eine Harnstoff-Verknüpfung erzeugt werden sollte. Die 2'-Desoxynucleoside wurden als 5-Aminomethyl- und 5-Aminopropyl-2'-Desoxyuridin (**10**) und (**11**) bzw. 5-Aminopropyl-7-Deaza-2'-Desoxyadenosin Baustein **12** synthetisiert. Die Synthese und Charakterisierung von **1** in einer iEDDA- Reaktion wurde bereits beschrieben^{II}, weshalb im Folgenden nur auf **2** – **5** eingegangen werden soll.



Schema 4: Retrosynthese der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **1** - **5** in die Cyclopropen-Bausteine **8** und **9** sowie die 2'-Desoxynucleosid-Bausteine **10** - **12**.

Das 5'-Aminopropyl-2'-desoxyuridin (**11**) wurden nach dem in Schema 5 gezeigten Syntheseweg hergestellt. Ausgehend von 5-Iod-2'-desoxyuridin (**13**) wurde über eine literaturbekannte Syntheseroute die Zwischenstufe **14** synthetisiert.^{9, 160} Anschließend wurden die 3'- und 5'-Hydroxygruppen von **14** mit einer *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Gruppe geschützt und das Amin durch Entfernen der Trifluoracetyl-funktion freigesetzt.

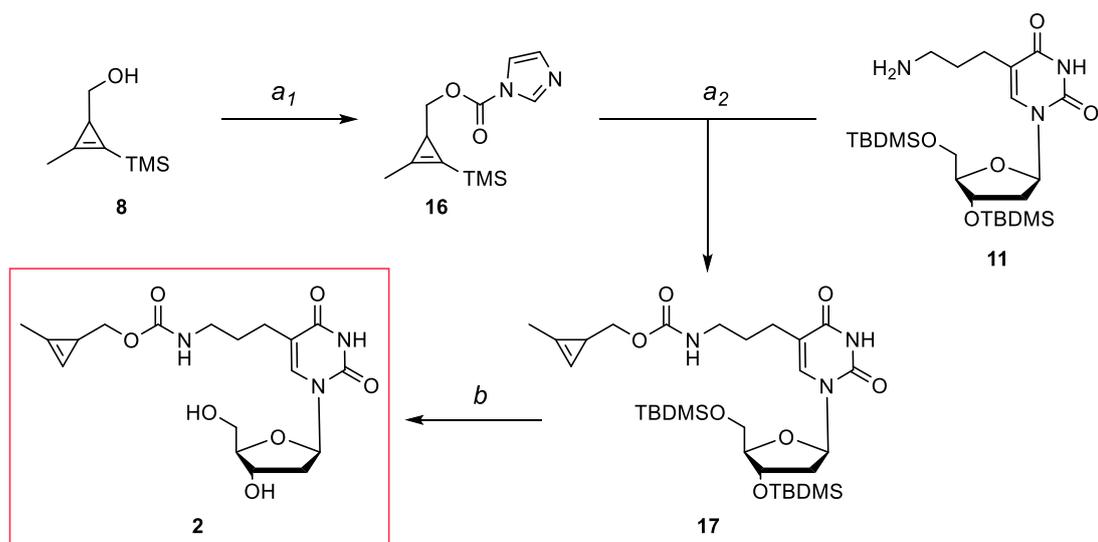
^{II} Durchgeführt im Rahmen der Masterarbeit von N. Seul, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.



Schema 5: Synthese des 5-Aminopropyl-2'-desoxyuridins **11**. a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, 30 °C, 16 h, 91 %; b) NaOH (1 M in H₂O), MeOH, RT, 2 h, 76 %.

Die Einführung der Schutzgruppen an den Hydroxyfunktionen von **14** dient dazu, mögliche Nebenreaktionen dieser in der nachfolgenden Carbamatkupplung zu unterbinden. Die Reaktion wurde ähnlich eines von U. REISACHER entwickelten Protokolls durchgeführt.¹⁶¹ **14** wurde dabei mit drei Äquivalenten TBDMS-Chlorid in Anwesenheit von Imidazol über Nacht bei 30 °C umgesetzt. Nach der Aufreinigung konnte **15** in einer Ausbeute von 91 % erhalten werden. Die abschließende Entfernung der Trifluoracetylgruppe erfolgte unter basischen Bedingungen mit Hilfe von Natriumhydroxid. Im Vergleich zu dem zuvor etablierten Abspaltungsprotokoll, welches über Nacht in wässriger Ammoniak-Lösung durchgeführt wird,¹⁶¹ ist die Reaktion mit Natriumhydroxid bereits nach 2 h abgeschlossen. Zusätzlich konnte die Ausbeute von 56 % auf 76 % erhöht werden.

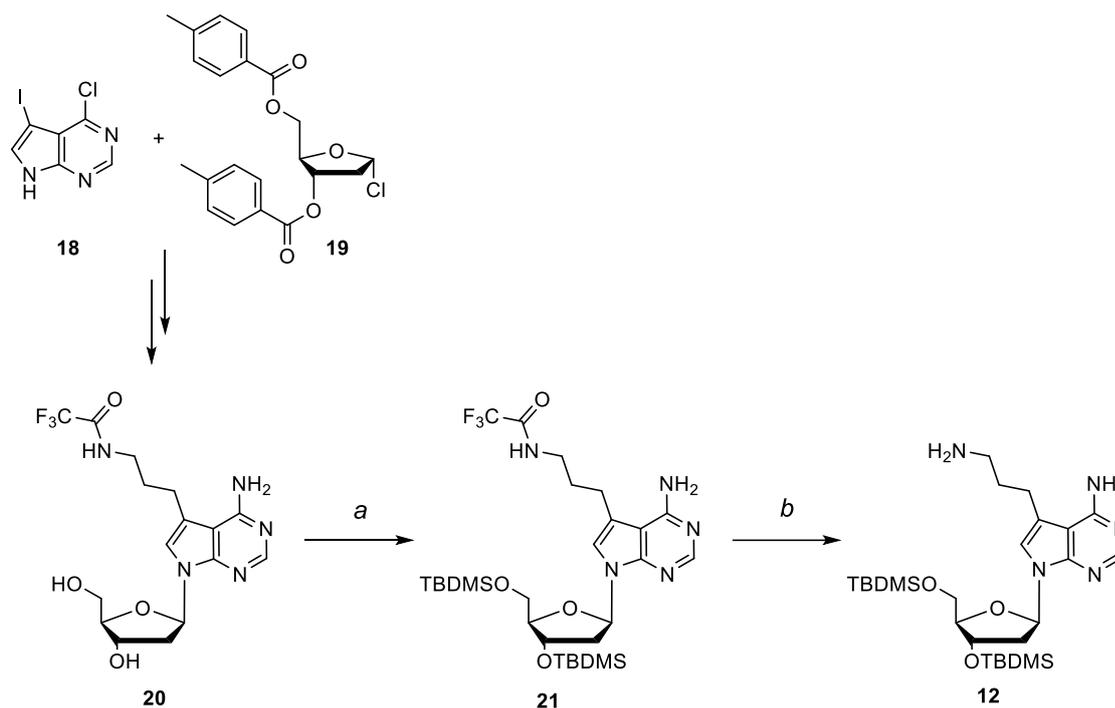
Der Cyclopropenylalkohol **8** wurde entsprechend zuvor publizierter Syntheseprotokolle hergestellt.^{20, 162} **8** und 5'-Aminopropyl-2'-desoxyuridin (**11**) konnten anschließend über den in Schema 6 gezeigten Syntheseweg zu Zielmolekül **2** zusammengefügt werden. Der Cyclopropenylalkohol **8** wurde dabei zunächst *in situ* aktiviert und anschließend mit **11** über eine Carbamatgruppe gekoppelt, wobei Verbindung **17** entsteht. Nach der Abspaltung der Silylgruppen von **17** im zweiten Schritt wurde Zielmolekül **2** erhalten.



Schema 6: Synthese von **2** ausgehend von den Bausteinen **8** und **11**. a_1) Carbonyldiimidazol, THF, RT, 4 h; a_2) DIPEA, THF, RT, 4 d, 76 % über 2 Stufen; b) TBAF (1,00 M in THF), THF, RT 14 h, 93%.

Die Aktivierung des Cyclopropenylalkohols **8** erfolgte mit Hilfe von Carbonyldiimidazol. Aufgrund der Instabilität des aktivierten Zwischenprodukts **16** wurde auf eine Aufarbeitung verzichtet und die Verbindung in einer Carbamat-Kupplung mit dem aminosubstituierten 2'-Desoxyuridins **11** *in situ* umgesetzt. Zur Erhöhung der Nucleophilie der Aminfunktion, wurde diese mit Diisopropylethylamin (DIPEA) deprotoniert. Nachdem das Gemisch vier Tage bei Raumtemperatur gerührt wurde, konnte **17** in einer Ausbeute von 76 % erhalten werden. Die Reaktionszeit könnte möglicherweise durch Erwärmen der Reaktionsmischung verkürzt werden, jedoch ist in dieser Hinsicht die Flüchtigkeit des Cyclopropens **8** problematisch. Abschließend wurden die TBDMS-Gruppen an den 3'- und 5'-Hydroxyfunktionen sowie die TMS-Gruppe, welche das Cyclopropen in den vorherigen Syntheseschritten stabilisiert, entfernt. Hierbei diente Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) als Abspaltungsreagenz. Um überschüssige Fluoridionen in der Reaktionsmischung abzufangen, wurde die Reaktion vor der Aufarbeitung mit Kieselgel versetzt. **2** wurde in einer Gesamtausbeute von 70 % über drei Stufen erhalten.

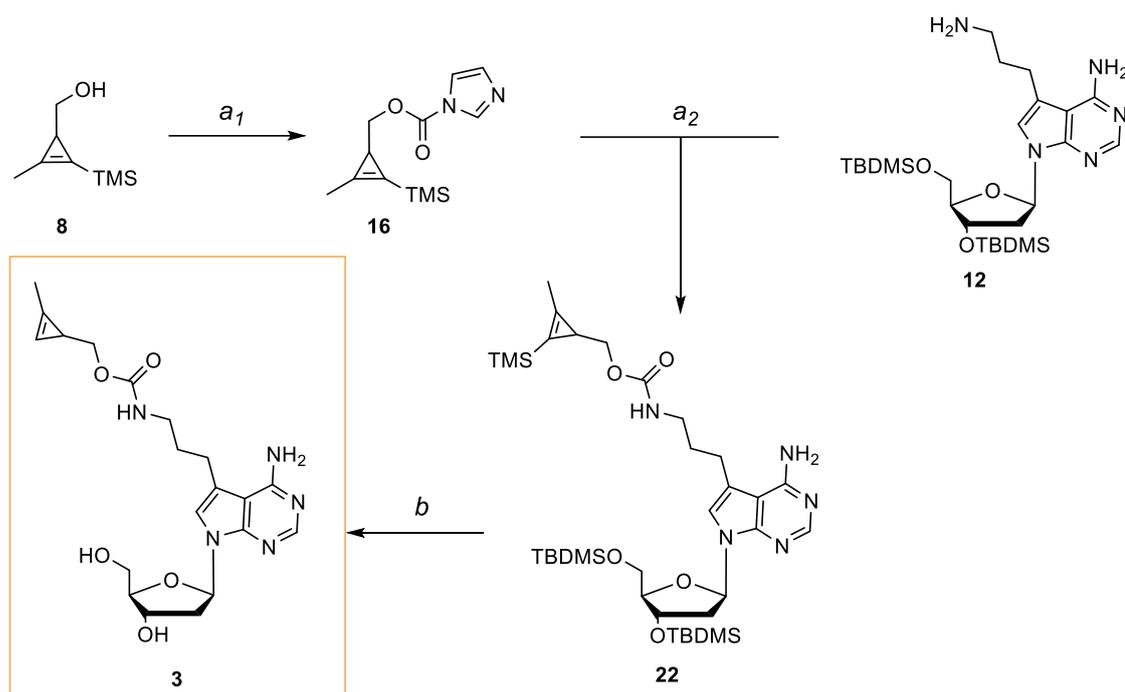
Zur Synthese des 1-MCP-modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosins **3** wurde zunächst der entsprechende aminosubstituierte Nucleosidbaustein **12** nach Schema 7 hergestellt. Die Zwischenstufe **20** wurde über eine literaturbekannte Synthese ausgehend von 7-Deaza-4-chlor-7-iodpurin (**18**) und „Hoffers Chlorzucker“ (**19**) erhalten.¹⁶³ **20** wurde anschließend analog zu dem 2'-Desoxyuridin **11** an den Hydroxyfunktionen geschützt und der Trifluoracetylsubstituent an der Aminfunktion entfernt.



Schema 7: Synthese des 5-Aminopropyl-7-deaza-2'-desoxyuridins (**12**). a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, RT, 16 h, 73 %; b) NaOH (1,00 M in H₂O), MeOH, RT, 2 h, 82 %.

Die 3'- und 5'-Hydroxyfunktionen von **20** wurden mit TBDMS-Gruppen nach Standardbedingungen unter Verwendung von TBDMS-Chlorid und Imidazol geschützt. Im zweiten Schritt wurde das Trifluoracetamid von **21** durch Reaktion mit NaOH in ein Amin umgewandelt, wobei Trifluoracetat als Nebenprodukt entstand. Die Ausbeute der Reaktion beträgt 82 % und liegt dabei in einem ähnlichem Bereich wie die Reaktion des entsprechenden 2'-Desoxyuridins **11**.

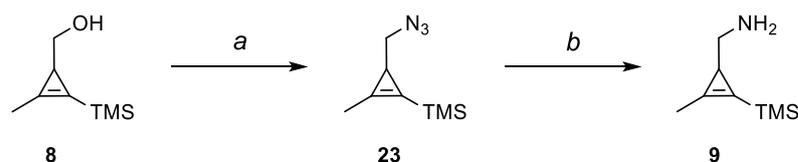
5-Aminopropyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin (**12**) wurde anschließend über eine Cabamatgruppe mit dem Cylopropenbaustein **8** gekoppelt. Die Synthese erfolgte entsprechend Schema 8 zunächst durch Aktivierung des Alkohols *in situ* und anschließende Zugabe des Aminderivats. Das Zielmolekül **3** wurde nach Abspaltung der Silylgruppen erhalten.



Schema 8: Synthese von 1-MCP-modifiziertem 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **3** ausgehend von Cyclopropenylalkohol **8** und dem aminopropylsubstituierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosin Derivat **12**. a_1) Carbonyldiimidazol, THF, RT, 4 h; a_2) DIPEA, DCM, RT, 24 h, 51 % über zwei Stufen; b) TBAF (1,00 M in THF), THF, RT, 24 h, 95 %.

8 wurde analog des entsprechenden 2'-Desoxyuridin Derivats mit Hilfe von Carbonyldiimidazol aktiviert und mit **12** umgesetzt. Das Produkt **22** konnte nach einer Reaktionszeit von 24 h in einer Ausbeute von 51 % erhalten werden. Grund für die moderate Ausbeute könnte unter anderem die Flüchtigkeit der Cyclopropenverbindung sein. Im zweiten Schritt erfolgte die Abspaltung der Silylgruppen von **22** mit einer TBAF-Lösung in THF. Das 1-MCP-modifizierte 7-Deaza-2'-desoxyadenosin **3** wurde mit einer Ausbeute von 48 % über drei Stufen erhalten.

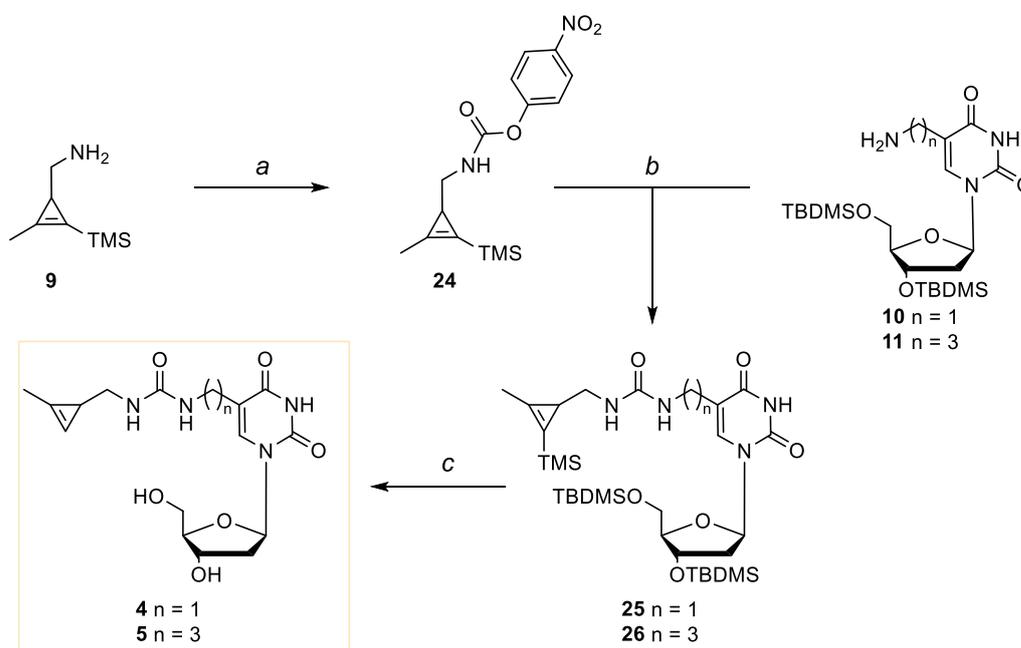
Zur Synthese der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridine **4** und **5**, bei welchen die Modifikation über eine Harnstoff-Gruppe an die Nucleobase angefügt ist, wurde zunächst das Cyclopropenylamin **9** hergestellt. Die Synthese erfolgte dabei nach einer Vorschrift von DEVARAJ *et al.*¹³⁰ Ausgehend von Cyclopropenylalkohol **8** wurde die Hydroxygruppe zunächst durch ein Azid substituiert und dieses anschließend zum entsprechenden Amin **9** reduziert (Schema 9)



Schema 9: Synthese des Cyclopropenamins **9** ausgehend von Cyclopropenalkohol **8**. a) DPPA, DBU, THF, 0 °C zu RT, 16 h; b) PPh_3 , $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (5:1), RT, 16 h, 21 % (über zwei Stufen).

Der indirekte Syntheseweg über das Azid **23** als Zwischenstufe wurde gewählt, da der direkte Umsatz der Hydroxygruppe in ein Amin zu einer Vielzahl an Abbauprodukten führt.¹³⁰ **23** wurde ausgehend von **8** über eine Substitutionsreaktion mit Diphenylazidphosphat in Anwesenheit von Diazabicycloundecen hergestellt. Um Ausbeuteverluste aufgrund der hohen Flüchtigkeit von **23** zu minimieren, wurde das Rohprodukt nur durch Filtration über Kieselgel gereinigt und sofort umgesetzt. Anschließend wurde eine Staudinger-Reduktion mit Triphenylphosphin durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde dabei ein Diethylether-Wasser-Gemisch anstelle des in der Literatur angegebenen Tetrahydrofuran-Wasser-Gemischs verwendet, da Diethylether sich aufgrund seines Siedepunkt besser von dem niedrigsiedenden Produkt **9** abtrennen lässt. Die Gesamtausbeute über zwei Stufen betrug 21 %. Die Flüchtigkeit der Produkte, aber auch der Ausgangsverbindung könnte dabei zu einer Reduktion der Ausbeute geführt haben.

Das Cyclopropenylamin **9** wurde anschließend mit den aminmodifizierten 2'-Desoxyuridinen **10** und **11** entsprechend Schema 10 gekoppelt. Der aminsituiertere Baustein mit einem kurzen Methyllinker **10** wurde zuvor nach einer literaturbekannten Vorschrift von TANG *et al.* hergestellt.¹⁶⁴ Die Aktivierung von **9** im ersten Syntheseschritt wurde mit *p*-Nitrochlorformiat durchgeführt, da dieses bereits erfolgreich zur Synthese harnstoffsubstituierter Glukosederivate eingesetzt werden konnte.¹⁶⁵ Nach der Kupplung erfolgte im zweiten Schritt die Abspaltung der Silylgruppen von **25** bzw. **26**, wodurch die Zielmoleküle **4** und **5** erhalten wurden.

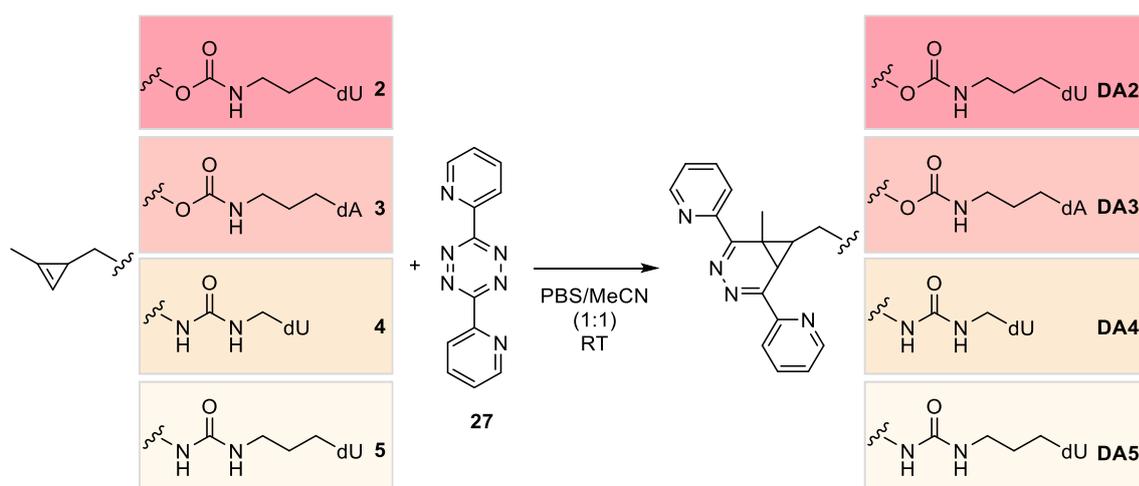


Schema 10: Synthese der harnstoffverknüpften 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridine **3** und **4** ausgehend von Cyclopropenylamin **9** und 5-Aminomethyl- bzw. 5-Aminopropyl-2'-desoxyuridin **11** bzw. **12**. a) *p*-Nitrophenylchlorformiat, Pyridin, DCM, 0 °C zu RT, 16 h, 66 %; b) DIPEA, DCM, RT, 16 h, 75 % ($n=1$), 94 % ($n=3$); c) TBAF-Hydrat, THF, 16 h, 75 % ($n=1$), 63 % ($n=3$).

Der Umsatz von **9** mit *p*-Nitrophenylchlorformiat erfolgt über Nacht in Anwesenheit von Pyridin, wobei Verbindung **24** erhalten wurde. Diese kann durch basenkatalysierte Eliminierung ein intermediäres Isocyanat ausbilden, welches mit einem Amin zu einem Harnstoff reagieren kann.¹⁶⁵ Anders als für die carbamatverknüpften Derivate **2** und **3** wurde die aktivierte Verbindung **24** zunächst isoliert, um die Ausbildung der unerwünschten symmetrisch substituierten Harnstoffverbindung mit **9** zu unterbinden. Die Kupplung von **24** mit den 5-Aminomethyl- bzw. 5-Aminopropyl-2'-Desoxyuridinen **10** bzw. **11** erfolgte über Nacht mit Hilfe von DIPEA. Die finale Abspaltung der Silylgruppen von **25** bzw. **26** wurde analog zu den carbamatverknüpften Derivaten zunächst mit einer 2 M TBAF-Lösung in Tetrahydrofuran durchgeführt. Jedoch konnte hierbei das Produkt nicht isoliert werden. Bei Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid konnte nur eine Abspaltung der TBDMS-Gruppen, jedoch nicht der TMS-Funktion, beobachtet werden. Letztere ließen sich auch nachfolgend nicht mit Kaliumcarbonat entfernen. Erst bei Verwendung von festem TBAF-Hydrat konnte das gewünschte Molekül isoliert werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei Entfernung der TMS-Gruppe zusätzlich eine Protonenquelle benötigt wird, um das Kohlenstoffatom des Cyclopropens zu protonieren. Die Zielmoleküle **4** bzw. **5** wurden in einer Gesamtausbeute von 37 bzw. 39 % über drei Stufen erhalten. Ausbeuteverluste könnten möglicherweise aufgrund der mehrfachen Aufreinigungsschritte entstanden sein, die zur Entfernung von in der Probe verbliebenen TBAF-Rückständen nötig waren.

4.1.2 Charakterisierung der iEDDA-Reaktion

Die synthetisierten 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside **2** - **5** wurden anschließend in einer iEDDA-Reaktion eingesetzt, um ihre Anwendungsmöglichkeiten als chemische Reporter für die bioorthogonale Markierung von DNA zu untersuchen. Die jeweiligen iEDDA-Reaktionen wurden in Bezug auf ihre Geschwindigkeit charakterisiert. Hierbei können die unterschiedlichen Linkerstrukturen sowie Nukleobasen verglichen werden. Als Reaktionspartner wurde das dipyridiylsubstituierte Tetrazin **27** gewählt. Es handelt sich hierbei um eine kommerziell erhältliches Modell-Tetrazin, welches häufig zur Untersuchung von iEDDA-Reaktionen *in vitro* eingesetzt wird, wodurch ein Vergleich mit anderen Literaturwerten möglich wird.^{20, 83, 130} **27** kann mit **2** – **5** zu den Diels-Alder Produkten **DA2** – **DA5** reagieren (Schema 11).



Schema 11: Reaktion der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **2** – **5** mit Tetrazin **27** zu den Produkten **DA2** – **DA5**.

Zur Untersuchung der iEDDA-Reaktion wurden das jeweilige 1-MCP-modifizierte 2'-Desoxynucleosid sowie Tetrazin **27** in äquimolarer Konzentration in ein 1:1-Gemisch von Acetonitril und phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gegeben und die Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reagenzien wurden hierbei in Form einer 20-fach konzentrierten Stammlösung in DMSO eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 10 h wurde das Gemisch mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) analysiert. Um apparative Schwankungen in der Analyse auszugleichen, wurde der Reaktionsmischung außerdem Thymidin als interner Standard (IS) zugesetzt.

Das Chromatogramm der Reaktionsmischung von **2** und **27** zeigt im Vergleich zu den Chromatogrammen der Edukte **2** und **27** einen neuen Peak bei 28,5 min (Abbildung 24). Dieser konnte mittels LC-MS dem Reaktionsprodukt **DA2** zugeordnet und somit eine erfolgreiche Click-Reaktion nachgewiesen werden. Zusätzlich sind Peaks bei 25,7 min, 27,3 min sowie 32,4 min zu erkennen. Letzterer ist auch im Chromatogramm der Eduktlösung neben dem Peak von **2** bei 25,5 min zu finden. Eine LC-MS Analyse zeigte, dass es sich hierbei um ein Dimer von **2** handelt. Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, kann es bei reaktiven Cyclopropenen zu einer Dimerisierung bzw. Polymerisierung kommen. Eine partielle Dimerisierung wurde bereits für das 1-MCP-modifizierte 2'-Desoxyuridin **1** beschrieben, diese fand jedoch nur für ungelöste Proben bei Luft- oder Wärmeeinwirkung statt. In Lösung ließ sich über einen Zeitraum von sieben Tagen keine Veränderung des Dimer-Anteils feststellen.ⁱⁱⁱ Da die bioorthogonale Markierung nur in Lösung und zusätzlich mit geringen Konzentrationen durchgeführt wird, ist die Wahrscheinlichkeit der Dimerisierung hierbei gering und schränkt daher die Anwendungsmöglichkeiten der

ⁱⁱⁱ Untersucht im Rahmen der Masterarbeit von N. Seul, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.

Verbindungen als chemischer Reporter nicht zwangsläufig ein. Die Peaks bei 27,3 min bzw. 25,7 min konnten **27** bzw. einem Hydrolyseprodukt von **27** mittels LC-MS zugeordnet werden. Zusätzliche Peaks, welche auf unerwünschte Nebenprodukte der Reaktion hindeuten, sind im Chromatogramm der Reaktionsmischung nicht zu finden. In Kombination mit dem vollständigen Umsatz von **2** innerhalb der Reaktionszeit lässt dies eine selektive Reaktion mit hoher Ausbeute vermuten, wodurch wichtige Kriterien der bioorthogonalen Markierung erfüllt werden.

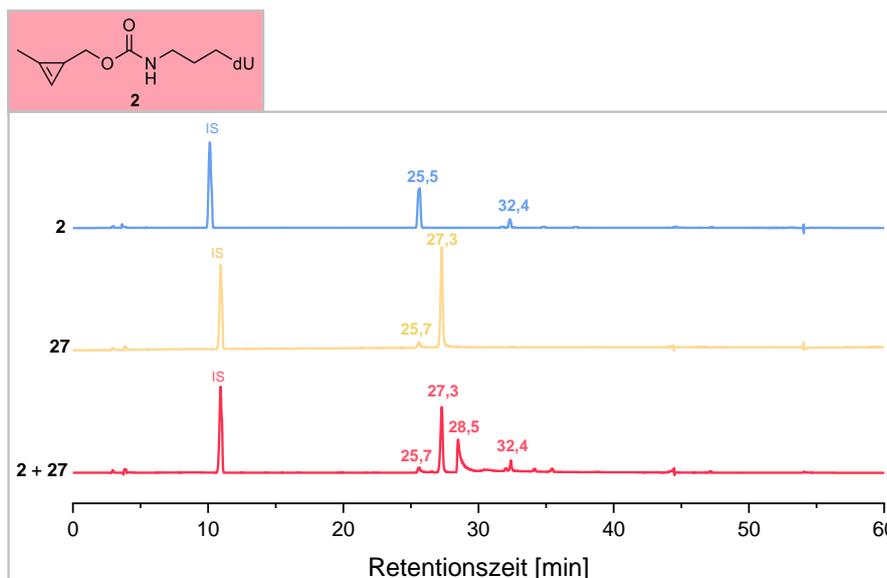


Abbildung 24: Chromatogramme einer Lösung von **2** (0,50 mM; blau), **27** (0,50 mM; gelb) sowie **2 + 27** (jeweils 0,50 mM; rot) in PBS/MeCN (1:1), nach Inkubation von 10 h bei Raumtemperatur. Trennmethode: 0 – 30 % MeCN in H₂O über 30 min (Kapitel 6, Tabelle 2).

Zur genaueren Betrachtung der iEDDA-Reaktion von **2** und **27** wurde außerdem der Verlauf über mehrere Stunden verfolgt. Hierzu wurde die Reaktion, wie im vorherigen Absatz beschrieben, durchgeführt und unmittelbar nach der Zugabe der Reaktanden sowie jede darauffolgende Stunde mittels RP-HPLC analysiert (Abbildung 25). In den erhaltenen Chromatogrammen ist der Peak des 2'-Desoxynucleosids **2** nach einer Reaktionszeit von 5 h vollständig verschwunden. Auch der Peak des Tetrazins **27** zeigt nach diesem Zeitraum keine Veränderung. Das Produkt **DA2** entsteht leicht versetzt und ist nach 8 bis 9 h näherungsweise konstant. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass es sich bei der iEDDA-Reaktion mit Tetrazinen um eine zweistufige Reaktion handelt, bei der das finale Produkt erst durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Stickstoff-Eliminierung gebildet wird. Auffällig ist zudem die partielle Abnahme der Dimer-Peakhöhe im Verlauf der Reaktion, was darauf hindeutet, dass Monomer und Dimer im Gleichgewicht miteinander stehen. Alternativ ist denkbar, dass das Dimer ebenfalls eine Reaktion mit **27** eingeht, jedoch wurde in der LC-MS-Analyse keine entsprechende Produktmasse gefunden.

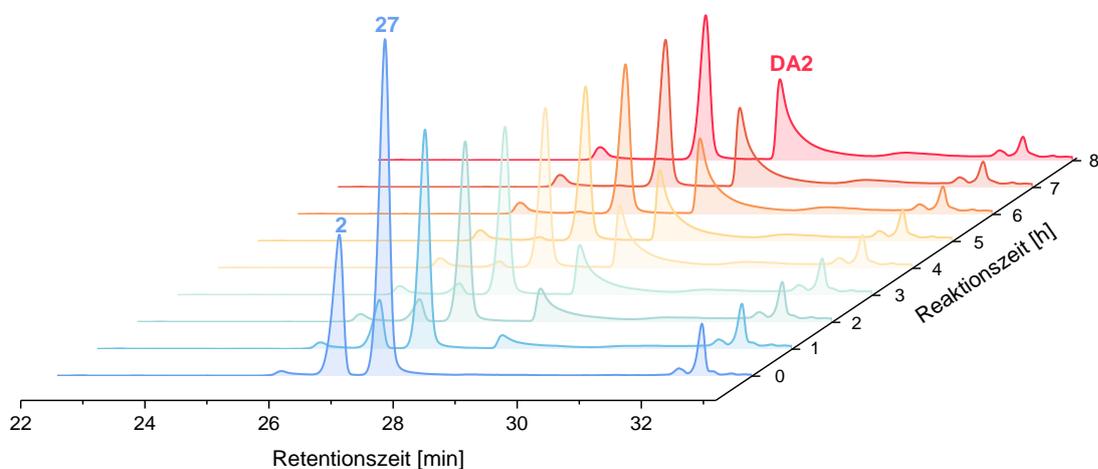


Abbildung 25: Reaktionsverlauf der iEDDA-Reaktion von **2** und **27** zu **DA2** über 8 h. Die Edukte wurden in äquimolarer Konzentration (0,50 mM) in PBS/MeCN (1:1) gemischt und unmittelbar nach der Zugabe der Reaktanden (0 h) sowie jede nachfolgende Stunde mittels RP-HPLC analysiert.

Die Untersuchung der Reaktion des 1-MCP-modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosins **3** mit **27** erfolgte analog der vorhergegangenen Durchführung. Auch hier wurde in der HPLC-Analyse der Reaktionsmischung die Entstehung einer neuen Verbindung detektiert, welche mittels LC-MS als Diels-Alder Produkt **DA3** identifiziert wurde (Anhang Abbildung A1). Der Einsatz von **3** als Substrat ausgestattet mit einem chemischen Reporter für die bioorthogonale Markierung von DNA ist daher ebenfalls denkbar.

Es wurden anschließend die beiden 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridine **4** und **5** mit Harnstoffverknüpfung betrachtet. Das Chromatogramm der Reaktionsmischung von **5** und **27** nach 10 h Reaktionszeit zeigt zwei große Peaks bei 16,5 min sowie 19,0 min, welche in den Chromatogrammen der Edukte nicht zu finden sind (Abbildung 26). Eine LC-MS-Analyse bestätigte, dass es sich bei dem Peak bei 19,0 min um das gewünschte Produkt **DA5** handelt. Die für den Peak bei 16,5 min gefundene Masse entspricht der Masse von **DA5** zuzüglich eines Wassermoleküls. Es könnte sich hierbei möglicherweise um eine Addukt der Harnstoffgruppe mit Wasser handeln.

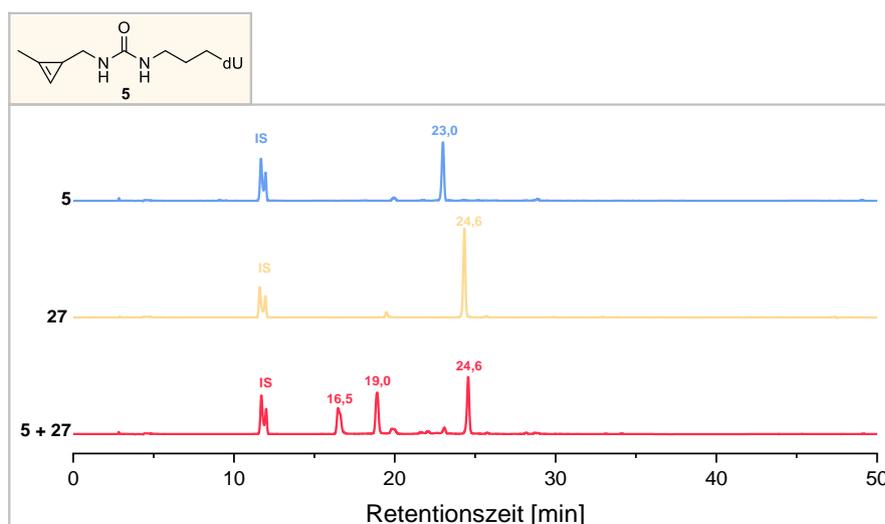


Abbildung 26: Chromatogramme einer Lösung von **5** (0,50 mM; blau), **27** (0,50 mM; gelb) sowie **5 + 27** (0,50 mM; rot) in PBS/MeCN (1:1), nach Inkubation von 10 h bei Raumtemperatur. Trennmethode: 0 – 40 % MeOH (+ 0,1 % TFA) in H₂O (+ 0,1 % TFA) über 30 min (Abschnitt 6, Tabelle 5).

Die Produktbildung wurde über den Reaktionsverlauf 8 h näher betrachtet (Abbildung 27). Hierbei lässt sich erkennen, dass das Nebenprodukt bereits unmittelbar nach der Zugabe der Reaktanden vorliegt und im Laufe der Reaktionszeit abnimmt. Die Peakfläche des Produkts **DA5** nimmt innerhalb des betrachteten Zeitraums zu. Eine Abnahme der Peakhöhe von **5** und Tetrazin **27** erfolgt nur in der ersten Stunde und ist anschließend konstant.

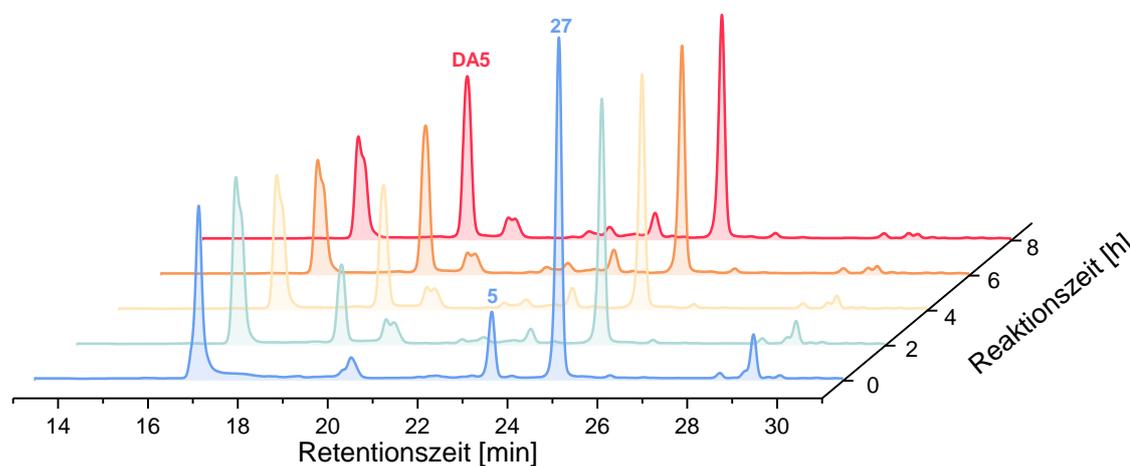


Abbildung 27: Reaktionsverlauf der iEDDA-Reaktion von **5** und **27** über 8 h. Die Edukte wurden in gleicher Konzentration (0,50 mM) in PBS/MeCN (1:1) gegeben und das Gemisch stündlich über RP-HPLC analysiert.

Die Analyse der iEDDA-Reaktion des zweiten harnstoffverknüpften Derivats **4** zeigt einen ähnlichen Verlauf (Anhang Abbildung A2). Auch hier wird das gewünschte Produkt **DA4** sowie ein weiteres Nebenprodukt mit der Masse des Diels-Alder-Produktes zuzüglich Wasser gebildet.

Nachdem alle betrachteten 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside erfolgreich in einer iEDDA-Reaktion angewendet werden konnten, wurden die Reaktionen kinetisch untersucht. Hierzu wurde in den Reaktionsansätzen das jeweilige 2'-Desoxynukleosid in fünffachem Überschuss gegenüber Tetrazin **27** eingesetzt, sodass für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante eine Kinetik pseudo-erster Ordnung angenommen werden kann. Jede Reaktion wurde unmittelbar nach der Zugabe der Edukte sowie jede weitere Stunde mittels HPLC analysiert. Bei Auftragung der normierten HPLC-Peakflächen der Edukte sowie der Produkte gegen die Reaktionszeit lassen sich unterschiedliche Verläufe je nach verwendetem 2'-Desoxynukleosid erkennen (Abbildung 28). Für die beiden harnstoffverknüpften Derivate **4** und **5** ist der Umsatz der Ausgangsmaterialien bereits nach 2 h abgeschlossen während für das carbamatverknüpfte 7-Deaza 2'-desoxyadenosin **3** dazu 4 h bzw. für das 2'-Desoxyuridin **2** 5 h benötigt werden. Die Produktmenge steigt für **3** am schnellsten an. Im Vergleich dazu ist der Anstieg für **2** am langsamsten.

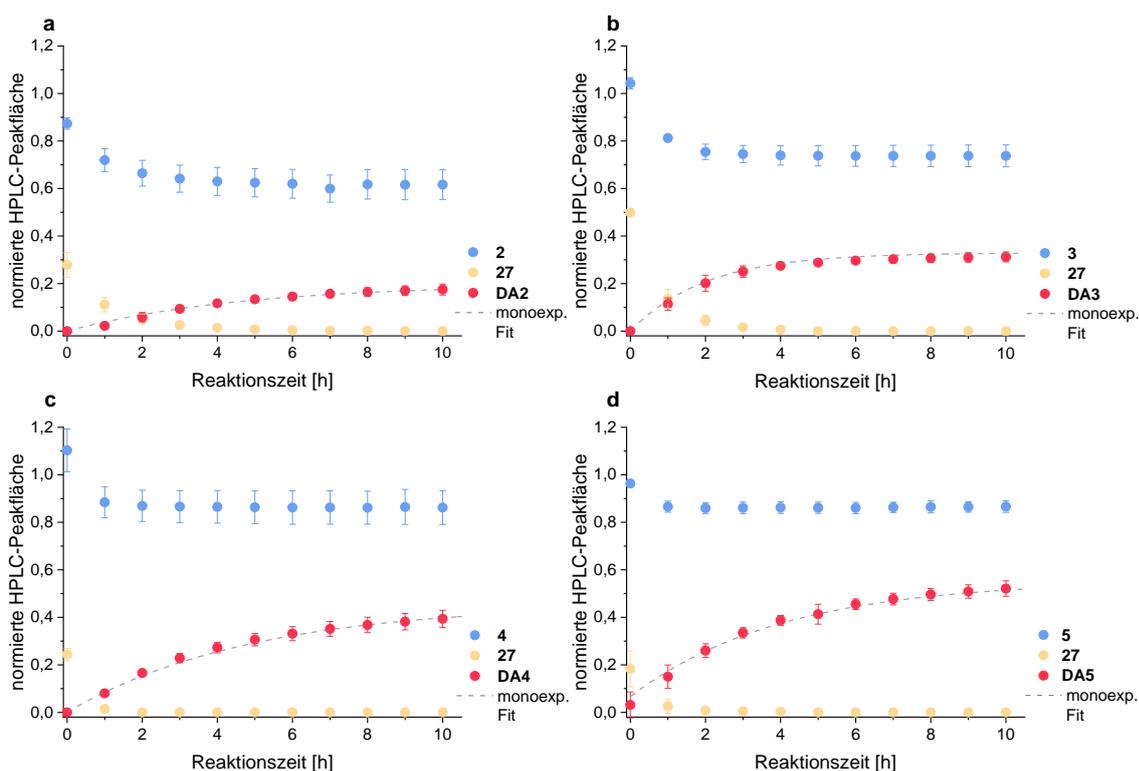


Abbildung 28: Kinetische Analyse der iEDDA-Reaktionen von **27** und den 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden **2** (a), **3** (b), **4** (c) und **5** (d). 0,50 mM Nukleosid wurde in PBS/MeCN (1:1) vorgelegt, 0,10 mM **27** zugegeben und die Reaktionsmischung stündlich via RP-HPLC analysiert. Die HPLC-Peakflächen der einzelnen Komponenten wurden auf den Standard normiert und gegen die Reaktionszeit aufgetragen

Eine quantitative Aussage über die erhaltenen Produktmengen kann an dieser Stelle nicht getroffen werden, da die absolute Peakfläche der jeweiligen Produkte auch abhängig von deren Extinktionskoeffizient sind.

Der Verlauf der Messwerte für die iEDDA-Produkte wurde monoexponentiell angepasst und aus der Krümmung der erhaltenen Funktion mit Hilfe der Konzentration der im Überschuss der vorliegenden Komponente die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 berechnet.¹⁴¹ Die erhaltenen Werte von k_2 für Verbindung **2** bis **5** sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zum Vergleich wurde außerdem die auf analoge Weise bestimmte Geschwindigkeitskonstante des 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridins **1** mit Carbamatverknüpfung und einem kurzen Methyllinker aufgeführt.^{IV}

Tabelle 1: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten k_2 der iEDDA-Reaktion von **2** bis **5** mit **27**.

1-MCP-modifiziertes 2'-Desoxynucleosid	k_2 [$M^{-1}s^{-1}$]
1	0,274 ± 0,020
2	0,117 ± 0,010
3	0,268 ± 0,010
4	0,127 ± 0,003
5	0,138 ± 0,010

Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten liegen im Bereich von $k_2 = 10^{-1} M^{-1}s^{-1}$. Im Vergleich zu iEDDA-Reaktionen anderer Dienophile ordnen sich die 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **1** – **5** damit eher im unteren Geschwindigkeitsbereich an. Sie befinden sich jedoch in ähnlicher Größenordnung wie bekannte SPAAC Beispiele, die bereits *in vivo* angewendet werden konnten.^{38, 52} Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, zeichnen sich Cyclopropene nicht als Dienophile mit höchstmöglicher Reaktivität aus, sondern positionieren sich als guter Kompromiss zwischen Reaktivität und Stabilität in zellulärer Umgebung. Die Geschwindigkeitskonstante eines literaturbekannten 1-MCP-Derivats mit einem Carbamat-Linker liegt mit $k_2 = 2,77 M^{-1}s^{-1}$ etwa eine Größenordnung höher.⁸³ Die Cyclopropenylfunktion wurde hierbei jedoch lediglich an einem kurzen Isopropylrest angebracht. Die größere sterische Hinderung der Nucleobase könnte für **1** – **5** zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit geführt haben.

Im Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der carbamatverknüpften Derivate **1** – **3** mit der harnstoffverknüpften Derivaten **4** und **5** erzielen die Carbamat-Derivate abgesehen von **2** höhere Werte. Die höhere Elektronendichte der Harnstoff-Funktion im Vergleich zu einer

^{IV} Ermittelt im Rahmen der Masterarbeit von N. Seul, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.

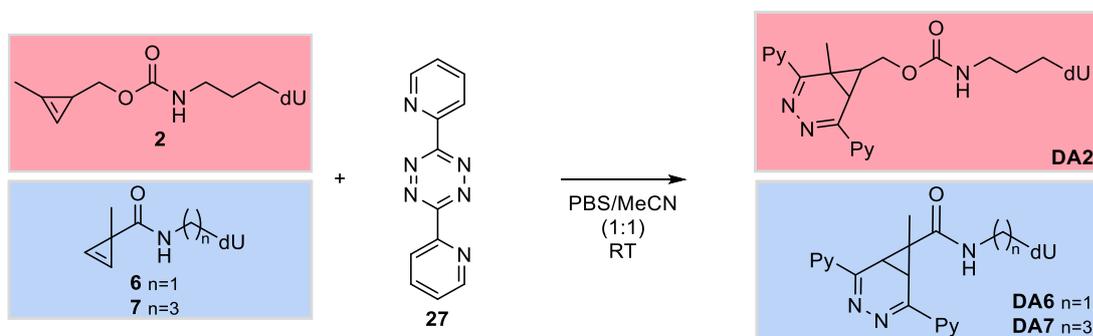
Carbamat-Gruppe ließe eher eine erhöhte Reaktivität dieser Verbindungen erwarten. Zudem zeigten DEVARAJ *et al.*, dass bei Positionierung eines Stickstoffatoms einer Amidgruppe neben der Cyclopropenylfunktion höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden, als mit einem benachbarten Sauerstoffatom einer Carbamat-Gruppe. Die langsamere Produktbildung von **4** und **5** könnte möglicherweise durch die Ausbildung des Nebenprodukts verursacht werden. Bezüglich der Länge der Alkylkette sowie der verwendeten Nucleobase lässt sich keine deutliche Veränderung in den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten erkennen. Diese Faktoren haben folglich in diesem Fall keinen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionskinetik auf Nucleosidebene.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich zwar Unterschiede in der Kinetik zwischen den verwendeten Linkern erkennen lassen, diese sind jedoch nicht signifikant. Die höchsten Geschwindigkeiten wurden mit den carbamatverknüpften Derivaten **1** und **3** erzielt.

4.1.3 Orthogonale Reaktivität von 1- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleosiden

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **2** – **5** zur dualen bioorthogonalen Markierung, wurde deren orthogonale Reaktivität gegenüber den 3-MCP-modifizierten Derivaten **6** und **7** untersucht. Letztere wurden dabei von M. MIJIC und D. HARIJAN bereitgestellt.

Zunächst wurden die Reaktivität der 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside in einer iEDDA-Reaktion mit Tetrazin **27** verglichen. Die Reaktion wurde dazu mit beiden isomeren Cyclopropen Verbindungen einzeln sowie im Gemisch durchgeführt. Für ein Gemisch von 1-MCP Derivat **2** und dem 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynucleosid **6** bzw. **7** können bei Reaktion mit **27** die Produkte **DA2** und **DA6** bzw. **DA7** entstehen (Schema 12).



Schema 12: Schema der iEDDA-Reaktion eines Gemischs von 1-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynucleosid **2** und 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynucleosid **6** bzw. **7** mit **27** zu den Produkten **DA2** und **DA6** bzw. **DA7**.

Die iEDDA-Reaktion wurde hierbei wie im vorherigen Kapitel beschrieben durchgeführt und analysiert. Das Chromatogramm der Reaktionsmischung von 1-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynukleosid **2** und **27** zeigt, analog zu dem vorherigen Abschnitt den Peak des Produkts **DA2** bei 28,5 min. Im Chromatogramm der Reaktionsmischung von 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynukleosid **6** und **27** hingegen lässt sich kein neuer Peak erkennen (Abbildung 29). Dies deutet darauf hin, dass das entsprechende Produkt **DA6** nicht oder nur in geringer Menge gebildet wird, sodass eine Detektion nicht mehr möglich ist. Das Chromatogramm der Reaktionsmischung von **27** und beiden Nukleosiden im Gemisch entspricht einer Überlagerung der Chromatogramme der Reaktionsmischung der einzelnen Nukleoside (Abbildung 29). Auch hier lässt sich kein Peak von **DA6** erkennen. In einer nachfolgenden LC-MS Analyse dieses Gemischs konnte nur die Produktmasse von **DA2** gefunden werden. Dies bestätigt, dass es für das 3-MCP-modifizierte 2'-Desoxyuridin **6** im Gegensatz zu dem 1-MCP-modifizierten Derivat bei Reaktion mit Tetrazin **27** nicht zur Ausbildung eines detektierbaren Produkts kommt.

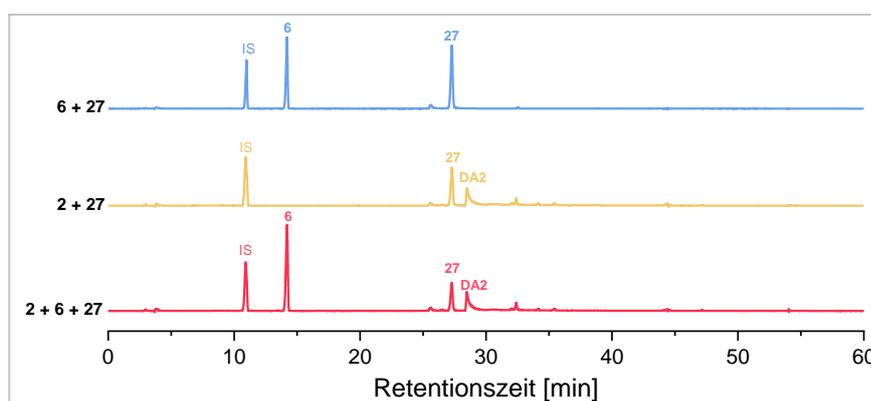


Abbildung 29: Vergleich der Chromatogramme einer Reaktionsmischung von **6** mit **27** (blau), **2** mit **27** (gelb) und **2** und **6** im Gemisch mit **27** (rot). Die Reaktion wurde mit einer Konzentration von 0,50 mM aller Edukte in PBS/MeCN (1:1) über 10 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Trennmethode: 0 – 30 % MeCN in H₂O über 30 min (Kapitel 6, Tabelle 2).

Zur genaueren Beleuchtung des Reaktionsverlaufs wurde das Gemisch von **2** und **6** mit **27** stündlich analysiert. Hierbei zeigt die Auftragung der normierten Peakflächen der einzelnen Komponenten gegen die Reaktionszeit, dass die Menge an 3-MCP-modifiziertem Nukleosid **6** im Verlauf der Reaktion konstant bleibt, während das 1-MCP-modifizierte 2'-Desoxynukleosid **2** vollständig umgesetzt wird (Abbildung 30). Dies bestätigt die unterschiedliche Reaktivität der beiden Cyclopropenyl-derivate. Um auszuschließen, dass es sich bei dem Ergebnis um einen Einzelfall handelt, wurde zusätzlich die iEDDA-Reaktion von **2** in Kombination mit dem 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosid **7** betrachtet. Die Reaktion wurde dazu erneut mit beiden Nukleosiden im Gemisch durchgeführt. In der Auftragung der HPLC-Peakflächen der Reaktionskomponenten gegen den zeitlichen Verlauf ist auch hier eine konstante Menge von **7** bei vollständigem Umsatz von **2** zu erkennen (Abbildung 30, b).

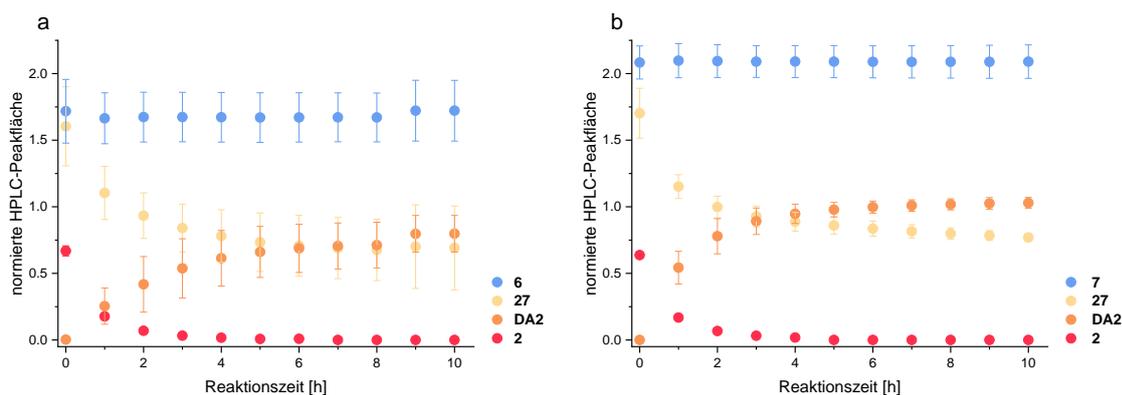
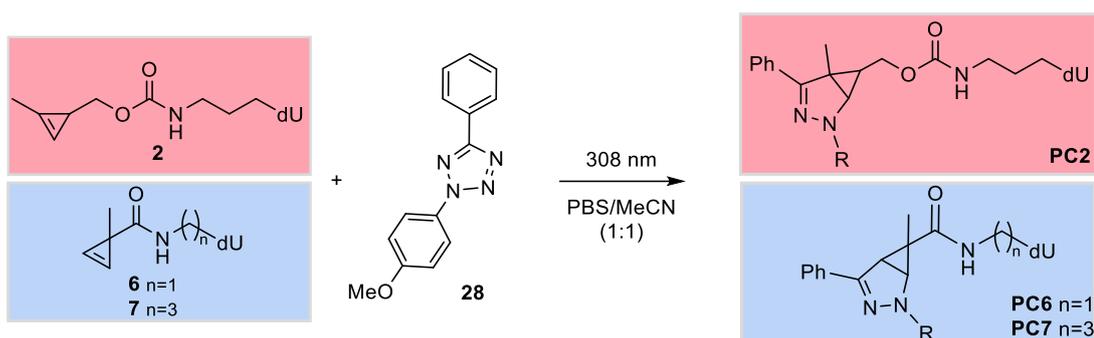


Abbildung 30: Vergleich der Reaktivität von **2** und **6** (a) bzw. **7** (b) in einer iEDDA-Reaktion mit **27** durch Auftragung der auf den Standard normierten HPLC-Peakflächen von Edukten und Produkt gegen die Reaktionszeit.

Die orthogonale Reaktivität der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside **3** - **5** gegenüber dem 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynukleosid **6** wurden in einer iEDDA-Reaktion mit **27** ebenfalls untersucht. Auch hier konnte bei Betrachtung der HPLC-Peakflächen ein vollständiger Umsatz der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside festgestellt werden, während die Menge an 3-MCP Derivat konstant blieb (Anhang, Abbildung A3). Zusätzlich konnten in einer Analyse mittels LC-MS nur die Diels-Alder-Produkte **DA2** – **DA5** gefunden werden. Die Ergebnisse bestätigen Reaktivitätsunterschiede zwischen 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden. Diese konnten in einer Reihe unterschiedlicher Derivate unabhängig von Linkerstruktur oder angefügter Base beobachtet werden.

Nach Betrachtung der iEDDA-Reaktion wurden anschließend die Photoclick- Reaktion von **2** – **5** im Vergleich zu den 3-MCP-modifizierten Derivaten **6** und **7** untersucht. Hierbei wurde die Reaktion ebenfalls zunächst mit beiden Nukleosiden einzeln und anschließend im Gemisch durchgeführt. Als Reaktionspartner diente das Diaryltetrazol **28**, da dieses bereits literaturbekannt¹⁴¹ ist und zudem zur Untersuchung der Photoclick-Reaktion von **6**^V und **7**¹⁴² eingesetzt wurde. **28** lässt sich durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 308 nm aktivieren und kann mit den cyclopropanmodifizierten 2'-Desoxynukleosiden **2** und **6** bzw. **7** zu den Produkten **PC2** und **PC6** bzw. **PC7** reagieren (Schema 13). **28** wurde von D. HARIJAN bereitgestellt.

^V Durchgeführt im Rahmen der Masterarbeit von M. Mijic, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.



Schema 13: Schema der Photoclick-Reaktion eines Gemischs von 1-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynucleosid **2** und 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynucleosid **6** bzw. **7** mit **28** zu den Produkten **PC2** und **PC6** bzw. **PC7**.

Die Photoclick-Reaktion wurde in einem 1:1 Gemisch von PBS-Puffer und Acetonitril durchgeführt. Alle Edukte wurden dabei äquimolarer Konzentration zugegeben und das Reaktionsgemisch für 10 min bei 308 nm belichtet.

Das Chromatogramm der Reaktion von **6** mit **28** enthält den Peak der Produkts **PC6** bei 25,0 min sowie mehrere kleinere Peaks, bei welchen es sich vermutlich um unspezifische Nebenprodukte des Nitrilimins handelt.¹⁴² In der Reaktionsmischung von **2** und **28** sind letztere ebenfalls zu finden, jedoch lässt sich kein neuer Peak erkennen, welcher **PC2** zugeordnet werden könnte. Das Chromatogramm der Reaktionsmischung mit **2** und **6** im Gemisch zeigt ebenfalls nur die Peaks, welche auch in den Reaktionsmischungen der einzelnen Nucleoside zu finden sind (Abbildung 31). In der nachfolgenden Analyse der Peaks mittels LC-MS ließ sich nur **PC6** nachweisen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass nur das 3-MCP-modifizierte 2'-Desoxyuridin **6** in einer Photoclick-Reaktion reagiert, das 1-MCP-Derivat **2** hingegen nicht.

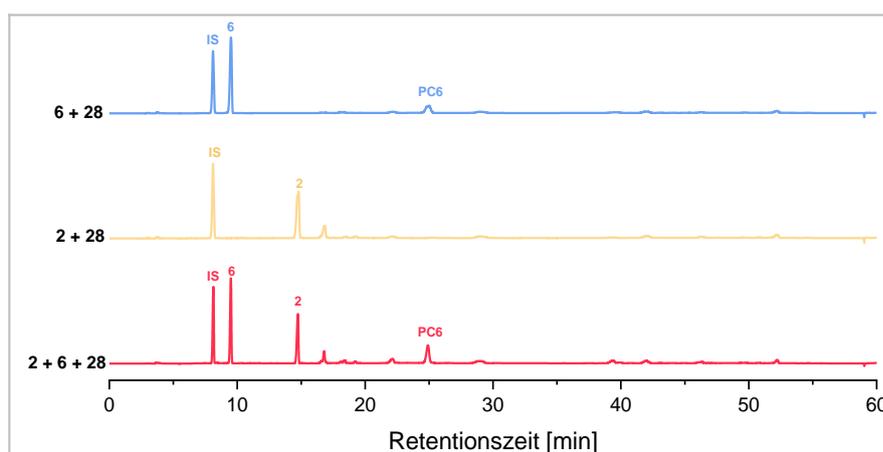


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Chromatogramme einer Reaktionsmischung von **26** mit **28** (blau), **2** mit **28** (gelb) und **2** und **6** im Gemisch mit **28** (rot). Die Reaktion wurde mit 0,50 mM der Edukte in PBS/MeCN (1:1) durchgeführt. Die Aktivierung erfolgte durch Belichtung bei 308 nm für 10 min bei 20 °C. Trennmethode: 0 – 40 % MeCN in H₂O über 30 min (Kapitel 6, Tabelle 6).

Die Photoclick-Reaktion des Gemischs von **2** und **6** mit **28** wurde anschließend über den Verlauf der Belichtung beobachtet. Die Reaktion wurde dazu wie zuvor beschrieben gestartet und jeweils nach einem Belichtungsintervall von 60 s mittels RP-HPLC untersucht. Bei Auftragung der HPLC-Peakflächen der Edukte sowie **PC6** gegen die Belichtungszeit lässt sich erkennen, dass sowohl die Peakfläche des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **2** als auch des 3-MCP-modifizierten Derivats **6** abnimmt (Abbildung 32, a). Die Abnahme der Peakfläche von **6** ist mit 15 % jedoch stärker als die von **2** mit 10 %. In Kombination mit der vorherigen Massenanalyse des Reaktionsgemischs, bei welcher nur das Produkt **PC6** gefunden wurde, zeigt dies eine höhere Reaktivität des 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridins **6** im Vergleich zu dem entsprechenden 1-MCP-Derivat **2** in einer Photoclick-Reaktion. Um diese Annahme weiter zu bestätigen, wurde die Reaktivitätsanalyse auch mit **2** und 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynukleosid **7** durchgeführt. Die Auftragung der Peakflächen bei HPLC-analytischer Beobachtung der Reaktion über den Verlauf der Belichtungszeit zeigte ebenfalls eine Abnahme beider Nukleoside (Abbildung 32, b). Die Peakfläche von **7** nimmt um 11 % bzw. die von **2** um 8 % ab. Jedoch erfolgt die Abnahme im Fall von **7** exponentiell, während für **2** ein linearer Verlauf zu erkennen ist. Dies lässt vermuten, dass die Verringerung der Peakfläche von **2** auf eine Degradation der Verbindung anstelle des Umsatzes in einer Reaktion zurückzuführen sein könnte.

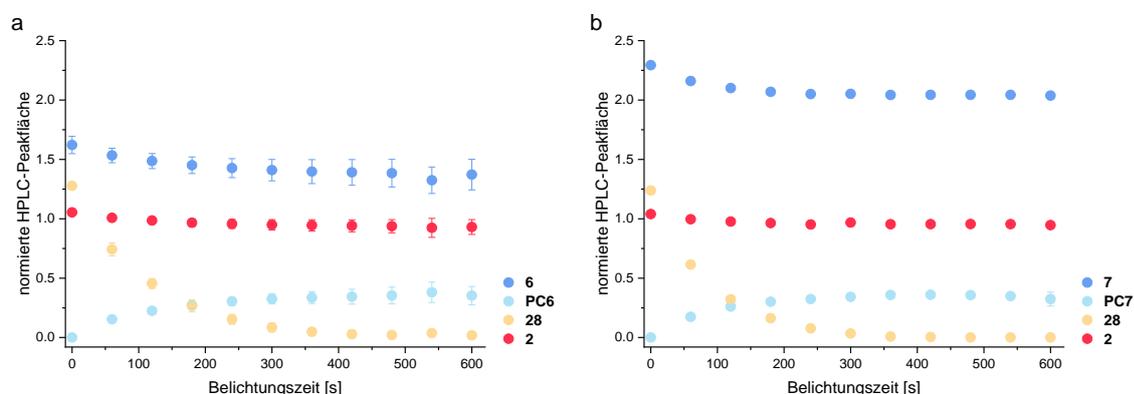


Abbildung 32: Vergleich der Reaktivität von **2** und **6** (a) bzw. **7** (b) in einer Photoclick-Reaktion mit **28** durch Auftragung der HPLC-Peakflächen von Edukten und Produkt gegen die Belichtungszeit.

Die Photoclick-Reaktion der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside **3** bis **5** einzeln sowie in Kombination mit **6** wurde ebenfalls untersucht. Keine der Photoclick-Reaktionen zeigte dabei in der LC-MS-Analyse einen neuen Peak, der dem entsprechenden Photoclick-Produkt zugeordnet werden konnte. Zusätzlich konnte in allen Experimenten zur Orthogonalität eine stärkere Abnahme der Peakfläche von **6** im Vergleich zu **3** - **5** festgestellt werden (Anhang, Abbildung A4).

Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse die unterschiedliche Reaktivität von 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden in einer iEDDA- als auch einer Photoclick-Reaktion, welche zuvor für Verbindung **1** und **6** beobachtet wurde. Der postulierte

Reaktivitätsunterschied in einer iEDDA-Reaktion konnte eindeutig gezeigt werden und so die Grundlage für den Einsatz der 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside zur dualen Markierung bei sequenzieller Zugabe der Reaktionspartner geschaffen werden. Zusätzlich konnten auch Unterschiede in der Reaktivität in einer Photoclick-Reaktion festgestellt werden. Das 3-MCP-modifizierte Derivat reagiert dabei im Vergleich mit dem 1-MCP Derivat bevorzugt mit Tetrazol **28**. Dies könnte die simultane Durchführung von orthogonaler iEDDA und Photoclick Reaktion im gleichen System ermöglichen.

Abschließend wurde daher die duale Markierung mit Hilfe des 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosids **2** und **6** sowie Tetrazin **27** und Tetrazol **28** untersucht. Es wurde hierbei zunächst die sequenzielle Zugabe der Reaktionspartner **27** und **28** zu einem Gemisch von **2** und **6** betrachtet, wobei der Reaktionsverlauf über RP-HPLC verfolgt wurde (Abbildung 33). Zu Beginn wurden **2** und **6** in äquimolarer Konzentration vorgelegt und **27** zugegeben. Unmittelbar nach der Zugabe von **27** sowie in den nachfolgenden Stunden nimmt die HPLC-Peakfläche des 1-MCP-modifizierten Derivats **2** ab, während die Menge an 3-MCP-modifiziertem 2'-Desoxynukleosids **6** konstant bleibt. Die Entstehung des Produkts **DA2** setzt ebenfalls nach der Zugabe von **27** ein, was auf einen selektiven ersten Markierungsschritt schließen lässt. Nach dem vollständigen Umsatz von **2** nach einer Reaktionszeit von 6 h wurde Tetrazol **28** zugegeben. Das Gemisch wurde anschließend für 10 min bei 308 nm belichtet, wobei jeweils nach 2 min Belichtungszeit eine Probe entnommen wurde. In den erhaltenen Chromatogrammen ist eine Abnahme der Peakfläche von **6** nach Beginn der Belichtung zu erkennen. Gleichzeitig setzt auch die Bildung von Produkt **PC6** ein.

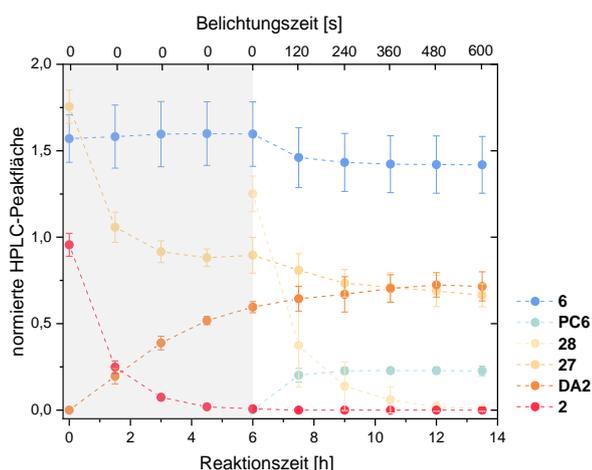


Abbildung 33: Auftragung der normierten HPLC-Peakflächen der Edukte **2**, **6**, **27**, **28** und Produkte **DA2** und **PC6** bei sequentieller Zugabe von **27** und **28** zu einem Gemisch von **2** und **6** gegen die Reaktions- bzw. Belichtungszeit. Es wurden 0,50 mM **2** und **6** in PBS/MeCN (1:1) gegeben und das Gemisch nach der Zugabe von 0,50 mM **27** für 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 0,50 mM **28** zugegeben und für 10 min bei 308 nm belichtet, wobei alle 120 s eine Probe entnommen wurde.

Die iEDDA- und Photoclick-Reaktion wurden außerdem im selben Reaktionsgefäß mit simultaner Zugabe aller Reaktionspartner durchgeführt. **2**, **6**, **27** und **28** wurde in äquimolarer Konzentration in PBS/Acetonitril (1:1) gegeben und die Lösung nach der Entnahme einer HPLC-Probe (0 h) für 10 min bei 308 nm belichtet. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur inkubiert und alle 1,5 h mittels RP-HPLC analysiert. Bei Betrachtung der normierten HPLC-Peakflächen gegen die Reaktionszeit (Abbildung 34) zeigt sich eine Abnahme aller Edukte innerhalb der Reaktionszeit. Die Produktbildung von **PC6** ist nach der Belichtung von 10 min abgeschlossen, während die Menge von **DA2** nach einer Reaktionszeit von 10 h näherungsweise konstant ist.

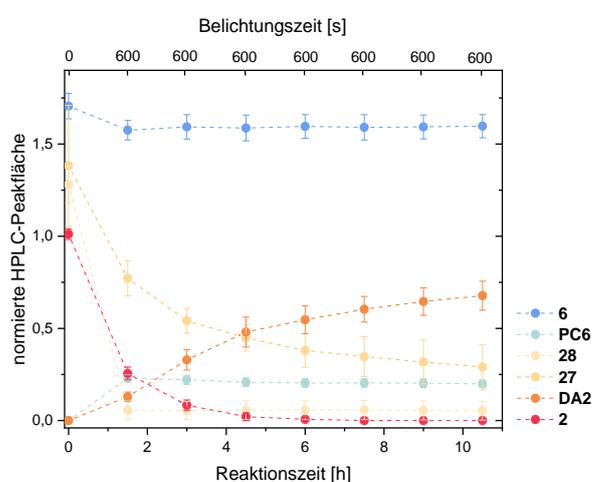
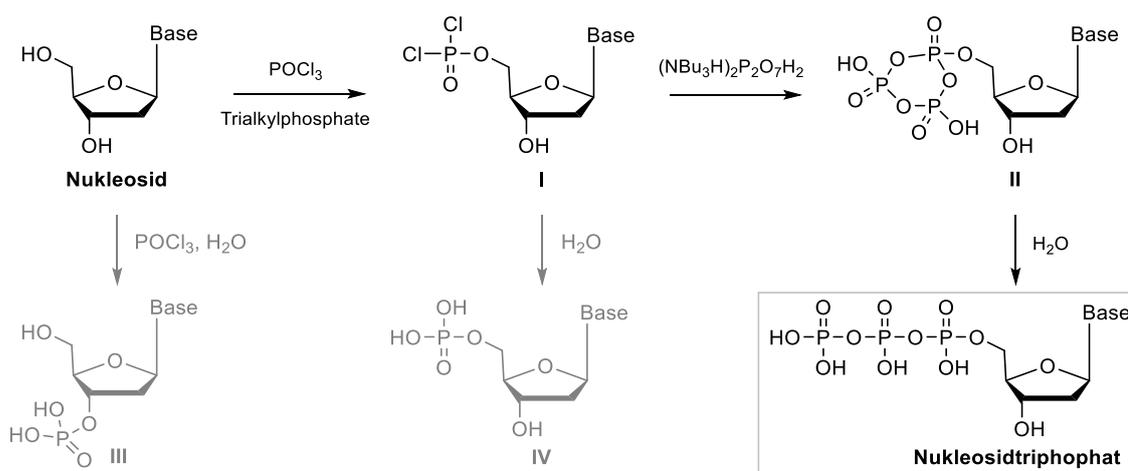


Abbildung 34: Auftragung der normierten HPLC-Peakflächen der Edukte **2**, **6**, **27**, **28** und Produkte **DA2** und **PC6** bei simultaner Zugabe von **27** und **28** zu einem Gemisch von **2** und **6** gegen die Reaktionszeit. Es wurden **2** (0,50 mM) und **6** (0,50 mM) sowie **27** (0,50 mM) und **28** (0,50 mM) in PBS/MeCN (1:1) gegeben und das Gemisch für 10 min bei 308 nm belichtet. Anschließend wurde 10 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedliche und orthogonale Reaktivität von 1- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden bestätigt werden konnte. Die Durchführung von orthogonaler iEDDA- und Photoclick-Reaktion im selben Reaktionsgefäß konnte anschließend am Beispiel eines Gemischs von **2** und **6** gezeigt werden. Die synthetisierten 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside mit Carbamatlinker **1**, **2** und **3** zeigten die höchsten Geschwindigkeitskonstanten in der iEDDA-Reaktion. Sie wurden daher für die nachfolgende Untersuchung der bioorthogonalen Markierung eines cyclopropenmodifizierten Oligonukleotids verwendet.

4.2 Untersuchung cyclopropenbasierter dualer Markierung von DNA *in vitro*

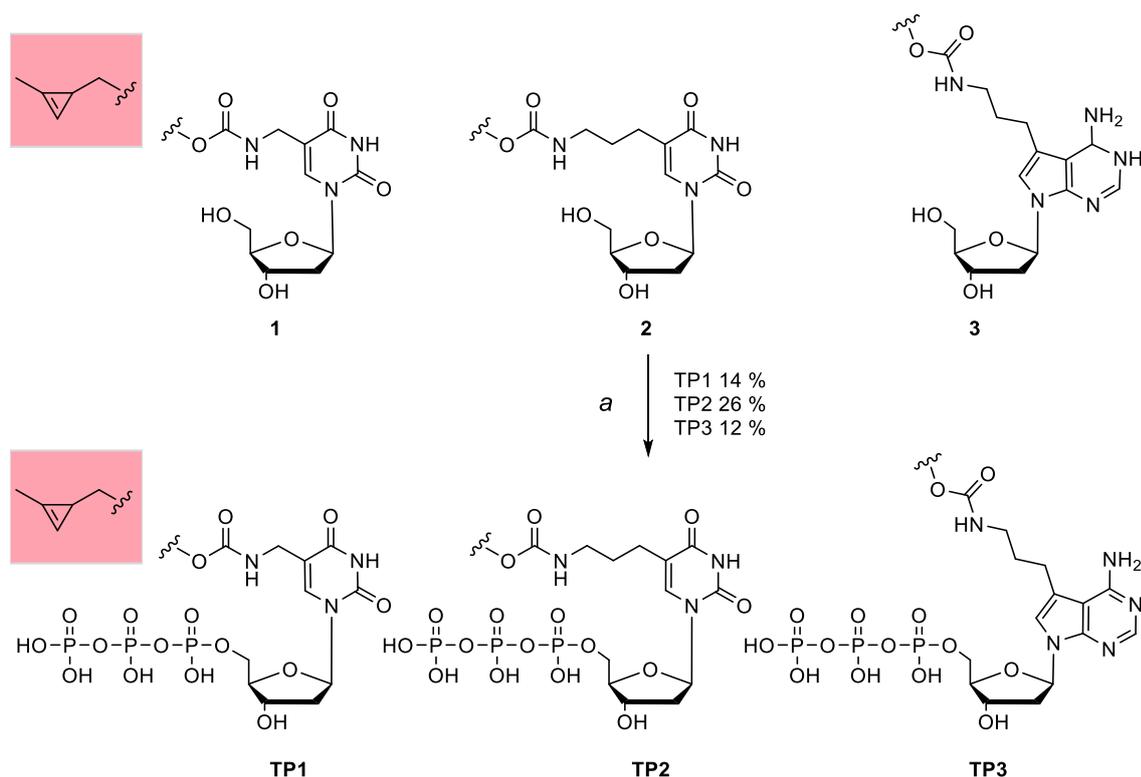
Nach der Untersuchung von Kinetik und orthogonaler Reaktivität auf Nukleosidebene wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Einbau der cyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynucleoside in ein Oligonucleotid und die nachfolgend bioorthogonale Markierung an DNA betrachtet. Zur Inkorporation der modifizierten Nucleoside wurde eine enzymatische Strategie gewählt. Da die bioorthogonale Markierung final in Zellen durchgeführt werden soll eignet sich dieser Ansatz besser in Bezug auf die spätere Anwendung. Zusätzlich ist die geringe Stabilität des 1-Methylcyclopropens unter stark oxidierenden Bedingungen limitierend für eine synthetische Herstellung über DNA-Festphasensynthese.¹³⁹ Die modifizierten 2'-Desoxynucleoside wurden hierbei zunächst nach der Ludwig-Eckstein-Methode in die entsprechenden Nucleosidtriphosphate überführt (Schema 14).^{166, 167} Hierbei wird ausgehend von einem Nucleosid zunächst ein Dichlorophosphatintermediat **I** durch Reaktion mit Phosphorylchlorid gebildet. Dieses wird mit einem Pyrophosphat-Anion zu einem cyclischen Anhydrid **II** umgesetzt, welches final durch Hydrolyse in das gewünschte Triphosphat überführt werden kann. Aufgrund der geringen Stabilität der Intermediate **I** und **II** werden diese ohne zusätzliche Aufarbeitung *in situ* umgesetzt. Die Ausbeute an Triphosphat ist in der Regel aufgrund unterschiedlicher Nebenreaktionen, die während der Synthese auftreten können, gering.¹⁶⁶ Unter anderem kann es zu einer Hydrolyse von **I** kommen, wodurch das Monophosphat **IV** entsteht. Des Weiteren kann der Angriff des Phosphorylchlorids an der 3'-Hydroxygruppe entsprechend Molekül **III** anstelle der 5'-Position erfolgen. Die Selektivität dieses Schritts kann durch Verwendung von Trialkylphosphaten als Lösungsmittel erhöht werden, wie YOSHIKAWA *et al.* zeigen konnten.¹⁶⁸



Schema 14: Triphosphatsynthese nach Ludwig-Eckstein inklusive häufiger Nebenprodukte **III** und **IV**. Die Nucleoside werden zunächst durch Substitution mit POCl_3 in ein Dichlorophosphat-Intermediat **I** überführt. Durch Reaktion mit einem Pyrophosphat entsteht das cyclische intermediat **II**, welches abschließend zum Triphosphat hydrolysiert wird.

4.2.1 Inkorporation und Markierung 1-MCP-modifizierter Nukleotide

Die drei reaktivsten Derivate der zuvor synthetisierten 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **1** - **3** wurden nach der Ludwig Eckstein Methode zu den Triphosphaten **TP1** – **TP3** umgesetzt (Schema 15). Die Produkte wurden dabei Ausbeuten von 12 bis 26 % erhalten. Unterschiede in den Ausbeuten könnten unter anderem während der Aufarbeitung entstanden sein. Die Verbindungen mussten hierbei mehrfach mittels semipräparativer HPLC von beispielsweise Mono- und Diphosphatverunreinigungen abgetrennt werden.



Schema 15: Synthese der cyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynucleosidtriphosphate **TP1** – **TP3**. a) 1. Protonen Schwamm, POCl_3 , TMP, -15°C , 5 h; 2. $(\text{NBu}_3\text{H})_2\text{P}_2\text{O}_7\text{H}_2$, NBu_3 , DMF, RT, 30 min; 3. TEAB-Puffer (pH 7,5) RT, 4 h, 14 % (**TP1**), 26 % (**TP2**), 12 % (**TP3**).

TP1 – **TP3** wurden anschließend in Primerverlängerungsexperimenten mit Hilfe von Polymerasen in einen DNA-Strang eingefügt. Hierbei wurden sogenannte Running-Start-Experimente durchgeführt, bei welchen der Einbau des modifizierten Nucleotids erst nach dem Einbau einiger natürlicher Nucleotide im späteren Verlauf der Verlängerung erfolgt. Für die Primerverlängerung mit den 2'-Desoxyuridintriphosphaten **TP1** und **TP2** wurden die Primer P1 und das Templat T1 verwendet (Abbildung 35, a). Der Primer trägt an 5'-Ende ein ATTO390 Fluorophor für die nachfolgende Detektion. Der Einbau des modifizierten 2'-Desoxynucleotids erfolgt komplementär an der rot markierten Position des Templats. Im Fall des 7-Deaza-2'-desoxyadenosins **TP3** wurde in der Templatsequenz das 2'-Desoxyadenosin an dieser Position

durch Thymidin ausgetauscht (P2, Abbildung 35, a). Um einen Mehrfacheinbau von **TP3** zu vermeiden, wurde zusätzlich Thymidin an Position 31 durch 2'-Desoxyadenosin ersetzt. Die Akzeptanz der modifizierten 2'-Desoxynukleotide wurde mit Hilfe drei unterschiedlicher DNA-Polymerasen getestet: der Hemo KlenTaq, der Vent (exo-) und der Deep Vent (exo-) Polymerase. Es handelt sich hierbei um thermostabile Polymerasen, welche auch in PCR-Experimenten zum Einsatz kommen und kommerziell erhältlich sind.¹⁶⁹⁻¹⁷² Die Hemo KlenTaq Polymerase ist eine verkürzte Version der aus dem Bakterium *Thermococcus aquaticus* isolierten Taq-DNA-Polymerase, welcher zusätzlich die N-terminale 5'→3'-Exonukleaseaktivität entfernt wurde. Es handelt sich um eine Polymerase der A-Familie.¹⁶⁹ Die Vent (exo-) sowie die Deep Vent (exo-) Polymerase gehören hingegen der B-Familie an. Die beiden Polymerasen wurden ursprünglich aus in hydrothermalen Quellen in der Tiefsee lebenden Organismen isoliert und deren 5'→3'-Exonukleaseaktivität nachträglich entfernt.^{170, 171} Die Deep Vent (exo-) Polymerase besitzt dabei im Vergleich zu Vent (exo-) Polymerase eine höhere Stabilität.¹⁷¹

Zur Primerverlängerung wurden Primer und Templat zunächst bei 90 °C hybridisiert. Um eine thermisch induzierte Degradation der Cyclopropenylfunktion zu vermeiden, wurde das modifizierte Nukleotid erst nach beendeter Hybridisierung zugegeben. Die Verlängerung des Primers erfolgte anschließend über 30 min. Hierbei wurde eine Temperatur von 37 °C eingestellt, welche den physiologischen Bedingungen der Zelle angenähert werden sollte. Als Positiv-Kontrolle (+TTP/ +dATP) wurde eine Probe mitgeführt, welcher alle natürlichen Nucleosidtriphosphate (dNTPs) zugefügt wurden und so eine vollständige Verlängerung des Primers auf 35 Nucleotide erwartet wird. Im Gegenzug wurden in der Negativ-Kontrolle (-TTP/ -dATP) alle dNTPs abzüglich Thymidintriphosphat (TTP, für **TP1** und **TP2**) bzw. 2'-Desoxyadenosintriphosphat (dATP, für **TP3**) zugegeben. Hierbei sollte ein Abbruchstrang mit 26 Nucleotiden an der Stelle des fehlenden dNTPs erhalten werden. Die Analyse der Primerverlängerung erfolgte über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und anschließende Visualisierung der Fluoreszenz des ATTO390-Farbstoffs.

Im Fall von **TP1** lässt sich in dem erhaltenen Gel für alle Polymerasen die gleiche Verteilung der Banden in Positiv- und Negativ-Kontrolle sowie der Probe mit **TP1** erkennen (Abbildung 35, b). Die Positiv-Kontrolle liefert dabei ein vollständig verlängertes Produkt, während in der Negativ-Kontrolle ein kürzerer Abbruchstrang mit höherer Gelmobilität erhalten wird. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Polymerasen bei fehlendem komplementärem Nucleotid auch eine fehlgepaarte Base einfügen. In die Proben mit **TP1** wird ebenfalls eine vollständig verlängerte Primersequenz erhalten. Das cyclopropenmodifizierte 2'-Desoxynucleosidtriphosphat wird folglich von allen verwendeten Polymerasen akzeptiert und effizient als Ersatz für TTP in die DNA eingebaut.

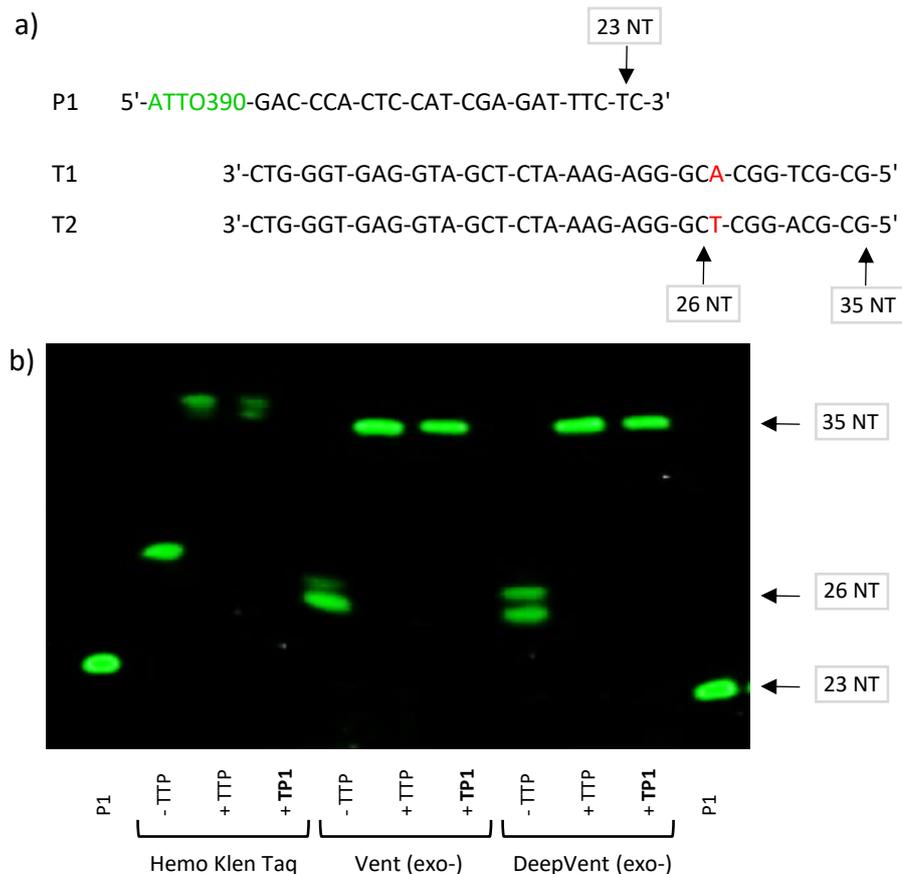


Abbildung 35: a) Sequenzen der verwendeten Templatstränge T1 (für TP1 und TP2) und T2 (für TP3) sowie des Primers P1. b) PAGE-Analyse des Primerverlängerungsexperiments mit TP1 bei Elongation für 30 min bei 37 °C mit den drei ausgewählten Polymerasen. Negativ-Kontrollen (-TTP) wurden nur dATP, dCTP und dGTP zugegeben, Positiv-Kontrollen (+TTP) enthalten alle natürlichen dNTPs. In Proben (+TP1) wurde TTP durch TP1 ausgetauscht. Die Visualisierung erfolgte anhand der Fluoreszenz des ATTO390-Farbstoffs, wobei $\lambda_{exc} = 312 \pm 20$ nm, $\lambda_{em} = 505 \pm 20$ nm.

In nachfolgenden Experimenten mit TP2 und TP3 wurde in der PAGE-Analyse ebenfalls ein vollständig verlängertes Produkt mit allen Polymerasen gefunden (Anhang Abbildung A5), was darauf schließen lässt, dass auch diese effizient in das Oligonukleotid eingefügt werden. Die Anknüpfung der 1-Methylcylopropenylfunktion an die 5-Position von 2'-Desoxyuridin bzw. die 7-Position von 7-Deaza-2'-desoxyadenosin über einen Methyl- oder Propyllinker beeinflusst demzufolge, ähnlich wie der literaturbekannte Propinyl linker^{18, 121, 133}, die Aktivität der verwendeten Enzyme nicht signifikant.

Die Einbaueffizienz von TP1 – TP3 durch Polymerasen wurde in einem Primerverlängerungsexperiment mit unterschiedlichen Verlängerungszeiten genauer untersucht. Hierbei wurde zunächst die Hemo KlenTaq Polymerase betrachtet, da diese der A-Familie angehört. Polymerasen dieser Familie reagieren, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, empfindlicher auf modifizierte Substrate. Die Proben mit TP1 – TP3 sowie Negativ- und Positiv-

Kontrolle wurde nach der Hybridisierung von Primer und Templat für 5, 10, 15, 30 und 60 min bei 37 °C verlängert. Die nachfolgende PAGE-Analyse (Abbildung 36) zeigt eine vollständige Verlängerung des Primers in Anwesenheit von **TP2** und **TP3** bereits innerhalb von 5 min. Im Fall von **TP1** liegt nach diesem Zeitraum noch unvollständig verlängerter Primer vor. Ein vollständiger Umsatz wird erst nach 30 min erzielt. Das über einen kurzen Methyllinker modifizierte 2'-Desoxynukleotid scheint daher für die Polymerase schlechter zugänglich zu sein. Möglicherweise fügt sich der längere Propyllinker besser in die Struktur des Enzyms ein. Die Doppelbanden, welche in einigen vollverlängerten Proben zu erkennen sind, sind auf den Einbau einer 3'-Überhangbase durch das Enzym zurückzuführen. Dieses Phänomen wird nach Herstellerangaben für die Hemo KlenTaq Polymerase häufig beobachtet.¹⁷³

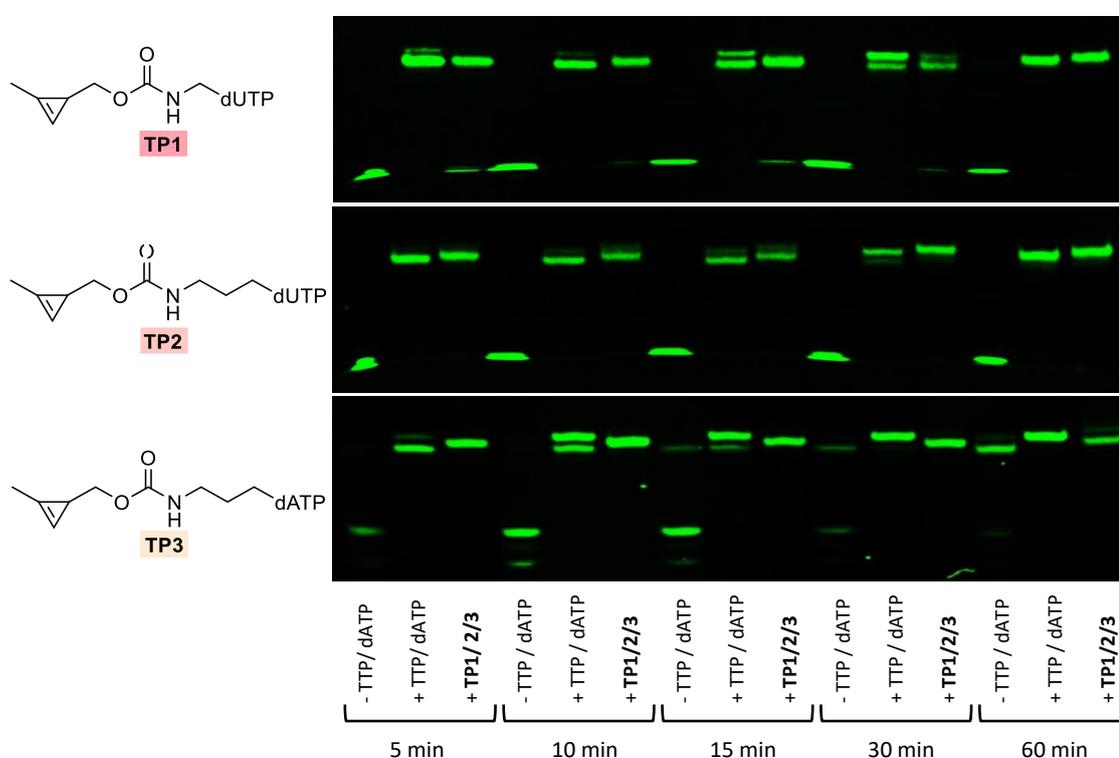


Abbildung 36: PAGE-Analyse des Primerverlängerungsexperiments mit der Hemo KlenTaq Polymerase bei 37 °C und unterschiedlichen Elongationszeiten. Negativ-Kontrollen (-TTP bzw. -dATP) wurden mit Zugabe von dATP, dCTP, dGTP für **TP1** und **TP2** bzw. dTTP, dCTP, dGTP für **TP3**, während Positiv-Kontrollen (+TTP bzw. +dATP) alle natürlichen dNTPs enthielten.

Das Experiment wurde anschließend mit der Deep Vent (exo-) Polymerase wiederholt (Anhang, Abbildung A6). Hierbei wurde ein effizienter Einbau von allen modifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten bei einer Verlängerung von 5 min beobachtet. Die nachfolgenden Experimente wurden daher mit dieser Polymerase durchgeführt.

Nach der erfolgreichen enzymatischen Inkorporation der 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten in DNA sollten diese anschließend über eine iEDDA-Reaktion markiert werden (Abbildung 37). Als Reaktionspartner diente dazu zum einen das 5-carboxytetramethylrhodamin(TAMRA)-modifizierte Tetrazin **29**. Dieses ist kommerziell erhältlich und wurde bereits in vorgegangenen Studien zu Markierung cyclopropenmodifizierter DNA eingesetzt.¹³³ Zum anderen wurde das Cyanin-Styryl-Tetrazin-Konjugat **30** verwendet. Hierbei handelt es sich um den in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen fluorogenen Tetrazinfarbstoff, was in Hinblick auf eine spätere Übertragung der Reaktion in Zellen von Vorteil ist. Zusätzlich konnten mit diesem Derivat bei Reaktionen an DNA hohe Geschwindigkeitskonstanten von $k_2 \geq 284\,000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden.⁷⁹ **30** wurde dabei von P. GENG bereitgestellt.

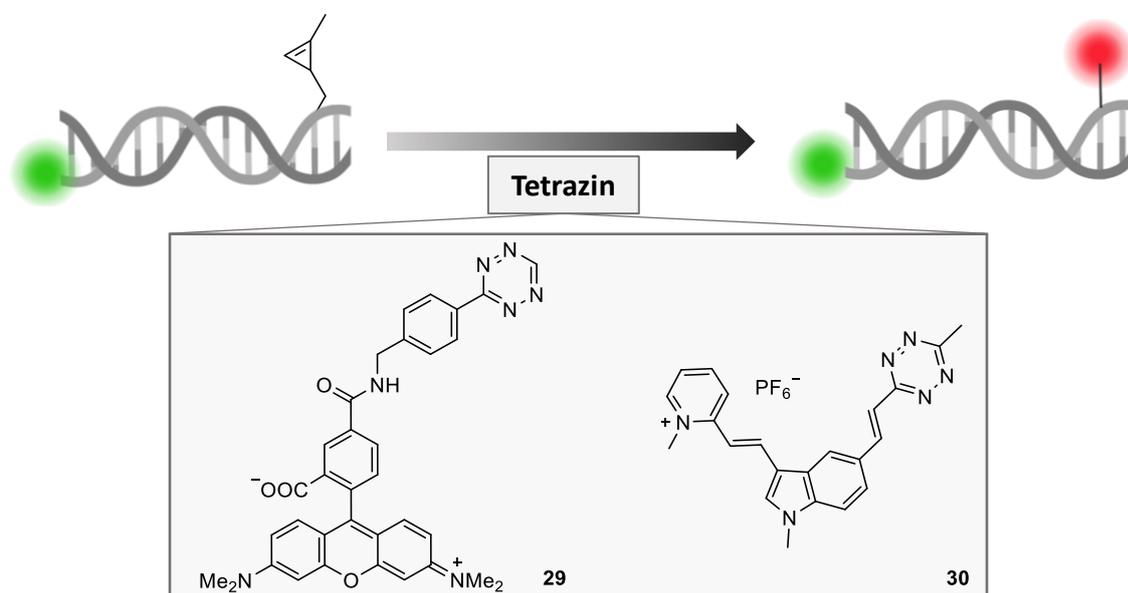


Abbildung 37: Postsynthetische Markierung der 1-MCP-modifizierten DNA unter Verwendung der tetrazin-modifizierten Fluorophore **29** und **30**.

Es wurde zunächst 1-MCP-modifizierte DNA mit **TP1** – **TP3** nach den zuvor optimierten Bedingungen hergestellt. Diese wurde anschließend entsalzt, da in der Reaktionsmischung enthaltenen Salze einen negativen Einfluss auf die nachfolgende iEDDA-Reaktion nehmen können. Das Oligonukleotid wurde anschließend über definierte Zeiträume von 0, 15, 30, 60 und 180 min mit einem Überschuss an Tetrazin **29** inkubiert und das Gemisch mittels PAGE analysiert. In den erhaltenen Gelen lässt sich mit allen modifizierten Triphosphaten bei Inkubation mit **29** die Entstehung einer neuen Bande mit verringerter Gelmobilität beobachten (Abbildung 38). Dies deutet auf eine erfolgreiche Konjugation mit dem Tetrazin-Derivat hin. Die Produktbildung wird außerdem durch die zusätzliche Fluoreszenz der Bande im spezifischen Emissionsbereich bei 550 – 600 nm des TAMRA-Farbstoffs von **29** belegt. Der Vergleich zeigt, dass das Produkt für die Probe von **TP1** erst nach 30 min detektiert werden kann, während

dieses für das Derivat mit dem längerem Propyllinker **TP2** sofort nach der Zugabe von **30** entsteht. Möglicherweise ragt die Modifikation mit längerem Linker weiter aus der DNA-Struktur heraus und ist für den Reaktionspartner besser zugänglich. Bei Verwendung des 7-Deaza-2'-desoxyadenosintriphosphats **TP3** wird bereits unmittelbar nach der Zugabe von **29** ein vollständiger Umsatz des Ausgangsmaterials beobachtet und somit die schnellste Reaktion aller Derivate erzielt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von triazinmodifizierten Nucleosidtriphosphaten in der Literatur überein.¹⁴⁹ Hier wird ebenfalls eine effizientere Markierung des modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosins gegenüber dem entsprechenden Thymin beobachtet. Die unterschiedliche Ausrichtung des Cyclopropens bei Modifikation der 7-Position des Purins im Vergleich zur 5-Position des Pyrimidins könnte hierbei ausschlaggebend für die verbesserte Kinetik sein.

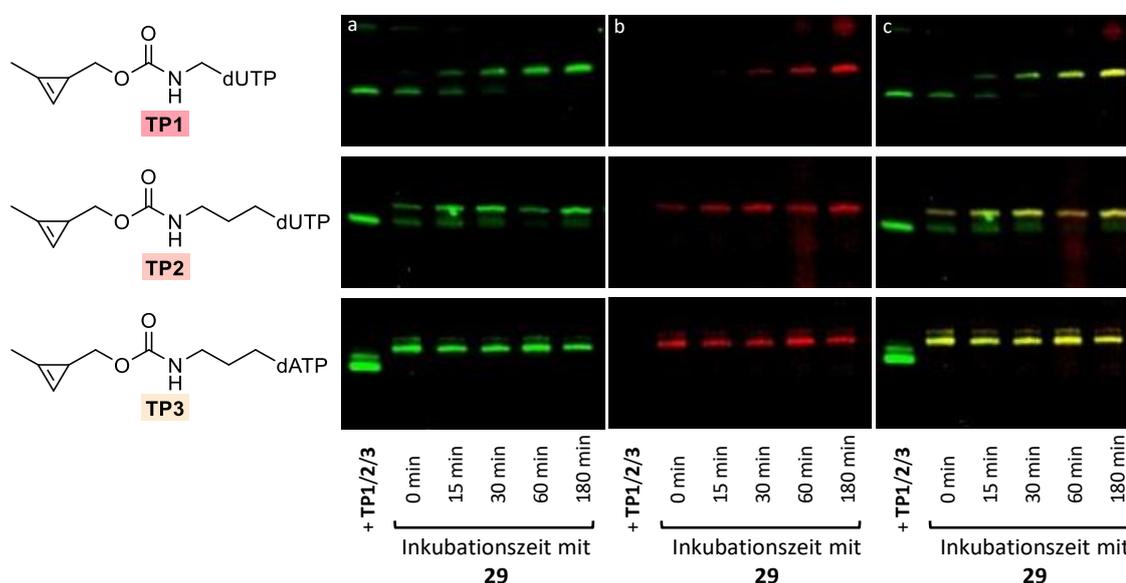


Abbildung 38: Postsynthetische Markierung der 1-MCP-modifizierten DNA mit Tetrazin **29**. Die DNA wurde durch Primerveränderung von P1 mit Hilfe der Deep Vent (exo-) Polymerase für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit von **TP1**, **TP2** bzw. **TP3** hergestellt. Die Proben wurden anschließend entsalzt, lyophilisiert und mit **29** für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Analyse erfolgte über PAGE und nachfolgende Fluoreszenz-Detektion, wobei a) $\lambda_{exc} = 312 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 505 \pm 20 \text{ nm}$; b) $\lambda_{exc} = 540 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 605 \pm 20 \text{ nm}$; c) Überlagerung von a und b.

Die postsynthetische Markierung über iEDDA-Reaktion wurde nachfolgend außerdem mit Tetrazin **30** untersucht. Die Experimente wurden dabei analog zu denen mit Tetrazin **29** durchgeführt. Um eine Überlappung der Detektion des ATTO390-Farbstoffs von P1 mit der des Tetrazins **30** bei 500 nm zu vermeiden, wurde hierbei ein Cy5-markierter Primer mit derselben Basensequenz verwendet (P2). In der nachfolgenden PAGE-Analyse wurde erneut eine neue Bande mit verringerter Gelmobilität für alle Proben mit **30** detektiert (Abbildung 39). Die zusätzliche Fluoreszenz der Bande im Emissionsbereich des Cyanin-Styryl-Farbstoffs von 500 – 550 nm bestätigt, dass es sich hierbei um das gewünschte Markierungsprodukt handelt.

Bemerkenswerterweise ist für alle Proben bereits unmittelbar nach der Zugabe von **30** ein vollständiger Umsatz der DNA zum Konjugationsprodukt erkennbar, was auf eine hohe Geschwindigkeit der Markierungsreaktion schließen lässt. WAGENKNECHT *et al.* hatten für dieses Tetrazinderivat bereits eine 1000-fache Beschleunigung der iEDDA-Reaktion von BCN-modifizierter Nucleosiden zu BCN-modifizierter DNA beobachtet, was vermutlich auf eine DNA-templatierte Vorkoordination zurückzuführen ist.⁷⁹ Die Ergebnisse bestätigen, dass auch bei Verwendung eines Cyclopropens als Dienophil hohe Geschwindigkeiten der iEDDA-Reaktion mit **30** an DNA erzielt werden können.

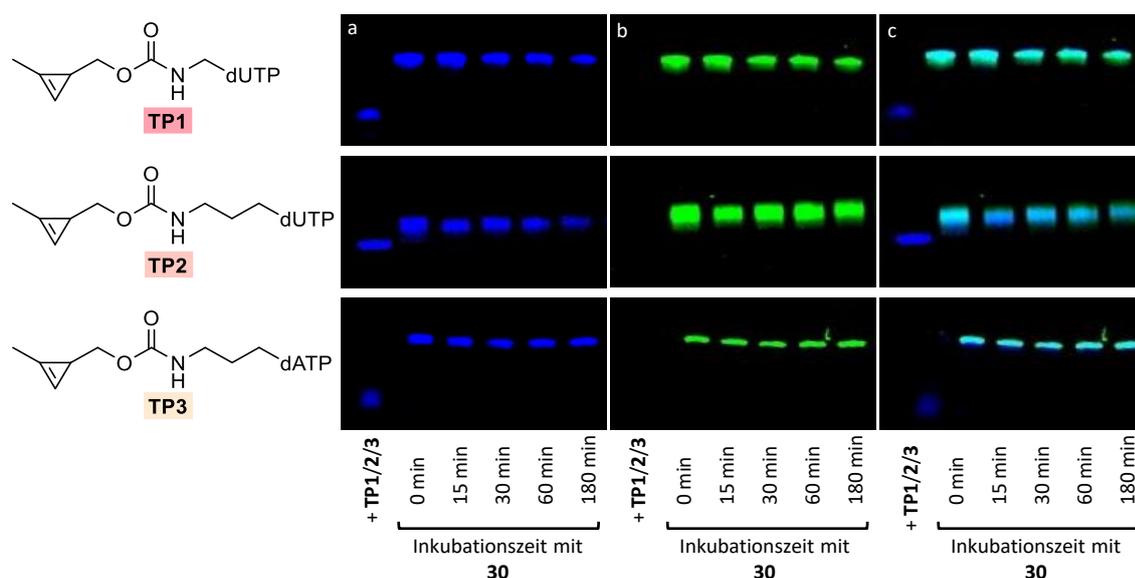


Abbildung 39: PAGE-Analyse der postsynthetischen Markierung der cyclopropenmodifizierten DNA mit Tetrazin **30**. Die DNA-Herstellung erfolgte durch Primerverlängerung mit Hilfe der Deep Vent (*exo*-) Polymerase für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit von **TP1** bzw. **TP2** bzw. **TP3**. Die Proben wurden entsalzt, lyophilisiert, mit **30** für die angegebenen Zeiten inkubiert und mittels PAGE sowie nachfolgende Fluoreszenz-Detektion analysiert, a) $\lambda_{exc} = 603 \pm 10$ nm, $\lambda_{em} = 670 \pm 20$ nm; b) $\lambda_{exc} = 470 \pm 20$ nm, $\lambda_{em} = 505 \pm 20$ nm; c) Überlagerung von a und b.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die synthetisierten 1-MCP-modifizierten Nucleosidtriphosphate **TP1** – **TP3** von Polymerasen unterschiedlicher Familien toleriert und effizient in die DNA inkorporiert werden. Die entsprechend modifizierte DNA kann anschließend postsynthetisch über eine iEDDA-Reaktion mit unterschiedlichen Tetrazinen markiert werden. Während bei der kinetischen Untersuchung der cyclopropenmodifizierten Nucleoside mit **27** Geschwindigkeitskonstanten im unteren Geschwindigkeitsbereich der iEDDA-Reaktion gefunden wurden, kann die Markierung auf DNA-Ebene bei Verwendung von **30** mit hoher Geschwindigkeit innerhalb von Minuten durchgeführt werden.

4.2.2 Untersuchung der Markierung 3-MCP-modifizierter DNA

Nach Durchführung der postsynthetischen iEDDA-Reaktion an 1-MCP-modifizierter DNA wurde anschließend die Photoclick-Reaktion von 3-MCP-modifizierter DNA betrachtet. Diese sollte dabei ebenfalls enzymatisch in Primerverlängerungsexperimenten hergestellt werden. Hierbei wurden die entsprechenden Triphosphate **TP6** und **TP7** der 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleoside **6** und **7** verwendet. **TP6** wurde von R. MICHENFELDER zu Verfügung gestellt. **TP7** wurde anhand einer Vorschrift von D. HARIJAN über die Ludwig-Eckstein Methode synthetisiert.¹⁴²

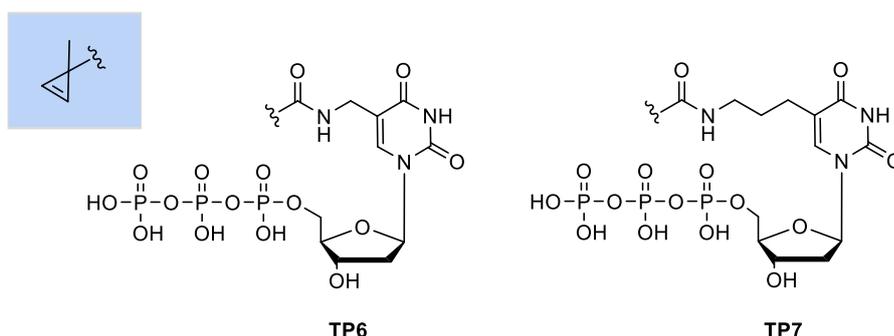


Abbildung 40: 3-MCP-modifizierte 2'-Desoxynucleosidtriphosphate **TP6** und **TP7** für die enzymatische Inkorporation in DNA und anschließende Markierung mittels Photoclick-Reaktion.

In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden Nucleosidtriphosphate **TP6**^{VI} und **TP7**¹⁴² von Polymerasen akzeptiert und enzymatisch in DNA eingefügt werden können. Es wurde daher nachfolgend nur die Photoclick-Reaktion der 3-MCP-modifizierten DNA betrachtet (Abbildung 41). Als Reaktionspartner kamen die beiden Tetrazole **31** und **28** zum Einsatz. **31** ist ein pyrenmodifiziertes Tetrazol, dass in sichtbaren Bereich bis zu 450 nm angeregt werden kann. Die Verbindung wurde von L. RIEGER bereitgestellt. Das Diaryltetrazol **28** konnte bereits erfolgreich für die bioorthogonale Markierung von Proteinen über Photoclick-Reaktion angewendet.¹⁴¹ Die Detektion erfolgt hierbei über die intrinsische Fluoreszenz des bei der Reaktion entstehenden Pyrazolins.

^{VI} Durchgeführt im Rahmen der Masterarbeit von R. Michenfelder, Karlsruher Institut für Technologie, 2020.

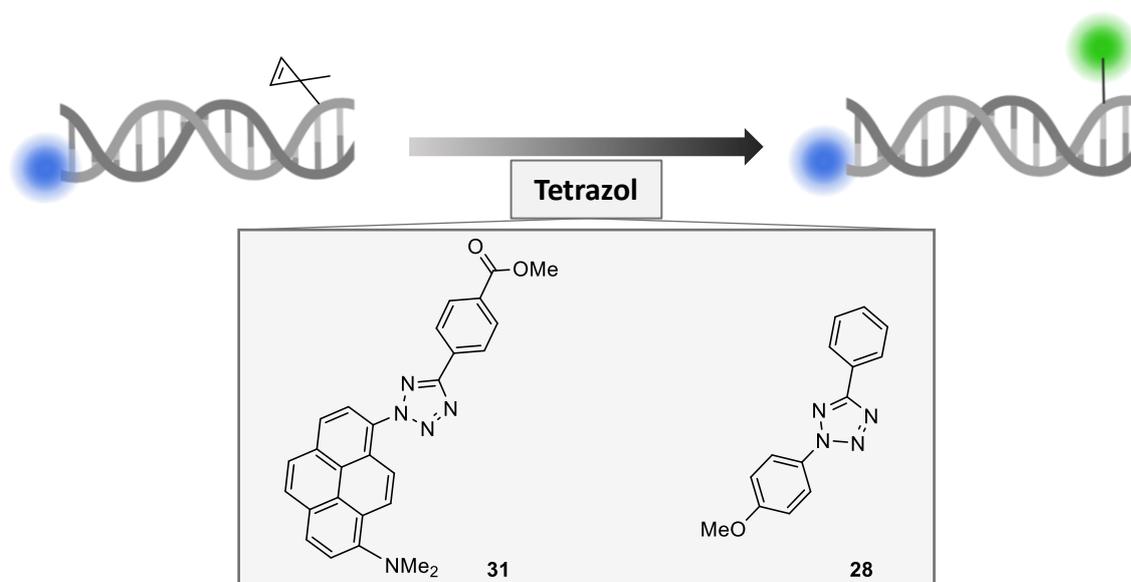


Abbildung 41: Bioorthogonale Markierung von 3-MCP-modifizierter DNA *in vitro* unter Verwendung der beiden Tetrazole **31** und **28**.

3-MCP-modifizierte DNA wurde zunächst über Primerverlängerung in Anwesenheit von **TP6** mit Hilfe der Deep Vent (exo-) Polymerase hergestellt, wobei die Verlängerung bei 37 °C über 30 min erfolgte. Als Ausgangsmaterialien diente das Templat T1 sowie der Cy5-modifizierte Primer P2. Nach beendeter Verlängerung wurde das erhaltene Oligonukleotid analog zur iEDDA-Reaktion zunächst entsalzt und lyophilisiert. Für die anschließende Photoclick-Reaktion wurde dieses in PBS-Puffer gelöst und mit 10 Äquivalenten Tetrazol **28** versetzt. Das Gemisch wurde für unterschiedliche Zeiträume bei 308 nm belichtet und die Proben anschließend mittels denaturierender PAGE analysiert. Als Negativ-Kontrolle wurde außerdem eine Probe mitgeführt, welche ohne den Zusatz von **28** belichtet wurde. In dem erhaltenen Gel lässt sich keine Veränderung der Bande des Ausgangsmaterials über den Belichtungsverlauf feststellen (Abbildung 42, a). Es ist außerdem keine weitere Bande zu erkennen, welche dem Photoclick-Produkt zugeordnet werden könnte. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die Photoclick-Reaktion häufig die Anwesenheit von organischem Lösungsmittel, vorzugsweise Acetonitril benötigt.⁹⁵ Zusätzlich wurde auch die Photoclick-Reaktion des freien 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosids **6** in einem 1:1-Gemisch von PBS-Puffer und Acetonitril erfolgreich durchgeführt. Die photoinduzierte Markierung der 3-MCP modifizierten DNA wurde daher in diesem Lösungsmittel wiederholt. In der nachfolgenden PAGE-Analyse lässt sich ebenfalls keine neue Bande erkennen, welche dem Produkt zugeordnet werden könnte (Abbildung 42, b). Für dieses Experiment war unter anderem die schlechte Löslichkeit der DNA bei Zugabe von Acetonitril problematisch und könnte die ausbleibende Produktbildung verursacht haben.

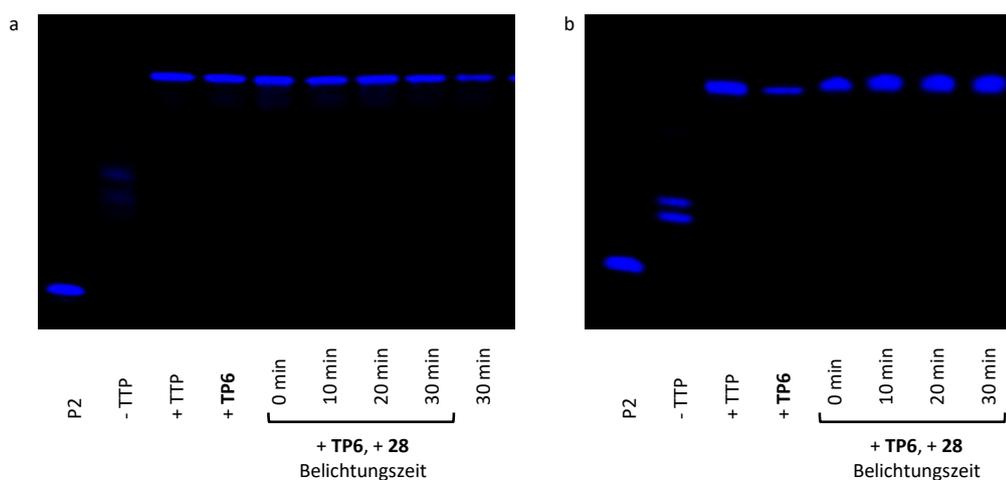


Abbildung 42: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von **28** und 3-MCP-modifizierter DNA, welche durch Primerverlängerung mit **TP6** hergestellt wurde. Die entsalzene DNA wurde in dem jeweiligen Lösungsmittel gelöst und mit 10 μ g **28** über die angegebenen Zeiträume bei 308 nm belichtet. a) Durchführung in PBS, b) Durchführung in PBS/MeCN (1:1). Als Negativ-Kontrolle (30 min) wurde eine Probe ohne die Zugabe von **28** für 30 min belichtet.

In den vorherigen Markierungsexperimenten über iEDDA-Reaktion mit Tetrazin **29** führte die Verknüpfung über einen längeren Propyllinker zu schnelleren Reaktionen, vermutlich aufgrund der besseren Zugänglichkeit der Cyclopropens. Es wurde daher nachfolgend auch die Photoclick-Reaktion mit **28** bei Inkorporation des 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosids mit dem längeren Propyllinker **TP7** untersucht. Der Einbau von **TP7** erfolgte dabei mit der Deep Vent (exo-) Polymerase durch Elongation bei 37 °C für 30 min. Die modifizierte DNA wurde nach Entsalzen und Lyophilisieren in PBS/MeCN (1:1) gelöst und mit **28** für 10, 20 und 30 min bei 308 nm belichtet. In der PAGE-Analyse ist keine neue Bande erkennbar, die auf eine erfolgreiche Konjugationsreaktion schließend lässt (Abbildung 43).

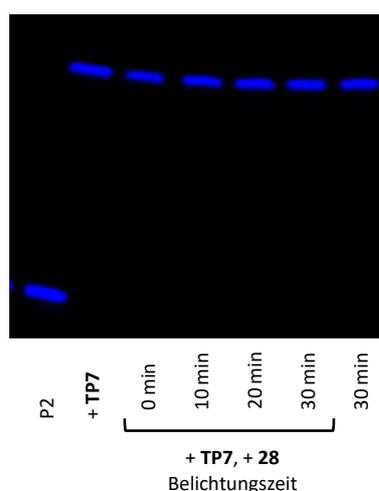


Abbildung 43: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von **28** und 3-MCP-modifizierter DNA, hergestellt durch Primerverlängerung mit **TP7**. Die entsalzene DNA wurde mit 10 μ g **28** in PBS/MeCN über die jeweiligen Zeiträume bei 308 nm belichtet. Als Negativ-Kontrolle (30 min) wurde eine Probe ohne die Zugabe von **28** für 30 min belichtet.

Für die Photoclick-Reaktion der 3-MCP-modifizierten DNA mit **28** konnte mit keiner der bisher getesteten Reaktionsbedingungen eine Produktbildung festgestellt werden. Das bei Belichtung von **28** entstehende Nitrilimin besitzt eine hohe Reaktivität und kann in Abwesenheit eines geeigneten Dipolarophils Nebenreaktionen eingehen (Abschnitt 2.2.2). Möglicherweise kann das Nitrilimin innerhalb seiner begrenzten Lebensdauer das in der DNA-Struktur liegende Cyclopropan nicht erreichen und daher das gewünschte Produkt nicht gebildet werden. Um dieses Problem zu minimieren, wurden nachfolgend Photoclick-Experimente mit Tetrazol **31** durchgeführt. Der Pyrensubstituent dieser Verbindung kann in den Basenstapel interkalieren, wodurch Cyclopropan und das bei der Belichtung entstehende Nitrilimin bereits in räumliche Nähe gebracht werden. Die Reaktion wurde analog zu den Experimenten mit **28** durchgeführt, wobei PBS sowie PBS/MeCN (1:1) als Lösungsmittel verwendet wurden. Die Belichtung erfolgte im Absorptionsmaximum von **28** bei 405 nm für 10 bis 60 min. In der nachfolgenden PAGE-Analyse ist weder bei den Proben in PBS, noch in PBS/MeCN, eine neue Bande zu erkennen, welche dem Konjugationsprodukt zugeordnet werden könnte (Abbildung 44, a und b). Des Weiteren wird keine zusätzliche Fluoreszenz der Banden im Emissionsbereich des Pyrenfarbstoffs detektiert. Grund für die ausbleibende Reaktion in beiden Fällen könnte die schlechte Löslichkeit von **31** im wässrigen Medium, kombiniert mit der geringen Löslichkeit der DNA in Acetonitril, sein. Um nach Möglichkeit beide Ausgangsmaterialien ausreichend in Lösung zu bringen, wurde außerdem DMSO als Lösungsmittel verwendet. Hierbei wurde eine Abnahme der Intensität der Bande des Ausgangsmaterials im Verlauf der Belichtung beobachtet (Abbildung 44, c). Jedoch ist diese auch in der Negativ-Kontrolle bei Belichtung der DNA ohne Zugabe von **31** zu erkennen. Die Abnahme ist daher vermutlich auf ein Photobleaching des Cy5-Farbstoffs des Primers und nicht auf den Umsatz der DNA in einer Photoclick-Reaktion zurückzuführen.

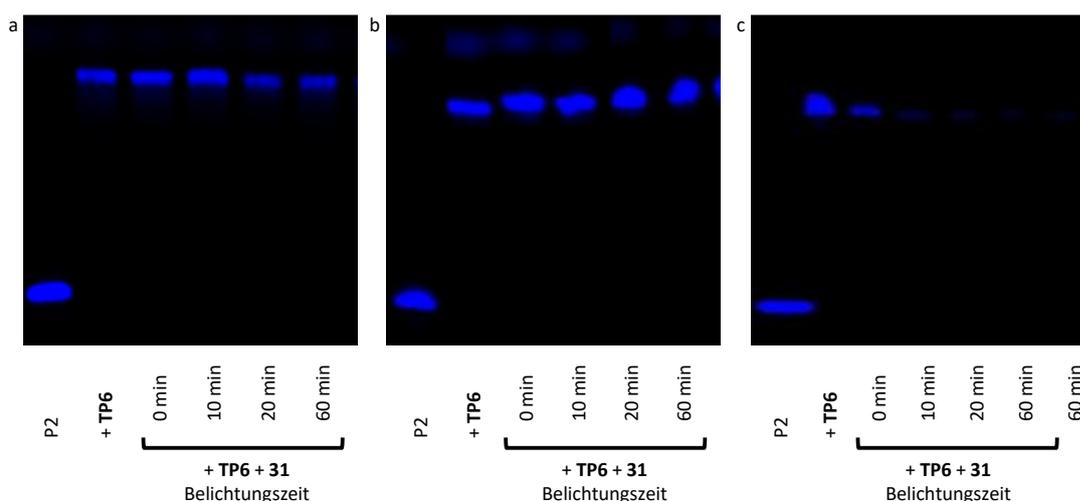


Abbildung 44: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von **31** und 3-MCP-modifizierter DNA durch Inkorporation von **TP6**. Die entsalzte DNA wurde im jeweiligen Lösungsmittel gelöst und mit 10 Äq. **31** über die angegebenen Zeiträume bei 308 nm belichtet, wobei die Durchführung in PBS (a), PBS/MeCN (1:1) (b), DMSO (c) erfolgte. Als Negativ-Kontrolle (60 min) wurde eine Probe ohne die Zugabe von **31** für 60 min belichtet.

Die Photoclick-Reaktion von **31** und 3-MCP-modifizierter DNA in einem DMSO-Acetonitril-Gemisch wurde abschließend auch mit Inkorporation von **TP7** untersucht, jedoch konnte auch hier keine Produktbildung festgestellt werden (Anhang, Abbildung A7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Photoclick-Reaktion eines 3-MCP modifizieren Oligonukleotids unter keiner der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Reaktionsbedingungen nachgewiesen werden konnte. Dies könnte im Fall der Experimente mit Tetrazol **28** dadurch zu erklären sein, dass Nitrilimin und Cyclopropen aufgrund der fehlenden Affinität von **28** zu DNA nicht ausreichend in räumliche Nähe gebracht werden können. Zusätzlich könnten hierbei Löslichkeitsunterschiede der Ausgangsmaterialien zu Problemen bei der Produktbildung geführt haben. Die Löslichkeitsunterschiede sind bei Tetrazol **31** und der modifizierten DNA noch ausgeprägter, sodass diese vermutlich zu einem Ausbleiben der Produktbildung geführt haben. Für eine zukünftige Durchführung der Reaktion an DNA *in vitro*, könnte möglicherweise die Verwendung eines wasserlöslichen Tetrazols, welches zusätzlich eine DNA-affine Gruppe trägt, zielführend sein.

4.3 Untersuchung cyclopropenbasierter metabolischer Markierung von DNA *in vivo*

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Anwendung der 1- und 3-MCP-modifizierten Derivate zur metabolischen Markierung der DNA in Zellen betrachtet. Die Verbindungen sollten dabei von den zellulären Enzymen als Substrat akzeptiert und in die genomische DNA eingefügt werden. Anschließend sollte die Markierung mittels iEDDA- bzw. Photoclick-Reaktion und auch deren gemeinsamer Einsatz zur dualen bioorthogonalen Markierung untersucht werden.

Für nachfolgende Zellexperimente wurde zunächst die Zytotoxizität der cyclopropenmodifizierten 2'-Desoxyukleoside bzw. 2'-Desoxynukleotide in HeLa-Zellen untersucht. Hierbei wurden insbesondere die Konzentrationsbereiche betrachtet, welche für die nachfolgenden Experimente angestrebt wurden. Die Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften erfolgt über MTT-Tests. Diese Methode beruht auf der Zugabe des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu einer behandelten Zellprobe, welcher von zellulären Enzymen zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert werden kann.¹⁷⁴ Die Absorption der Probe im Detektionsbereich des Formazans kann anschließend photometrisch ausgelesen und ins Verhältnis zur Absorption einer, nur mit MTT-Reagenz behandelten Negativ-Kontrolle gesetzt werden. So kann die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt werden, welche unter den definierten Bedingungen mit der Zellviabilität korreliert.¹⁷⁴ MTT-Tests wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den 2'-Desoxynukleosiden **1**, **2**, **3**, **6** und **7** sowie dem 2'-Desoxynukleosidtriphosphat **TP1** durchgeführt. Es wurden dazu HeLa-Zellen für 48 h mit einer definierten Konzentration des jeweiligen Derivats, welche dem Zellmedium zugesetzt wurde, inkubiert und anschließend mit MTT-Reagenz behandelt. Die Verbindungen wurden in Form von 1,00 M Stammlösungen in DMSO bzw. im Fall von **TP1** in Wasser eingesetzt. Die Zellviabilität in Prozent wurde anschließend in Abhängigkeit der Konzentration der jeweiligen Verbindung betrachtet (Abbildung 45). Für die 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridine **1** und **2** lässt sich bei einer Konzentration von 0,10 mM keine Toxizität feststellen. Mit steigender Konzentration sinkt die Viabilität der Zellen, wobei auch mit der höchsten untersuchten Konzentration von 1,00 mM noch circa 75 % Zellviabilität erhalten bleibt. Das Triphosphat **TP1** verhält sich ähnlich wie das entsprechende Nukleosid **1**. Auch für die 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxyuridine **6** und **7** kann bei einer Konzentration von 0,10 mM keine Zytotoxizität festgestellt werden. Die Viabilität verbleibt dabei im Rahmen des experimentellen Fehlers über den Konzentrationsbereich konstant. Das 7-Deaza-2'-Desoxyadenosin Derivat **3** besitzt als einzige Verbindung in der getesteten Reihe eine mittlere letale Dosis LD₅₀ unter 1,00 mM und damit die höchste Zytotoxizität. Die nachfolgenden Experimente zur metabolischen Markierung sollten mit einer

Nukleosid Konzentration von 0,10 mM durchgeführt werden, bei welcher mit allen Derivaten eine Zellviabilität größer 80 % erhalten werden konnte.

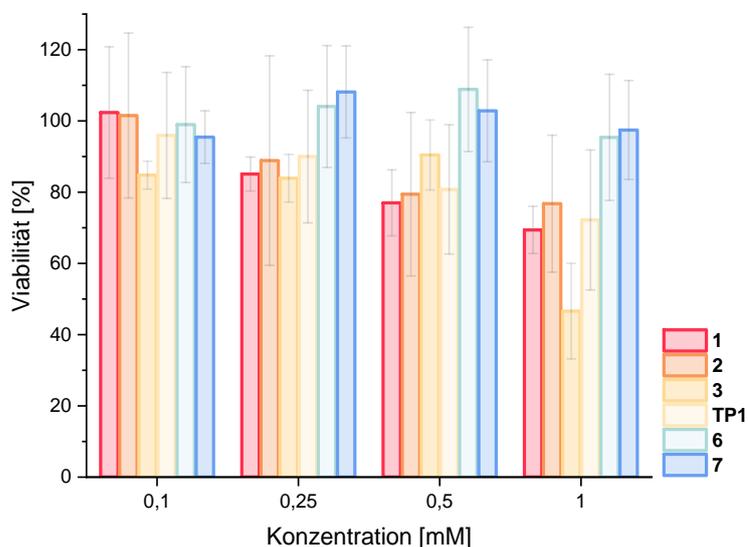


Abbildung 45: Viabilität von HeLa-Zellen mit unterschiedlicher Konzentrationen der 2'-Desoxynukleoside **1**, **2**, **3**, **6**, **7** sowie dem 2'-Desoxynukleotid **TP1**, bestimmt über MTT-Test. HeLa-Zellen, kultiviert in Medium ohne Zusatz von Nukleosiden und L-Glutamat, wurden für 48 h mit den einzelnen Verbindungen in der jeweiligen Konzentration inkubiert und anschließend mit MTT behandelt. Jede Probe wurde 6-fach bestimmt und die gemittelte Absorption nach Abzug der Absorption einer Positiv-Kontrolle (ohne metabolische Aktivität) auf eine Negativ-Kontrolle (ohne Zugabe eines modifizierten Derivats) normiert.

In Summe zeigt keines der untersuchten cyclopropenmodifizierten Derivate in dem getesteten Konzentrationsbereich eine signifikante Toxizität. Sie können daher nachfolgend in metabolischen Markierungsexperimenten eingesetzt werden.

4.3.1 Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion

Es wurde zunächst die metabolische Inkorporation der 1-MCP-modifizierten Nukleoside **1**, **2** und **3** sowie eine anschließende Markierung über die iEDDA-Reaktion betrachtet. Bei der metabolischen Markierung wird, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, der Zelle lediglich das modifizierte 2'-Desoxynukleosid zur Verfügung gestellt. Dieses soll anschließend über die Zellmembran transportiert, von der zelleigenen Enzymkaskade phosphoryliert und in die genomische DNA inkorporiert werden. Die Einbaueffizienz wird dabei unter anderem von der Akzeptanz der metabolisierenden Enzyme gegenüber dem modifizierten Substrat bestimmt, welche wiederum in Relation zur Größe der Modifikation steht.⁹ Um den Einbau von unter anderem cyclopropenmodifizierten Nukleosiden zu ermöglichen, entwickelten WAGENKNECHT *et al.* ein optimiertes Zellkulturmedium.⁹ Es handelt sich hierbei um *Minimum Essential Medium*

(MEM), welches weder natürliche Nucleoside noch L-Glutamin enthält. Letzteres ist dabei eine essenzielle Stickstoffquelle in der zellulären Nucleosidsynthese.¹⁷⁵ Durch Kultivierung in diesem, sogenanntem No/No-Medium wird in der Zelle eine künstliche Knappheit an Nucleosiden erzeugt und dadurch der Druck zur Inkorporation des modifizierten Nucleosids erhöht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Experimente zur metabolischen Markierung in No/No-Medium durchgeführt.

Zur experimentellen Durchführung der metabolischen Markierung wurden HeLa-Zellen zunächst für 48 h mit den 1-MCP modifizierten 2'-Desoxynucleosiden **1 - 3** inkubiert, wobei diese dem Zellmedium in einer Konzentration von 100 μ M zugesetzt wurden. Mit dieser Inkubationszeit sollte sichergestellt werden, dass mindestens eine Zellteilung durchlaufen wurde. Die Zellen wurden anschließend fixiert und über Nacht mit einem Tetrazin-Farbstoff **32** inkubiert. Bei **32** handelt es sich, wie zuvor beschrieben, um einen fluorogenen Farbstoff, dessen Fluoreszenz erst bei Reaktion der Tetrazinfunktion aufleuchtet und zusätzlich durch die Interkalation in DNA verstärkt wird. Aufgrund dessen sind vor der Visualisierung der Zellen über konfokale Fluoreszenzmikroskopie keine weiteren Waschschriffe zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff nötig. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Probe mit 5-Vinyl-2'-Desoxyuridin (**VdU**) als modifiziertes Derivat mitgeführt, da dieses zuvor bereits erfolgreich zu metabolischen Markierung von DNA in HeLa-Zellen eingesetzt werden konnte.¹²³ In den erhaltenen Zellbildern (Abbildung 46) ist in der Positiv-Kontrolle eine deutliche Fluoreszenz des Nucleus im Emissionsbereich von **32** ($\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 500 - 550$ nm) zu erkennen, während in der Negativ-Kontrolle mit **32** ohne die Zugabe eines reaktiven Nucleosids keine Fluoreszenz detektiert wird. Die Proben mit den 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleosiden **1 - 3** gleichen der Negativ-Kontrolle und zeigen ebenfalls keine detektierbare Fluoreszenz.

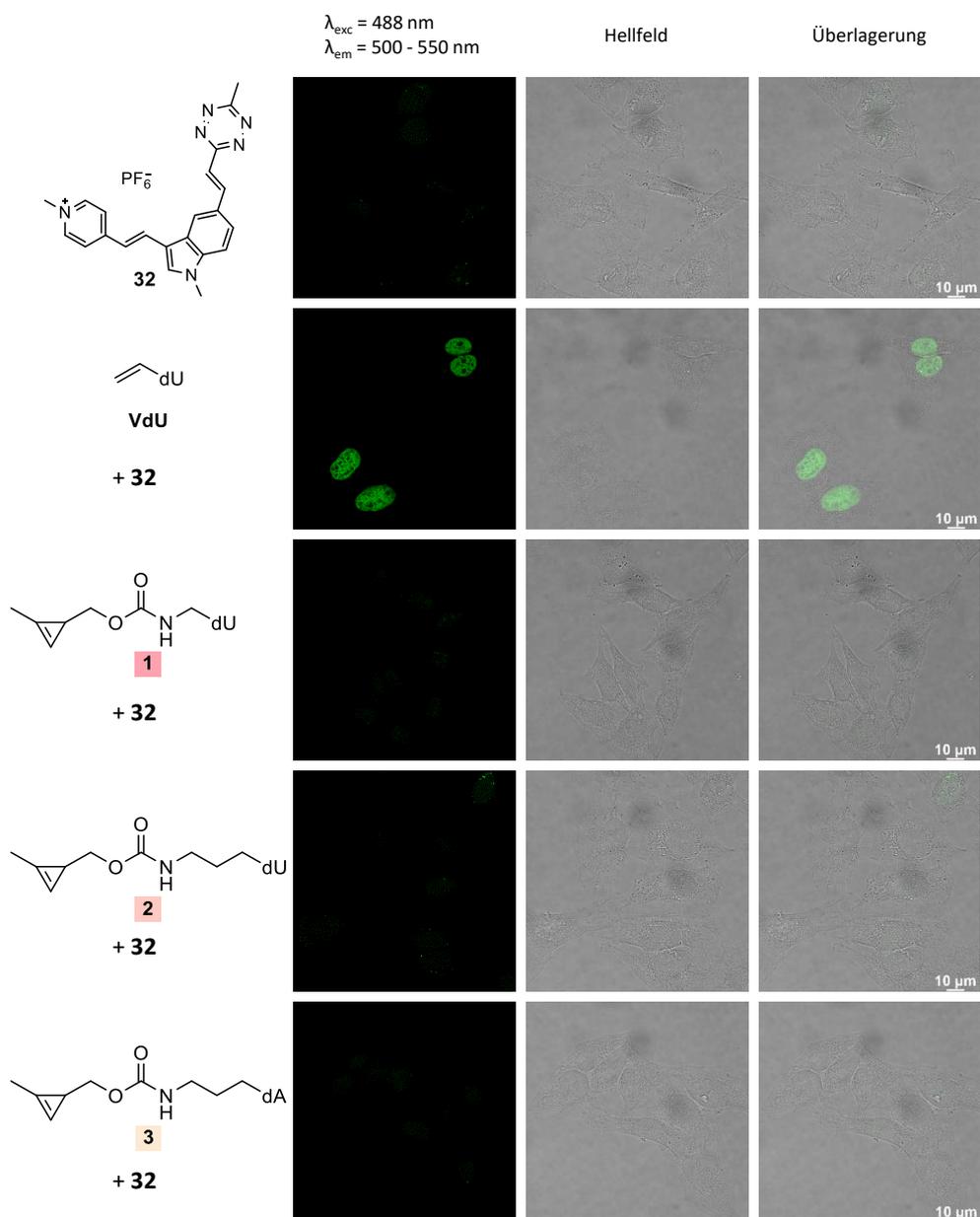


Abbildung 46: Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion unter Verwendung von **1**, **2**, **3** und **32**. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden für 48 h mit **1**, **2**, oder **3** (100 μM in Medium) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und über Nacht mit **32** (1,00 μM in Medium) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

Ein Grund für die ineffiziente metabolische Markierung könnte sein, dass das Cyclopropen für den Reaktionspartner in der dicht gepackten Chromatinstruktur der DNA nicht zugänglich ist. Um dies zu adressieren, wurde in einem weiteren Experiment die zelluläre DNA vor der Zugabe von **32** denaturiert. Die Zellen wurden hierzu für 30 min mit einer 2 M HCl-Lösung inkubiert. Jedoch konnte auch hier in den Proben mit **1** – **3** kaum Fluoreszenz detektiert werden (Anhang Abbildung A 8). In diesem Experiment könnte jedoch zusätzlich die Instabilität der 1-MCP-Gruppe in saurer Umgebung problematisch sein.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside **1 – 3** nicht ausreichend von den an der Metabolisierung beteiligten Enzymen akzeptiert und daher nicht in die genomische DNA eingefügt werden. Vorherige Studien zeigten, dass insbesondere die Kinasen, welche die Phosphorylierung des Nucleosids ausführen, aufgrund ihrer hohen Substratspezifität empfindlich auf modifizierte Substrate reagieren.¹⁵⁰ Um diese Enzyme zu umgehen und nach Möglichkeit einen effizienten Einbau der 1-MCP-modifizierten Derivate in zelluläre DNA zu erzielen, wurde anstelle der Nucleoside **1 - 3** die entsprechenden Triphosphate **TP1 – TP3** in die Zelle eingeführt. Da Triphosphate aufgrund ihrer Ladung die Zellmembran nicht überqueren können, wurde hierbei der synthetische Nucleosidtriphosphat-Transporter (SNTT) verwendet. Dieser kann, wie in Abschnitt 2.6, beschrieben Nucleosidtriphosphate über die Zellmembran transportieren und diese anschließend im Zytosol freigeben.¹⁵⁵

Der Transport des 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleotids **TP1** in HeLa-Zellen wurde in Anlehnung einem Protokoll von KRAUS *et al.* durchgeführt.¹⁵⁶ Anders als in der Literatur wurden jedoch ebenfalls HeLa-Zellen verwendet, welche in No/No-Medium kultiviert wurden. Die Zellen wurden für 10 min mit einer äquimolaren Lösung von **TP1** und SNTT in Tricin-Puffer behandelt. Letzterer ist nötig, da die im Zellmedium enthaltenen Phosphate ebenfalls einen Komplex mit SNTT bilden und so mit **TP1** konkurrieren können.¹⁵⁵ Anschließend wurde die SNTT/**TP1**-Lösung entfernt und 2 h in Medium inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, **TP1** in ihre DNA zu inkorporieren. Die Proben wurden daraufhin fixiert und über Nacht mit **32** inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums kann dabei die iEDDA-Reaktion in der Zelle stattfinden. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen lässt sich ein deutliches Fluoreszenzsignal im Bereich des Nucleus erkennen (Abbildung 47). Wird hingegen nur jeweils **TP1** oder **SNTT** einzeln zugeben und mit **32** inkubiert, entsteht diese charakteristische Färbung nicht. Die Ergebnisse lassen auf einen erfolgreichen Transport und Inkorporation von **TP1** in die genomische DNA und die anschließende Markierung über iEDDA-Reaktion mit **30** schließen.

Die Lokalisation der beobachteten Fluoreszenz im Bereich der zellulären DNA wurde über eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342 bestätigt (Anhang, Abbildung A 9). Der Vergleich der Fluoreszenz- mit der Hellfeldaufnahme in beiden Experimenten zeigt, dass nicht alle Zellkerne gleichmäßig angefärbt sind bzw. einige keine Färbung aufweisen. Dies ist dadurch begründet, dass sich nicht alle Zellen in derselben Phase des Zellzyklus befinden und daher **TP1** innerhalb der zweistündigen Inkubation nach dem Transport in die Zelle unterschiedlich effizient inkorporieren.

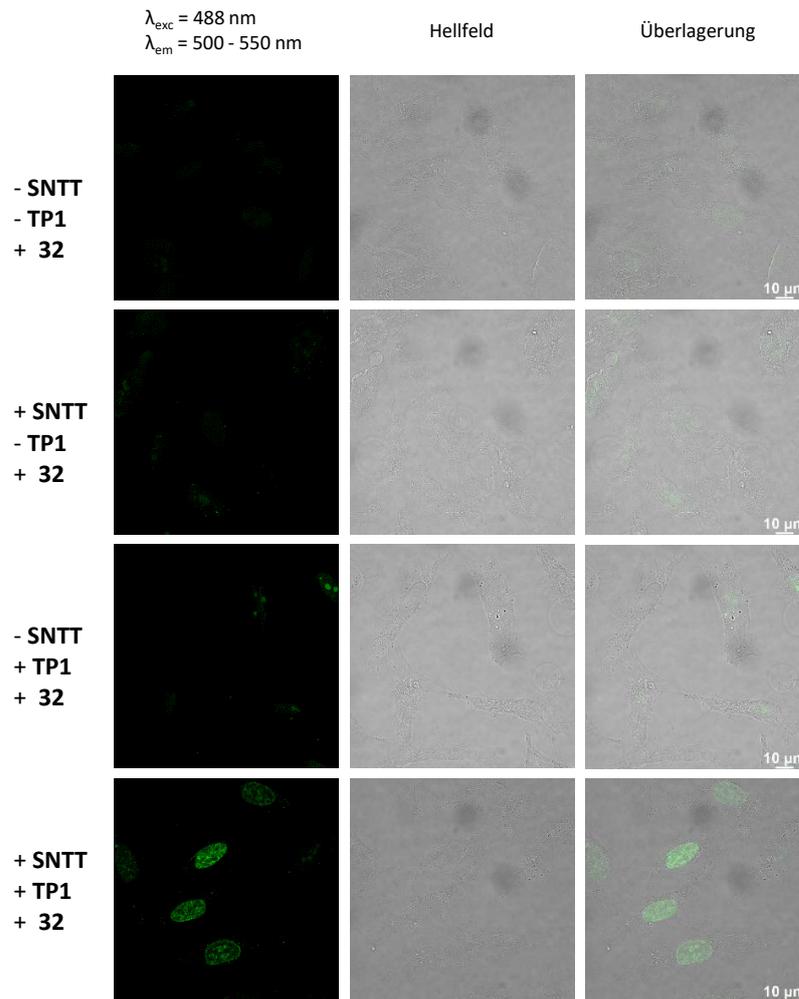


Abbildung 47: Metabolische Markierung mit **TP1** in HeLa-Zellen unter Verwendung von SNTT. Die Zellen wurden für 10 min mit einer Lösung von SNTT und **TP1** (jeweils 10 μM) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für 2 h in Medium inkubiert. Sie wurden anschließend fixiert und über Nacht mit **32** (1,00 μM in Medium) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Das Experiment wurde mit HeLa-Zellen wiederholt, welche in Standard-Zellkulturmedium (DMEM) und nicht in No/No-Medium kultiviert wurden und dementsprechend einen großen Überschuss an natürlichen Nucleosiden bzw. Nucleotiden enthalten. In der Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte keine Fluoreszenz des Nucleus detektiert werden (Anhang, Abbildung A 10), möglicherweise aufgrund des geringen Einbaus des modifizierten Nucleotids. Dies zeigt, dass auch für die Inkorporation der modifizierten Nucleosidtriphosphate optimierte Zellkulturbedingungen nötig sind.

Der Transport und nachfolgende Einbau von **TP1** in zelluläre DNA wurde anschließend näher untersucht. Hierbei wurde zunächst die initiale Inkubation mit der **TP1/SNTT**-Lösung, innerhalb welcher das reaktive Nucleotid in die Zellen transportiert wird, variiert. Neben den zuvor gewählten 10 min wurde auch eine Inkubationszeit von 5 und 15 min getestet. Die nachfolgende

Fixierung sowie Markierung erfolgte analog zu den vorhergegangenen Experimenten. In der Visualisierung über Fluoreszenzmikroskopie zeigen die Zellen bei einer Inkubation von 5 min im Vergleich zu 10 min ein schwächeres Signal (Abbildung 48), möglicherweise da innerhalb dieser Zeit nicht ausreichendes reaktives **TP1** in die Zelle transportiert werden kann. Die Intensität der Signale bei 10 und 15 min ist vergleichbar. Jedoch besitzt der Tricin-Puffer, welcher als Lösungsmittel für die Zugabe von SNTT und **TP1** verwendet wird, nach 15 min einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität. Alle nachfolgenden Experimente wurden daher mit einer Inkubationszeit von 10 min durchgeführt.

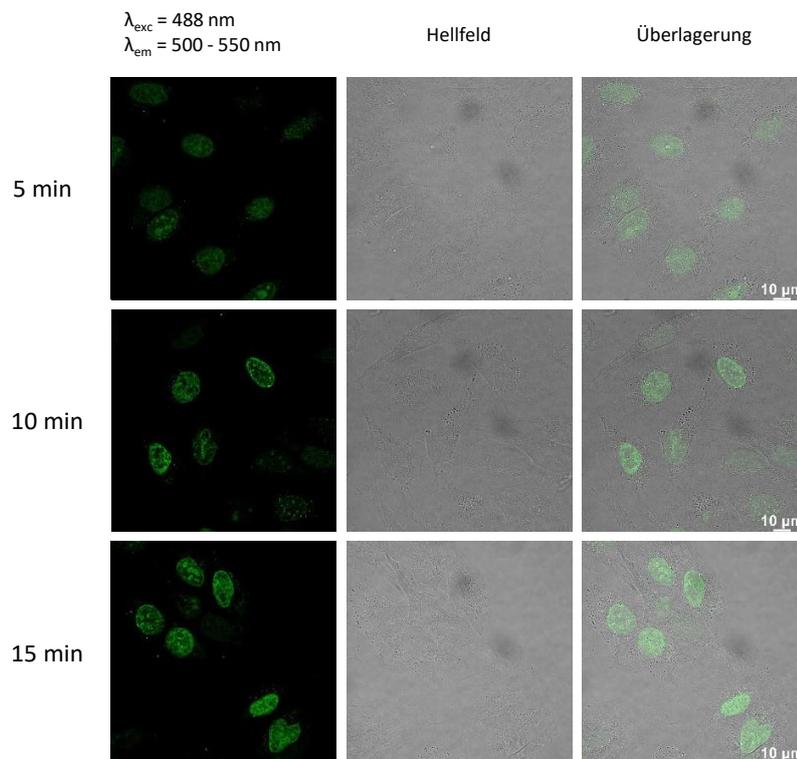


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der metabolischen Markierung von **TP1** mit Hilfe von SNTT bei unterschiedlicher Inkubationszeit mit der SNTT/**TP1** Lösung. Die Zellen wurden für 5, 10, bzw. 15 min mit der Lösung behandelt, für 2 h in Medium inkubiert und anschließend fixiert und mit **32** über Nacht inkubiert.

Als zweiter Parameter wurde die Inkubationszeit nach dem Transport von **TP1** in die Zelle betrachtet. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgt die Inkorporation von **TP1** in zelluläre DNA. Es wurden hierbei eine kurze Inkubation von einer Stunde sowie längere Inkubationszeiten von maximal 24 h gewählt. In den erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen lässt sich eine deutliche Veränderung des Fluoreszenzsignals über die verschiedenen Inkubationszeiten erkennen (Abbildung 49). Bei einer Inkubation von einer Stunde sind im Vergleich zu 2 h weniger Zellen gefärbt, vermutlich da nur wenige Zellen innerhalb der ersten Stunde die S-Phase des Zellzyklus erreichen und das modifizierte Nukleotid inkorporieren. Nach 2 h Inkubationszeit wird das stärkste Signal erhalten. Bei einer Inkubationszeit von 5 h kann eine beginnende Aggregation

des Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Diese nimmt bei längerer Inkubationszeit weiter zu. Nach 24 h werden nur noch punktförmige Signale und keine homogene Färbung des Nukleus mehr erhalten. Diese Art von Signal ist ebenfalls in der Negativ-Kontrolle bei Zugabe von **32**, ohne den vorherigen Zusatz von **TP1** und gleicher Inkubationszeit, zu erkennen (Anhang, Abbildung A 11). Es könnte sich dabei um den Einschluss von ungebundenem Farbstoff in endosomalen Vesikeln handeln. Zwar sollte dieser in unreakiertem Zustand nicht fluoreszent sein, jedoch könnte es auch durch partielle Degradation oder Hydrolyse der Tetrazin-Funktion zu einem Fluoreszenzanstieg gekommen sein. In Bezug auf die Inkorporation von **TP1** würde dies wiederum bedeuten, dass nach einer Inkubationszeit von 5 h die Menge an reaktivem Nukleotid in der zellulären DNA abnimmt. Nach 12 h befindet sich kaum noch cyclopropanmodifizierte DNA im Nukleus, weshalb keine homogene Färbung, sondern nur noch eine Aggregation des ungebundenen Farbstoffs beobachtet werden. Eine Inkubation mit dem modifizierten Triphosphat für 2 h ist daher für eine effektive Markierung der zellulären DNA am geeignetsten.

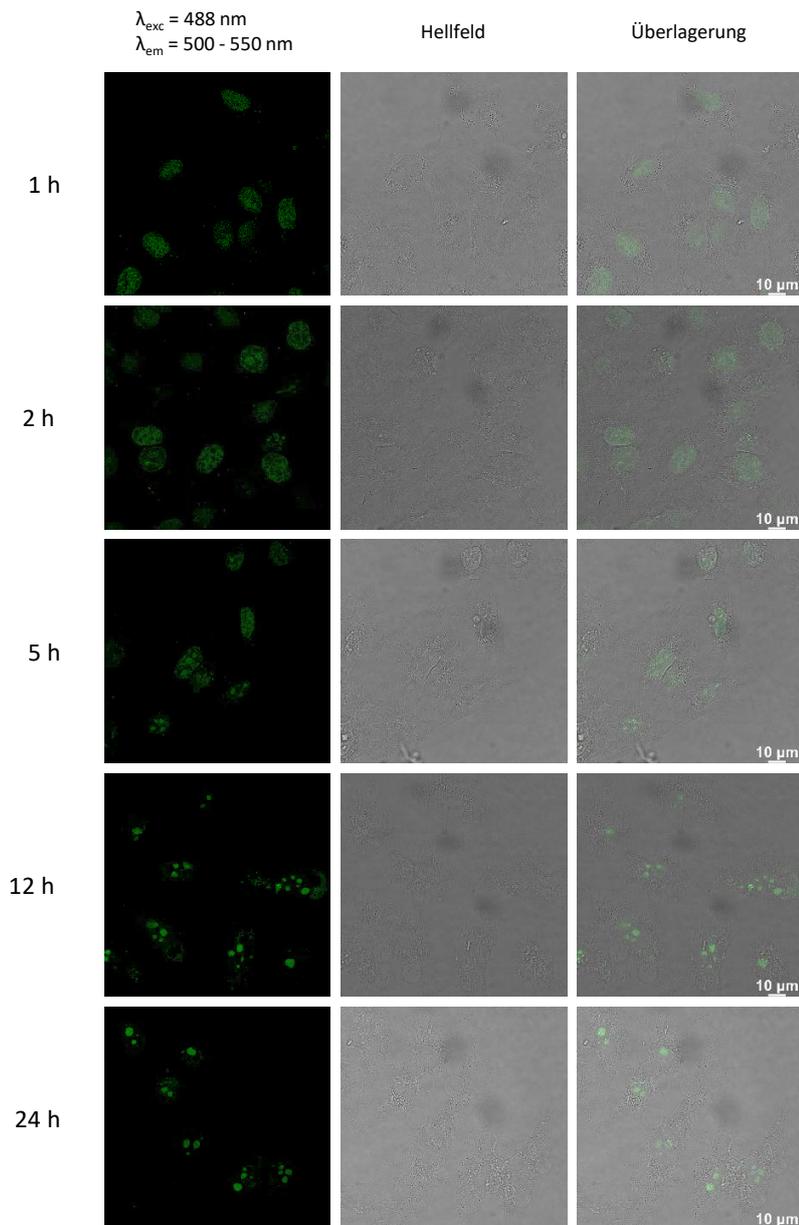


Abbildung 49: Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die metabolische Markierung von HeLa-Zellen nach dem Transport von **TP1** in die Zelle mit Hilfe von SNTT. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium wurden für 10 min mit einer SNTT/**TP1** Lösung (10 μM in Tricin-Puffer) behandelt und anschließend für die angegebenen Zeiträume in Medium inkubiert. Es wurde anschließend fixiert und über Nacht mit **32** inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Abschließend wurde außerdem untersucht, ob die Signalstärke durch Zugabe einer größeren Menge des Tetrazin-Farbstoffs **32** erhöht werden kann. Hierbei wurde neben der zuvor verwendeten Konzentration von 1,00 μM eine fünffach und zehnfach höhere Konzentration getestet. Die Durchführung der Experimente erfolgte nach den zuvor optimierten Bedingungen mit **TP1** und SNTT. In den erhaltenen Zellbildern liegt bei höherer Farbstoffkonzentration eine starke Hintergrundfluoreszenz im Zytoplasma sowie eine ausgeprägtere Aggregation des

Farbstoffs im Nukleus vor. Diese ist ebenfalls in den Negativ-Kontrollen zu finden (Anhang, Abbildung A 12). Eine verstärkte Fluoreszenz des gewünschten Signals im Nukleus lässt sich hingegen nicht erkennen bzw. das Signal kann nicht mehr eindeutig von der Hintergrundfluoreszenz des Zytoplasmas abgegrenzt werden. Für eine selektive Markierung, welche ohne die Entfernung von ungebundenem Farbstoff durch zusätzliche Waschschritte durchgeführt werden kann, ist daher eine möglichst geringe Konzentration an **32** zielführend.

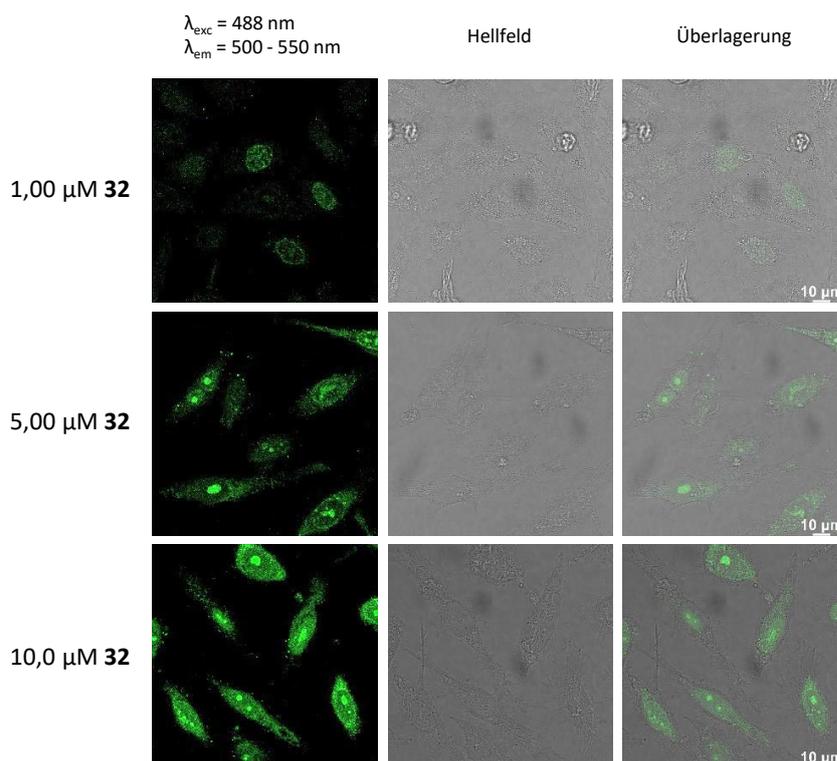


Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung unterschiedlicher Konzentrationen von **32** bei der metabolischen Markierung von HeLa-Zellen mit **TP1** und **32**. HeLa-Zellen (No/No) wurden für 10 min mit SNTT/**TP1** ($10 \mu\text{M}$ in Tricin) behandelt, 2 h in Medium inkubiert, fixiert und über Nacht mit **32** in den angegebenen Konzentrationen angefärbt.

Nach der Entwicklung eines optimierten Protokolls für **TP1** wurde auch dessen Anwendung für die metabolische Markierung mit 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten **TP2** und **TP3** mit Hilfe von SNTT und dem Cyanin-Styryl-Tetrazin-Konjugat **32** untersucht. Die erhaltenen Aufnahmen zeigen für **TP2** ebenfalls eine Fluoreszenz im Bereich des Nukleus (Abbildung 51). Diese ist in den Negativ-Kontrollen bei alleiniger Zugabe von **32** bzw. **TP2** oder SNTT mit **32** nicht zu erkennen (Anhang, Abbildung A 13). **TP2** konnte folglich ebenfalls erfolgreich mit SNTT in die Zelle transportiert, metabolisch in die genomische DNA inkorporiert und mittels iEDDA-Reaktion markiert werden. Im Vergleich zu **TP1** ist das Fluoreszenzsignal mit **TP2** bei gleicher Mikroskop-Einstellung jedoch schwächer, was eine geringere Inkorporation von **TP2** vermuten lässt. Zwar zeigten die vorhergegangenen Primerverlängerungsexperimente

einen effizienteren Einbau von **TP2** gegenüber **TP1**, jedoch sind die bakteriellen DNA-Polymerasen, welche in diesen Experimenten verwendet wurden, nur begrenzt vergleichbar mit den eukaryotischen Polymerasen der HeLa-Zelle. Im Fall der metabolischen Markierung in zellulärer Umgebung könnte die geringere Größe der Modifikation von **TP1** ausschlaggebend für die verbesserte Akzeptanz durch die Enzyme sein. Die Proben mit dem 1-MCP-modifizierten 7-Deaza-2'-Desoxyadenosin-Triphosphat **TP3**, zeigen anders als mit den anderen Triphosphaten, kein Fluoreszenzsignal (Abbildung 51). Dieses Phänomen wurde ebenfalls von HOCEK *et al.* beschrieben. Sie zeigten, dass ein BODIPY-modifiziertes dATP bei Verwendung von SNTT weniger effizient inkorporiert wird als ein entsprechendes TTP.¹⁷⁶

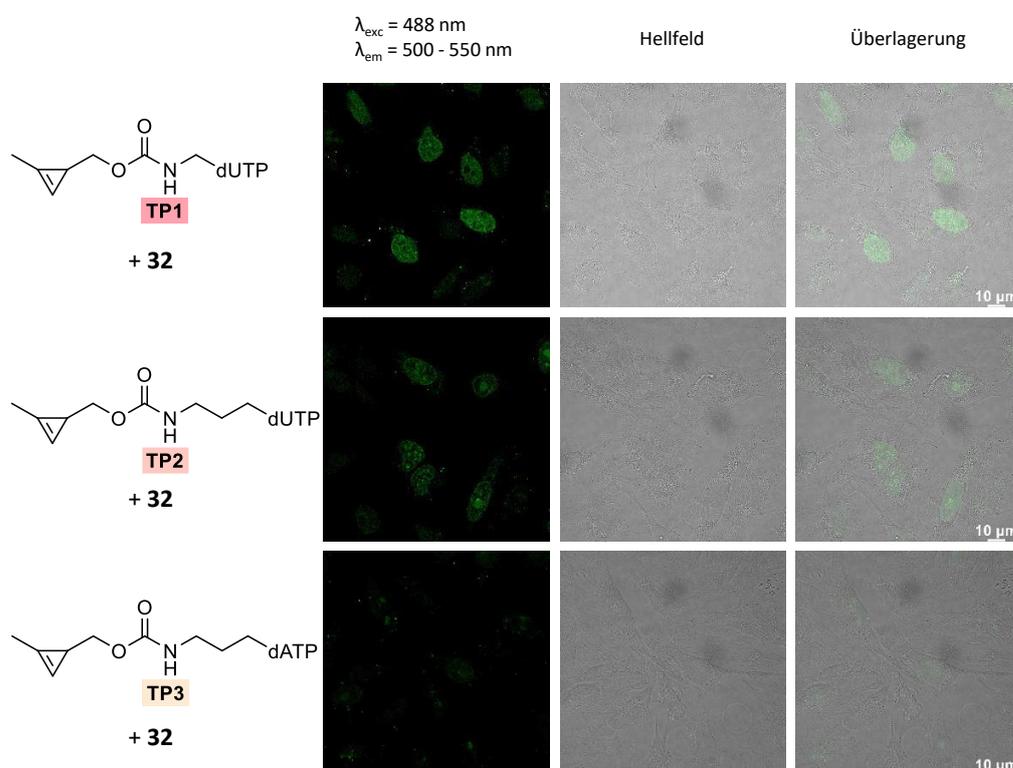


Abbildung 51: Vergleich der metabolischen Inkorporation von **TP1** – **TP3** mit Hilfe von SNTT und der anschließenden Markierung über iEDDA-Reaktion. HeLa-Zellen (No/No) wurden für 10 min mit 10 μM SNTT und **TP1** in Tricin behandelt, 2 h in Medium inkubiert, fixiert und über Nacht mit **32** angefärbt.

Zusammengenommen konnte die metabolische Markierung von DNA durch Inkorporation von zwei unterschiedlichen 1-MCP-modifizierten Substraten und anschließende iEDDA-Reaktion mit einem fluorogenen Tetrazin gezeigt werden. Die Zugabe des modifizierten 2'-Desoxynukleosids zu HeLa-Zellen führt dabei nicht zu einer Fluoreszenzmarkierung der zellulären DNA, vermutlich aufgrund der geringen Akzeptanz des Nukleosides durch die zellulären Enzyme. Wird hingegen ein entsprechendes Nukleosid-Triphosphat mit Hilfe eines synthetischen Triphosphat Transporters in die Zelle transportiert, kann eine signifikante Fluoreszenz des Nukleus detektiert werden. Dadurch lässt sich schlussfolgern, dass im Fall der 1-MCP-modifizierten Nukleoside der

Phosphorylierungsschritt durch die Kinasen ausschlaggebend für die ineffiziente Inkorporation in zelluläre DNA war. Werden diese Enzyme jedoch umgangen, ist eine metabolische Inkorporation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 1-MCP-modifizierten Nukleosid-Triphosphate und bioorthogonale Markierung der genomischen DNA in der Zelle möglich.

4.3.2 Metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion

Die metabolische Markierung von DNA über die Photoclick-Reaktion mit einer 3-MCP-Funktion in zellulärer Umgebung wurde ebenfalls untersucht. Ähnlich zu den 1-MCP modifizierten Derivaten wurde zunächst die metabolische Inkorporation der jeweiligen 2'-Desoxynukleoside **6** und **7** betrachtet. Als Reaktionspartner wurde das pyrenmodifizierte Tetrazol **31** verwendet. Dieses wurde von L. RIEGER bereitgestellt.

Die allgemeine Durchführung erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von WAGENKNECHT *et al.*⁹⁵, wobei ebenfalls in No/No Medium kultivierte HeLa-Zellen eingesetzt wurden. Die beiden modifizierten Nukleoside **6** und **7** wurden in einer Konzentration von 100 µM in das Zellmedium gegeben und die Zellen für 48 h in diesem inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, die Zellmembran mit Hilfe von Triton-X 100 permeabilisiert und die zelluläre DNA durch Inkubation mit einer HCl-Lösung denaturiert. Für die nachfolgende Photoclick-Reaktion wurden die Zellen zunächst mit **31** versetzt. Da vorherige Studien⁹⁵, aber auch die in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Photoclick-Experimente mit DNA *in vitro* gezeigt hatten, dass die Photoclick-Reaktion mit **31** die Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Acetonitril, benötigt, wurde **31** in Form einer 30 µM Lösung in Acetonitril zu den Zellproben gegeben. Nach Inkubation von einer Stunde mit **31** wurden die Zellen für 20 min bei 405 nm belichtet, wobei die Temperatur konstant bei 20 °C gehalten wurde. Ungebundener Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit Acetonitril entfernt. Als Positiv-Kontrolle wurde die metabolische Markierung mit VdU durchgeführt, da diese mit dem verwendeten Protokoll bereits literaturbekannt ist.⁹⁵

In der nachfolgenden Visualisierung über konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 52) zeigen die Zellen der Positiv-Kontrolle eine Fluoreszenz im Nukleus im Detektionsbereich von **31** ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 - 500 \text{ nm}$). In der Negativ-Kontrolle bei alleiniger Zugabe von **31** ist hingegen keine Fluoreszenz erkennbar. In Proben mit **6** und **7** liegt ähnlich zur Positiv-Kontrolle eine Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns vor. Dies lässt auf eine Inkorporation der 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside in die zelluläre DNA und erfolgreiche photoinduzierte Markierung mit **31** schließen. Die Lokalisierung der beobachteten Fluoreszenz im Bereich der zellulären DNA wurde zusätzlich mit einer Gegenfärbung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DRAQ5 bestätigt (Anhang, Abbildung A 15).

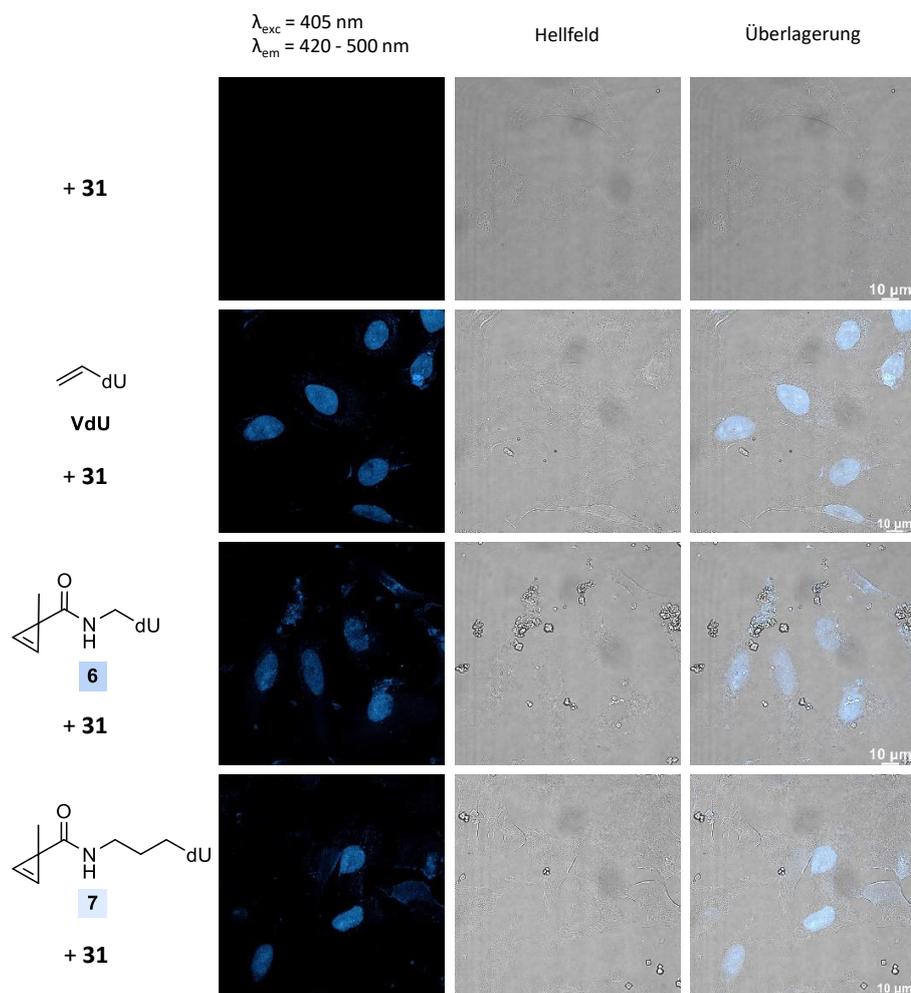


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der metabolischen Inkorporation von **6** und **7** in zelluläre DNA mit anschließender Photoclick-Reaktion mit **31** nach DNA-Denaturierung. HeLa-Zellen (No/No) wurden für 48 h mit **6** bzw. **7** (100 μM) in Medium inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und die zelluläre DNA denaturiert. Anschließend wurde 1 h mit einer Lösung von **31** (30 μM in MeCN) inkubiert und die Proben 20 min bei 405 nm belichtet. Die metabolische Markierung mit VdU diente als Positiv Kontrolle.

Das Experiment wurde ohne Denaturierung der zellulären DNA vor der bioorthogonalen Markierung wiederholt. Die Zellen wurden hierbei nach der Fixierung für 1 h mit **31** inkubiert und anschließend entsprechend den vorherigen Bedingungen belichtet. Jedoch konnte in der nachfolgenden Analyse über Fluoreszenzmikroskopie kein Fluoreszenzsignal gefunden werden (Anhang, Abbildung A 16). Möglicherweise ist die Modifikation ohne vorherige Denaturierung nicht ausreichend zugänglich für den Reaktionspartner.

Werden die Ergebnisse der metabolischen Markierungsexperimente mittels Photoclick- und iEDDA-Reaktion gemeinsam betrachtet, lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die Inkorporationseffizienz der modifizierten Substrate in DNA durch die zellulären Enzyme als auch die Zugänglichkeit der Modifikation in der Chromatinstruktur ausschlaggebend für den Erfolg

der Markierungsreaktion sind. Mit den modifizierten Nukleosiden **1 - 3** sowie auch **6** und **7** konnte die metabolische Markierung der zellulären DNA in ihrer nativen Struktur nicht gezeigt werden. Wird hingegen ein zusätzlicher Denaturierungsschritt vor der bioorthogonalen Reaktion eingefügt und die Modifikation so besser zugänglich, ließ sich die Markierung der 3-MCP-Funktion mittels Photoclick-Reaktion erfolgreich durchführen. Im Fall der 1-MCP-modifizierten Derivat könnte das Ausbleiben der Markierung möglicherweise auf die Instabilität der reaktiven Gruppe unter den stark sauren Bedingungen der DNA-Denaturierung zurückzuführen sein. Eine Markierung von 1-MCP-modifizierter zellulärer DNA über iEDDA-Reaktion ist dennoch möglich, wenn das entsprechende modifizierte Nukleosidtriphosphat anstelle des Nukleosids eingeführt wird. Hierbei sind weniger zelluläre Enzyme an der Metabolisierung des modifizierten Substrats beteiligt und so wird potenziell dessen Inkorporation verbessert. In diesem Fall ist zudem keine Denaturierung der DNA nötig. Möglicherweise kompensiert hierbei die höhere Inkorporationseffizienz die erschwerte Zugänglichkeit der Modifikation.

Zusammengenommen konnte mit beiden isomeren Cyclopropenen als chemische Reporter eine Markierung der zellulären DNA über eine bioorthogonale iEDDA- oder Photoclick-Reaktion gezeigt werden. Die Cyclopropen-Gruppe kann dabei in Form eines 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosids bzw. eines 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphats von den zellulären Enzymen in die genomische DNA eingefügt werden. Die Ergebnisse stellen eine wichtige Erweiterung des Anwendungsspektrums von Cyclopropenen in der bioorthogonalen Markierung von DNA dar.

4.3.3 Duale Markierung mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktion

Nachdem die Markierung der DNA in HeLa-Zellen mittels cyclopropenbasierter Photoclick- und iEDDA-Reaktion jeweils einzeln gezeigt werden konnte, wurde abschließend untersucht, ob diese auch zur dualen bioorthogonalen und orthogonalen Markierung kombiniert werden können.

Hierbei wurden die beiden zuvor erarbeiteten Markierungsprotokolle entsprechend Abbildung 53 kombiniert. Die 3-MCP-Funktion sollte dabei metabolisch über 2'-Desoxynukleosid **6** eingeführt werden. Für die anschließende Markierung wurde das pyrenmodifizierte Tetrazol **31** gewählt. Die Einführung der 1-MCP-Funktion sollte in Form des 2'-Desoxynukleotids **TP1** in Kombination mit SNTT erfolgen. Um eine eindeutige Detektion der beiden Markierungsprodukte in getrennten Fluoreszenzkanälen zu gewährleisten, wurde der tetrazinmodifizierte Farbstoff **33** eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine abgewandelte Version von **32**, welche einen Chinolin-Rest anstelle von Pyridin trägt und eine charakteristische Emission zwischen 600 und 650 nm besitzt. **33** wurde von P. GENG bereitgestellt.

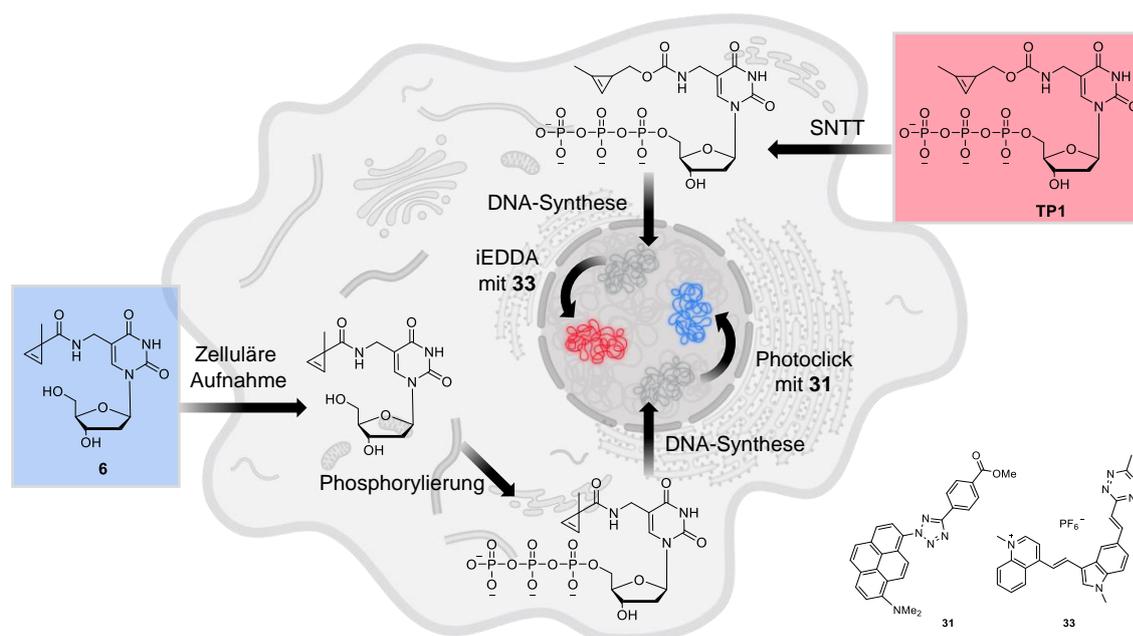


Abbildung 53: Schematische Darstellung der dualen bioorthogonalen und orthogonalen Markierung mittels cyclorpropenbasierter iEDDA- und Photoclick-Reaktion. Die 3-MCP-Funktion soll in Form von 2'-Desoxynucleosid **6** metabolisch in die DNA eingefügt und mit Hilfe von **31** photoinduziert markiert werden. Die 1-MCP-Gruppe hingegen soll als Triphosphat **TP1** mit Hilfe von SNTT eingeführt und mit **33** in einer iEDDA-Reaktion umgesetzt werden.

Es wurde zunächst untersucht, ob eine Orthogonalität der beiden Markierungsprotokolle in der Zelle gegeben ist. Nur bei selektiver Reaktion der beiden funktionellen Gruppen mit jeweils einem Reaktionspartner ist eine duale bioorthogonale Markierung von zellulärer DNA möglich. Im ersten Schritt wurde die orthogonale Reaktivität von 1-MCP modifizierter DNA betrachtet. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden für 10 min mit einer **TP1**/SNTT-Lösung behandelt und anschließend 2 h in Medium inkubiert. Wurde nach Fixierung der Zellen eine iEDDA-Reaktion mit Tetrazin **33** durchgeführt, kann analog zu den Experimenten mit **33** mittels Fluoreszenzmikroskopie eine charakteristische Fluoreszenz der Zellnuklei im Detektionsbereich des Tetrazinfarbstoffs ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 - 650 \text{ nm}$) beobachtet werden. Wurde hingegen nach dem zuvor beschriebenen Protokoll eine Photoclick-Reaktion mit **31** durchgeführt, lässt sich keine Fluoreszenz des Nukleus im Emissionsbereich von **31** ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 - 500 \text{ nm}$) erkennen (Abbildung 54). Nachfolgend wurde auch die orthogonale Markierung der 3-MCP-Gruppe in der Zelle untersucht. Hierbei wurden die Zellen zunächst für 48 h mit 2'-Desoxynucleosid **6** inkubiert. Nach anschließender Fixierung und DNA-Denaturierung wurde eine Probe mit **31** photoinduziert markiert. Hierbei ergibt sich wie zuvor eine charakteristische Fluoreszenz der Nuklei im Emissionsbereich von **31**, was auf eine erfolgreiche Markierung schließen lässt. Mit einer zweiten Probe wurde eine Markierung über iEDDA-Reaktion mit **33** durchgeführt. In den erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen lässt sich keine Fluoreszenz der Zellen im Emissionsbereich von **33** erkennen (Abbildung 54).

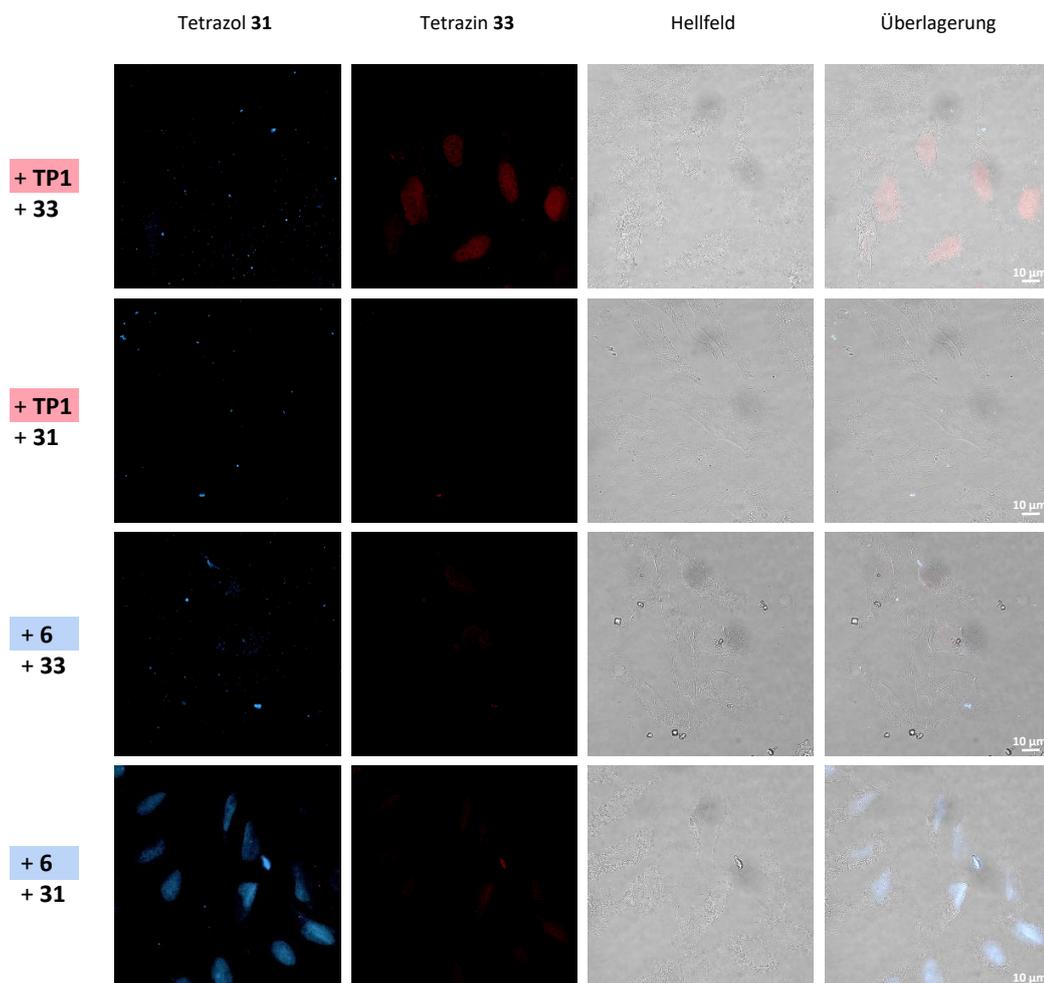


Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der orthogonalen metabolischen Markierung über iEDDA- und Photoclick-Reaktion mit 1-MCP und 3-MCP-Funktionen in HeLa-Zellen. Zur Inkorporation von 1-MCP wurden die Zellen für 10 min mit einer TP1/SNTT Lösung behandelt und anschließend 2 h in Medium inkubiert. Im Fall von 3-MCP wurde 6 dem Zellenmedium zugesetzt und die Zellen 48 h in diesem inkubiert. Die Proben wurden anschließend nach den zuvor entwickelten Protokollen mit iEDDA-Reaktion mit 33 oder einer Photoclick-Reaktion mit 33 markiert. 31: $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 420 - 500 \text{ nm}$; 33: $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 600 - 650 \text{ nm}$.

Zusammengenommen bestätigen die Experimente die Orthogonalität der beiden Markierungsprotokolle mit 1- und 3-Methylcyclopropenen auch in zellulärer Umgebung. Um schließlich die duale und orthogonale Markierung genomischer DNA nachzuweisen, wurde der folgende Arbeitsablauf etabliert, der alle notwendigen intrazellulären Transport- und Markierungsschritte kombiniert. HeLa-Zellen wurden 48 h mit dem 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosid 6 inkubiert und anschließend mit einer Lösung von SNTT und dem 1-MCP-modifizierten Nukleosidtriphosphat TP1 in Tricin-Puffer behandelt. Nach zweistündiger Inkubation im Medium wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit dem Tetrazin-Farbstoff 33 versetzt, um die IEDDA-Markierung zu ermöglichen. Die genomische DNA wurde dann einer HCl-Denaturierung unterzogen, und schließlich wurden die Zellen nach einstündiger Inkubation in

Gegenwart des Tetrazol-Farbstoffs **31** bei 405 nm bestrahlt, um die Photoclick-Markierung zu induzieren. Die Bilder dieser Zellen zeigen eine starke Fluoreszenz im Zellkern in beiden Emissionskanälen (Abbildung 55). Besonders bemerkenswert ist, dass sich die Fluoreszenzsignale nicht vollständig überlagern, was für eine doppelte Markierung der genomischen DNA durch zwei verschiedene Fluoreszenzmarker spricht.

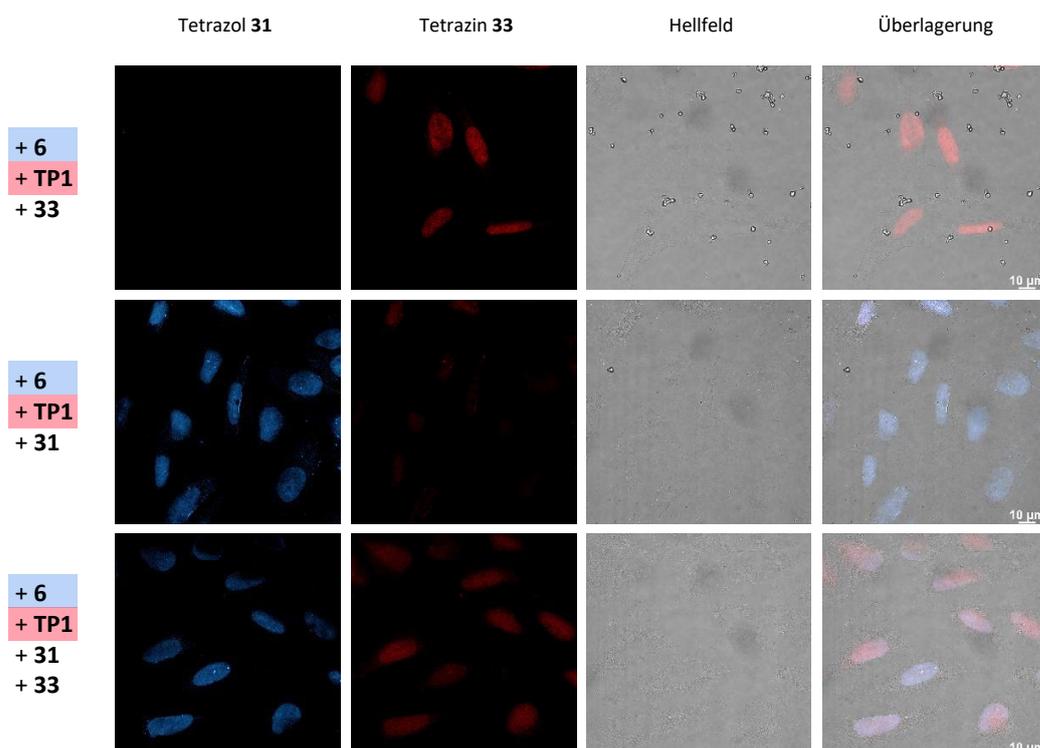


Abbildung 55: Duale bioorthogonale Markierung der zellulären DNA in HeLa-Zellen durch metabolische Inkorporation einer 1-MCP und 3-MCP Funktion. Die beiden chemischen Reporter wurden durch 48-stündige Inkubation mit **6** sowie 10-minütige Behandlung mit **TP1/SNTT** und mit nachfolgender zweistündiger Inkubation in Medium eingeführt und anschließend mittels iEDDA-Reaktion mit **33**, gefolgt von einer Photoclick-Reaktion mit **31** markiert. Wird jeweils nur eine bioorthogonale Reaktion in Anwesenheit beider isomere Cyclopropene in der Zelle durchgeführt lässt sich jeweils ein definiertes Signal im Nukleus im jeweiligen Emissionskanal des Reaktionspartners erkennen.

Die Ergebnisse bestätigen die Orthogonalität der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten metabolischen Markierung über iEDDA- und Photoclick-Reaktion mit Methylcyclopropenen in der Zelle. Diese Eigenschaft konnte anschließend für die duale bioorthogonale und orthogonale Markierung von zellulärer DNA genutzt werden. Das hierbei entwickelte Protokoll stellt eine Grundlage für die Entwicklung neuer Markierungsstrategien dar, welche zukünftig die Untersuchung von Funktionsweise und auch der Interaktion von Nukleinsäuren auf molekularer Ebene *in vivo* ermöglichen kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die duale bioorthogonale Markierung von DNA durch eine orthogonale iEDDA- und Photoclick-Reaktion mit Hilfe isomerer Cyclopropenen entwickelt. Die Orthogonalität der beiden Reaktionen wurde dabei zunächst anhand methylcyclopropen-modifizierter Nucleoside untersucht und so bestätigt, dass diese sich für die geplante Anwendung eignen. 1-MCP- sowie 3-MCP-modifizierten Nucleosidtriphosphate wurden anschließend enzymatisch in Oligonucleotide eingefügt und die Markierung auf DNA-Ebene *in vitro* betrachtet. Abschließend erfolgte die Markierung der DNA *in vivo* anhand von HeLa-Zellen, wobei die 1-MCP und 3-MCP-modifizierten Nucleoside bzw. Nucleotide metabolisch durch die zelleigenen Enzyme in die genomische DNA eingefügt wurden (Abbildung 56).

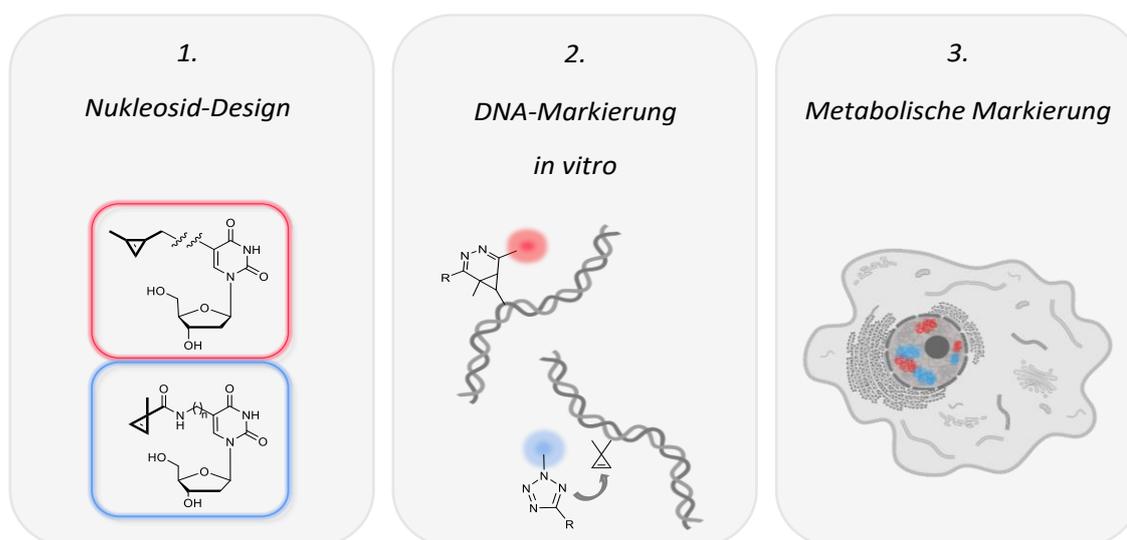


Abbildung 56: Überblick über die verschiedenen Projektteile, die zur Entwicklung cyclopropenbasierter dualer Markierung von DNA bearbeitet wurden.

Zu Beginn wurde eine kleine Bibliothek 1-MCP-modifizierter 2'-Desoxynucleoside mit unterschiedlicher Verknüpfung von 1-MCP und Nucleobase synthetisiert, um diese für die geplante Anwendung zu optimieren. Hierbei wurden Harnstoff- sowie Carbamat-Gruppen in Kombination mit Methyl- und Propyllinkern verwendet. Neben der Positionierung der Modifikation an C5 von Thymin, wurde auch ein an 7-Position modifiziertes 7-Deaza-2'-Desoxyadenosin hergestellt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Verbindungen in einer iEDDA-Reaktion mit einem Modell-Tetrazin wurden mittels RP-HPLC bestimmt, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen unterschiedlichen Linkerlängen oder -typen. Auch der Einfluss der Nucleobase auf die Kinetik war in diesem Fall gering. Die über eine Carbamat-

Gruppe verknüpften 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside lieferten im Durchschnitt die höchsten Geschwindigkeitskonstanten und wurden daher in den nachfolgenden Experimenten an DNA verwendet. Im Hinblick auf eine Anwendung zur dualen und orthogonalen Markierung wurde außerdem die Reaktivität der Verbindungen mit der von bekannten 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden verglichen. Hierbei wurde selektiv nur für 1-MCP-Derivate eine iEDDA-Reaktion beobachtet und damit auch für cyclopropenmodifizierte Nukleoside die in Literatur beschriebenen Reaktivitätsunterschiede bestätigt. Zusätzlich konnte jedoch auch eine bevorzugte Reaktion der 3-MCP-Gruppe mit einem Nitrilimin in einer Photoclick-Reaktion gegenüber der 1-MCP festgestellt werden. Dies ließ sich für alle Derivate unabhängig von Linker und Nukleobase beobachten. Die Grundlagen für eine Anwendung zu dualen und orthogonalen Markierung von DNA wurden dadurch nachgewiesen.

Drei über eine Carbamat-Gruppe verknüpfte 1-MCP-modifizierte 2'-Desoxynukleoside wurden anschließend in die entsprechenden Nukleosidtriphosphate überführt und enzymatisch über Primerverlängerungsexperimente in DNA eingefügt. Hierbei wurden die modifizierten Derivate von allen drei getesteten Polymerasen akzeptiert und mit hoher Effizienz anstelle des entsprechenden natürlichen Nukleotids inkorporiert. Eine postsynthetische Markierung der 1-MCP-modifizierten DNA mittels iEDDA-Reaktion konnte anschließend mit zwei unterschiedlichen fluoreszenten Tetrazin-Derivaten gezeigt werden. Die Markierungsreaktion mit einem Cyanin-Styryl-Tetrazin-Konjugat ließ sich dabei innerhalb von Minuten mit vollständigem Umsatz der Edukt-DNA durchführen. Zwei 3-MCP-modifizierte Nukleotide konnten ebenfalls enzymatisch in ein Oligonukleotid eingefügt werden. Eine nachfolgende Photoclick-Reaktion der modifizierten DNA konnte jedoch unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen nicht gezeigt werden. Eine Hauptursache könnten dabei die großen Polaritäts- und damit verbunden Löslichkeitsunterschiede der DNA und den verwendeten Tetrazolen gewesen sein. Für nachfolgenden Experimente zur DNA-Markierung über Photoclick-Reaktion *in vitro* könnte daher die Entwicklung eines wasserlöslichen Tetrazols mit einem DNA-affinen Substituenten zielführend sein.

Im letzten Teil des Projekts wurde die metabolische Inkorporation der cyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynukleoside und die anschließende bioorthogonale Markierung mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktion in HeLa-Zellen untersucht. Im Fall der 1-MCP modifizierten Derivate ließ sich bei Zugabe des Nukleosids in das Zellmedium und anschließender Fixierung sowie Inkubation mit dem fluorogenen Cyanin-Styryl-Tetrazin-Konjugat, sowohl ohne als auch mit Denaturierung der genomischen DNA, keine Markierung feststellen. Wird jedoch das entsprechende modifizierte Triphosphat über einen synthetischen Nukleosid-Triphosphat Transporter in die Zelle eingeführt, konnte nach der Markierung mit iEDDA-Reaktion in fixierten Zellen eine deutliche Fluoreszenz des Nukleus detektiert und damit die erfolgreiche

Inkorporation und Markierung des 1-MCP modifizierten Nucleotids gezeigt werden. Die Markierung ist hierbei zudem ohne vorherige DNA-Denaturierung möglich. Dies ist vermutlich durch eine höhere Inkorporationsrate des modifizierten Triphosphats im Vergleich zu dem entsprechenden Nucleosid zu erklären, da die Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen entfällt. Bei nachfolgender Untersuchung der metabolischen Markierung mit 3-MCP-modifizierten Nucleosiden ließ sich in fixierten Zellen nach DNA-Denaturierung die Photoclick-Reaktion mit einem Pyrenetetrazol erfolgreich nachweisen. Letzteres wurde dabei in Form einer Lösung in Acetonitril zugegeben, um die zuvor beschriebenen Löslichkeitsprobleme zu umgehen. In diesem Fall führt möglicherweise die bessere Zugänglichkeit der Modifikation nach DNA-Denaturierung in Kombination mit der höheren Stabilität der 3-MCP-Funktion unter den Denaturierungsbedingungen einer effizienten Markierung. Die beiden metabolischen Markierungsprotokolle wurden abschließend zur dualen Markierung der zellulären DNA kombiniert. Um Kreuzreaktionen, die zur unspezifischen Markierung führen würden, auszuschließen, wurde zunächst die Orthogonalität der beiden Markierungsprotokolle mit den isomeren Methylcyclopropenen auch in der Zelle bestätigt. Abschließend konnte durch Kombination aller nötigen intrazellulären Transport- und Markierungsschritte in definierter Reihenfolge ein Protokoll für die duale metabolische Markierung der genomischen DNA entwickelt werden. Die markierten Zellen zeigen hierbei eine signifikante aber nicht vollständig überlappende Fluoreszenz in beiden Emissionskanälen der Reaktionspartner (Abbildung 57).

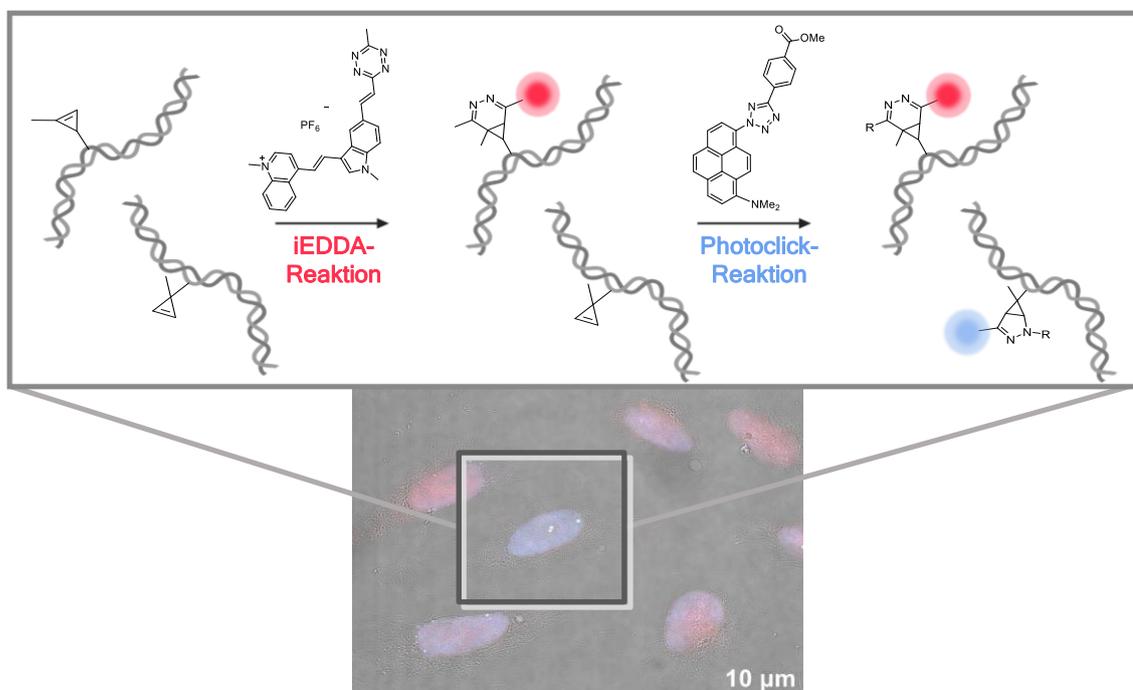


Abbildung 57: In dieser Arbeit entwickelte Methode zur dualen Markierung der DNA in HeLa-Zellen durch metabolische Inkorporation von 1-MCP- bzw. 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynucleosiden bzw. -nucleotiden und sequenzieller Markierung über iEDDA- und Photoclick-Reaktion.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode stellt eine wichtige Erweiterung der Visualisierungsmöglichkeit von Nukleinsäuren über bioorthogonale Reaktionen *in vivo* dar. Auf Basis dieser könnten zukünftig Markierungsstrategien entwickelt werden, die die Untersuchung von Funktionsweise oder Interaktion von Nukleinsäuren auf molekularer Ebene in lebenden Organismen ermöglichen. Für eine Anwendung in lebenden Zellen sollte jedoch zunächst eine Anpassung der Photoclick-Markierung durchgeführt werden. Die Denaturierung der genomischen DNA könnte dabei durch Steigerung der Inkorporationsrate des modifizierten Substrats vermieden werden, beispielsweise durch Inkorporation des entsprechenden Triphosphats anstelle des Nucleosids. Des Weiteren ist bei Entwicklung eines wasserlöslichen Tetrazolfarbstoffs auch eine Durchführung in Zellmedium denkbar. Durch Optimierung der einzelnen Protokolle könnten anschließend auch beiden Markierungsreaktionen in der Zelle simultan durchgeführt werden, wodurch das Anwendungsspektrum zusätzlich erweitert wird. Neben der Markierung zweier DNA-Stränge könnte auch die duale Markierung von DNA und RNA bzw. zwei RNA-Molekülen verfolgt werden. Dies ist insbesondere aufgrund der vielen bisher unbekannt Funktionen und Wirkungsweise von zellulärer RNA auch in der Zukunft relevant.

6. EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Materialien, Methoden und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die eingesetzten Reagenzien wurden von den Firmen ABCR, ALPHA AESAR, MERCK, JENA BIOSCIENCE, SIGMA ALDRICH, TCI und VWR erworben. Sie wiesen mindestens die Qualitätsstufe „zur Synthese“ auf und wurden ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Die Reagenzien für Primerverlängerungsexperimente wurden von NEW ENGLAND BIOLABS sowie JENA BIOSCIENCE bezogen. Die verwendeten DNA-Stränge wurden in HPLC-Grad Reinheitsstufe von der Firma METABION hergestellt.

Die zur Synthese verwendeten Lösungsmittel entsprachen der Reinheitsstufe *pro analysis*. Trockene Lösungsmittel wurden dabei von der Firma ACROS ORGANICS bezogen und über Molekularsieb sowie unter Inertgas aufbewahrt. Für die Aufreinigungen der synthetisierten Verbindungen wurden, falls nicht anders angegeben, technische Lösungsmittel verwendet. HPLC-Trennungen wurden ausschließlich mit hochreinen organischen Lösungsmitteln (*HPLC grade*) der Firma FISCHER SCIENTIFIC sowie Wasser, welches mit Hilfe einer MERCK *Millipore Q8-Anlage* ultrafiltriert und entionisiert wurde, durchgeführt.

Reaktionsführung

Luft- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden nach der SCHLENK-Technik unter Argonatmosphäre (Argon 5.0, 99.999 % Reinheit) durchgeführt. Glasapparaturen wurden hierbei zunächst dreimal unter Hochvakuum (10^{-3} mbar) gesetzt, mit einem Heißluftföhn (500 °C) ausgeheizt und anschließend mit Argon geflutet. Für Reaktionen, die eine Durchführung bei tieferen Temperaturen erforderten, wurden folgende Kältemischungen verwendet:

0 °C	Eis/ Wasser
-15 °C	Eis/ NaCl
- 78 °C	Trockeneis/ Isopropanol

Lösungsmittel wurden an einen wasser- bzw. stickstoffgekühlten Rotationsverdampfer bei 40 °C bzw. 50 °C unter vermindertem Druck entfernt.

Belichtungsexperimente

Belichtungsexperimente wurden in einer von der Universität Regensburg sowie der Werkstatt des Instituts für organische Chemie entwickeltem Belichtungsapparat durchgeführt. Hierbei wurden folgende lichtemittierende Dioden (LED) verwendet, welche unterhalb der Probe angebracht waren.

Belichtung bei 308 nm: DUV310-SD351EV LED (ROITHNER LASERTECHNIK GMBH)

Belichtung bei 405 nm: NVSU233A LED (NICHIA)

Die Emissionsspektren der verwendeten LEDs sind Abbildung 58 gezeigt.

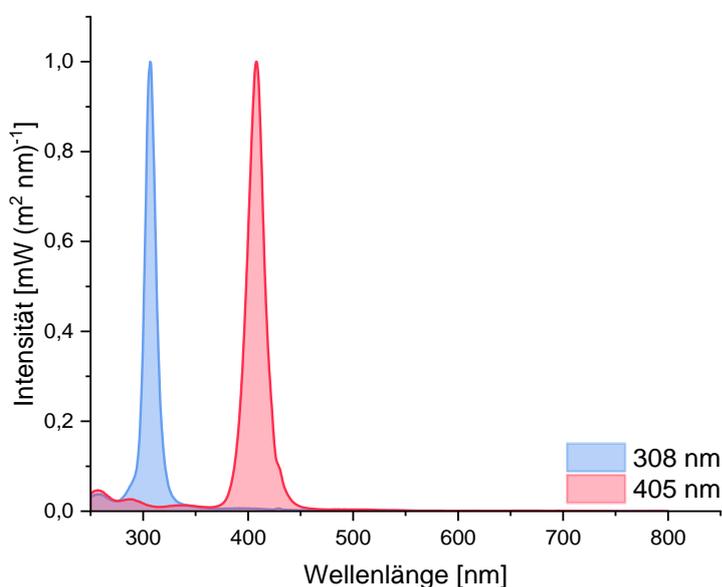


Abbildung 58: Emissionsspektrum der verwendeten LED bei Belichtung bei 308 nm sowie 405 nm.

Als Reaktionsgefäße wurden Quarzglasröhrchen (Schichtdicke 1,00 cm) der Firma STARNA verwendet und die Proben zwischen den Belichtungszeiten in regelmäßigen Intervallen kurz durchmischt. Die Temperatur der Proben, welche für das jeweilige Experiment angegeben ist, wurde während der Belichtung mit Hilfe eines LAUDA ALPHA R8 Thermostats bei der im jeweiligen Experiment angegebenen Temperatur konstant gehalten.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für Dünnschichtchromatographien wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten der Firma MERCK verwendet (Kieselgel 60 F₂₅₄; 0,25 mm Schichtdicke). Die Detektion erfolgte mittels UV-Lampen mit einer Anregungswellenlänge von 254 nm sowie 366 nm. Des Weiteren wurden zur Visualisierung eine Kaliumpermanganat-Lösung (1,00 g KMnO₄; 2,50 g K₂CO₃; 0,10 g NaOH; 100 ml H₂O) und 3,00 % Schwefelsäure (98 %) in MeOH als Färbereagenzien eingesetzt.

Flash-Säulenchromatographie

Die säulenchromatische Aufreinigung der synthetisierten Verbindungen erfolgte unter Verwendung von Kieselgel 60 der Firma SIGMA ALDRICH (Porengröße 60 Å, Partikelgröße 40 - 60 µm) als stationäre Phase. Die Probengemische wurden in der mobilen Phase gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert, auf die Trennsäule aufgetragen und mit einer Schutzschicht aus Seesand (reinst, mit HCl gereinigt) bedeckt. Während der Auftrennung wurde mit einem leichten Überdruck gearbeitet, welcher mit einer Handpumpe erzeugt wurde.

Lyophilisierung

Zu lyophilisierende Produkte wurden in Benzol gelöst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend am Hochvakuum getrocknet. Zur Gefriertrocknung von Triphosphat- sowie Oligonukleotid-Proben wurde eine *Alpha RVC* Vakuumzentrifuge der Firma CHRIST verwendet. Die Proben wurden hierbei in Eppendorf Gefäße überführt und bei 10^{-1} mbar getrocknet.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden an einem BRUKER *Avance Neo 400* (Gerätefrequenz: $^1\text{H} = 400,13$ MHz; $^{13}\text{C} = 100,62$ MHz) oder *Avance 500* (Gerätefrequenz: $^1\text{H} = 500,13$ MHz; $^{13}\text{C} = 125,77$ MHz; $^{31}\text{P} = 202,45$ MHz) aufgenommen. Die zu analysierenden Substanzen wurden hierzu in deuterierten Lösungsmitteln der Firma EURISOTOP gelöst. Die chemische Verschiebung (δ) der Signale wurde in parts per million (ppm) angegeben, wobei Tetramethylsilan als Referenz diente. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte anhand der Signale der unvollständig deuterierten Lösungsmitteln. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel sind im Folgenden mit ihren jeweiligen chemischen Verschiebungen aufgelistet:

CDCl_3	$^1\text{H}: \delta = 7,26$ ppm; $^{13}\text{C}: \delta = 77,16$ ppm
DMSO-d_6	$^1\text{H}: \delta = 2,50$ ppm; $^{13}\text{C}: \delta = 39,52$ ppm
D_2O	$^1\text{H}: \delta = 4,79$ ppm

Alle Kopplungskonstanten (J) wurden in Hertz angegeben. Zur Beschreibung der Multiplizität der Signale wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett), dd (Dublett von Dublett), dt (Dublett von Triplet), dq (Dublett von Quartett), ddd (Dublett von Dublett von Dublett) und m (Multiplet).

Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Messungen wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für organische Chemie des KIT durchgeführt. Bei den verwendeten Geräten handelte es sich um ein *Q Exactive Plus* Gerät der Firma THERMOSCIENTIFIC bzw. ein *Finnigan MAT95*, wobei Elektrospray-

Ionisation (ESI), Fast Atom Bombardement (FAB) und Elektronenstoß-Ionisation (EI) als Ionisationsmethoden eingesetzt wurden. Die Signale wurden im Masse/Ladungsverhältnis (m/z) angegeben und das Molekülion mit der Abkürzung $[M]^+$ oder in protonierter bzw. Natrium-Addukt Form mit $[M+H]^+$ bzw. $[M+Na]^+$ beschrieben. Des Weiteren wurden MALDI-TOF Spektren an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer der Firma SHIMADZU aufgenommen. Als Matrix diente hierbei 6-Aza-2-thiothymin (ATT) sowie 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THAP).

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Verfolgung der bioorthogonalen Reaktionen *in vitro* sowie der Aufreinigung der Triphosphate wurde ein *Dionex Ultimate3000* HPLC-System der Firma THERMOSCIENTIFIC verwendet. Dieses setzt sich aus Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen, Multidiodenarray, RS-Fluoreszenzdetektor und Fraktionssammler zusammen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software *Chromleon 7*. Für analytische Trennung wurden analytische Umkehrphasen-Chromatographiesäulen der Firma VDSPHER, Modell *OptiBio PUR 300 C18-SE* (250 × 4,6 mm, 5 μ m) und *PUR 100 C4-SE* (250 × 4,6 mm, 5 μ m) verwendet. Alle Analysen wurden mit 10,0 μ l Injektionsvolumen, bei einer Temperatur von 30 °C und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,00 $\text{ml}\times\text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 265 nm. Als mobile Phase diente ein Acetonitril-Wasser- bzw. Methanol-Wasser-Gemisch. Die Zusammensetzung des Eluenten wurde nach den in Tabelle 2 bis Tabelle 7 aufgeführten Gradienten variiert.

Tabelle 2: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dU **2** und Tetrazin **27** sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von **2** und 3-MCP-dU **6** bzw. **7** mit **27**.

Zeit [min]	% MeCN in H ₂ O
0,00	0
30,00	30
40,00	30
40,01	90
50,00	90
50,01	0
60,00	0

Tabelle 3: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dA **3** mit Tetrazin **27** sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von **3** und 3-MCP-dU **6** mit Tetrazin **27** sowie Tetrazol **28**.

Zeit [min]	% MeOH in H ₂ O
0,00	0
30,00	60
40,00	60
40,01	90
50,00	90
50,01	0
60,00	0

Tabelle 4: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dU **4** mit Tetrazin **27** sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von **4** und 3-MCP-dU **6** mit **27**.

Zeit [min]	% MeOH in H ₂ O (+ 0,10 % TFA)
0,00	0
30,00	40
40,00	40
40,01	90
50,00	90
50,01	0
60,00	0

Tabelle 5: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dU **5** mit Tetrazin **27** sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von **5** und 3-MCP-dU **6** mit **27**.

Zeit [min]	% MeCN in H ₂ O (+ 0,10 % TFA)
0,00	0
30,00	60
40,00	60
40,01	90
50,00	90
50,01	0
60,00	0

Tabelle 6: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der Photoclick-Reaktion von **2** – **7** mit Tetrazol **28**.

Zeit [min]	% MeCN in H ₂ O
0,00	0
15,00	40
30,00	40
40,00	60
45,00	80
50,00	90
55,00	90
55,01	0
65,00	0

Tabelle 7: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von 1-MCP-dU **2** - **5** und 3-MCP-dU **6** bzw. **7** in einer Photoclick-Reaktion mit Tetrazol **28**.

Zeit [min]	% MeCN in H ₂ O
0,00	0
40,00	40
50,00	40
60,00	60
65,00	80
70,00	90
75,00	90
75,01	0
85,00	0

Semipräparative Trennungen zur Aufreinigung von Nukleosidtriphosphat-Proben erfolgten mit Hilfe einer VDS_{PHER} *OptiBio PUR 300 C18-SE*-Säule (250 × 10 mm, 5 μm) bei einer Temperatur von 30 °C und einer Flussrate von 2,50 ml×min⁻¹. Die Probe wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und über den in Tabelle 8 beschriebenen Gradienten von Acetonitril in Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Puffer (50 mM; pH 7,00) aufgetrennt. Die Nukleosidtriphosphate konnten bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert und fraktioniert aufgesammelt werden. Die Anwesenheit des Nukleosidtriphosphats in der entsprechenden Fraktion wurde mittels MALDI-TOF bestätigt.

Tabelle 8: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur Aufreinigung von **TP1**, **TP2** und **TP3**.

Zeit [min]	% MeCN in TEAB-Puffer
0,00	0
40,00	20
40,01	90
55,00	90
55,01	0
65,00	0

Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Die chromatographische Auftrennung der Proben erfolgte an einem ein *Dionex Ultimate3000* HPLC-System der Firma THERMOSCIENTIFIC, welches sich aus einem Autosampler, Pumpenmodul, Säulenofen sowie UV/Vis-Detektor zusammensetzt. Die Trennungen wurden mit Chromatographiesäulen der Firma VDSPHER, Modell *OptiBio PUR 300 C18-SE* (250 × 4.6 mm, 5 µm) und *PUR 100 C4-SE* (250 × 4.6 mm, 5 µm) entsprechend den im vorherigen Absatz angegebenen Gradienten für die jeweilige Probe durchgeführt. Das HPLC-System wurde mit einem *Q Exactive Plus* Massenspektrometer der Firma THERMOSCIENTIFIC mit Elektronenspray-Ionisation gekoppelt.

Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide sowie Nukleosid-triphosphate

Die Konzentration der Triphosphat- sowie Oligonukleotid-Proben wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm an einem *ND-1000* Spektrophotometer der Firma NANODROP im Nukleinsäuremodus bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte dabei nach dem LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} . Dieser ergibt sich für Oligonukleotide aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide (Tabelle 9) unter Berücksichtigung der Wechselwirkung benachbarten Nukleotide im Doppelstrang durch den Faktor 0,9 nach Formel 1:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot \epsilon_{260}(A) + T \cdot \epsilon_{260}(T) + C \cdot \epsilon_{260}(C) + G \cdot \epsilon_{260}(G)) \cdot 0.9 + X \cdot \epsilon_{260}(X) \quad 1$$

- A: Anzahl der Adeninbasen
- T: Anzahl der Thyminbasen
- C: Anzahl der Guaninbasen
- G: Anzahl der Cytosinbasen

X: Anzahl der Modifikationen (ATTO390 oder Cy5)

ϵ : Molarer Extinktionskoeffizient bei 260 nm entsprechend Tabelle 9

Tabelle 9: Extinktionskoeffizienten der natürlichen Nukleotide sowie der verwendeten Fluorophore bei 260 nm.

Nukleotid bzw. Modifikation	ϵ_{260} [$\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
A	15400
T	8800
C	7300
G	11700
ATTO390	12400
Cy5	10000

Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleosidtriphosphat-Proben wurden näherungsweise die Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Nukleoside verwendet, welche in Tabelle 10 aufgeführt sind.

Tabelle 10: Extinktionskoeffizienten der Nukleoside, welche zur Berechnung der Konzentration der Nukleosidtriphosphat-Proben verwendet wurde.

Nukleosid	ϵ_{260} [$\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
1	7700
2	5500
3	2800
6	7000
7	7400

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die PEX-Produkte sowie die bioorthogonalen Markierungsexperimente wurden mittels denaturierender Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) analysiert. Hierzu wurde eine *Sequi-Gen GT* Sequenzierzelle (21 × 40 cm) von THERMOFISCHER in Kombination mit einem *PowerPac HV* Netzteil der Firma BIORAD verwendet.

Es wurde zunächst eine zwölf-prozentige Gelmischung entsprechend Tabelle 11 angesetzt. Die Polymerisation wurde zu Beginn des Experimentes durch die Zugabe von *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS), in Form einer zehn-prozentigen wässrigen Lösung, gestartet und das Gel anschließend sofort in die Gelkammer gegossen. Nach 40 min war die Polymerisation abgeschlossen und das Gel wurde

über einen Zeitraum von 45 min im Laufpuffer äquilibriert. Vor und nach dem Äquilibrieren wurden die Probenaschen mit jeweils Laufpuffer gespült, um überschüssigen Harnstoff herauszulösen. Die Proben wurden mit einem äquivalenten Volumen an Ladepuffer versetzt und jeweils 10 µl in die Probenaschen pipettiert. Die elektrophoretische Trennung wurde anschließend bei 50 W und 50 °C durchgeführt. Die Gele wurden anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenz-Imagers visualisiert. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammensetzung der PAGE-Gelmischungen sowie der für die Elektrophorese verwendeten Puffer

Lösung	Zusammensetzung
10X TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	890 mM TRIS Base 890 mM Borsäure 20,0 mM EDTA
Polyacrylamid- Gelmischung	15,6 ml Acrylamid/ Bisacrylamid (19/1) 25,0 g Harnstoff 5,00 ml 10X TBE-Puffer 20,0 µl TEMED 0,05 g APS 29,0 ml H ₂ O
Lade-Puffer	63,0 mM TRIS Base 63,0 mM Borsäure 14,0 mM EDTA 5,00 M Harnstoff 2,80 % Ficoll 0,07 % Bromphenolblau 0,01 % Xylencyano FF
Lauf-Puffer (1X TBE-Puffer)	89,0 mM TRIS Base 89,0 mM Borsäure 2,00 mM EDTA

Fluoreszenz-Imager

Die PAGE-Gele wurden nach abgeschlossener Elektrophorese mit Hilfe eines *Azure 400* Fluoreszenz-Imager der Firma AZURE BIOSYSTEMS sowie einem *Stella 830* Spektrofluorometer von RAYTEST visualisiert. Die erhaltenen Bilder wurden mit *AzureSpot Analysis Software* von AZURE BIOSYSTEMS bzw. *AIDA Image Analyzer v.450* der Firma RAYTEST ausgewertet. Die jeweiligen Anregungswellenlängen und Emissionsfilter sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammenfassung der verwendeten Anregungswellenlängen sowie Detektionsbereiche der verwendeten Fluorophore der PAGE.

	AZURE BIOSYSTEMS		RAYTEST	
	Anregung [nm]	Detektion [nm]	Anregung [nm]	Detektion [nm]
ATTO390	365	475	312 ± 20	505 ± 20
Cy5	628	684	630 ± 10	670 ± 20
28	302	475	312 ± 20	505 ± 20
29	524	572	540 ± 10	605 ± 20
30	472	513	470 ± 20	505 ± 20
31	302	475	470 ± 20	505 ± 20

Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden an einem LEICA *DMI8, TCS SP8* Mikroskop über ein *HC PL APO 63x/1,40 OIL CS2* Objektiv mit Hilfe der Software *LASX* visualisiert. Alle Bilder wurden im Lightning-Modus mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln und einer Scangeschwindigkeit von 700 Hz aufgenommen. Zur Detektion wurde ein Photomultiplier (PMT)- sowie Hybridphoto (HyD)-Detektor verwendet. Die Anregungswellenlängen der Farbstoffe sowie die entsprechenden Detektionsbereiche sind in Tabelle 13 aufgelistet

Tabelle 13: Zusammenfassung der Anregungswellenlängen und Detektionsbereiche der in der Mikroskopie verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe.

	Anregung [nm]	Detektion [nm]
31	405	420 – 470
32	488	500 – 550
33	488	600 – 650
DRAQ5	636	650 – 700
Hoechst 33342	405	450 – 500

Mikroplattenlesegerät (Plate Reader)

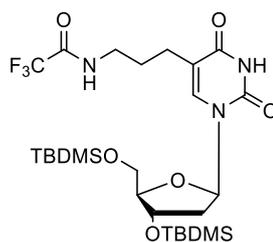
Die MTT-Tests wurden an einem CLARIOSTAR plus Plate Reader von BMG-LABTECH ausgelesen. Es wurde hierbei die Absorption der einzelnen Proben bei 570 nm bestimmt.

6.2 Synthesevorschriften

Die Verbindungen **8**,¹³⁰ **10**,¹⁶⁴ **14**,⁹ und **20**¹⁶³ wurden anhand von literaturbekannten Syntheseprotokollen hergestellt. **1** wurde im Rahmen der Masterarbeit von N. Seul, Karlsruher Institut für Technologie, 2020 synthetisiert.

3',5'-Bis-(TBDMS)-5-(2,2,2-trifluoro-N-propylacetamid)-2'-desoxyuridin

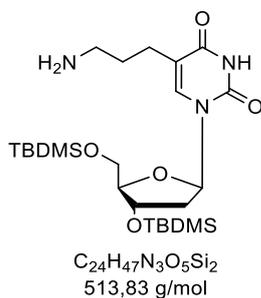
15



C₂₆H₄₆F₃N₃O₆Si₂
609,83 g/mol

Zu einer Lösung von 600 mg **14** (1,57 mmol; 1,00 Äq.) in 15 ml wasserfreiem *N,N*-Dimethylformamid wurden 536 mg Imidazol (7,87 mmol; 5,00 Äq.) sowie 711 mg TBDMS-Chlorid (4,27 mmol; 3,00 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 30 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 ml Wasser sowie 100 ml *n*-Hexan beendet. Die organische Phase wurde anschließend dreimal mit 100 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Kieselgel; DCM/ MeOH 0 - 5 %) wurde das Produkt **15** als weißer Schaum erhalten (879 mg; 1,44 mmol; 92 %).

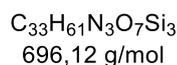
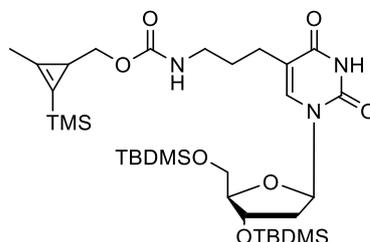
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁶¹

5-Aminopropyl-3',5'-bis-(TBDMS)-2'-desoxyuridin **11**

500 mg **15** (0,820 mmol; 1,00 Äq.) wurden in 4,00 ml Methanol gelöst und mit 2,46 ml NaOH (1,00 M in H_2O ; 2,46 mmol; 3,00 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, die organische Phase dreimal mit 50 ml gesättigter Natriumchlorid Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel; DCM/ MeOH 0 – 10 %). 322 mg der Verbindung **11** (0,627 mmol; 76 %) wurden als weißer Feststoff erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁶¹

(1-Methyl-2-(TMS)-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-(3',5'-bis-O-(TBDMS)-5-(propylen-2'-desoxyuridinyl))carbammat **17**



199 mg Carbonyldiimidazol (1,15 mmol; 1,20 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 3,00 ml wasserfreien Tetrahydrofuran gelöst. Nach der Zugabe von 160 mg **8** (1,02 mmol; 1,00 Äq.) wurde das Reaktionsgemisch 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1,78 ml DIPEA (1,32 g; 10,2 mmol; 10,0 Äq.) sowie 1,05 g **11** (2,05 mmol; 2,00 Äq.) zugeben und die Lösung 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EE 3:1) gereinigt. Das Produkt **17** wurde als gelbliches Öl (540 mg; 0,776 mmol; 76 %) erhalten.

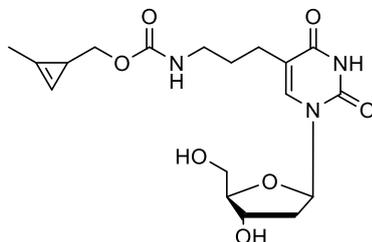
DC (*n*-Hexan/EE 3:1): $R_f = 0,31$ – Das Produkt konnte mit einer $KMnO_4$ -Lösung sowie H_2SO_4 (3 % in MeOH) angefärbt werden.

1H -NMR (500 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 9,07 (s; 1H; NH-Thym); 7,45 (s; 1H; H-6 Thym); 6,31 (dd; $J = 8,1; 5,7$ Hz; 1H; H-1'); 5,00 (t; $J = 6,2$ Hz; 1H; NH-Carbamat); 4,38 (dt; $J = 5,5; 2,5$ Hz; 1H; H-3'); 3,95 – 3,87 (m; 2H; H-4'; Cp- CH_2a); 3,87 – 3,77 (m; 2H; Cp- CH_2b ; H-5'a); 3,75 (dd; $J = 11,4; 3,0$ Hz; 1H; H-5'b); 3,16 (q; $J = 6,5$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Thym); 2,34 (t; $J = 7,3$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Thym); 2,23 (ddd; $J = 13,2; 5,8; 2,4$ Hz; 1H; H-2'a); 2,17 (s; 3H; CH_3 -Cp); 2,01 (dq; $J = 13,6; 7,2; 6,6$ Hz; 1H; H-2'b); 1,69 (p; $J = 7,0$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Thym); 1,52 (t; $J = 5,6$ Hz; 1H; H-3-Cp); 0,91 (s; 9H; *t*Bu-TBDMS); 0,88 (s; 9H; *t*Bu-TBDMS); 0,14 (s; 9H; CH_3 -TMS); 0,09 (s; 6H; CH_3 -TBDMS); 0,07 (d; $J = 3,3$ Hz; 6H; CH_3 -TBDMS).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 163,8; 157,2; 150,4; 136,4; 134,8; 114,4; 111,1; 87,9; 84,9; 73,4; 72,4; 63,2; 41,2; 39,9; 29,8; 26,1; 25,9; 24,3; 18,7; 18,5; 18,1; 13,4; -1,1; -4,5; -4,7; -5,2; -5,3.

HRMS (+ ESI, $[M+Na]^+$, $C_{33}H_{61}N_3O_7Si_3Na$): ber. = 718,37095; gef. = 718,37024.

(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(propylen-2'-desoxyuridinyI)carbammat **2**



$C_{18}H_{25}N_3O_7$
395,41 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 100 mg **17** (0,144 mmol; 1,00 Äq.) in 1,00 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst. Es wurden 0,720 ml TBAF-Lösung (1 M in THF; 107 mg; 0,720 mmol; 1,00 Äq.) zugeben und das Reaktionsgemisch 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Rohprodukt auf Kieselgel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/MeOH 20:1 bis 10:1) gereinigt. Das Produkt **2** wurde in Form eines weißen Feststoffs (53,0 mg; 0,134 mmol; 93 %) erhalten.

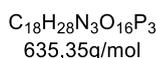
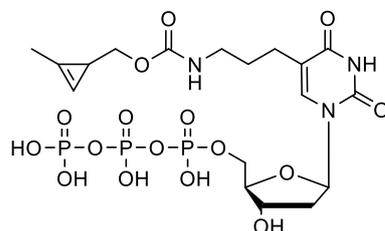
DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0,65$ – Das Produkt konnte mit einer $KMnO_4$ -Lösung sowie H_2SO_4 (3 % in MeOH) angefärbt werden.

1H -NMR (500 MHz; $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 11,27 (s; 1H; NH-Thym); 7,67 (s; 1H; H-6 Thym); 7,05 (t; $J = 5,6$ Hz; 1H; NH-Carbamat); 6,86 (d; $J = 4,0$ Hz; 1H; H-2-Cp); 6,17 (t; $J = 6,9$ Hz; 1H; H-1'); 5,23 (d; $J = 4,3$ Hz; 1H; OH-3'); 5,00 (t; $J = 5,1$ Hz; 1H; OH-5'); 4,27 – 4,20 (m; 1H; H-3'); 3,84 – 3,72 (m; 3H; Cp-**CH**₂; H-4') ; 3,61 – 3,49 (m; 2H; H-5'); 3,00 - 2,91 (m; 2H; NH-**CH**₂CH₂CH₂-Thym); 2,22 - 2,16 (m; 2H; NH-CH₂CH₂**CH**₂-Thym); 2,12 – 2,02 (m; 5H; **CH**₃-Cp/ H-2'); 1,58 – 1,48 (m; 3H; H-3-Cp; NH-CH₂**CH**₂CH₂-Thym).

^{13}C -NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 163,8; 156,9; 151,9; 136,8; 120,8; 113,5; 102,8; 87,8; 84,3; 71,3; 70,9; 61,8; 40,0 (Der Peak von C-2' überlappt mit dem Lösungsmittelsignal); 28,8; 24,2; 17,3; 11,9.

HRMS (+ ESI, $[M+Na]^+$, $C_{18}H_{25}N_3O_7Na$): ber. = 418,15847; gef. = 418,15836.

(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(propylen-2'-desoxyuridinyl-5'-triphosphat)carbamat TP2

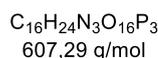
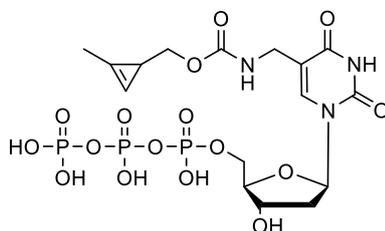


30,0 mg **2** (75,9 μmol ; 1,00 Äq.) wurden zusammen mit 24,2 mg frisch gemörsertem Protonenschwamm (113 μmol ; 1,50 Äq.) über Nacht im Vakuum getrocknet. Unter Argonatmosphäre wurden anschließend 0,75 ml wasserfreies Trimethylphosphat zugegeben und das Gemisch auf $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. 7,40 μl Phosphoroxychlorid (79,7 μmol ; 1,05 Äq.) wurden schnell zur Lösung zugefügt, wobei ein Farbumschlag von gelb zu lila zu erkennen war. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, erneut 2,82 μl Phosphoroxychlorid (30,3 μmol ; 0,40 Äq.) zugegeben und eine weitere Stunde bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. In einem separaten Kolben wurden zeitgleich 0,90 ml trockenes *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt und 79,3 μl wasserfreies Tributylamin (61,9 mg; 333 μmol ; 4,40 Äq.) sowie 250 mg Tributylammoniumpyrophosphat (455 μmol ; 6,00 Äq.), welches im Vakuum vorgetrocknet wurde, zugefügt. Dieses Gemisch wurde schnell zur gekühlten Reaktionslösung gegeben und die Lösung nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur noch eine Stunde gerührt. Zur nachfolgenden Hydrolyse wurde die Reaktionsmischung über 40 min in 2,71 ml TEAB-Puffer (100 mM; pH 7,00) eingetropft. Das entstandene Gemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (C18; 0 - 20 % MeCN in TEAB-Puffer (50 mM; pH 7,00) in 20 min). Das Triphosphat **TP2** wurde in Form eines weißen Feststoffs mit einer Ausbeute von 26 % erhalten. Die Ausbeute wurde über die Absorption der erhaltenen Lösung bei 260 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O): δ (ppm) = -6,43 (d; $J = 20,7$ Hz); -11,57 (d; $J = 20,3$ Hz); -22,66 (t; $J = 20,8$ Hz).

MS (- MALDI-TOF, $[\text{M}+\text{H}]^+$; $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{P}_3\text{H}$): ber. = 636,08; gef. = 636,44.

(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(methylen-2'-desoxyuridinyl-5'-triphosphat)carbamat TP1

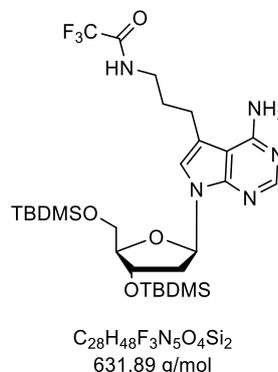


In einem ausgeheizten Kolben wurden 31,4 mg **1** (85,5 μmol , 1,00 Äq.) sowie 27,5 mg frisch gemörserter Protonenschwamm (128 μmol ; 1,50 Äq.) über Nacht im Vakuum getrocknet. Nach dem Belüften des Kolbens mit Argon wurde der Feststoff in 0,850 ml wasserfreien Trimethylphosphat gelöst. Das Gemisch wurde auf -15°C gekühlt und 8,34 μl Phosphoroxchlorid (13,8 mg; 89,8 μmol ; 1,05 Äq.) schnell zugegeben. Die Lösung wurde 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurden 3,18 μl Phosphoroxchlorid (5,20 mg; 34,2 μmol ; 0,400 Äq.) zugegeben und erneut eine Stunde gerührt. In einem separaten Kolben wurden 281 mg Tributylammoniumpyrophosphat (512 μmol ; 6,00 Äq.) in 1,00 ml wasserfreiem *N,N*-Dimethylformamid gelöst und mit 89,4 μl Tributylamin (69,7 mg; 376 μmol ; 4,40 Äq.), welches über Nacht im Vakuum getrocknet wurde, versetzt. Diese Lösung wurde schnell zur gekühlten Reaktionsmischung gegeben, wobei ein Farbumschlag von lila zu orange zu erkennen war. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch 1 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung über einen Zeitraum von 40 min in 3,00 ml TEAB-Puffer (100 mM; pH 7,00) getropft. Nach beendeter Zugabe wurde erneut 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend in Eppendorf Gefäße überführt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (C18; 0 - 20 % MeCN in TEAB-Puffer (50 mM; pH 7,00) in 20 min). Das Triphosphat **TP1** wurde in Form eines weißen Feststoffs mit einer Ausbeute von 14 % erhalten.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O): δ (ppm) = -7,36 (d; J = 18,9 Hz; 1P); -11,55 (d; J = 19,1 Hz, 1P); -22,75 (t; J = 20,4 Hz; 1P).

MS (- MALDI-TOF, $[\text{M}]^-$, $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$): ber. = 607,04; gef. = 607,02.

3',5'-Bis-(TBDMS)-7-deaza-7-(2,2,2-trifluoro-N-propylacetamid)-2'-desoxyadenosin **21**

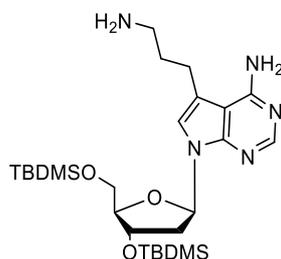


Unter Argonatmosphäre wurden 1,52 g **20** (3,79 mmol; 1,00 Äq.) und 1,68 g Imidazol (24,6 mmol; 6,50 Äq.) in 42,0 ml wasserfreiem *N,N*-Dimethylformamid gelöst. 2,29 g TBDMS-Chlorid (15,2 mmol; 4,00 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 ml Wasser beendet und die wässrige Phase dreimal mit 250 ml *n*-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/MeOH 20:1) gereinigt. Das Produkt **21** wurde als beiger Schaum (1,74 g; 2,75 mmol) in einer Ausbeute von 73 % erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9,42 (s; 1H; NH); 8,03 (s; 1H; H-2-Ad); 7,04 (s; 1H; H-8-Ad); 6,59 (s; 2H; NH₂- Ad,); 6,50 (dd; *J* = 8,1 Hz; 1H; H-1'); 4,49 (dt; *J* = 5,6; 2,7 Hz; 1H; H-3'); 3,79 (td; *J* = 4,8; 2,4 Hz; 1H; H-4'); 3,75- 3,60 (m; 2H; H-5'); 3,26 (d; *J* = 8,3 Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad); 2,75 (td; *J* = 7,4; 3,1 Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad); 2,57- 2,51 (m; 1H; H-2a'); 2,14 (ddd; *J* = 13,1; 6,0; 2,9 Hz; 1H H-2'b); 1,76 (p; *J* = 7,5 Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad,); 0,90 (s; 9H; *t*Bu-TBDMS); 0,87 (s; 9H; *t*Bu-TBDMS); 0,10 (s; 6H; CH₃-TBDMS); 0,04 (s; 6H; CH₃-TBDMS).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 157,6; 156,2; 151,6; 150,8; 118,1; 114,6; 101,8; 86,4; 81,9; 72,5; 63,0; 39,2; 38,7; 29,6; 25,8; 25,7; 23,1; 18,0; 17,7; -4,80; -4,94; -5,54; -5,57. Das Signal von NH-CH₂CH₂CH₂-Ad- und C-2' überlagert mit dem Lösungsmittelsignal.

HRMS (+ ESI, [M+H]⁺, C₂₈H₄₈F₃N₅O₄Si₂H): ber. = 632,32752; gef. = 632,32672.

3',5'-Bis-(TBDMS)-7-deaza-7-aminopropyl-2'-desoxyadenosin 12

$C_{26}H_{49}N_5O_3Si_2$
535,88 g/mol

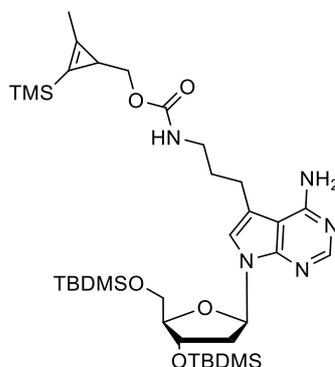
In einem Kolben wurden 1,69 g **21** (2,67 mmol; 1,00 Äq.) in 13,4 ml MeOH gelöst und 8,00 ml NaOH (1,00 M in H₂O; 8,01 mmol; 3,00 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 200 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde dreimal mit 200 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt **12** als braunes Öl in einer Ausbeute von 82 % erhalten (1,18 g; 2,67 mmol).

¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃) δ (ppm) = 8,22 (s; 1H; H-2 Ad); 6,96 (s; 1H; H-8 Ad); 6,68 (dd; *J* = 8,0; 5,9 Hz; 1H; H-1'); 6,15 – 5,98 (m; 2H; NH₂-Ad,); 4,53 (dt; *J* = 5,8; 2,9 Hz; 1H, H-3'); 3,94 (q; *J* = 3,4 Hz; 1H; H-4'); 3,81 – 3,70 (m; 2H; H-5'); 2,82 (t; *J* = 7,2 Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad,); 2,76 (t; *J* = 6,0 Hz; 4,1 Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad,); 2,42 (ddd; *J* = 13,5; 8,0; 5,9 Hz; 1H; H-2'a); 2,26 (ddd; *J* = 13,0; 6,0; 2,9 Hz; 1H; H-2'b); 1,76 (p; *J* = 6,9 Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad); 0,92 (s; 9H; *t*Bu-TBDMS); 0,90 (s; 9H; *t*Bu-TBDMS); 0,08 (s; 12H; CH₃-TBDMS).

¹³C-NMR (126 MHz; CDCl₃) δ (ppm) = 157,7; 151,9; 151,1; 118,5; 115,7; 103,7; 87,3; 83,1; 72,6; 63,3; 41,1; 34,7; 25,9; 25,8; 22,9; 18,6; 18,2; -4,6; -4,6; -5,2; -5,35.

HRMS (+ ESI, [M+H]⁺, C₂₆H₄₉N₅O₃Si₂): ber. = 536,34522; gef = 536,34454.

(1-Methyl-2-(TMS)-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-(3',5'-bis-O-(TBDMS)-5-(propylen-2'-desoxyadenosinyl))carbammat 22



C₃₅H₆₃N₅O₅Si₃
718,17 g/mol

62,0 mg Carbonyldiimidazol (0,384 mmol; 1,20 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre zu einer Lösung von 50,0 mg **8** (0,320 mmol; 1,00 Äq.) in 2,00 ml trockenem Tetrahydrofuran geben. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 0,557 ml DIPEA (414 mg; 3,20 mmol; 10,0 Äq.) sowie 343 mg **12** (0,640 mmol; 2,00 Äq.) zugeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel; DCM/MeOH 50:1 bis 20:1) gereinigt und das Produkt **22** wurde als bräunliches Öl (118 mg; 0,164 mmol; 51 %) erhalten.

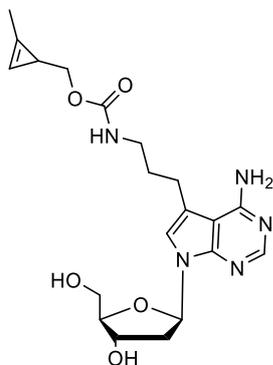
DC (DCM/MeOH 10:1): $R_f = 0,25$ – Das Produkt konnte mit einer KMnO₄-Lösung sowie H₂SO₄ (3 % in MeOH) angefärbt werden.

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) = 8,02 (s; 1H; H-2-Ad); 7,03 (d; $J = 5,5$ Hz; 2H; H-8-Ad; NH-Carbamat); 6,56 (s; 2H; NH₂-Ad); 6,50 (dd; $J = 8,0; 6,0$ Hz; 1H; H-1'); 4,55 – 4,38 (m; 1H; H-3'); 3,93 – 3,74 (m; 2H; Cp-CH₂a; H-4'); 3,74 – 3,49 (m; 3H; Cp-CH₂b; H-5'); 3,04 (q; $J = 6,6$ Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad); 2,80 – 2,67 (m; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad); 2,51 (m; 1H; H-2'a); 2,17 (m; 4H; Cp-CH₃; H-2'b); 1,79 – 1,59 (m; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Ad); 1,45 (t; $J = 5,4$ Hz; 1H; H-3-Cp); 0,88 (d; $J = 10,5$ Hz; 18H; *t*Bu-TBDMS); 0,14 (s; 9H; CH₃-TMS); 0,10 (d; $J = 1,4$ Hz; 6H; CH₃-TBDMS); 0,04 (d; $J = 1,7$ Hz; 6H; CH₃-TBDMS).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 157,5; 156,4; 151,5; 150,6; 134,7; 117,9; 115,0; 110,4; 101,8; 86,2; 81,8; 72,6; 71,5; 62,9; 39,6; 39,9; 30,5; 25,6; 23,1; 18,4; 17,9; 17,6; 13,0; -1,30; -4,9; -5,0; -5,6; -5,6.

HRMS (+ ESI, [M+H]⁺, C₃₅H₆₃N₅O₅Si₃H): ber. = 718,42098; gef. = 718,42017.

(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(propylen-2'-desoxyadenosinyl) carbamat **3**



$C_{20}H_{27}N_5O_5$
417,47 g/mol

224 mg **22** (0,312 mmol; 1,00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 2,30 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und 1,56 ml TBAF (1 M in THF; 1,56 mmol; 5,00 Äq.) zugeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt als gelbes Öl erhalten und anschließend mittels Säulenchromatographie (Kieselgel; DCM/MeOH 20:1 bis 15:1) gereinigt. Das Produkt wurde aus Benzol lyophilisiert. Es wurden 124 mg **3** in Form eines weißen Feststoffs (0,297 mmol; 95 %) erhalten.

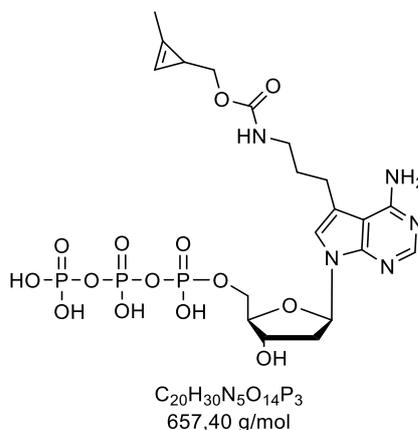
DC (DCM/MeOH 10:1): $R_f = 0,43$ – Das Produkt konnte mit $KMnO_4$ -Lösung sowie H_2SO_4 (3 % in MeOH) angefärbt werden.

1H -NMR (500 MHz; DMSO- d_6): δ (ppm) = 8,01 (s; 1H; H-2 Ad); 7,11 (s; 2H; H-8 Ad, NH-Carbamat); 6,86 (s; 1H; H-2 Cp); 6,55 (s; 2H; NH_2 -Ad); 6,46 (dd; $J = 8,4; 5,9$ Hz; 1H; H-2'); 5,21 (d; $J = 4,0$ Hz; 1H; OH-3'); 5,04 (t; $J = 5,7$ Hz; 1H; OH-5'); 4,31 (m; $J = 2,7$ Hz; 1H; H-3'); 3,87 – 3,71 (m; 3H; 4-H'; Cp- CH_2); 3,59 – 3,42 (m; 2H; H-5'); 3,04 (q; $J = 6,6$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Ad); 2,72 (t; $J = 7,6$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Ad); 2,43 (m; 1H; H-2a'); 2,15 – 2,05 (m; 4H; Cp- CH_3 ; H-2'b); 1,71 – 1,63 (m; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Ad); 1,51 (td; $J = 5,1; 1,7$ Hz; 1H; H-3-Cp).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 157,6; 156,5; 151,3; 150,4; 120,4; 118,7; 114,7; 102,3; 102,0; 87,1; 82,7; 71,1; 70,1; 62,2; 40,2; 39,8; 30,5; 23,2; 16,8; 11,5.

HRMS (+ ESI, $[M+H]^+$, $C_{20}H_{28}N_5O_5$): ber. = 418,20850; gef. = 418,20758.

(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(propylen-2'-desoxyadenosinyl-5'-triphosphat))carbamat TP3

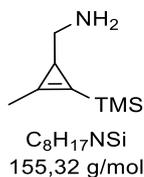


30,5 mg **3** (83,9 μ mol; 1,00 Äq.) wurden zusammen mit 27,0 mg frisch gemörsertem Protonenschwamm (126 μ mol; 1,50 Äq.) über Nacht unter Vakuum getrocknet. Unter Argonatmosphäre wurden anschließend 1,00 ml wasserfreies Trimethylphosphat zugegeben und das Gemisch auf $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. 8,19 μ l Phosphoroxychlorid (13,5 mg; 88,1 μ mol; 1,05 Äq.) wurden schnell zur Lösung zugefügt, wobei ein Farbumschlag von gelb zu lila zu erkennen war. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, erneut 3,12 μ l Phosphoroxychlorid (33,6 μ mol; 0,40 Äq.) zugegeben und eine weitere Stunde bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. In einem separaten Kolben wurden zeitgleich 1,00 ml trockenes *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt und 87,7 μ l wasserfreies Tributylamin (68,4 mg; 369 μ mol; 4,40 Äq.) sowie 276 mg Tributylammoniumpyrophosphat (503 μ mol; 6,00 Äq.), welches im Vakuum vorgetrocknet wurde, zugefügt. Dieses Gemisch wurde schnell zur gekühlten Reaktionslösung gegeben und die Lösung nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur noch eine Stunde gerührt. Zur nachfolgenden Hydrolyse wurde die Reaktionsmischung über 40 min in 3,00 ml TEAB-Puffer (100 mM, pH 7,00) eingetropft. Das entstandene Gemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Das Triphosphat **TP3** wurde in Form eines weißen Feststoffs in einer Ausbeute von 12 % erhalten.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz; D_2O): δ (ppm) = -5,84 – -8,39 (m, 1P); -10,85 (d; $J = 17,8$ Hz; 1P); -19,66 – -22,02 (m, 1P).

MS (- MALDI-TOF, $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3$): ber. = 656,10; gef. = 656,81.

2-Methyl-3-(TMS)cycloprop-2-en-1-yl)methanamin **9**



5,00 ml trockenes Tetrahydrofuran wurden unter Argonatmosphäre vorgelegt und 500 mg **8** (3,20 mmol; 1,00 Äq.) zugeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und 0,620 ml Diazabicycloundecen (633 mg; 4,16 mmol; 1,30 Äq.) sowie 0,910 ml Diphenylazidophosphat (1,14 g; 4,16 mmol; 1,30 Äq.) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde der Großteil des Lösungsmittels durch Spülen mit Druckluft verdampft. Das Gemisch wurde über eine kurze Chromatographiesäule (Kieselgel, DCM) gereinigt und das Cyclopropenazid nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck als gelbe Flüssigkeit erhalten. Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet

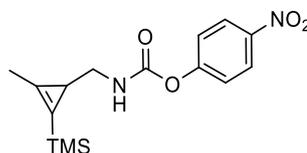
Das Cyclopropeazid wurde in 6 ml eines Diethylether/Wasser-Gemischs (5:1) gelöst und 1,09 g Triphenylphosphan (4,16 mmol; 1,30 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 5,00 ml einer 1,00 M HCl beendet. Die Lösung wurde dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert. Der pH-Wert der wässrigen Phase wurde anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 9,00 eingestellt und diese dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Cyclopropenamin **7** wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten (109 mg, 0,700 mmol; 22 % über zwei Stufen).

DC (Diethylether): $R_f = 0,10$

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹³⁰

4-Nitrophenyl ((2-methyl-3-(TMS)cycloprop-2-en-1-yl)methyl) carbamat

24



$C_{15}H_{20}N_2O_4Si$
320,42 g/mol

Eine Lösung von 349 mg *p*-Nitrophenylchlorformiat (1,73 mmol; 1,30 Äq.) in 5,00 ml trockenem Dichlormethan wurde unter Argonatmosphäre mit 1,34 ml Pyridin (1,32 g; 16,6 mmol; 12,5 Äq.) versetzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurden 207 mg **9** (1,33 mmol; 1,00 Äq.), gelöst in 5,00 ml wasserfreiem Dichlormethan, langsam zugeben. Das Reaktionsgemisch wurde noch weitere 30 min im Eisbad und nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,00 ml einer 1 M HCl-Lösung in H₂O beendet. Es wurden 150 ml Dichlormethan zugeben und die organische Phase so lange mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen bis in der wässrigen Phase keine Gelbfärbung mehr zu erkennen war. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, *n*-Hexan/Diethylether 10:1 bis 3:1) wurde das Produkt **24** als weißer Feststoff (283 mg; 0,883 mmol; 66 %) erhalten.

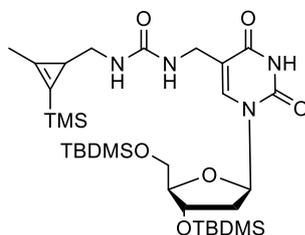
DC (*n*-Hexan/Diethylether 5:1): $R_f = 0,30$

¹H-NMR (500 MHz; CDCl₃): δ (ppm) = 8,28 – 8,20 (m; 2H; Pheny-H); 7,35 – 7,27 (m; 2H; Pheny-H); 4,98 (d; $J = 6,0$ Hz; 1H; NH-Carbamat); 3,19 (dd; $J = 5,7; 4,6$ Hz; 2H; Cp-CH₂); 2,22 (s; 3H; CH₃-Cp); 1,52 (t; $J = 4,7$ Hz; 1H; H-3-Cp); 0,19 (s; 9H; CH₃-TMS).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 156,3; 153,0; 144,7; 135,5; 125,2; 122,1; 111,7; 48,1; 19,4; 13,3; -0,96.

HRMS (+ ESI, [M+H]⁺, C₁₅H₂₀N₂O₄SiH): ber. = 321,12706; gef. = 321,12640.

(1-Methyl-2-(TMS)-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-(3',5'-bis-O-(TBDMS)-5-(methylen-2'-desoxyuridiny))harnstoff 25



$C_{31}H_{58}N_4O_6Si_3$
667,08 g/mol

Zu einer Lösung von 140 mg **24** (0,449 mmol; 1,00 Äq.) in 1,00 ml trockenem Dichlormethan wurden unter Argonatmosphäre 0,760 ml DIPEA (565 mg; 1,40 Äq.) sowie 322 mg **10** (0,628 mmol; 1,40 Äq.), gelöst in 1,00 ml trockenem Dichlormethan, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel; DCM/MeOH 100:1 bis 20:1) gereinigt. Das Produkt **25** wurde als weißer Feststoff (224 mg; 0,336 mmol; 75 %) erhalten.

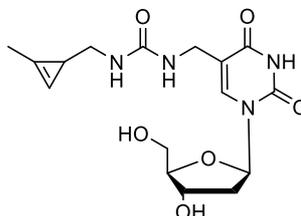
DC (DCM/MeOH 20:1): $R_f = 0,42$ – Das Produkt konnte mit $KMnO_4$ -Lösung sowie H_2SO_4 (3 % in MeOH) angefärbt werden.

1H -NMR (500 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 9,67 (s; 1H; NH-Thym); 7,65 (s; 1H; H-6 Thym); 6,25 (dd; $J = 7,7; 6,1$ Hz; 1H; H-1'); 5,54 (m; 1H; NHCONH); 4,57 (m; 1H; NHCONH); 4,38 (dt; $J = 5,4; 2,5$ Hz; 1H; H 3'); 4,02 (d; $J = 6,5$ Hz; 2H; NH-**CH**₂-Thym); 3,92 (td; $J = 3,8; 2,4$ Hz; 1H; H-4'); 3,80 – 3,72 (m; 2H; H-5'); 3,12 (ddt; $J = 13,2; 9,2; 4,1$ Hz; 1H; Cp-**CH**₂a); 2,88 (dtd; $J = 12,8; 5,0; 1,8$ Hz; 1H; Cp-**CH**₂b); 2,24 (ddd; $J = 13,4; 5,8; 2,4$ Hz; 1H; H-2'a); 2,15 (d; $J = 1,4$ Hz; 3H, Cp-**CH**₃); 2,05 (ddd; $J = 13,6; 8,1; 6,0$ Hz; 1H; H-2'b); 1,40 (dd; $J = 4,8; 4,4$ Hz; 1H; H-3-CP); 0,89 (d; $J = 12,2$ Hz; 18H; tBu-TBDMS); 0,12 (d; $J = 1,4$ Hz; 9H; CH₃-TBDMS); 0,11 (s; d; 6H; CH₃-TBDMS); 0,07 (s; 6H; CH₃-TBDMS).

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 164,3; 158,1; 150,4; 138,3; 135,9; 112,4; 111,9; 88,0; 85,4; 72,5; 63,2; 47,5; 40,9; 37,7; 25,9; 25,8; 19,7; 18,4; 17,9; 13,2; -1,1; -4,7; -4,8; -5,3; -5,42.

HRMS (+ EI, $[M]^+$, $C_{31}H_{58}N_4O_6Si_3$): ber. = 667,3737; gef. = 667,3735.

(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(methylen-2'-desoxyuridiny))harnstoff 4



C₁₆H₂₂N₄O₆
366,37 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 100 mg **25** (0,150 mmol; 1,00 Äq.) in 1,00 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. In einem separaten Kolben wurde ebenfalls unter Argonatmosphäre 196 mg TBAF-Hydrat (0,750 mmol; 5,00 Äq.) in 0,750 ml trockenes Tetrahydrofuran geben. Die beiden Lösungen wurden vereint und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Rohprodukt auf Kieselgel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/MeOH 10:1) gereinigt. Das Produkt **4** wurde als weißer Feststoff (19,0 mg; 51,8 µmol; 35 %) erhalten.

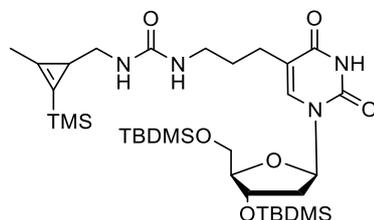
DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0,31$ – Das Produkt konnte mit KMnO₄-Lösung sowie H₂SO₄ (3 % in MeOH) angefärbt werden.

¹H-NMR (500 MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) = 11,38 (s; 1H; NH-Thym); 7,70 (s; 1H; H-6 Thym); 6,78 (s; 1H; H-1-Cp); 6,15 (dd; $J = 7,6; 6,1$ Hz; 1H; H-1'); 6,08 (dt; $J = 7,6; 3,7$ Hz; 1H; NHCONH); 5,87 (dt; $J = 7,9; 4,7$ Hz; 1H; NHCONH); 5,27 (s; 1H; OH-3'); 5,02 (s; 1H; OH-5'); 4,22 (dt; $J = 6,2; 3,0$ Hz; 1H; H-3'); 3,85 – 3,72 (m; 3H; H-4', NH-CH₂-Thym); 3,53 (m; 2H; H-5'); 2,98 (dt; $J = 13,5; 4,9$ Hz; 1H; Cp-CH₂a); 2,82 (dtd; $J = 13,1; 5,2; 2,4$ Hz; 1H; Cp-CH₂a); 2,13 – 1,98 (m; 5H; CH₃-Cp; H-2'); 1,36 (td; $J = 4,3; 1,7$ Hz; 1H; H-3-Cp).

¹³C-NMR (126 MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) = 163,3; 157,9; 150,4; 137,3; 121,4; 112,1; 103,2; 87,5; 84,1; 70,6; 61,5; 45,3; 40,0 (Das Signal von C-2' überlappt mit dem Lösungsmittelsignal); 36,2; 18,2; 11,4.

HRMS (+ ESI, [M+H]⁺, C₁₆H₂₁N₄O₆H): ber. = 367,16121; gef. = 367,16092.

(1-Methyl-2-(TMS)-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-(3',5'-bis-O-(TBDMS)-5-(propylen-2'-desoxyuridiny))harnstoff 26



$C_{33}H_{62}N_4O_6Si_3$
695,14 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 3,00 ml trockenes Dichlormethan vorgelegt und der Reihe nach 140 mg **22** (0,440 mmol; 1,00 Äq.), 0,760 ml DIPEA (565 mg; 4,40 mmol; 10,0 Äq.) sowie 449 mg **9** (0,880 mmol; 2,00 Äq.) zugeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, DCM/MeOH 100:1 bis 10:1). Das Produkt **24** wurde als weißer Feststoff (289 mg; 0,416 mmol; 95 %) erhalten.

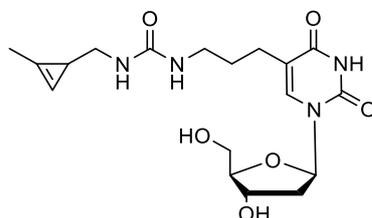
DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0,86$ – Das Produkt konnte mit $KMnO_4$ -Lösung sowie H_2SO_4 (3 % in MeOH) angefärbt werden.

1H -NMR (500 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 9,50 (s; 1H; NH-Thym); 7,49 (s; 1H; H-6 Thym); 6,31 (dd; $J = 8,1; 5,7$ Hz; 1H; H-1'); 5,00 (t; $J = 5,8$ Hz; 1H; NHCONH); 4,46 (t; $J = 5,4$ Hz; 1H; NHCONH); 4,39 (dt; $J = 5,5; 2,4$ Hz; 1H; H-3'); 3,92 (dt; $J = 2,8$ Hz; 1H; H-4'); 3,83 (dd; $J = 11,4; 3,1$ Hz; 1H; H-5'a); 3,75 (dd; $J = 11,3; 2,9$ Hz; 1H; H-5'b); 3,20 – 3,09 (m; 3H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Thym; Cp- CH_2a); 2,95 (m; 1H; Cp- CH_2b); 2,36 (tt; $J = 7,4; 4,6$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Thym); 2,23 (ddd; $J = 13,1; 5,8; 2,3$ Hz; 1H; H-2'a); 2,18 (s; 3H; CH_3 -Cp); 2,01 (ddd; $J = 13,5; 8,3; 6,0$ Hz; 1H; H-2'b); 1,67 (quin; $J = 6,9$ Hz; 2H; NH- $CH_2CH_2CH_2$ -Thym); 1,45 (t; $J = 4,6$ Hz; 1H; H-3-CP); 0,90 (d; $J = 13,0$ Hz; 18H; tBu-TBDMS); 0,14 (s; 9H- CH_3 -TMS); 0,11 – 0,05 (m; 12H; CH_3 -TBDMS).

^{13}C -NMR (126 MHz; $CDCl_3$): δ (ppm) = 165,5; 159,5; 151,2; 137,8; 137,0; 115,4; 112,9; 88,9; 85,9; 73,4; 64,2; 48,5; 42,3; 40,0; 31,1; 27,0; 26,8; 24,9; 20,8; 19,5; 19,1; 14,3; 0,0; -3,6; -3,8; -4,3; -4,3.

HRMS (+ EI, $[M]^+$, $C_{33}H_{62}N_4O_6Si$): ber. = 695,4050; gef. = 695,4050.

**(1-Methyl-cycloprop-1-en-3-yl)methylen-5-(propylen-2'-desoxyuridinyll)
harnstoff 5**



$C_{18}H_{26}N_4O_6$
394,43 g/mol

Zu einer Lösung von 60,0 mg **26** (86,3 μ mol; 1,00 Äq.) in 0,50 ml trockenem *N,N*-Dimethylformamid wurden 0,430 ml TBAF (1,00 M in THF; 0,430 mmol; 5,00 Äq.) gegeben und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM/MeOH 20:1 bis 10:1, + 0,20 % Triethylamin) gereinigt. Das Produkt **5** wurde als weißer Feststoff (21,0 mg; 53,2 μ mol; 62 %) erhalten.

DC (DCM/MeOH 9:1): $R_f = 0,36$ – Das Produkt konnte mit $KMnO_4$ -Lösung sowie H_2SO_4 (3 % in MeOH) angefärbt werden.

1H -NMR (500 MHz; DMSO- d_6): δ (ppm) = 7,73 (s; 1H; H-6 Thym); 6,78 (s; 1H; H-2-CP); 6,17 (t; $J = 6,8$ Hz; 1H; H-1'); 5,86 (t; $J = 5,8$ Hz; 1H; NHCONH); 5,67 (t; $J = 5,8$ Hz; 1H; NHCONH); 5,28 (d; $J = 23,2$ Hz; 1H; OH-3'); 5,20 – 5,05 (m; 1H; OH-5'); 4,29 – 4,17 (m; 1H; H-3'); 3,76 (q; $J = 3,5$ Hz; 1H; H-4'); 3,65 – 3,47 (m; 2H; H-5'); 2,97 (dq; $J = 12,8; 6,8; 5,8$ Hz; 3H; NH-CH₂CH₂CH₂-Thym; Cp-CH₂a); 2,84 (dt; $J = 13,4; 5,2$ Hz; 1H; Cp-CH₂b); 2,28 – 2,14 (m; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Thym); 2,08 (m; 5H; CH₃-Cp; H-2'); 1,49 (p; $J = 7,3$ Hz; 2H; NH-CH₂CH₂CH₂-Thym); 1,36 (td; $J = 4,2; 1,7$ Hz; 1H; H-3-Cp).

^{13}C -NMR (126 MHz; DMSO- d_6): δ (ppm) = 161,7; 158,2; 149,7; 134,9; 121,4; 112,2; 103,3; 87,4; 84,6; 70,2; 61,2; 45,3; 40,0 (Das Signal von C-2' überlappt mit dem Lösungsmittelpk); 38,5; 28,8; 24,1; 18,3; 11,5.

HRMS (+ ESI, $[M+H]^+$, $C_{18}H_{27}N_4O_6$): ber. = 395,19251; gef. = 395,19243.

6.3 Allgemeine Durchführung der iEDDA- und Photoclick-Experimente *in vitro*

Die Bestimmung der Reaktionskinetik der iEDDA-Reaktion sowie die Untersuchung der Orthogonalität von iEDDA- und Photoclick-Reaktion erfolgte mittels analytischer RP-HPLC. Alle Reaktanden wurden als 10 mM Stammlösung in DMSO eingesetzt und aus diesen die benötigten Volumina entnommen. Um apparative Unregelmäßigkeiten auszugleichen wurde allen Proben Thymidin als interner Standard in einer Konzentration von 0,25 mM zugesetzt. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der HPLC-Peakfläche der einzelnen Komponenten normiert auf die Peakfläche des Standards gegen die Reaktionszeit.

6.3.1 Reaktionsverfolgung der iEDDA-Reaktion

1-MCP-modifiziertes 2'-Desoxynukleosid und Tetrazin **27** wurden äquimolarer Konzentration von 0,50 mM in ein 1:1-Gemisch von PBS-Puffer und Acetonitril gegeben. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 500 μ l. Das Reaktionsgemisch wurde unmittelbar nach Zugabe der Edukte sowie stündlich über einen Zeitraum von 14 h mittels RP-HPLC untersucht.

6.3.2 Bestimmung der Reaktionskinetik der iEDDA-Reaktion

Das jeweilige 1-MCP-modifizierte 2'-Desoxynukleosid wurde in einer Konzentration von 0,50 mM in PBS/MeCN (1:1) vorgelegt und anschließend 0,10 mM Tetrazin **27** zugeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 bzw. 14 h mit **2** und **3** bzw. **4** und **5** bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dabei stündlich eine Probe entnommen und diese mittels RP-HPLC analysiert. In den erhaltenen Chromatogrammen wurde die Fläche des Produktsignals auf die Peakfläche des Standards normiert und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Aufgrund des Überschusses an Nukleosid wurde eine Kinetik pseudo-erster Ordnung angenommen und die Datenpunkte entsprechend Formel 2 angepasst.

$$y = b \cdot \exp(-k_{l,obs} \cdot t) + a \quad 2$$

Die Geschwindigkeitskonstante k lässt sich anschließend als Quotient von k_{obs} und der Konzentration der im Überschuss vorliegenden Komponente bestimmen.

$$k = k_{l,obs} / [\text{Nukleosid}] \quad 3$$

6.3.3 Untersuchung der orthogonalen Reaktivität

Reaktivitätsvergleich der Nukleoside in einer iEDDA-Reaktion

Zum Vergleich der Reaktivitäten der 1-MCP- und 3-MCP-modifizierte 2'-Desoxynukleoside gegenüber Tetrazin **27** wurde die Reaktion mit beiden Nukleosiden im Gemisch durchgeführt. Als Lösungsmittel diente PBS/MeCN (1:1), wobei die Lösungsmittelmenge jeweils so gewählt wurde, dass das Gesamtvolumen der Reaktionslösung 500 µl betrug. Die Nukleoside wurden in einer Konzentration von 0,50 mM im Lösungsmittel vorgelegt und 0,50 mM **27** zugeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei Raumtemperatur inkubiert, wobei stündlich eine Probe mittels RP-HPLC analysiert wurde.

Reaktivitätsvergleich der Nukleoside in einer Photoclick-Reaktion

Das Gemisch von 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden sowie Tetrazol **28** wurde in 500 µL PBS/MeCN (1:1) gegeben, wobei die Konzentration aller Komponenten 0,50 mM betrug. Das Reaktionsgemisch wurde in einer Glass-Küvette 10 min bei 308 nm und 25 °C belichtet und jeweils nach 60 Sekunden eine Probe entnommen. Hierbei wurde jeweils durch Invertieren durchmischt.

Sequenzielle iEDDA- und Photoclick-Reaktion

1-MCP und 3-MCP modifiziertes 2'-Desoxynukleosid wurden in 1,00 ml PBS/MeCN (1:1) vorgelegt, wobei die Konzentration der Nukleoside 0,50 mM betrug. Tetrazin **27** wurde in einer Konzentration von 0,50 mM zugeben und das Reaktionsgemisch unmittelbar nach der Zugabe stündlich mittels RP-HPLC analysiert. Nach 6 h war **27** vollständig umgesetzt und das Tetrazol **28** wurde in einer Konzentration von 0,50 mM zugegeben. Das Gemisch wurde für 10 min bei 308 nm belichtet, wobei jeweils nach 120 s Belichtungszeit eine Probe mittels RP-HPLC analysiert wurde.

Simultane iEDDA- und Photoclick-Reaktion

1-MCP und 3-MCP modifiziertes 2'-Desoxynukleosid, Tetrazol **28** und Tetrazin **27** wurden in einer Konzentration von 0,50 mM in PBS/MeCN (1:1) gegeben, wobei das Gesamtvolumen der Reaktion 1,00 ml betrug. Das Gemisch wurde unmittelbar nach der Zugabe aller Reagenzien mittels RP-HPLC analysiert und anschließend für 10 min bei 308 nm belichtet. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h stündlich mittels RP-HPLC untersucht.

6.3.4 Nachweis der Produkte über LC-MS

Der Nachweis der Diels-Alder- sowie Photoclick-Produkte erfolgte mittels LC-MS. Hierbei wurde die Reaktion wie in Abschnitt 6.3.1 beschrieben durchgeführt und mit der in Abschnitt 6.1 beschriebenen Trennmethode analysiert. Die gefundenen Massen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Berechnete sowie gefundene Massen der iEDDA-Produkte von **DA2** – **DA5**, der gefundenen Dimer-Massen von **2** – **5** und der Massen der Photoclick-Produkte **PC6** – **PC7**.

	Molekülion	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
DA2	[M+H] ⁺	604,25142	604,25116
DA3	[M+H] ⁺	626,28339	626,28523
DA4	[M+H] ⁺	575,23611	575,23511
DA5	[M+H] ⁺	603,26741	603,26792
Dimer 2	[M+H] ⁺	835,40971	835,40863
Dimer 3	[M+H] ⁺	733,31515	733,31384
Dimer 4	[M+H] ⁺	733,31515	733,31384
Dimer 5	[M+H] ⁺	789,77775	789,77736
PC6	[M+H] ⁺	562,22962	562,22766
PC7	[M+H] ⁺	590,26029	590,26013

6.4 Primerverlängerung und DNA-Markierung *in vitro*

6.4.1 Template und Primer

Für den enzymatischen Einbau der modifizierten Nukleotide mittels Primerverlängerung wurden folgende Primer (P) und Template (T) verwendet.

P1	5'- ATTO390-GAC-CCA-CTC-CAT-CGA-GAT-TTC-TC-3'
P2	5'- Cy5-GAC-CCA-CTC-CAT-CGA-GAT-TTC-TC-3'
T1	3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AGG-GCA-CGG-TCG-CG-5'
T2	3'-CTG-GGT-GAG-GTA-GCT-CTA-AAG-AGG-GCT-CGG-ACG-CG-5'

6.4.2 Primerverlängerungsexperimente

Zur Durchführung der Primerverlängerungsexperimente wurden ein *TGradient 96* Thermocycler der Firma BIOMETRA verwendet. Um eine Kondensation der Probe am Deckel des Reaktionsgefäßes während des Erhitzens zu vermeiden, wurde die Deckeltemperatur des Thermocyclers für alle Experimente auf 99 °C eingestellt. Die Proben setzten sich entsprechend Tabelle 15 zusammen, wobei das Gesamtvolumen 20 µl betrug. Als Lösungsmittel dient MilliQ-Wasser.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Proben der Primerverlängerungsexperimente.

Reagenz	Menge
Templat	900 nM
Primer	750 nM
Puffer	1X
DNA-Polymerase	1 Unit
dNTPs	Jeweils 200 µM

Im ersten Schritt wurden Primer und Templat hybridisiert. Hierbei wurden die beiden Oligonukleotide sowie der für die jeweilige Polymerase benötigt Reaktionspuffer mit der entsprechenden Menge Wasser in ein PCR-Gefäß geben. Das Gemisch wurde für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend mit einer Rate von 1,2 °C/min auf 25 °C abgekühlt. Im darauffolgenden Schritt erfolgte die Verlängerung des Primers mit den natürlichen bzw. modifizierten Triphosphaten. Letztere wurden zunächst als 400 µM Stammlösung in Wasser angesetzt und gemeinsam mit der Polymerase zur PEX-Mischung geben. Das Gemisch wurde wie

in den jeweiligen Experimenten angegeben auf die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase oder 37 °C erhitzt und für die entsprechend angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Die verwendeten Polymerasen sowie deren Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Nach beendeter Elongation wurden die Proben mittels PAGE analysiert oder zunächst entsalzt und anschließend weiter umgesetzt.

Tabelle 16: Zusammenfassung der optimalen Arbeitstemperatur sowie Reaktionspufferzusammensetzung der verwendeten Polymerasen.

DNA-Polymerase	Arbeits- temperatur	Reaktionspuffer	Puffer-Zusammensetzung
Hemo KlenTaq	68 °C	Hemo KlenTaq Reaktionspuffer	60,0 mM Tricin, 5,00 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3,50 mM MgCl ₂ , 6,00 % Glycerol pH = 8,7
Vent (exo-) Deep Vent (exo-)	72 °C	Thermo-Pol Reaktionspuffer	20,0 mM Tris-HCl, 10,0 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10,0 mM KCl, 2,00 mM MgCl ₂ , 0,10 % Triton® X-100 pH = 8,8

6.4.3 Postsynthetische Markierung der DNA mittels iEDDA-Reaktion

Zur Durchführung der Markierungsexperimente wurde die mittels PEX synthetisierte DNA zunächst über *illustra NAP-5*-Säulen der Firma GE HEALTHCARE entsalzt. Die Säulen wurden zunächst entsprechend der Herstellerangaben äquilibriert und die Oligonukleotide in 1,00 ml MilliQ Wasser eluiert. Die Proben wurden anschließend lyophilisiert und in der dem ursprünglichen Volumen entsprechenden Menge Wasser gelöst. Für die nachfolgende iEDDA-Reaktion wurden 1000 Äquivalente (bezogen auf die Menge an verwendetem Primer) des jeweiligen Tetrazins zugeben und das Gemisch wurde über die angegebenen Zeitintervalle bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe mitgeführt der kein Tetrazin zugesetzt wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl Ladepuffer der Gelelektrophorese beendet und unmittelbar danach mittels denaturierender PAGE analysiert.

6.4.4 Postsynthetische Markierung der DNA mittels Photoclick-Reaktion

Analog zur iEDDA-Reaktion wurde die synthetisierte DNA zunächst entsalzt und anschließend im Lösungsmittel der Reaktion gelöst. Es wurden jeweils zwölf PEX-Ansätze vereint und Tetrazol **28** bzw. **31** in der jeweilig angegebenen Menge, bezogen auf die eingesetzte Menge des Primers, zugeben. Die Lösung wurde in eine Küvette überführt und im Fall von Tetrazol **28** bei 308 nm und Fall von Tetrazol **31** bei 405 nm belichtet. Nach den für das jeweilige Experiment spezifischen Zeiträumen wurden 20 µl Probe entnommen, mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt und mittels PAGE analysiert.

6.5 Zellkultur

6.5.1 Standardisierte Arbeitsbedingungen in der Zellkultur

Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer *safemate 1.2* Steril Bank der Firma BIOAIR durchgeführt. Verbrauchsmaterialien, welche nicht steril verpackt waren, wurden zunächst autoklaviert. Vor der Verwendung wurden alle Materialien, Geräte, sowie Schutzhandschuhe mit einer 80 %-igen Ethanol-Lösung in Wasser desinfiziert.

6.5.2 Kultivierung der Zellen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellexperimente wurden wild type HeLa-Zellen des humanen Zervix Karzinoms der Firma ATCC verwendet. Die Zellen wurden in einem Inkubator von BINDER bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Als Medium diente dabei zum einen *Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium* (DMEM; [+] 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamin, [+] Pyruvat, GIBCO™), ergänzt mit 10 % fötalem Kalbsserum (FCS, GIBCO™) und 60,0 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 U/ml P/S, GIBCO™). Des Weiteren wurde *ROTI™ Cell Eagle's MEM-Alpha Medium* ohne Glutamin und ohne Nukleoside (No/No-Medium, CARL ROTH) verwendet, welchem zusätzlich 10 % FCS, dialysiert (GIBCO™) sowie 1 U/ml P/S zugesetzt wurde. Zur Adaption der Kultur an das jeweilige Medium wurden die Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen in diesem kultiviert.

Bei einer Konfluenz von circa 80 % wurden die Zellen passagiert. Hierbei wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 5,00 ml *Dulbeccos Phosphate Buffered Saline* (DPBS, GIBCO™) gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen wurden diese mit 1,00 ml einer 0,25 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe 9,00 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in der entsprechenden Verdünnung mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für nachfolgende Zellexperimente wurden die Zellen auf die gewünschte Zellzahl verdünnt und in 96-well-plates (CELLSTAR) oder µ-slides 8- bzw. 18-well (IBIDI) überführt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

6.5.3 MTT-Test

In einer 96-well Platte wurden 1×10^4 HeLa-Zellen/well, kultiviert in No/No-Medium, ausgesät. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und zu den Proben No/No-Medium zugeben, welches das jeweilige Nukleosid in der gewünschten Konzentration enthält. Für eine Konzentration wurden jeweils sechs Replikate angefertigt. Die Positiv-Kontrolle wurde mit 15 µL 10 % Triton-X-100 in PBS versetzt. Die Proben wurden erneut 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach beendeter Inkubationszeit wurden 15 μL MTT-Reagenz zugegeben, die Proben für drei weitere Stunden im Inkubator aufbewahrt und anschließend 100 μL Lysispuffer (*Solubilization buffer*) zugeben. Nach weiteren 24 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde die Absorption der einzelnen Proben bei 570 nm mit Hilfe des Plate-Readers bestimmt. Die erhaltenen Werte derselben Konzentration wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Zur Auswertung wurde von der Absorption der Proben die Absorption der Positiv-Kontrolle abgezogen und die Proben auf die Absorption der Negativ-Kontrolle normiert. Die resultierenden Werte geben die relative Vitalität der Zellen in Prozent wieder.

6.5.4 Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion

Es wurden zunächst 1×10^4 HeLa-Zellen/well, kultiviert in No/No-Medium, in μ -slides 8-well ausgesät. Dem Medium wurde das entsprechende Nukleosid in einer Konzentration von 100 μM zugegeben. Alle Nukleoside wurden in Form einer 1,00 M Stammlösung in DMSO eingesetzt, welche anschließend mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurde. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend fixiert. Hierbei wurde zunächst mit DPBS gewaschen, 10 min mit einer 4,00 % Paraformaldehyd-Lösung (pH 6,90) auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierung wurde anschließend für 5 min mit 50,0 mM Glycin und 50,0 mM NH_4Cl in DPBS abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden 1,00 μM des Tetrazin-Farbstoffs **32** in DMEM zugeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Bei zusätzlicher DNA-Denaturierung wurde vor der Zugabe des Tetrazins 5 min mit einer 0,1 % Triton-X 100 Lösung in DPBS und anschließend 30 min mit einer 2,00 M HCl in H_2O inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und 10 min mit einer 0,10 M wässrigen Natriumtetraborat-Lösung neutralisiert.

6.5.5 Metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion

In μ -slides 8-well wurden 1×10^4 HeLa-Zellen/well, kultiviert in No/No-Medium, ausgesät und dem Medium dabei 100 μM des jeweiligen Nukleosids zugesetzt. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend fixiert, permeabilisiert und die DNA denaturiert. Hierbei wurde zunächst mit DPBS gewaschen, mit einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach weiteren 5 min mit 50,0 mM Glycin und 50,0 mM NH_4Cl in DPBS abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurde zunächst 5 min mit einer 0,1 % Triton-X 100 Lösung in DPBS und anschließend 30 min mit einer 2,00 M HCl in H_2O inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und 10 min mit einer 0,10 M wässrigen Natriumtetraborat-Lösung neutralisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde 30,0 μM **31** in Acetonitril zugeben und für 1 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Das Tetrazol wurden hierbei in Form einer 6,33 mM Stammlösung in DMSO

eingesetzt. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Proben für 20 min bei 405 nm belichtet, wobei die Temperatur konstant bei 20 °C gehalten wurde. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Acetonitril gewaschen und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

6.5.6 SNTT-Transporter Experimente

Es wurden zunächst HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, in der jeweils angegebenen Zellzahl in einem μ -slide 8-well bzw. 18-well ausgesät (Standard-Protokoll: 1×10^4 Zellen/well (8-well) bzw. $1,5 \times 10^4$ Zellen/well (18-well)) und 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der SNTT-Transporter und die jeweiligen Triphosphate wurden in Form einer Treatment-Lösung 10 μ M in Tricin-Puffer eingesetzt. Von beiden Komponenten wurde zunächst eine 1,00 mM Stammlösung in Wasser erstellt und diese mit Tricin-Puffer auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die Zusammensetzung des Tricin-Puffers ist in Tabelle 17 angegeben. Vor der Zugabe der Treatment-Lösung wurden die Zellen mit Tricin-Puffer gewaschen und anschließend über den im Experiment angegebenen Zeitraum mit der Treatment-Lösung (Standard-Protokoll: 10 min) inkubiert. Die Treatment-Lösung wurde anschließend durch Medium ausgetauscht und die Zellen über einen definierten Zeitraum (Standard-Protokoll: 2 h) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die nachfolgende Fixierung und Markierung mittels iEDDA- bzw. Photoclick-Reaktion erfolgte analog zu den Protokollen zur metabolischen Markierung für die jeweilige Reaktion.

Tabelle 17: Zusammensetzung des für die Experimente mit dem SNTT-Transporter verwendeten Tricin-Puffers.

Reagenz	Menge
Tricin	5,00 mM
Glucose	11,0 mM
NaCl	125 mM
CaCl ₂	1,80 mM
MgSO ₄	0,80 mM
KCl	5,40 mM

6.5.7 Duale metabolische Markierung

1×10^4 HeLa-Zellen/well, kultiviert in No/No-Medium, wurden in einem μ -slide 8-well ausgesät. Dem Medium wurde 100 μ M **6** zugesetzt und die Zellen über 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Es wurde anschließend mit Tricin-Puffer gewaschen und für 10 min mit einer 1,00 μ M SNTT-Transporter sowie **TP1**-Lösung in Tricin-Puffer bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dem Austausch der Treatment-Lösung gegen No/No-Medium wurde erneut 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die

anschließende Fixierung wurde zunächst mit DPBS gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur mit einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung inkubiert und durch 5-minütige Inkubation mit 50,0 mM Glycin und 50,0 mM NH_4Cl in DPBS abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurde 1,00 μM **33** in DMEM zugeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde mit einer 0,1 % Triton-X 100 für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert, wobei davor zweimal mit DPBS gewaschen wurde. Es wurde anschließend 2,00 M HCl zugeben, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit DPBS gewaschen und 10 min mit einer 0,10 M wässrigen Natriumtetraborat-Lösung neutralisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit DPBS wurde 30,0 μM **31** in Acetonitril zugeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 20 min bei 405 nm belichtet. Um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, wurde zweimal mit Acetonitril gewaschen und die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

7. ANHANG

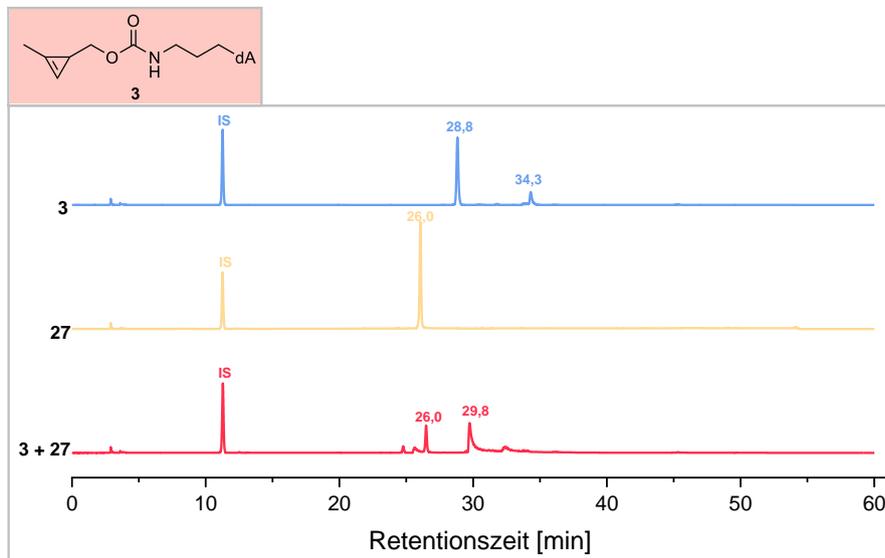


Abbildung A 1: Chromatogramme einer Lösung von **3** (0,50 mM; blau), **27** (0,50 mM; gelb) sowie **3 + 27** ((0,50 mM; rot) in PBS/MeCN (1:1), nach Inkubation von 10 h bei Raumtemperatur. Der Peak bei 29,8 min wurde mittels LC-MS als Produkt **DA3** identifiziert. Trennmethode: 0 – 60 % MeOH in H₂O über 30 min (Abschnitt 6.1, Tabelle 3).

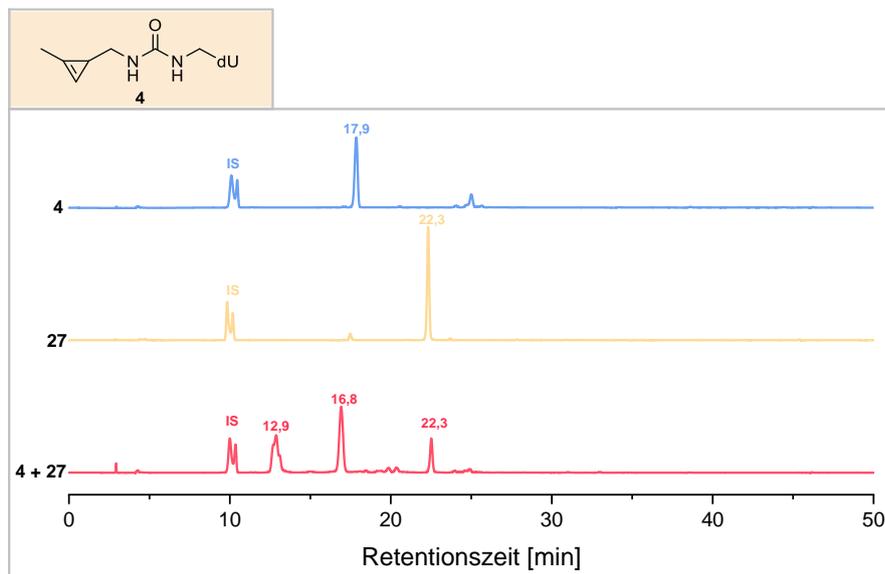


Abbildung A 2: Chromatogramme einer Lösung von **4** (0,50 mM; blau), **27** (0,50 mM; gelb) sowie **4 + 27** ((0,50 mM; rot) in PBS/MeCN (1:1), nach Inkubation von 10 h bei Raumtemperatur. Der Peak bei 16,8 min wurde mittels LC-MS als Produkt **DA4** identifiziert. Trennmethode: 0 – 40 % MeCN in H₂O (+0,1 % TFA) über 30 min (Abschnitt 6.1, Tabelle 4).

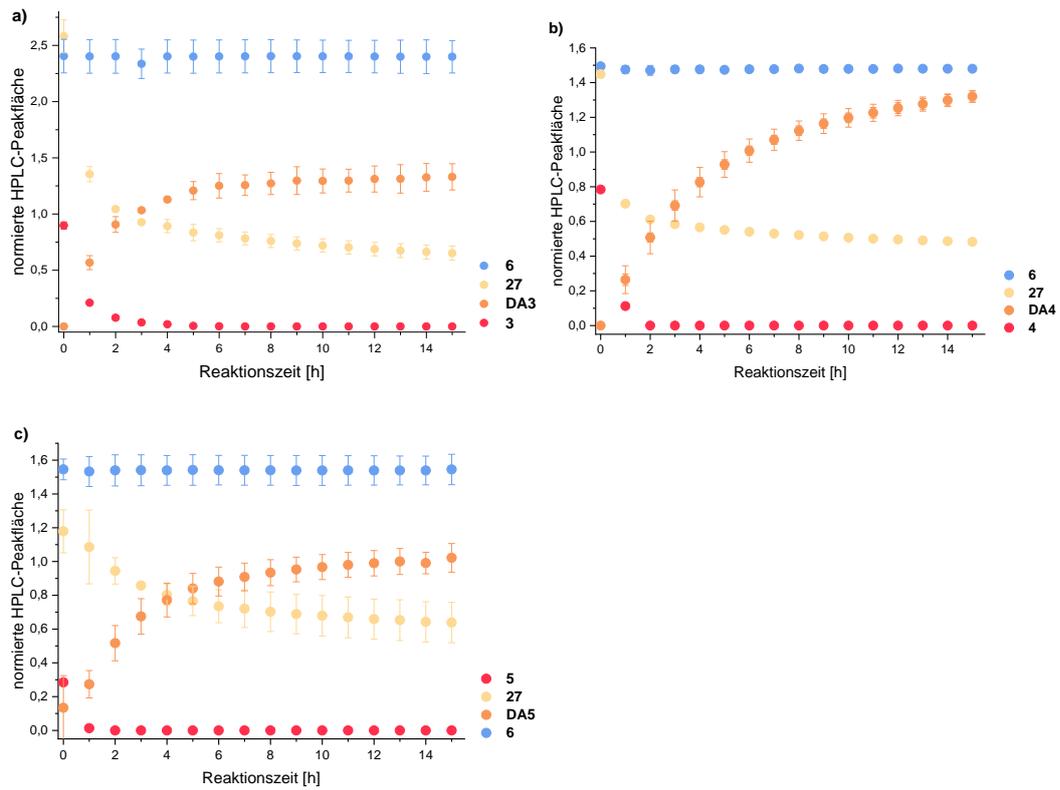


Abbildung A 3: Vergleich der Reaktivität von **6** und **3** (a), **4** (b) und **5** (c) in einer iEDDA-Reaktion mit **27** durch Auftragung der auf den Standard normierten HPLC-Peakflächen von Edukten und Produkt gegen die Reaktionszeit.

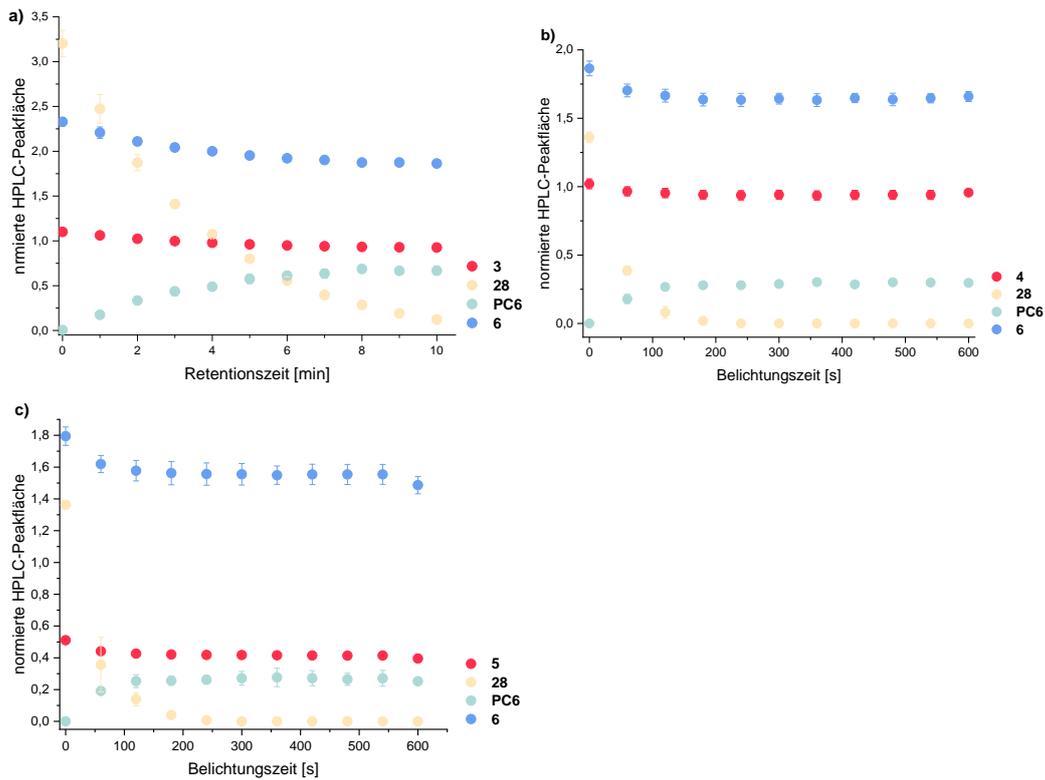


Abbildung A 4: Vergleich der Reaktivität von **6** und **3** (a), **4** (b) und **5** (c) in einer Photoclick-Reaktion mit **28** durch Auftragung der auf den Standard normierten HPLC-Peakflächen von Edukten und Produkt gegen die Reaktionszeit.

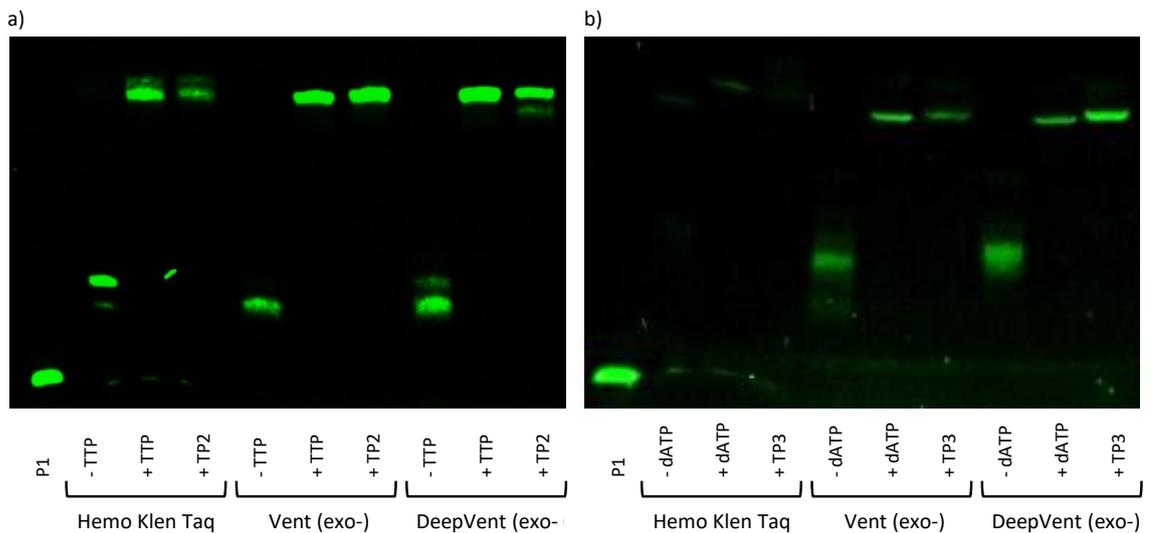


Abbildung A 5: PAGE-Analyse des Primerverlängerungs-Experiments mit **TP2** (a) und **TP3** (b) bei Elongation für 30 min bei 37 °C mit den drei ausgewählten Polymerasen. Negativ-Kontrollen (-TTP bzw. -dATP) wurden nur dCTP, dGTP, dATP bzw. TTP zugegeben, Positiv-Kontrollen (+TTP/+dATP) enthalten alle natürlichen Nukleotide. In Proben (+TP2 bzw. TP3) wurde TTP/dATP durch **TP2/TP3** ausgetauscht.

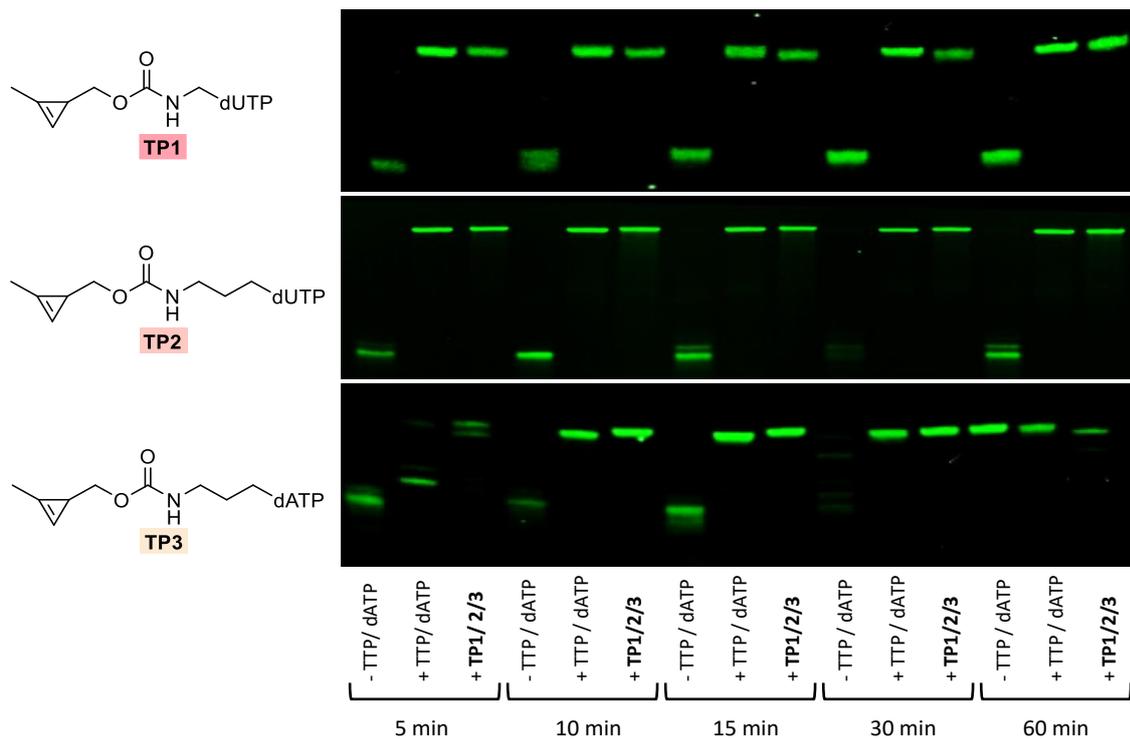


Abbildung A 6: PAGE-Analyse des Primerverlängerungsexperiments mit der Deep Vent (exo-) Polymerase bei 37 °C und unterschiedlichen Elongationszeiten. Negativ-Kontrollen (-TTP bzw. -dATP) wurden mit Zugabe von dATP, dCTP, dGTP für **TP1** und **TP2** bzw. von dTTP, dCTP, dGTP für **TP3**, während Positiv-Kontrollen (+TTP bzw. +dATP) alle natürlichen Nukleoside enthielten.

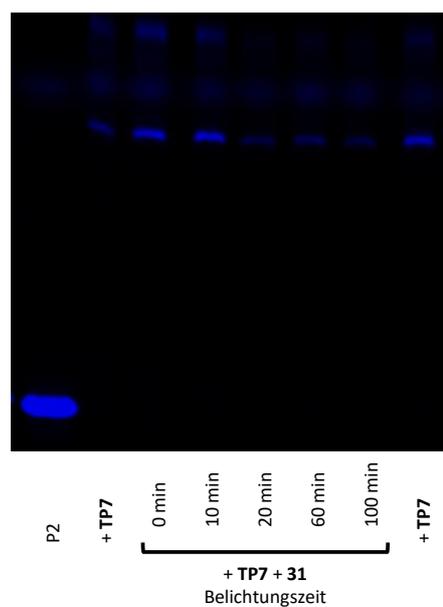


Abbildung A 7: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von **31** und 3-MCP-modifizierter DNA, welche durch Primerverlängerung mit **TP7** hergestellt wurde. Die entsalzte DNA wurde in DMSO/MeCN (1:3) gelöst und mit 10 Äquivalenten **31** über die angegebenen Zeiträume bei 308 nm belichtet.

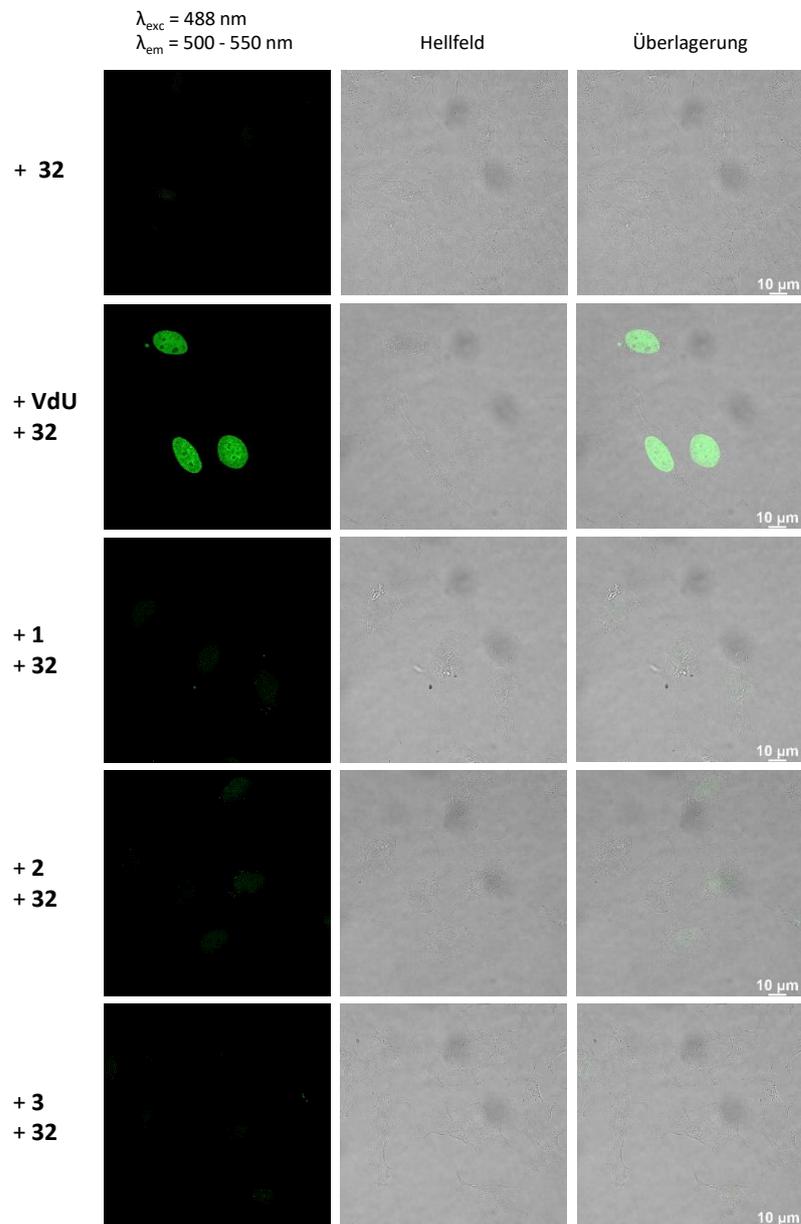


Abbildung A 8: Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion unter Verwendung von **1**, **2**, **3** und **32** mit zusätzlicher Denaturierung der genomischen DNA. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden für 48 h mit **1**, **2**, oder **3** (0,10 mM) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die DNA mit einer HCl-Lösung denaturiert. Nach der Inkubation mit **32** über Nacht wurden die Zellen mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

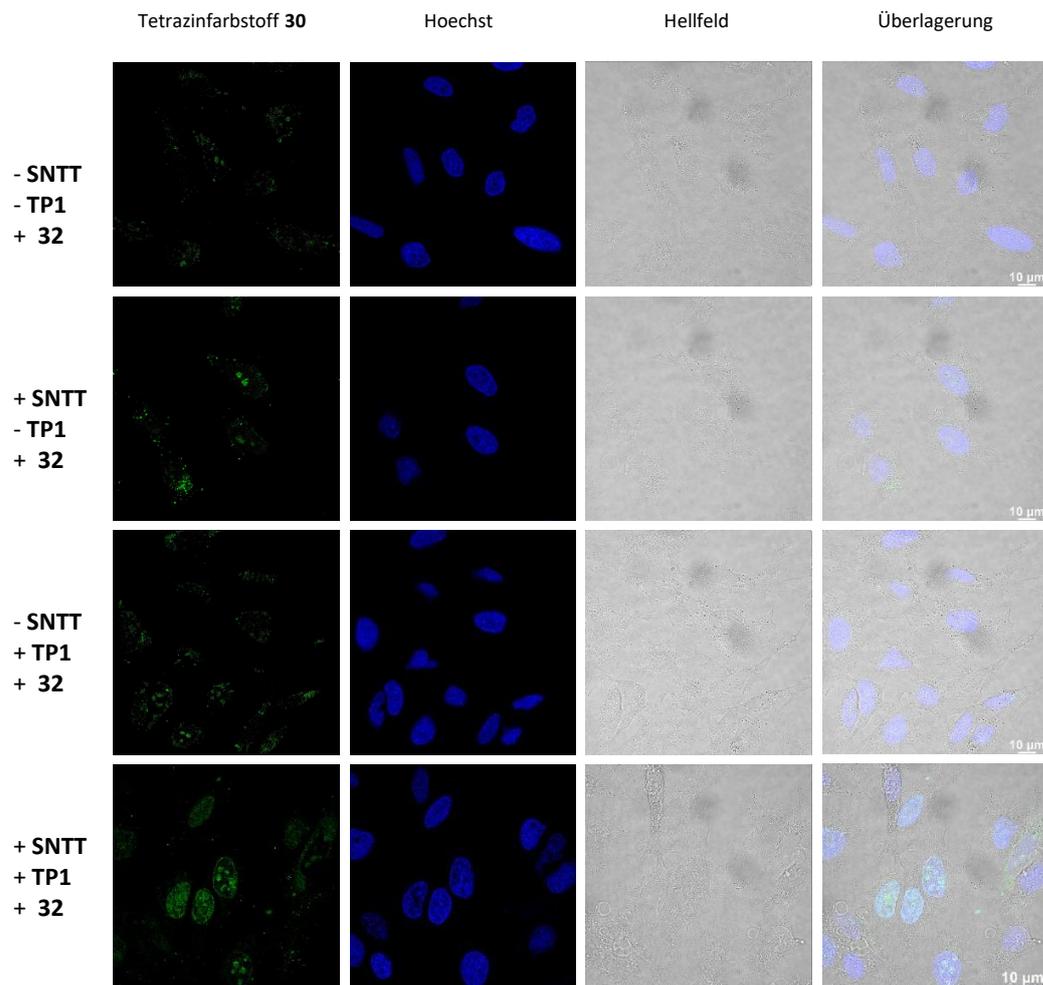


Abbildung A 9: Metabolische Markierung mit **TP1** in HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, unter Verwendung von SNTT und Gegenfärbung mit Hoechst 33342. Die Zellen wurden für 10 min mit einer Lösung von SNTT und **TP1** (10 μ M) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für 2 h in Medium inkubiert. Sie wurden anschließend fixiert und über Nacht **32** zugegeben. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, wobei **32**: $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 500 - 550$ nm; Hoechst 33342: $\lambda_{exc} = 405$ nm, $\lambda_{em} = 420 - 470$ nm.

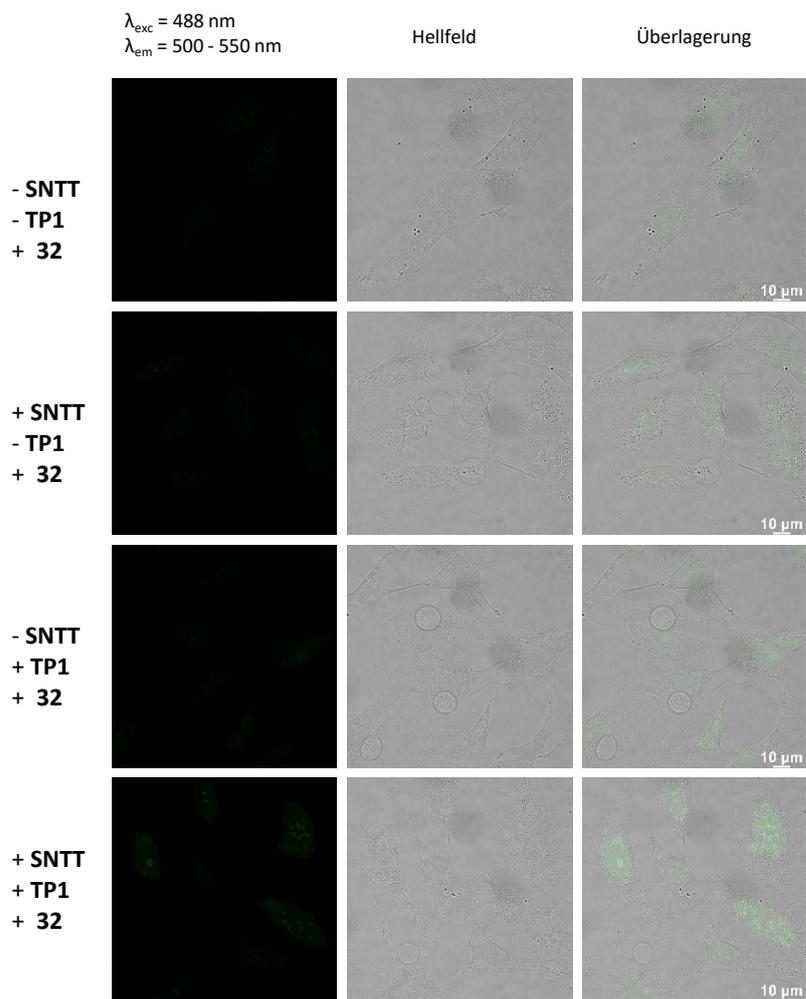


Abbildung A 10: Metabolische Markierung mit TP1 in HeLa-Zellen unter Verwendung von SNTT. Die Zellen wurden für 10 min mit einer Lösung von SNTT und TP1 (10 μM) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für 1 h in Medium inkubiert. Sie wurden anschließend fixiert und über Nacht 32 zugegeben. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

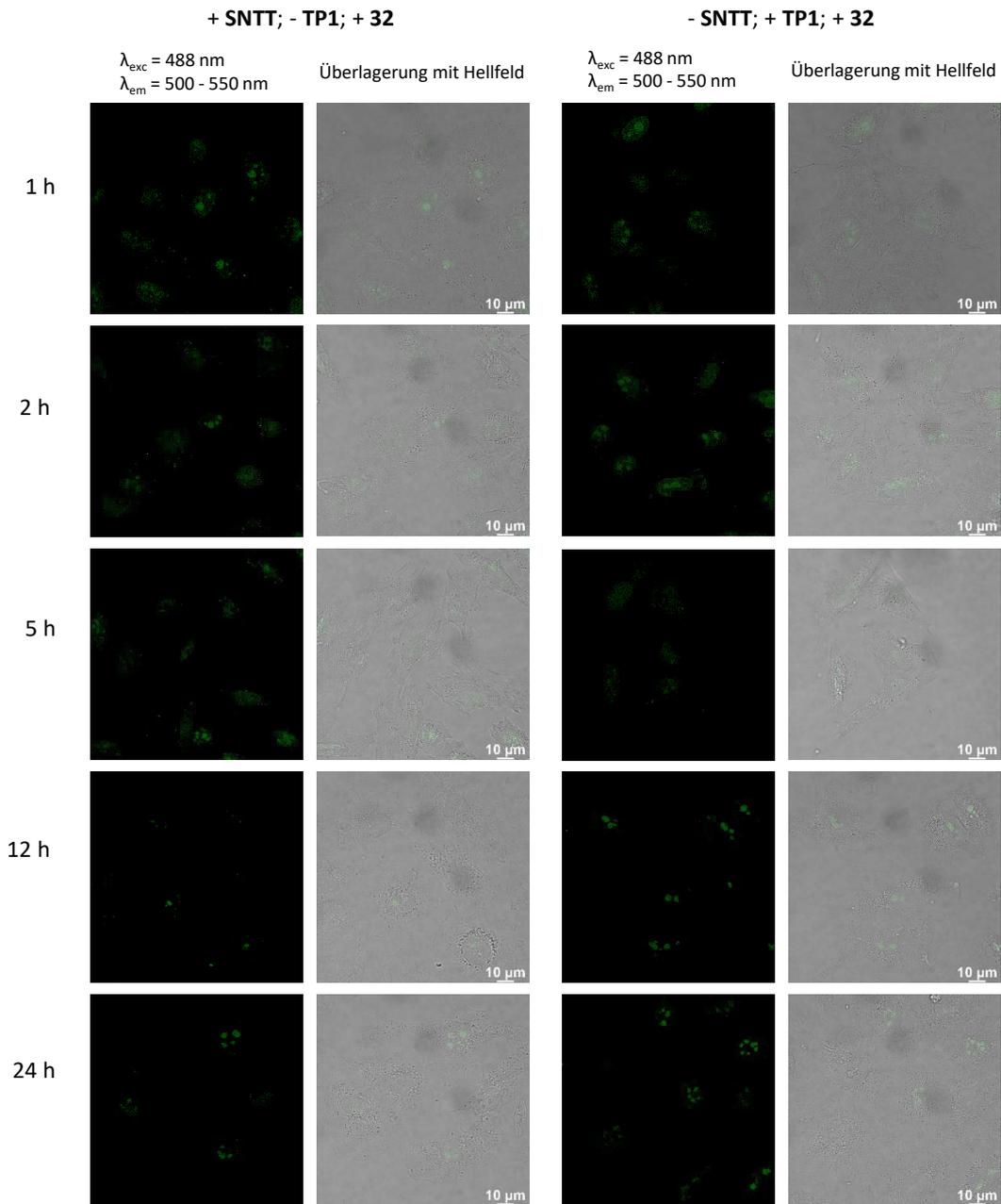


Abbildung A 11: Negativ-Kontrollen der Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die metabolische Markierung von HeLa-Zellen nach dem Transport von **TP1** in die Zelle mit Hilfe von SNTT. Die Zellen der Negativ-Kontrolle wurden für 10 min mit einer Lösung von SNTT oder **TP1** (10 μM) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für die angegebenen Zeiträume in Medium inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und über Nacht mit **32** inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

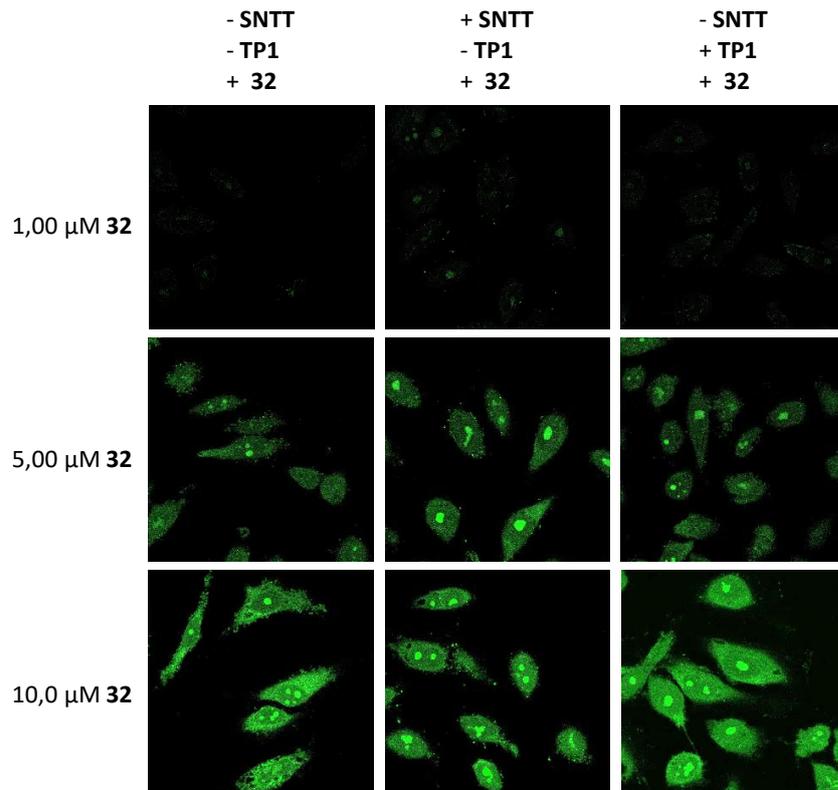


Abbildung A 12: Negativ-Kontrollen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unterschiedlicher Konzentrationen von **32** bei der metabolischen Markierung mit **TP1** und **32**. HeLa-Zellen (No/No) wurden für 10 min mit 10 μM SNTT und **TP1** in Tricin behandelt, 2 h in Medium inkubiert, fixiert und über Nacht mit **32** in den angegebenen Konzentrationen angefärbt. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$.

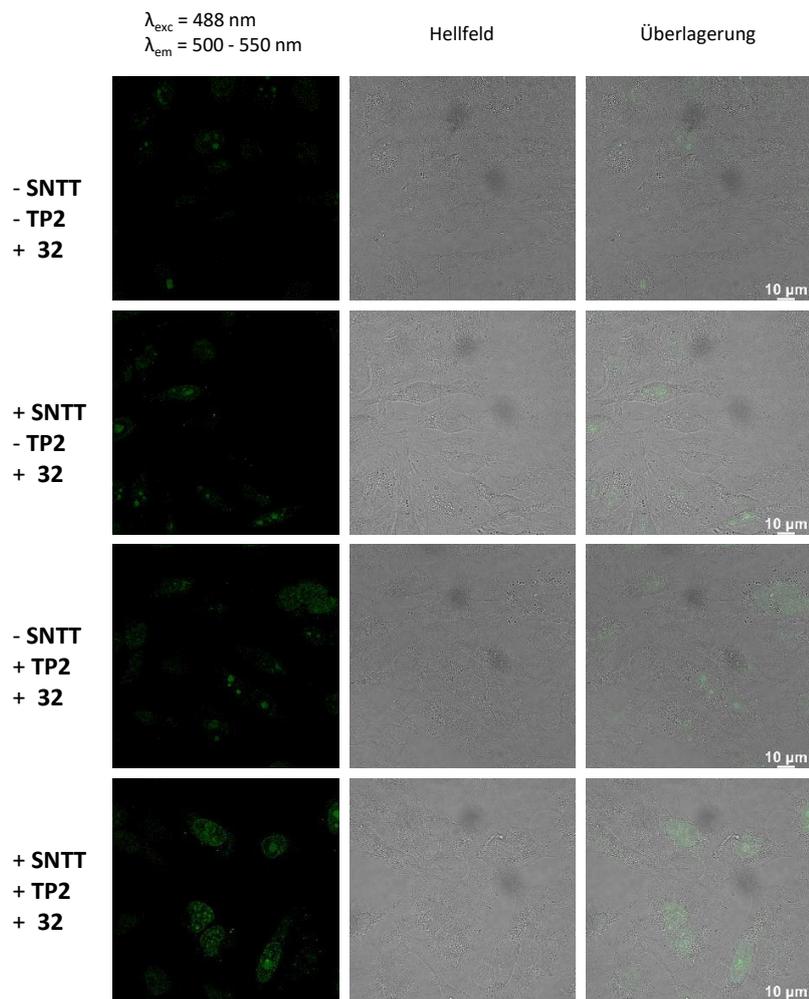


Abbildung A 13: Metabolische Markierung mit **TP2** in HeLa-Zellen unter Verwendung von **SNTT**. Die Zellen wurden für 10 min mit einer Lösung von **SNTT** und **TP2** (jeweils 10 μM) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für 2 h in Medium inkubiert. Sie wurden anschließend fixiert und über Nacht **32** (1,00 μM in Medium) zugegeben. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

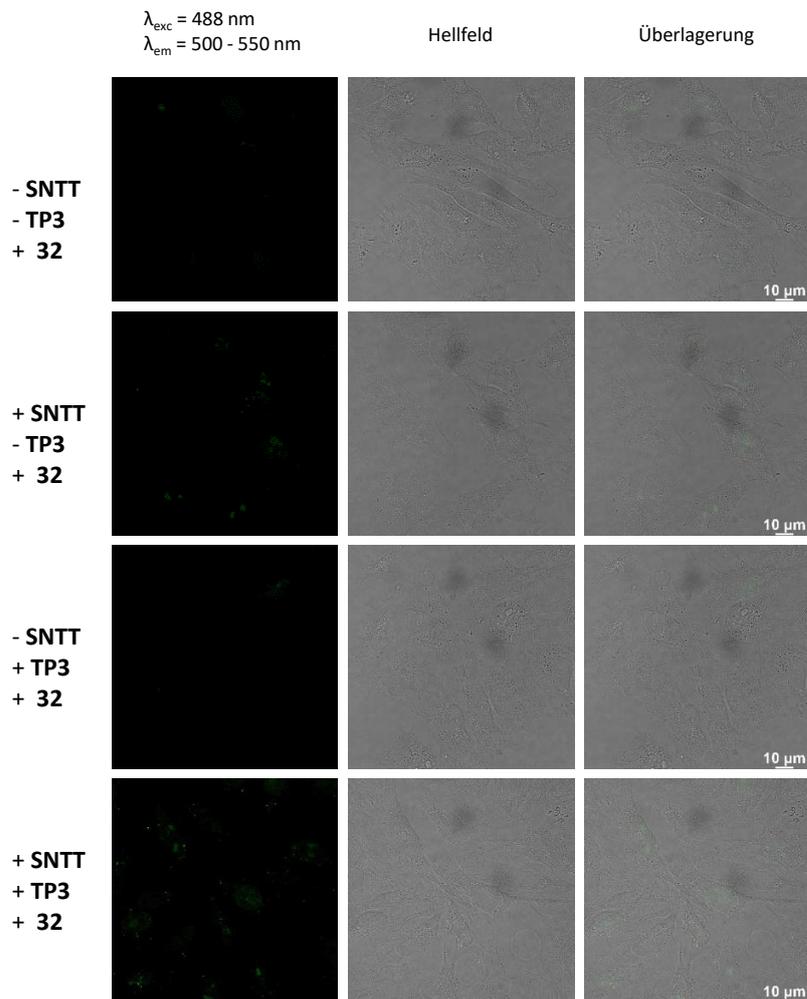


Abbildung A 14: Metabolische Markierung mit **TP3** in HeLa-Zellen unter Verwendung von SNTT. Die Zellen wurden für 10 min mit einer Lösung von SNTT und **TP3** (jeweils 10 μM) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für 2 h in Medium inkubiert. Sie wurden anschließend fixiert und über Nacht **32** (1,00 μM in Medium) zugegeben. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

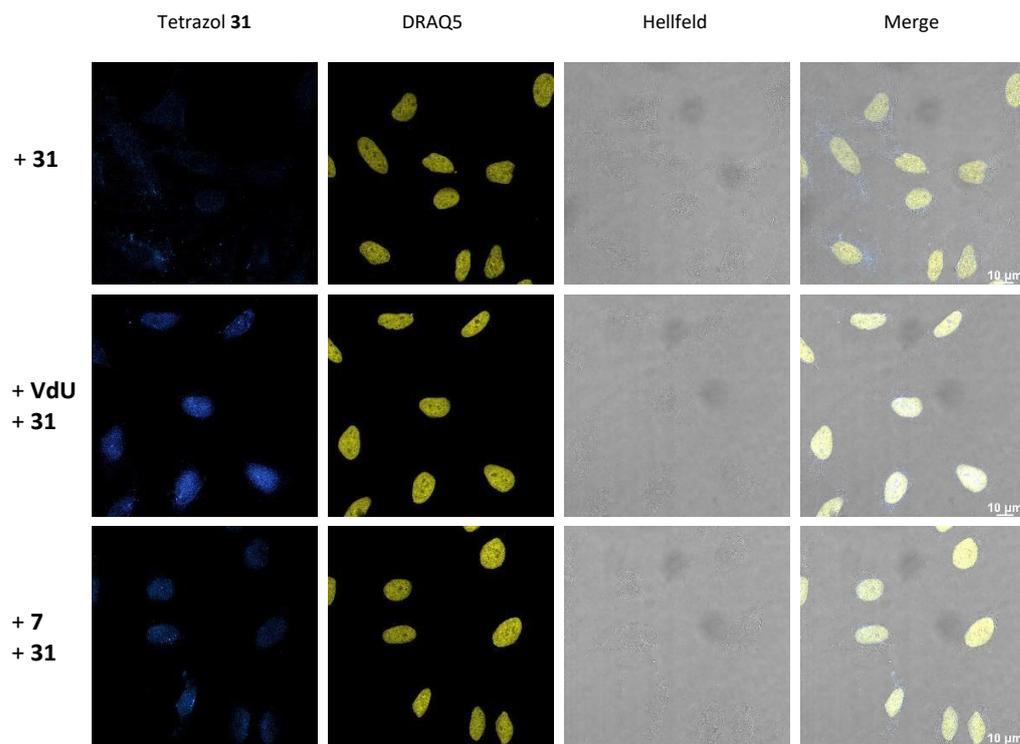


Abbildung A 15: Metabolische Markierung mit **7** und **31** über Photoclick-Reaktion und Gegenfärbung mit DRAQ5. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden für 48 h mit **7** (100 µM) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und die genomische DNA denaturiert. Die Proben wurden mit **31** (30 µM in MeCN) versetzt, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und 20 min bei 405 nm belichtet. Die Visualisierung erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

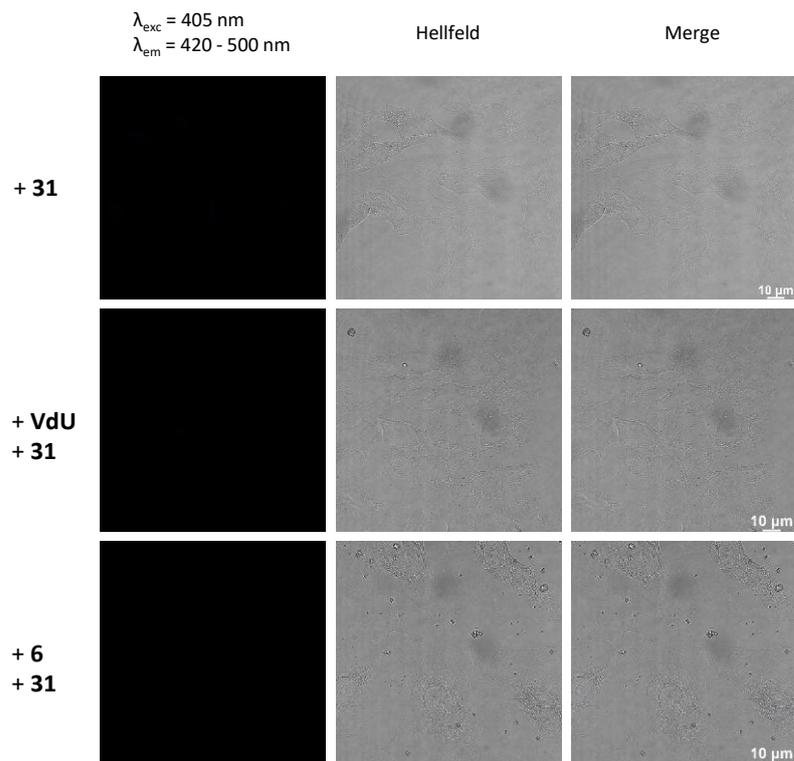


Abbildung A 16: Untersuchung der metabolischen Markierung mit **6** und **31** über Photoclick-Reaktion ohne DNA-Denaturierung. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden für 48 h mit **6** (100 μM) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, mit **31** (30 μM in MeCN) versetzt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und 20 min bei 405 nm belichtet. Die Visualisierung erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

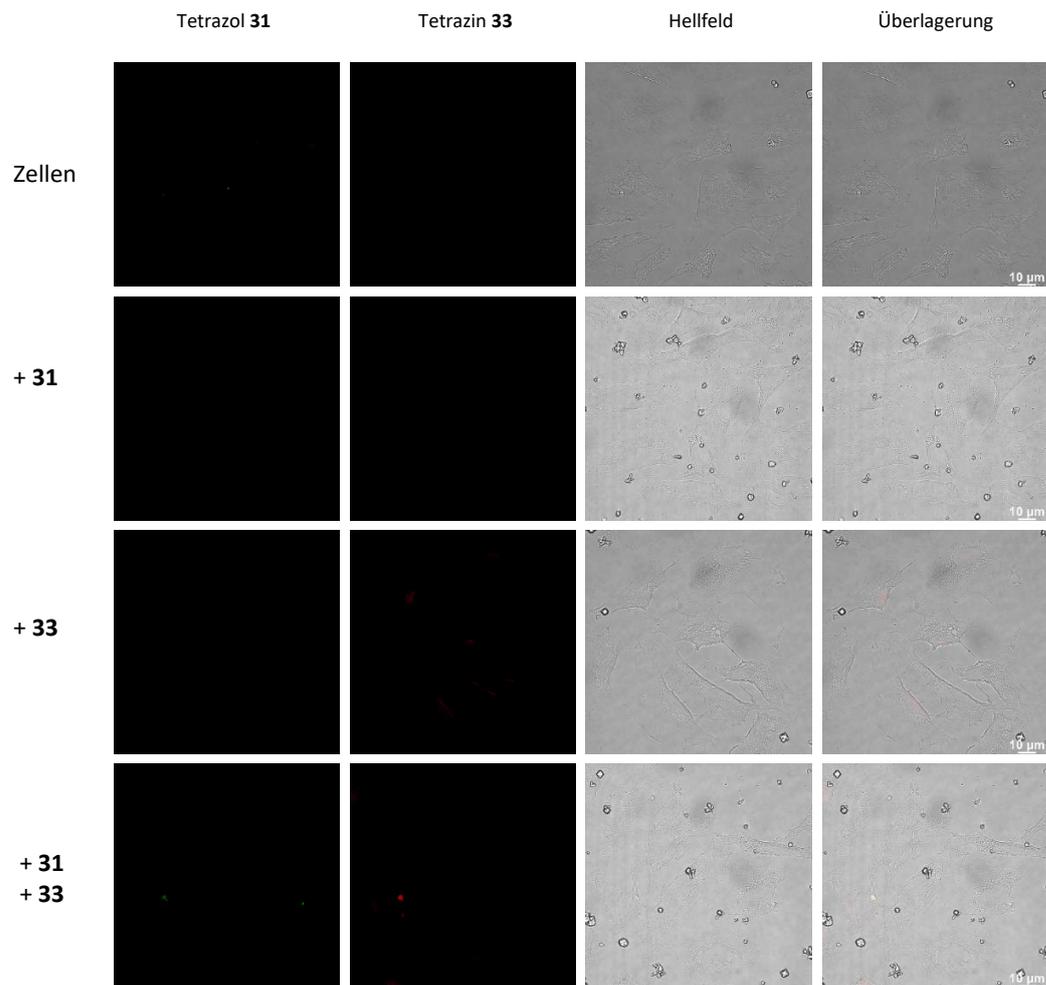


Abbildung A 17: Negativ-Kontrolle der dualen metabolischen Markierung mit **TP1** und **6** sowie **31** und **32**. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden im Fall der Negativ-Kontrolle für 48 h in Medium inkubiert und anschließend fixiert. Proben mit **32** wurden über Nacht mit diesem inkubiert, Proben ohne **32** wurden in Medium inkubiert. Die Zellen wurden anschließend permeabilisiert und die zelluläre DNA denaturiert. Proben mit **31** wurden anschließend für 1 h mit diesem inkubiert. Die Visualisierung erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

δ	chemische Verschiebung
abs.	absolut
AmdU	5-azidmdifizierten 2'-Desoxyuridin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalente
ATT	6-Aza-2-thiothymin
BCN	Bicyclo[6,1,0]nonin
ber.	berechnet
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
d	Dublett
DA	Diels-Alder-Reaktion
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DBU	Diazabicycloundecen
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Zellmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
DPPA	Diphenylazidophosphat
dU	2'-Desoxyuridin
EDG	Elektronenschiebende Gruppe (<i>electron donating group</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EdU	5-Ethyl-2'-desoxyuridin
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
EWG	Elektronenziehende Gruppe (<i>electron withdrawing group</i>)
FAB	Fast Atom Bombardment
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
gef.	gefunden
HeLa	Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie (<i>Henrietta Lacks</i>)
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high resolution – mass spectrometry</i>)
HyD	Hybridphotodetektor
I	Intensität
iEDDA	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (<i>inverse electron-demand Diels-Alder-reaction</i>)
IS	Interner Standard
J	Kopplungskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (<i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>)
LED	Leuchtdiode (<i>light-emitting diode</i>)
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
M	Molarität
m	Multipllett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>)
MCP	Methylcyclopropen
Me	Methyl

MeCN	Acetonitril
MEM	Synthetisches Zellkulturmedium (<i>Minimum Essential Medium</i>)
MeOH	Methanol
MO	Molekülorbital
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger-RNA</i>)
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
No/No-Medium	Zellmedium (<i>Minimum Essential Medium</i>) ohne L-Glutamin, ohne Nukleoside
norm.	normiert
NT	Nukleotide
OH	Hydroxid
p	Pentett
P	Primer
p. a.	für analytische Zwecke (<i>pro analysi</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösungen (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Photoclick
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PEX	Primerverlängerung (<i>primer extension</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PMT	Photomultiplier
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
quant.	quantitativ
R _F	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SNTT	synthetischer Nukleosidtriphosphat Transporter (<i>synthetic nucleoside triphosphate transporter</i>)

SPAAC	Ringspannungsgetriebene Azid-Alkin-Cycloaddition (<i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
T	Templatstrang
t	Triplett
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCO	trans-Cycloocten
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
TMP	Trimethylphosphat
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Flugzeitmassenspektrometer (<i>time-of-flight mass spectrometer</i>)
TP	Triphosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
VdU	5-Vinyl-2'-Desoxyuridin
Vis	Sichtbar (<i>visible</i>)
wt%	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Visualisierung unterschiedlicher Biomoleküle wie beispielsweise Glykane (a), Lipide (b), DNA (c) und Proteine (d) in der Zelle über bioorthogonale Chemie, wobei: a) Übernommen mit Genehmigung von P. Chang et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 27, 8400–8401. Copyright 2024 American Chemical Society; b) Übernommen mit Genehmigung von C. Jao et al. *ChemBioChem*, 2015, 16, 4, 611-617. Copyright 2024 John Wiley and Sons; c) Übernommen mit Genehmigung von Rieder et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 9168–9172. Copyright 2024 John Wiley and Sons; d) Übernommen mit Genehmigung von T. Peng et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 43, 14423-14433. Copyright 2024 American Chemical Society. 2
- Abbildung 2: Verteilung der Publikationen im Bereich der bioorthogonalen Chemie von 2010 bis 2020 auf die verschiedenen Arten an Biomolekülen. Entnommen und übersetzt aus R. Bird et al. *Bioconjugate Chem.* 2021, 32, 2457–2479, lizenziert unter Creative Common CC-BY 4.0. 3
- Abbildung 3: Zweistufige Strategie der bioorthogonalen Markierung. Das zu betrachtende Biomolekül wird im ersten Schritt mit einem chemischen Reporter ausgestattet. Im zweiten Schritt wird an diesem mit Hilfe eines komplementären Kupplungspartners eine Sonde angebracht. 6
- Abbildung 4: Zeitlicher Überblick über die wichtigsten bioorthogonalen Reaktionen.³² (CuAAC: Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, SPAAC: strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) 8
- Abbildung 5: Molekülorbitalschemata der wechselwirkenden Grenzorbitale bei einer normalen Diels-Alder-Reaktion (blau) und einer iEDDA-Reaktion (rot).⁶⁰ 11
- Abbildung 6: Überblick über die Geschwindigkeitskonstanten k_2 bekannter bioorthogonaler Reaktionen.^{26, 54, 56, 63, 65} 12
- Abbildung 7: Zwei-Faktor-Fluoreszenzanstieg eines tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffs. Ein Fluoreszenzanstieg wird durch Umsatz des als Quencher wirkenden Tetrazins (rot) und Einschränkung der Rotation bei Interkalation in die DNA-Helix (blau) erzielt.⁷⁹ 14

- Abbildung 8: Überblick über die wichtigsten Dienophile für eine bioorthogonale iEDDA-Reaktion und deren Einordnung in Bezug auf Reaktivität und Stabilität..... 15
- Abbildung 9: Überblick über die möglichen Nebenreaktionen eine Nitrilimins mit verschiedenen Nukleophilen (grau) und Lösungsansätze durch sterische (blau) oder elektronische (rot) Abschirmung..... 17
- Abbildung 10: Überblick über bekannte Tetrazole für eine Photoclick-Reaktion und deren Anregungswellenlängen, wobei eine Aktivierung des dinaphthalinsubstituierten Derivats bei 700 nm nur über Zwei-Photonen-Anregung mit einem Femtosekunden-Laser möglich war. . 18
- Abbildung 11: Überblick über bekannte Ansätze zu Erzeugung von Orthogonalität zwischen zwei bioorthogonalen Reaktionen. Schwarze Pfeile stehen für eine gewünschte und hellgraue Pfeile für eine unerwünschte Reaktion. 20
- Abbildung 12: 1. Orthogonalität von SPAAC und iEDDA-Reaktion durch sterische Hinderung der Reagenzien 2. Anwendung dieses orthogonalen Paares zu dualen Markierung von Tumorzellen in Mäusen. a) Mikro-PET-Aufnahmen von subkutanen Tumoren nach Markierung über SPAAC. b) Fluoreszenzgeführte Tumorentfernung nach Markierung über iEDDA-Reaktion. Entnommen aus Y. Wang et al. Nat. Commun., 2023, 14, 974, lizenziert unter CC-BY 4.0. 21
- Abbildung 13: links: Cyclopropenstruktur mit der Nummerierung der Atome; rechts: Polymerisationsreaktion von unsubstituierten Cyclopropenen nach einem En-Mechanismus. 23
- Abbildung 14: Bekannte 1-methylcyclopropenmodifizierte Nukleoside zur Markierung von DNA über iEDDA-Reaktion. Die Cyclopropen-Funktion wurde über einen Carbamat-Gruppe mit einem Propinyllinker angefügt.¹³³ 24
- Abbildung 15: Bekannte 3-methylcyclopropenmodifizierte Nukleoside zur Markierung von DNA über Photoclick-Reaktion. Das Cyclopropen wurde über eine Amid-Gruppe und einem Propinyl- oder einen Propylenlinker angefügt.¹⁴² 25
- Abbildung 16: Berechnete Geschwindigkeitskonstanten von 1,3- und 3,3-Dimethylcyclopropen mit einen diarylsubstituierten Nitrilimin (links) und einen diarylsubstituierten Tetrazin (rechts)..... 26
- Abbildung 17: Einführung von modifizierten Nukleosiden in ein Oligonukleotid, enzymatisch mit Hilfe von Polymerasen in Form von

Nukleosidtriphosphaten (links) oder synthetisch über DNA-Festphasensynthese mit Phosphoramiditen (rechts).	27
Abbildung 18: Schematische Darstellung eines PEX-Experiments. Templat und Primer werden hybridisiert und der Primer mit Hilfe einer Polymerase verlängert. Diese kann zu Elongation natürliche (dNTPs) oder modifizierte Nukleotide (o-dNTP) verwenden, wodurch modifizierte Basen enzymatisch in den Strang eingefügt werden können.	28
Abbildung 19: Schematische Darstellung der metabolischen Markierung von 2'-Desoxynukleosiden, die mit einem chemischen Reporter (blau) modifiziert sind.....	30
Abbildung 20: Überblick über modifizierte 2'-Desoxynukleoside, die über metabolische Markierung in zelluläre DNA eingefügt und visualisiert werden konnten.	31
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Transports von modifizierten Nukleotiden über die Zellmembran mit Hilfe des SNTTs.	32
Abbildung 22: Duale bioorthogonale und orthogonale Markierung von DNA basierend auf 1- und 3-methylcyclopropenmodifizierten 2'-Desoxynukleosiden als chemische Reporter.	33
Abbildung 23: 1-Methylcyclopropenmodifizierte 2'-Desoxynukleoside 1 – 5 , welche im Rahmen dieser Arbeit für die bioorthogonale Markierung von DNA mittels iEDDA-Reaktion eingesetzt werden sollen, sowie bekannte ¹⁴² 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleoside 6 und 7 für eine Markierung über Photoclick-Reaktion.	36
Abbildung 24: Chromatogramme einer Lösung von 2 (0,50 mM; blau), 27 (0,50 mM; gelb) sowie 2 + 27 (jeweils 0,50 mM; rot) in PBS/MeCN (1:1), nach Inkubation von 10 h bei Raumtemperatur. Trennmethode: 0 – 30 % MeCN in H ₂ O über 30 min (Kapitel 6, Tabelle 2).	45
Abbildung 25: Reaktionsverlauf der iEDDA-Reaktion von 2 und 27 zu DA2 über 8 h. Die Edukte wurden in äquimolarer Konzentration (0,50 mM) in PBS/MeCN (1:1) gemischt und unmittelbar nach der Zugabe der Reaktanden (0 h) sowie jede nachfolgende Stunde mittels RP-HPLC analysiert.....	46
Abbildung 26: Chromatogramme einer Lösung von 5 (0,50 mM; blau), 27 (0,50 mM; gelb) sowie 5 + 27 ((0,50 mM; rot) in PBS/MeCN (1:1), nach Inkubation von 10 h bei Raumtemperatur. Trennmethode: 0 – 40 % MeOH (+ 0,1 % TFA) in H ₂ O (+ 0,1 % TFA) über 30 min (Abschnitt 6, Tabelle 5).47	
Abbildung 27: Reaktionsverlauf der iEDDA-Reaktion von 5 und 27 über 8 h. Die Edukte	

- wurden in gleicher Konzentration (0,50 mM) in PBS/MeCN (1:1) gegeben und das Gemisch stündlich über RP-HPLC analysiert.47
- Abbildung 28: Kinetische Analyse der iEDDA-Reaktionen von **27** und den 1-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden **2** (a), **3** (b), **4** (c) und **5** (d). 0,50 mM Nukleosid wurde in PBS/MeCN (1:1) vorgelegt, 0,10 mM **27** zugegeben und die Reaktionsmischung stündlich via RP-HPLC analysiert. Die HPLC-Peakflächen der einzelnen Komponenten wurden auf den Standard normiert und gegen die Reaktionszeit aufgetragen 48
- Abbildung 29: Vergleich der Chromatogramme einer Reaktionsmischung von **6** mit **27** (blau), **2** mit **27** (gelb) und **2** und **6** im Gemisch mit **27** (rot). Die Reaktion wurde mit einer Konzentration von 0,50 mM aller Edukte in PBS/MeCN (1:1) über 10 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Trennmethode: 0 – 30 % MeCN in H₂O über 30 min (Kapitel 6, Tabelle 2)..... 51
- Abbildung 30: Vergleich der Reaktivität von **2** und **6** (a) bzw. **7** (b) in einer iEDDA-Reaktion mit **27** durch Auftragung der auf den Standard normierten HPLC-Peakflächen von Edukten und Produkt gegen die Reaktionszeit.52
- Abbildung 31: Gegenüberstellung der Chromatogramme einer Reaktionsmischung von **26** mit **28** (blau), **2** mit **28** (gelb) und **2** und **6** im Gemisch mit **28** (rot). Die Reaktion wurde mit 0,50 mM der Edukte in PBS/MeCN (1:1) durchgeführt. Die Aktivierung erfolgte durch Belichtung bei 308 nm für 10 min bei 20 °C. Trennmethode: 0 – 40 % MeCN in H₂O über 30 min (Kapitel 6, Tabelle 6). 53
- Abbildung 32: Vergleich der Reaktivität von **2** und **6** (a) bzw. **7** (b) in einer Photoclick-Reaktion mit **28** durch Auftragung der HPLC-Peakflächen von Edukten und Produkt gegen die Belichtungszeit. 54
- Abbildung 33: Auftragung der normierten HPLC-Peakflächen der Edukte **2**, **6**, **27**, **28** und Produkte **DA2** und **PC6** bei sequentieller Zugabe von **27** und **28** zu einem Gemisch von **2** und **6** gegen die Reaktions- bzw. Belichtungszeit. Es wurden 0,50 mM **2** und **6** in PBS/MeCN (1:1) gegeben und das Gemisch nach der Zugabe von 0,50 mM **27** für 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 0,50 mM **28** zugeben und für 10 min bei 308 nm belichtet, wobei alle 120 s eine Probe entnommen wurde..... 55
- Abbildung 34: Auftragung der normierten HPLC-Peakflächen der Edukte **2**, **6**, **27**, **28**

- und Produkte **DA2** und **PC6** bei simultaner Zugabe von **27** und **28** zu einem Gemisch von **2** und **6** gegen die Reaktionszeit. Es wurden **2** (0,50 mM) und **6** (0,50 mM) sowie **27** (0,50 mM) und **28** (0,50 mM) in PBS/MeCN (1:1) gegeben und das Gemisch für 10 min bei 308 nm belichtet. Anschließend wurde 10 h bei Raumtemperatur inkubiert. . 56
- Abbildung 35: a) Sequenzen der verwendeten Templatstränge T1 (für **TP1** und **TP2**) und T2 (für **TP3**) sowie des Primers P1. b) PAGE-Analyse des Primerverlängerungsexperiments mit **TP1** bei Elongation für 30 min bei 37 °C mit den drei ausgewählten Polymerasen. Negativ-Kontrollen (-TTP) wurden nur dATP, dCTP und dGTP zugegeben, Positiv-Kontrollen (+TTP) enthalten alle natürlichen dNTPs. In Proben (+**TP1**) wurde TTP durch **TP1** ausgetauscht. Die Visualisierung erfolgte anhand der Fluoreszenz des ATTO390-Farbstoffs, wobei $\lambda_{\text{exc}} = 312 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 \pm 20 \text{ nm}$ 60
- Abbildung 36: PAGE-Analyse des Primerverlängerungsexperiments mit der Hemo KlenTaq Polymerase bei 37 °C und unterschiedlichen Elongationszeiten. Negativ-Kontrollen (-TTP bzw. -dATP) wurden mit Zugabe von dATP, dCTP, dGTP für **TP1** und **TP2** bzw. dTTP, dCTP, dGTP für **TP3**, während Positiv-Kontrollen (+TTP bzw. +dATP) alle natürlichen dNTPs enthielten. 61
- Abbildung 37: Postsynthetische Markierung der 1-MCP-modifizierten DNA unter Verwendung der tetrazin-modifizierten Fluorophore **29** und **30**. 62
- Abbildung 38: Postsynthetische Markierung der 1-MCP-modifizierten DNA mit Tetrazin **29**. Die DNA wurde durch Primerverlängerung von P1 mit Hilfe der Deep Vent (exo-) Polymerase für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit von **TP1**, **TP2** bzw. **TP3** hergestellt. Die Proben wurden anschließend entsalzt, lyophilisiert und mit **29** für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Analyse erfolgte über PAGE und nachfolgende Fluoreszenz-Detektion, wobei a) $\lambda_{\text{exc}} = 312 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 \pm 20 \text{ nm}$; b) $\lambda_{\text{exc}} = 540 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \pm 20 \text{ nm}$; c) Überlagerung von a und b. 63
- Abbildung 39: PAGE-Analyse der postsynthetischen Markierung der cyclopropenmodifizierten DNA mit Tetrazin **30**. Die DNA-Herstellung erfolgte durch Primerverlängerung mit Hilfe der Deep Vent (exo-) Polymerase für 30 min bei 37 °C in Anwesenheit von **TP1** bzw. **TP2** bzw. **TP3**. Die Proben wurden entsalzt, lyophilisiert, mit **30** für die angegebenen Zeiten inkubiert und mittels PAGE sowie nachfolgende

Fluoreszenz-Detektion analysiert, a) $\lambda_{\text{exc}} = 603 \pm 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \pm 20 \text{ nm}$; b) $\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 \pm 20 \text{ nm}$; c) Überlagerung von a und b.....	64
Abbildung 40: 3-MCP-modifizierte 2'-Desoxynukleosidtriphosphate TP6 und TP7 für die enzymatische Inkorporation in DNA und anschließende Markierung mittels Photoclick-Reaktion.....	65
Abbildung 41: Bioorthogonale Markierung von 3-MCP-modifizierter DNA in vitro unter Verwendung der beiden Tetrazole 31 und 28	66
Abbildung 42: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von 28 und 3-MCP-modifizierter DNA, welche durch Primerverlängerung mit TP6 hergestellt wurde. Die entsalzte DNA wurde in dem jeweiligen Lösungsmittel gelöst und mit 10 Äq. 28 über die angegebenen Zeiträume bei 308 nm belichtet. a) Durchführung in PBS, b) Durchführung in PBS/MeCN (1:1). Als Negativ-Kontrolle (30 min) wurde eine Probe ohne die Zugabe von 28 für 30 min belichtet.....	67
Abbildung 43: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von 28 und 3-MCP-modifizierter DNA, hergestellt durch Primerverlängerung mit TP7 . Die entsalzte DNA wurde mit 10 Äq. 28 in PBS/MeCN über die jeweiligen Zeiträume bei 308 nm belichtet. Als Negativ-Kontrolle (30 min) wurde eine Probe ohne die Zugabe von 28 für 30 min belichtet.....	67
Abbildung 44: PAGE-Analyse der Photoclick-Reaktion von 31 und 3-MCP-modifizierter DNA durch Inkorporation von TP6 . Die entsalzte DNA wurde im jeweiligen Lösungsmittel gelöst und mit 10 Äq. 31 über die angegebenen Zeiträume bei 308 nm belichtet, wobei die Durchführung in PBS (a), PBS/MeCN (1:1) (b), DMSO (c) erfolgte. Als Negativ-Kontrolle (60 min) wurde eine Probe ohne die Zugabe von 31 für 60 min belichtet.....	68
Abbildung 45: Viabilität von HeLa-Zellen mit unterschiedlicher Konzentrationen der 2'-Desoxynukleoside 1 , 2 , 3 , 6 , 7 sowie dem 2'-Desoxynukleotid TP1 , bestimmt über MTT-Test. HeLa-Zellen, kultiviert in Medium ohne Zusatz von Nukleosiden und L-Glutamat, wurden für 48 h mit den einzelnen Verbindungen in der jeweiligen Konzentration inkubiert und anschließend mit MTT behandelt. Jede Probe wurde 6-fach bestimmt und die gemittelte Absorption nach Abzug der Absorption einer Positiv-Kontrolle (ohne metabolische Aktivität) auf eine Negativ-Kontrolle (ohne Zugabe eines modifizierten Derivats) normiert.	71

Abbildung 46: Metabolische Markierung mittels iEDDA-Reaktion unter Verwendung von 1 , 2 , 3 und 32 . HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium, wurden für 48 h mit 1 , 2 , oder 3 (100 µM in Medium) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und über Nacht mit 32 (1,00 µM in Medium) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie.	73
Abbildung 47: Metabolische Markierung mit TP1 in HeLa-Zellen unter Verwendung von SNTT. Die Zellen wurden für 10 min mit einer Lösung von SNTT und TP1 (jeweils 10 µM) in Tricin-Puffer behandelt und anschließend für 2 h in Medium inkubiert. Sie wurden anschließend fixiert und über Nacht mit 32 (1,00 µM in Medium) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.	75
Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der metabolischen Markierung von TP1 mit Hilfe von SNTT bei unterschiedlicher Inkubationszeit mit der SNTT/ TP1 Lösung. Die Zellen wurden für 5, 10, bzw. 15 min mit der Lösung behandelt, für 2 h in Medium inkubiert und anschließend fixiert und mit 32 über Nacht inkubiert.	76
Abbildung 49: Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die metabolische Markierung von HeLa-Zellen nach dem Transport von TP1 in die Zelle mit Hilfe von SNTT. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium wurden für 10 min mit einer SNTT/ TP1 Lösung (10 µM in Tricin-Puffer) behandelt und anschließend für die angegebenen Zeiträume in Medium inkubiert. Es wurde anschließend fixiert und über Nacht mit 32 inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.	78
Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung unterschiedlicher Konzentrationen von 32 bei der metabolischen Markierung von HeLa-Zellen mit TP1 und 32 . HeLa-Zellen (No/No) wurden für 10 min mit SNTT/ TP1 (10 µM in Tricin) behandelt, 2 h in Medium inkubiert, fixiert und über Nacht mit 32 in den angegebenen Konzentrationen angefärbt.	79
Abbildung 51: Vergleich der metabolischen Inkorporation von TP1 – TP3 mit Hilfe von SNTT und der anschließenden Markierung über iEDDA-Reaktion. HeLa-Zellen (No/No) wurden für 10 min mit 10 µM SNTT und TP1 in Tricin behandelt, 2 h in Medium inkubiert, fixiert und über Nacht mit 32 angefärbt.	80

- Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der metabolischen Inkorporation von **6** und **7** in zelluläre DNA mit anschließender Photoclick-Reaktion mit **31** nach DNA-Denaturierung. HeLa-Zellen (No/No) wurden für 48 h mit **6** bzw. **7** (100 μ M) in Medium inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und die zelluläre DNA denaturiert. Anschließend wurde 1 h mit einer Lösung von **31** (30 μ M in MeCN) inkubiert und die Proben 20 min bei 405 nm belichtet. Die metabolische Markierung mit VdU diente als Positiv Kontrolle. 82
- Abbildung 53: Schematische Darstellung der dualen bioorthogonalen und orthogonalen Markierung mittels cyclorpropenbasierter iEDDA- und Photoclick-Reaktion. Die 3-MCP-Funktion soll in Form von 2'-Desoxynukleosid **6** metabolisch in die DNA eingefügt und mit Hilfe von **31** photoinduziert markiert werden. Die 1-MCP-Gruppe hingegen soll als Triphosphat **TP1** mit Hilfe von SNTT eingeführt und mit **33** in einer iEDDA-Reaktion umgesetzt werden. 84
- Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der orthogonalen metabolischen Markierung über iEDDA- und Photoclick-Reaktion mit 1-MCP und 3-MCP-Funktionen in HeLa-Zellen. Zur Inkorporation von 1-MCP wurden die Zellen für 10 min mit einer **TP1**/SNTT Lösung behandelt und anschließend 2 h in Medium inkubiert. Im Fall von 3-MCP wurde **6** dem Zellenmedium zugesetzt und die Zellen 48 h in diesem inkubiert. Die Proben wurden anschließend nach den zuvor entwickelten Protokollen mit iEDDA-Reaktion mit **33** oder einer Photoclick-Reaktion mit **33** markiert. **31**: $\lambda_{exc} = 405$ nm, $\lambda_{em} = 420 - 500$ nm; **33**: $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 600 - 650$ nm. 85
- Abbildung 55: Duale bioorthogonale Markierung der zellulären DNA in HeLa-Zellen durch metabolisch Inkorporation einer 1-MCP und 3-MCP Funktion. Die beiden chemischen Reporter wurden durch 48-stündige Inkubation mit **6** sowie 10-minütige Behandlung mit **TP1**/SNTT und mit nachfolgender zweistündiger Inkubation in Medium eingeführt und anschließend mittels iEDDA-Reaktion mit **33**, gefolgt von einer Photoclick-Reaktion mit **31** markiert. Wird jeweils nur eine bioorthogonale Reaktion in Anwesenheit beider isomere Cyclopropene in der Zelle durchgeführt lässt sich jeweils ein definiertes Signal im Nukleus im jeweiligen Emissionskanal des Reaktionspartners erkennen. 86

Abbildung 56: Überblick über die verschiedenen Projekteile, die zur Entwicklung cyclopropenbasierter dualer Markierung von DNA bearbeitet wurden.	87
Abbildung 57: In dieser Arbeit entwickelte Methode zur dualen Markierung der DNA in HeLa-Zellen durch metabolische Inkorporation von 1-MCP- bzw. 3-MCP-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden bzw. -nukleotiden und sequenzieller Markierung über iEDDA- und Photoclick-Reaktion.....	89
Abbildung 58: Emissionsspektrum der verwendeten LED bei Belichtung bei 308 nm sowie 405 nm.	92

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten k_2 der iEDDA-Reaktion von 2 bis 5 mit 27	49
Tabelle 2: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dU 2 und Tetrazin 27 sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von 2 und 3-MCP-dU 6 bzw. 7 mit 27	94
Tabelle 3: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dA 3 mit Tetrazin 27 sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von 3 und 3-MCP-dU 6 mit Tetrazin 27 sowie Tetrazol 28	95
Tabelle 4: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dU 4 mit Tetrazin 27 sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von 4 und 3-MCP-dU 6 mit 27	95
Tabelle 5: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der iEDDA-Reaktion von 1-MCP-dU 5 mit Tetrazin 27 sowie zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von 5 und 3-MCP-dU 6 mit 27	95
Tabelle 6: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der Photoclick-Reaktion von 2 – 7 mit Tetrazol 28	96
Tabelle 7: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur Untersuchung der Reaktivitätsunterschiede von 1-MCP-dU 2 - 5 und 3-MCP-dU 6 bzw. 7 in einer Photoclick-Reaktion mit Tetrazol 28	96
Tabelle 8: Verwendeter Gradient der mobilen Phase zur Aufreinigung von TP1 , TP2 und TP3	97
Tabelle 9: Extinktionskoeffizienten der natürlichen Nukleotide sowie der verwendeten Fluorophore bei 260 nm.	98
Tabelle 10: Extinktionskoeffizienten der Nukleoside, welche zur Berechnung der Konzentration der Nukleosidtriphosphat-Proben verwendet wurde. .	98
Tabelle 11: Zusammensetzung der PAGE-Gelmischungen sowie der für die Elektrophorese verwendeten Puffer.	99
Tabelle 12: Zusammenfassung der verwendeten Anregungswellenlängen sowie Detektionsbereiche der verwendeten Fluorophore der PAGE.	100
Tabelle 13: Zusammenfassung der Anregungswellenlängen und Detektionsbereiche	

der in der Mikroskopie verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe.	100
Tabelle 14: Berechnete sowie gefundene Massen der iEDDA-Produkte von DA2 – DA5 , der gefunden Dimer-Massen von 2 – 5 und der Massen der Photoclick- Produkte PC6 – PC7	120
Tabelle 15: Zusammensetzung der Proben der Primerverlängerungsexperimente.	121
Tabelle 16: Zusammenfassung der optimalen Arbeitstemperatur sowie Reaktionspufferzusammensetzung der verwendeten Polymerasen.	122
Tabelle 17: Zusammensetzung des für die Experimente mit dem SNTT-Transporter verwendeten Tricin-Puffers.	126

11. LITERATURVERZEICHNIS

1. J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. D. Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R.-R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Y. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M.-H. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. C. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y.-H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigó, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y.-H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. D. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu, *Science*, **2001**, 291, 1304-1351.

2. E. R. Gibney and C. M. Nolan, *Heredity*, **2010**, 105, 4-13.
3. J. C. Kiefer, *Dev. Dyn.*, **2007**, 236, 1144-1156.
4. C. R. Bertozzi, Nobel Prize Lecture,
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/bertozzi/lecture/>,
(accessed 28.02.2024, 2024).
5. S. L. Scinto, D. A. Bilodeau, R. Hincapie, W. Lee, S. S. Nguyen, M. Xu, C. W. Am Ende, M. G. Finn, K. Lang, Q. Lin, J. P. Pezacki, J. A. Prescher, M. S. Robillard and J. M. Fox, *Nat. Rev. Methods Primers*, **2021**, 1.
6. T. Peng and H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 14423-14433.
7. C. Y. Jao, D. Nedelcu, L. V. Lopez, T. N. Samarakoon, R. Welti and A. Salic, *ChemBioChem*, **2015**, 16, 611-617.
8. P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8400-8401.
9. D. Ganz, P. Geng and H.-A. Wagenknecht, *ACS Chem. Biol.*, **2023**, 18, 1054-1059.
10. R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu and Q. A. Zhou, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457-2479.
11. W. Yi, P. Xiao, X. Liu, Z. Zhao, X. Sun, J. Wang, L. Zhou, G. Wang, H. Cao, D. Wang and Y. Li, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2022**, 7, 386.
12. J. Tu, M. Xu and R. M. Franzini, *ChemBioChem*, **2019**, 20, 1615-1627.
13. O. Ramström and The Nobel Committee for Chemistry, Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2022. *Journal*, **2022**.
14. G. Barany and R. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 7363-7365.
15. J. A. Prescher and C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, 1, 13-21.
16. D. H. Dube and C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 616-625.
17. M. Boyce and C. R. Bertozzi, *Nat. Methods*, **2011**, 8, 638-642.
18. D. Ploschik, F. Ronicke, H. Beike, R. Strasser and H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem*, **2018**, 19, 1949-1953.
19. Y. Tian and Q. Lin, *ACS Chem. Biol.*, **2019**, 14, 2489-2496.
20. D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber and J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 18638-18643.
21. V. Rigolot, C. Biot and C. Lion, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, 23084-23105.
22. R. D. Row and J. A. Prescher, *Acc. Chem. Res.*, **2018**, 51, 1073-1081.
23. E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 6974-6998.
24. R. N. Day and M. W. Davidson, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2887-2921.
25. K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll and H. A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.*, **2020**, 31, 990-1011.
26. K. Lang and J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 16-20.
27. B. Cheng, Q. Tang, C. Zhang and X. Chen, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2021**, 14, 363-387.
28. K. T. Xenaki, S. Oliveira and P. M. P. van Bergen en Henegouwen, *Front. Immunol.*, **2017**, 8.
29. D. M. Patterson, L. A. Nazarova and J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 592-605.

-
30. M. F. Debets, J. C. van Hest and F. P. Rutjes, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 6439-6455.
 31. G. B. Cserép, A. Herner and P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, 3, 042001.
 32. S. S. Nguyen and J. A. Prescher, *Nat. Rev. Chem.*, **2020**, 4, 476-489.
 33. L. K. Mahal, K. J. Yarema and C. R. Bertozzi, *Science*, **1997**, 276, 1125-1128.
 34. E. Saxon and C. R. Bertozzi, *Science*, **2000**, 287, 2007-2010.
 35. H. Staudinger and J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, **1919**, 2, 635-646.
 36. S. J. Luchansky, S. Argade, B. K. Hayes and C. R. Bertozzi, *Biochem.*, **2004**, 43, 12358-12366.
 37. H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh and H. S. Overkleeft, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 3626-3629.
 38. J. A. Prescher, D. H. Dube and C. R. Bertozzi, *Nature*, **2004**, 430, 873-877.
 39. H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.
 40. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.
 41. C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.
 42. N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo and C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 1, 644-648.
 43. F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttmann, H. Andersson, I. Vermes and A. van den Berg, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 5073-5080.
 44. V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester and M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 1912-1916.
 45. V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner and F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 5872-5876.
 46. D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow and P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16893-16899.
 47. C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaiikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee and A. Y. Ting, *Angew. Chem.*, **2012**, 124, 5954-5958.
 48. N. J. Agard, J. A. Prescher and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15046-15047.
 49. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 16793-16797.
 50. X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert and G.-J. Boons, *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 2285-2287.
 51. J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl and F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 9422-9425.
 52. S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher and C. R. Bertozzi, *Science*, **2008**, 320, 664-667.
 53. R. Xie, L. Dong, Y. Du, Y. Zhu, R. Hua, C. Zhang and X. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A., **2016**, 113, 5173-5178.
54. G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.*, **2012**, 124, 2493-2497.
55. N. K. Devaraj, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2297 – 2299.
56. B. L. Oliveira, Z. Guo and G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 4895-4950.
57. C. P. Ramil and Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2014**, 21, 89-95.
58. M. L. Blackman, M. Royzen and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 13518–13519.
59. O. Diels and K. Alder, *Ann.*, **1928**, 460, 98 -122.
60. J. Sauer and R. Sustmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1980**, 19, 779-807.
61. K. Lang and S. Mayer, *Synth.*, **2016**, 49, 830-848.
62. H. Wu and N. K. Devaraj, in *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*, eds. M. Vrabel and T. Carell, Springer International Publishing, Cham, 2016, DOI: 10.1007/978-3-319-29686-9_6, pp. 109-130.
63. Y. Fang, H. Zhang, Z. Huang, S. L. Scinto, J. C. Yang, Christopher W. am Ende, O. Dmitrenko, D. S. Johnson and J. M. Fox, *Chem. Sci.*, **2018**, 9, 1953-1963.
64. D. C. Rideout and R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7816-7817.
65. G. S. Kumar, S. Racioppi, E. Zurek and Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, 144, 57-62.
66. M. Merkel, K. Peewasan, S. Arndt, D. Ploschik and H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem*, **2015**, 16, 1541-1553.
67. R. A. Carboni and J. Lindsey, R. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 4342-4346.
68. M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 9646-9649.
69. A.-C. Knall and C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 5131-5142.
70. R. A. A. Foster and M. C. Willis, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 63-76.
71. M. R. Karver, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 2263-2270.
72. W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg and B. Wang, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1736-1738.
73. F. Thalhammer, U. Wallfaher and J. Sauer, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 6851-6854.
74. R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. Vulders, I. Verel, J. Lub and M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 3375-3378.
75. M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserep, U. Wenge, P. Kele and H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.*, **2016**, 81, 7527-7538.
76. G. B. Cserep, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H.-A. Wagenknecht and P. Kele, *Synth.*, **2015**, 47, 2738-2744.
77. J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand and R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 6917-6920.
78. A. Wiczorek, P. Werther, J. Euchner and R. Wombacher, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 1506-1510.

-
79. P. Geng, E. List, F. Röncke and H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, **2023**, 29, e202203156.
 80. B. Pfeuffer, P. Geng and H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem*, n/a, e202300739.
 81. Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters and W. R. Liu, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 13085-13088.
 82. A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin and J. M. Fox, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 3770-3776.
 83. D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H. W. Shih, K. N. Houk and J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 13680-13683.
 84. J. Yang, J. Seckute, C. M. Cole and N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 7476-7479.
 85. J. M. J. M. Ravasco, C. M. Monteiro and A. F. Trindade, *Org. Chem. Front.*, **2017**, 4, 1167-1198.
 86. H. Zhang, M. Fang and Q. Lin, *Top. Curr. Chem.*, **2023**, 382, 1.
 87. Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J. S. Lee and S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 2002-2006.
 88. J. S. Clovis, A. Eckellz, R. Huisgen and R. Sustmann, *Chem. Ber.*, **1967**, 100, 60-70.
 89. W. Song, Y. Wang, J. Qu and Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 9654-9655.
 90. W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden and Q. Lin, *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 2874-2877.
 91. Y. Wu, G. Guo, J. Zheng, D. Xing and T. Zhang, *ACS Sens.*, **2019**, 4, 44-51.
 92. Z. Yu and Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 4153-4156.
 93. X. S. Wang, Y.-J. Lee and W. R. Liu, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 3176-3179.
 94. G. S. Kumar and Q. Lin, *ChemBioChem*, **2022**, 23, e202200175.
 95. L. Rieger, B. Pfeuffer and H. A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.*, **2023**, 4, 1037-1042.
 96. J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, US, Boston, MA, 2006, p. 27-61.
 97. W. Feng, L. Li, C. Yang, A. Welle, O. Trapp and P. A. Levkin, *Angew. Chem.*, **2015**, 127, 8856-8859.
 98. S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang and T. Luo, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 4702-4705.
 99. P. An, T. M. Lewandowski, T. G. Erbay, P. Liu and Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140, 4860-4868.
 100. S. Jiang, X. Wu, H. Liu, J. Deng, X. Zhang, Z. Yao, Y. Zheng, B. Li and Z. Yu, *ChemPhotoChem*, **2020**, 4, 327-331.
 101. A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey and V. V. Tuchin, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, **2005**, 38, 2543.
 102. P. An, Z. Yu and Q. Lin, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 9920-9922.
 103. Z. Yu, L. Y. Ho, Z. Wang and Q. Lin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 5033-5036.
 104. Z. Yu, T. Y. Ohulchanskyy, P. An, P. N. Prasad and Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 16766-16769.

105. P. W. Kamm, J. P. Blinco, A.-N. Unterreiner and C. Barner-Kowollik, *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 3991-3994.
106. S. Arndt and H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 14580-14582.
107. F. M. K. Elekonawo, S. Lütje, G. M. Franssen, D. L. Bos, D. M. Goldenberg, O. C. Boerman and M. Rijpkema, *EJNMMI Res.*, **2019**, 9, 86.
108. Y. Wang, J. Zhang, B. Han, L. Tan, W. Cai, Y. Li, Y. Su, Y. Yu, X. Wang, X. Duan, H. Wang, X. Shi, J. Wang, X. Yang and T. Liu, *Nat. Commun.*, **2023**, 14, 974.
109. D. M. Patterson and J. A. Prescher, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2015**, 28, 141-149.
110. Y. Hu and J. M. Schomaker, *ChemBioChem*, **2021**, 22, 3254-3262.
111. M. Smeenk, J. Agramunt and K. M. Bongers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2021**, 60, 79-88.
112. J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler and A. Jaeschke, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 1382-1386.
113. A. Sachdeva, K. Wang, T. Elliott and J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 7785-7788.
114. V. F. Schart, J. Hassenruck, A. K. Spate, J. Dold, R. Fahrner and V. Wittmann, *ChemBioChem*, **2019**, 20, 166-171.
115. F. Peschke, A. Taladriz-Sender, M. J. Andrews, A. J. B. Watson and G. A. Burley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, 62, e202313063.
116. F. Liu, Y. Liang and K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, 50, 2297-2308.
117. M. K. Narayanam, Y. Liang, K. N. Houk and J. M. Murphy, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 1257-1261.
118. Y. Liang, J. L. Mackey, S. A. Lopez, F. Liu and K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 17904-17907.
119. D. Svatunek, K. Chojnacki, T. Deb, H. Eckvahl, K. N. Houk and R. M. Franzini, *Org. Lett.*, **2023**, 25, 6340-6345.
120. M. R. Karver, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 920-922.
121. U. Reisacher, D. Ploschik, F. Ronicke, G. B. Cserep, P. Kele and H. A. Wagenknecht, *Chem. Sci.*, **2019**, 10, 4032-4037.
122. M. L. Winz, E. C. Linder, J. Becker and A. Jaeschke, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 11781-11784.
123. U. Rieder and N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 9168-9172.
124. A. B. Neef and N. W. Luedtke, *ChemBioChem*, **2014**, 15, 789-793.
125. A.-C. Knall, M. Hollauf, R. Saf and C. Slugovc, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 10576-10580.
126. J. S. Italia, P. S. Addy, S. B. Erickson, J. C. Peeler, E. Weerapana and A. Chatterjee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141, 6204-6212.
127. E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 14893-14902.
128. K. B. Wiberg, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, 25, 312-322.
129. K. B. Wiberg and W. J. Bartley, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 6375-6380.
130. J. Yang, Y. Liang, J. Seckute, K. N. Houk and N. K. Devaraj, *Chemistry*, **2014**, 20,

-
- 3365-3375.
131. V. V. Diev, R. R. Kostikov, R. Gleiter and A. P. Molchanov, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 4066-4077.
132. S.-Y. Tang, J. Shi and Q.-X. Guo, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 2673-2682.
133. D. Ploschik, Dr. rer. nat. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2018.
134. B. Oller-Salvia, G. Kym and J. W. Chin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 2831-2834.
135. A. K. Spate, H. Busskamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx and V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25, 147-154.
136. A.-K. Späte, V. F. Schart, J. Häfner, A. Niederwieser, T. U. Mayer and V. Wittmann, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, 10, 2235-2242.
137. K. Bertheussen, M. van de Plassche, T. Bakkum, B. Gagestein, I. Ttofi, A. J. C. Sarris, H. S. Overkleeft, M. van der Stelt and S. I. van Kasteren, *Angew. Chem.*, **2022**, 134, e202207640.
138. T. S. Elliott, F. M. Townsley, A. Bianco, R. J. Ernst, A. Sachdeva, S. J. Elsässer, L. Davis, K. Lang, R. Pisa, S. Greiss, K. S. Lilley and J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.*, **2014**, 32, 465-472.
139. A. Bristiel, M. Cadinot, M. Pizzonero, F. Taran, D. Urban, R. Guignard and D. Guianvarc'h, *Bioconjugate Chem.*, **2023**, 34, 1613-1621.
140. F. Eggert and S. Kath-Schorr, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 7284-7287.
141. Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang and Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 10600-10604.
142. D. Harijan, Dr. nat. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, 2021.
143. D. Ganz, D. Harijan and H. A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.*, **2020**, 1, 86-97.
144. D. Krois, in *Molekularbiologie und Medizinische Chemie*, ed. D. Krois, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2017, DOI: 10.1007/978-3-662-53013-9_6, pp. 85-105.
145. A. Hottin and A. Marx, *Acc. Chem. Res.*, **2016**, 49, 418-427.
146. S. Obeid, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs and A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2010**, 107, 21327-21331.
147. S. H. Weisbrod and A. Marx, *Chem. Commun.*, **2008**, DOI: 10.1039/B809528K, 5675-5685.
148. S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum and M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 15071-15082.
149. U. Reisacher, B. Groitl, R. Strasser, G. B. Cserep, P. Kele and H. A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, 30, 1773-1780.
150. S. Lutz, L. Liu and Y. Liu, *Chimia*, **2009**, 63, 737.
151. M. Kubota, S. Nainar, S. M. Parker, W. England, F. Furche and R. C. Spitale, *ACS Chem. Biol.*, **2019**, 14, 1698-1707.
152. A. Salic and T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105, 2415-2420.
153. H. Zhao, H. D. Halicka, J. Li, E. Biela, K. Berniak, J. Dobrucki and Z. Darzynkiewicz, *Cytometry*, **2013**, 83, 979-988.
154. V. T. Sterrenberg, D. Stalling, J. I. H. Knaack, T. K. Soh, J. B. Bosse and C. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, 62, e202308271.

155. Z. Zawada, A. Tatar, P. Mocilac, M. Buděšínský and T. Kraus, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 9891-9895.
156. A. Spampinato, E. Kužmová, R. Pohl, V. Sýkorová, M. Vrábel, T. Kraus and M. Hocek, *Bioconjugate Chem.*, **2023**, 34, 772-780.
157. J. Matyašovský, L. Tack, A. Palágyi, M. Kuba, R. Pohl, T. Kraus, P. Güixens-Gallardo and M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, 19, 9966-9974.
158. P. Güixens-Gallardo and M. Hocek, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 7090-7093.
159. M. Kuba, R. Pohl, T. Kraus and M. Hocek, *Bioconjugate Chem.*, **2023**, 34, 133-139.
160. M. Nuzzolo, A. Grabulosa, A. M. Z. Slawin, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel and P. C. J. Kamer, *EurJOC*, **2010**, 2010, 3229-3236.
161. U. Reisacher, Dr. nat Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie 2019.
162. M. K. Pallerla and J. M. Fox, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 3594 - 3595.
163. J. Steinmeyer and H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, 29, 431-436.
164. A. Gubu, L. Li, Y. Ning, X. Zhang, S. Lee, M. Feng, Q. Li, X. Lei, K. Jo and X. Tang, *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24, 5895-5900.
165. T. Nishiyama, Y. Ichikawa and M. Isobe, *Synlett*, **2003**, 2003, 0047-0050.
166. J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung*, **1981**, 16, 131-133.
167. J. Ludwig and F. Eckstein, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 631-635.
168. M. Yoshikawa, T. Kato and T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 8, 5065-5068.
169. M. B. Kermekchiev, L. I. Kirilova, E. E. Vail and W. M. Barnes, *Nucleic Acids Res.*, **2009**, 37, e40-e40.
170. H. Kong, R. B. Kucera and W. E. Jack, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 1965-1975.
171. H. W. Jannasch, C. O. Wirsén, S. J. Molyneaux and T. A. Langworthy, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, 58, 3472-3481.
172. K. A. Eckert and T. A. Kunkel, *Genome Res.*, **1991**, 1, 17-24.
173. New England Biolabs, product information Hemo KlenTaq, (accessed 09.02.2024).
174. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.
175. J. W. Pelley, in *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*, ed. J. W. Pelley, W.B. Saunders, Philadelphia, 2012, vol. Zweite Edition, pp. 119-124.
176. P. Güixens-Gallardo, Z. Zawada, J. Matyašovský, D. Dziuba, R. Pohl, T. Kraus and M. Hocek, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, 29, 3906-3912.

ANLAGEN

Publikationen

N. Seul, D. Lamade, P. Stoychev, M. Mijic, R. Michenfelder, L. Rieger, P. Geng, H-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, 63, e202403044

Konferenzen

- 09/2021 X. Nucleinsäurechemie-Treffen 2021, Bad Herrenalb
Posterbeitrag: *Cyclopropene modified nucleosides for the dual bioorthogonal labelling of DNA*
- 06/2022 Chemical Biology of Nucleic Acids & Proteins, Meeting of the Division of Biochemistry 2022, Münster
Posterbeitrag: *Cyclopropene modified nucleosides for the dual bioorthogonal labelling of DNA*
- 08/2022 International Round Table on nucleosides, nucleotides and nucleic acids (IRT3NA2022), Stockholm
Posterbeitrag: *Cyclopropene modified nucleosides for the dual bioorthogonal labelling of DNA*
- 09/2023 GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2023, Leipzig
Posterbeitrag: *Cyclopropene modified nucleosides for the dual bioorthogonal labelling of DNA*
XI. Nucleinsäurechemietreffen 2023, Würzburg
Posterbeitrag: *Cyclopropene modified nucleosides for the dual bioorthogonal labelling of DNA*

Stipendien

Research Travel Grant des Karlsruhe House of Young Scientists zur Förderung eines dreimonatigen Forschungsaufenthalts an der University of California, Irvine.