

Synthese und Charakterisierung von neuartigen Spirohexen-modifizierten Nukleosiden für die Markierung von DNA mittels bioorthogonaler Reaktionen

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

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



genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Bastian Pfeuffer

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

2. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2024



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

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 August 2021 bis Oktober 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.

Bastian Pfeuffer

Datum

Vorwort

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht, für die Möglichkeit, diese Arbeit innerhalb Ihres Arbeitskreises anzufertigen. Danke für die spannende Themenstellung und das entgegengebrachte Vertrauen bei wissenschaftlichen Entscheidungen sowie die Hilfestellungen in jeder Subgroup und bei Gesprächen in Ihrem Büro. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe unterschiedliche Methoden und Forschungsbereiche kennenzulernen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Ute Schepers für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich dem Graduiertenkolleg 2039 für die wissenschaftlich und finanzielle Unterstützung meiner Promotion bedanken. Mit Freude habe ich an allen Veranstaltungen und Weiterbildungskursen teilgenommen und möchte mich herzlich bei allen Doktorandinnen und Doktoranden für die freundliche Aufnahme und die bereichernden Gespräche im Graduiertenkolleg bedanken.

Bei Prof. Dr. Tirayut Vilaivan möchte ich mich für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis und die Unterstützung, die ich zu jedem Zeitpunkt erfahren durfte, bedanken. Der Auslandsaufenthalt an der Chulalongkorn-Universität in Bangkok, Thailand hat nicht nur meine wissenschaftlichen Ergebnisse gefördert, sondern auch zu meiner persönlichen Weiterentwicklung beigetragen. Ebenso danke ich dem Karlsruhe House of Young Scientists für die finanzielle Förderung dieses Auslandsaufenthaltes.

Herzlichen Dank auch an Dr. Rita Michenfelder, Dr. Philipp Geng und Eileen List für das Korrekturlesen dieser Arbeit

Speziell möchte ich mich bedanken bei:

- Dr. Sepand Rastegar und Melina Köhler für die Hilfe der FISH-Experimente an den Zebrafisch-Embryos sowie die Auswertung der Bilder
- Annette Hochgesand für die schnelle und immer zuverlässigen MALDI-Messungen sowie die netten Gespräche, bei denen wir beide manchmal die Zeit vergessen haben
- Claudia Sommer für die Unterstützung in allen bürokratischen und organisatorischen Dingen. Danke für alles, wir vermissen dich sehr im Arbeitskreis

- Ariane Baumgart für deine nette und zuverlässige Art
- Lara Hirsch für alle ESI-Messungen
- Dem Labor 203: Danke Sven Klehenz für die Übernahme der Bierkasse und dem Abschaffen des Bargelds durch Paypal. Danke für die Pausen, in denen du immer einen guten Spruch parat hattest und die zahlreichen Feierabendbiere und -Aperolis. Mit dir konnte ich mich in jeglicher Hinsicht immer über alles unterhalten. Sei es privat oder auch chemisch (auch wenn ich nicht immer alles verstanden habe). Danke Madeleine Giraud für deine immer zuvorkommende und charmante Art. Danke, dass du immer für Zusammenhalt in der Gruppe gesorgt hast und mich, wenn es mir mal nicht so gut ging, immer aufgemuntert hast. Danke Eileen List für deine Hilfe mit den Zellen und der Unterstützung bei jeder dummen Frage, die ich (oft) hatte. Mir hat es viel Spaß gemacht mit dir die Triphosphat-Experimente zu machen, auch wenn wir nicht immer das Ergebnis bekommen haben, welches wir uns erhofft hatten. Danke für deine humorvolle und offene Art, von der sich glaub jeder eine Scheibe abschneiden kann. Ein eher kleineres Dankeschön geht an deinen tollen Kleidungsstil im Labor, da man sich oftmals „underdressed“ gefühlt hat, wenn man neben dir stand. Danke an dich Silas Leidenheimer für deine entspannte und zuvorkommende Art.
- Dem Labor 204: Danke Andreas Schmidt für deine lustige, hilfsbereite Art, welche mich immer wieder aufgemuntert hat. Ich habe jede Unterhaltung mit dir genossen und mich sehr gefreut als du nach deiner Masterarbeit strahlend zu mir kamst mit der Nachricht, dass du im Arbeitskreis promovieren kannst. Danke für jedes Gespräch, was wir gemeinsam hatten, sei es beruflich oder privat. Auch werde ich nicht vergessen, wie wir an jeder Party nur darauf gewartet haben, bis wir endlich Wolfgang Petry anmachen konnten. Danke auch, dass du bei den Liedern einigermaßen textsicher warst. Danke Mathis Mitha für deine extrovertierte Art und deine lustigen Kommentare in jeder Mittagspause. Danke, für die Gespräche mit dir und deine Spartipps, welche du gerne geteilt hast. Danke für deine unterhaltsamen Stories, welche manchmal jedoch eine unerwartete Wendung genommen haben. Danke für deine Hilfsbereitschaft bei dem Erstellen der Paper-Cover und bei allen sonstigen Angelegenheiten. Danke Lukas Frey für deine ruhige und offene Art. Danke für jegliche Kaffeepause und deine Unterstützung mit Bier am Chemcup. Danke, dass du bei jeglichen Abenden dabei warst und immer geholfen hast, wo es ging. Danke Maren

Schrödter für deine hilfsbereite Art und deinen trockenen Humor, der mich oft zum Schmunzeln gebracht hat. Danke für die tollen Geburtstagskarten, die du immer jedem gemalt hast. Danke für die hilfreichen Tipps, die du mir während der Masterarbeit und der Promotion gegeben hast und dass du mich beim Schreiben der Dissertation oft beruhigt hast, wenn ich mal nicht so gut drauf war. Danke Nicola Seul für sämtliche Aperol-Abende und deine witzige und humorvolle Art. Ich werde es wahrscheinlich nie lernen, wie ich am besten mit dir ein Gespräch beginne, ohne dass du dich erschreckst. Ich gebe jedoch mein Bestes. Danke für deine Hilfsbereitschaft während meiner Promotion und das Beantworten jeder dummen Frage. Danke Stephan Behling, für deine humorvolle Art, welche mir manchmal zu humorvoll war (Schrottplatz-Anruf). Danke dass du meine Fahrradkette repariert hast und dafür, dass du mir aufzeigst, wie toll mein Fahrrad nach all den Jahren noch sein kann. Danke auch an Jasmin Muuß, für deine motivierende und offene Art.

- Dem EG: Danke Jan Kunzmann für deine motivierende und offene Art. Ich habe selten so viel mit Leuten im Arbeitskreis gelacht wie mit dir. Danke, dass du uns gezeigt hast, dass man auch in der Promotion vorankommen kann, selbst wenn man zwei Laborumzüge hinter sich hat. Danke Simon Heckmeier, der mir gezeigt hat, dass es zu viel Sport nicht gibt. Danke für deine extrovertierte Art mit deinem charmanten Lächeln. Immer gerne verfolge ich den heckmesi und bikemesi-Account auf Instagram. Danke Kerstin Müller für deine nicht enden wollende motivierende Art. Danke, dass du mich immer wieder motiviert hast (manchmal sogar mehr als dich selbst) und immer positiv in die Zukunft blickst. Danke für die Hilfe bei jeglichen Synthesizer-Bestellungen und die Bereitschaft schnelle und dringliche MALDI-Proben zu messen. Danke Sebastian Häcker, dass du gefühlt bei allem und immer dabei bist. Danke für deinen trockenen Humor und gleichzeitig witzigen Art. Danke, dass du immer ein Lächeln auf den Lippen hast und alle um dich herum mit deiner Frohnatur ansteckst. Danke Anna-Lena Ruopp für deine offene und ausgeglichene Art. Danke für die Kuchen-Kreationen, welche du in den Arbeitskreis mitgebracht hast, welche immer sehr gut waren.
- Mein Labor 205: Danke Dr. Rita Michenfelder für alles. Ich weiß gar nicht wo ich anfangen und wo ich aufhören soll. Danke, dass du mich damals motiviert hast in diesem Arbeitskreis meine Masterarbeit anzufangen. Ich kannte damals nicht so viele

aber durch dich habe ich sofort Anschluss gefunden und war innerhalb von ein paar Wochen fester Bestandteil dieses Arbeitskreises. Danke für deine motivierende, hilfsbereite und harmoniebedürftige Art, welche mich trotz vieler Misserfolge durch meine Promotion getragen hat. Danke, dass ich mich immer auf dich verlassen kann, egal bei welchen Angelegenheiten. Danke, dass du damals in 205 gewechselt bist und dass wir so gute Freunde geworden sind. Danke Lisa Rieger für deine hilfsbereite, motivierende und ehrliche Art. Danke, dass wir alle Höhen und Tiefen zusammen im Labor durchstehen konnten und du mich aufgemuntert hast, wenn ich gegen den Abzug getreten habe oder ich niedergeschlagen war. Danke, dass ich mich immer auf dich verlassen konnte und dass du lieber deine eigenen Sachen hintenangestellt hast, nur um mir zu helfen. Danke für jegliche privaten Gespräche, die mich oftmals aufgemuntert haben, da du mir auch andere Sichtweisen aufgezeigt hast, an die ich oftmals nicht gedacht habe. Vielen Dank euch zwei für die gemeinsame Zeit im Labor mit vielen Schlagerpartys und guter Laune. Danke, dass ihr mich zusammen durch die Promotion begleitet habt. Ohne euch wäre es nicht das Gleiche gewesen.

- Meinen ehemaligen Arbeitskollegen im Arbeitskreis Wagenknecht: Danke an alle, die mich in meiner Zeit in der Masterarbeit bzw. in der Promotion begleitet haben. Besonders hervorheben möchte ich hier Dr. Philipp Geng. Danke für deinen trockenen Humor und deine Hilfsbereitschaft. Danke für deine wertvollen Tipps in privater und beruflicher Hinsicht. Ohne dich wäre diese Dissertation nicht so gut geworden, wie sie jetzt ist.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, ohne die ich es nicht so weit geschafft hätte. Danke für die bedingungslose Unterstützung in jeglicher Hinsicht und dass ihr immer an mich geglaubt hat. Das größte Dankeschön geht hier an meine Mutter Elke. Einfach danke für alles!

Vielen Dank auch an meine Freundin Maren, die mich während der gesamten Promotion unterstützt und aufgemuntert hat. Danke, dass du immer für mich da bist.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 Bioorthogonale Markierung	3
2.2 Click-Reaktionen für die bioorthogonale Markierung.....	5
2.2.1 Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf	7
2.2.2 Photoclick-Reaktion.....	11
2.3 Cyclopropen vs. Spirohexen (SPH).....	15
2.4 Metabolische Markierung von DNA	19
2.5 Transfektion.....	22
2.6 Peptid-Nukleinsäuren (PNA).....	24
2.6.1 Pyrrolidiny-PNA (acpcPNA).....	25
2.7 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	26
3 Themenstellung.....	30
4 Ergebnisse und Diskussion	31
4.1 Design SPH-modifizierter Nukleoside.....	31
4.2 Synthese SPH-modifizierter Nukleoside	32
4.3 Charakterisierung der Nukleoside I-V mittels iEDDA-Reaktion <i>in vitro</i>	40
4.4 Synthese SPH-modifizierter Oligonukleotide	51
4.5 Charakterisierung SPH-modifizierter DNA mittels iEDDA-Reaktion <i>in vitro</i>	54
4.6 Charakterisierung modifizierter Nukleoside mittels Photoclick-Reaktion	58
4.6.1 Photoclick-Reaktion mit 2-(4-Methoxyphenyl)-5-phenyl-2 <i>H</i> -tetrazol.....	58
4.6.2 Photoclick-Reaktion mit Pyren-modifizierten Tetrazolen.....	64
4.7 Zellbiologische Untersuchungen	71

Inhaltsverzeichnis

4.7.1	Transfektionsexperimente	71
4.7.2	Metabolische Markierung mittels SPH-modifizierter Nukleoside	75
4.8	FISH im Zebrafisch mit „Click“-modifizierten acpcPNA-Sonden.....	82
4.8.1	Synthese und Modifikation von acpcPNA-Sonden.....	83
4.8.2	Charakterisierung FRET <i>in vitro</i>	86
4.8.3	FISH in Zebrafisch-Embryos <i>in vivo</i>	91
5	Zusammenfassung und Ausblick	94
6	Experimentalteil	97
6.1	Materialien und Methoden	97
6.2	Synthesevorschrift	103
6.3	Oligonukleotide	126
6.3.1	Synthese von DNA1 bis DNA4	126
6.4	<i>In vitro</i> „Click“-Experimente	135
6.5	Zellexperimente.....	139
7	Anhang.....	141
7.1	Ergänzende Kinetik- und Fluoreszenzspektren	141
7.2	Ergänzende Zellbilder	155
7.3	Ergänzende Absorptionsspektren der acpcPNA Experimente	157
7.4	Ergänzende NMR-Spektren und MS-Spektren der hergestellten Moleküle	160
8	Abbildungsverzeichnis.....	188
9	Tabellenverzeichnis	202
10	Literaturverzeichnis.....	203
11	Appendix.....	209

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
a.u.	Willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
acpc	2-Amino-1-Cyclopentacarbonsäure
aegPNA	2-Aminoethyl-Glycin-Peptidnukleinsäure
APC	3-Aminopyrrolidin-4-Carbonsäure
Äq	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
BCN	Bicyclo[6.1.0]non-4-in
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BODIPY	4,4-Difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
CHBr ₃	Bromoform
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CuAAC	Kupfer(I)katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
CuI	Kupferiodid
d	Dublett
DA	Diels-Alder-Reaktion

Abkürzungsverzeichnis

DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIG	Digoxigenin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMA	Dimethylacetal
DMF	Dimethylformamid
DMF-DMA	Dimethylformamid-dimethylacetal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT-Cl	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
ε	Extinktionskoeffizient
EDG	Elektronenschiebende Gruppe (<i>electron donating group</i>)
EdU	Ethynyl-2'-Desoxyuridin
EE	Essigsäureethylester
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
Et ₂ O	Diethylether
Et ₃ N	Triethylamin
EtMgBr	Ethylmagnesiumbromid
EtOH	Ethanol
EWG	Elektronenziehende Gruppe (<i>electron withdrawing group</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Φ^F	Quantenausbeute
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
iEDDA	Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf
J	Kopplungskonstante
L	Liter
LED	Licht emittierende Diode
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
M	molar
m	Multiplett
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MeCN	Acetonitril
mg	Miligramm
min	Minuten
mL	Mililiter

Abkürzungsverzeichnis

mM	Milimolar
mmol	Milimol
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaOH	Natriumhydroxid
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphine) palladium
Pd/C	Palladium auf Kohle
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PNA	Peptidnukleinsäure
ppm	<i>parts per million</i>
p-TsOH	p-Toluensulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
sfGFP	<i>superfolder green fluorescent protein</i>
shha	sonic hedgehog signaling molecule a

Abkürzungsverzeichnis

Smp	Schmelzpunkt
SNTT	<i>synthetic nucleoside triphosphate transporter</i>
SPAAC	<i>strain promoted azide alkyne cycloaddition</i>
SPH	Spirohexen
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
t	Triplett
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
KO ^t Bu	Kaliumtertbutanolat
TCO	trans-Cycloocten
TFA	Trifluoressigsäure
TFAc	Trifluoracetat
THF	Tetrahydrofuran
Ti(O ⁱ Pr) ₄	Tetraisopropylorthotitanat
TMEEA	Tris[2-(2-methoxy-ethoxy)ethyl]amin
UV	Ultraviolett
VdU	5'-Vinyl-2'-desoxyuridin
Vis	sichtbares Licht
z.B.	zum Beispiel
δ	chemische Verschiebung

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

„When the world is in trouble, chemistry comes to the rescue“

Dieses Zitat verwendete CAROLYN BERTOZZI in einem Telefoninterview nach ihrem Gewinn des Nobelpreises 2022, welchen sie gemeinsam mit MORTEN MELDAL und BARRY SHARPLESS für ihre Entwicklungen bioorthogonaler Reaktionen überreicht bekam.^[1] Das Zitat unterstreicht die Bedeutung chemische und biologische Prozesse besser zu verstehen, um globale Herausforderungen und Krankheiten effektiver zu bekämpfen. Die von MELDAL^[2] und SHARPLESS^[3] unabhängig voneinander entwickelte Reaktion nutzt einen Kupfer-Katalysator, welcher durch die Zytotoxizität nur bedingt Anwendung in biologischen Systemen findet. BERTOZZI beschrieb 2003 die „Click“-Chemie auf der Zelloberfläche lebender Zellen und legte damit den Grundstein, um komplexe biologische Systeme auf molekularer Ebene zu untersuchen, ohne die natürlichen biochemischen Prozesse zu beeinträchtigen.^[4] In den letzten Jahren haben sich bildgebende Verfahren mit fluoreszierenden Sonden als wertvolle Werkzeuge zur Untersuchung biologischer Prozesse etabliert. Im Vergleich zu den früher verwendeten Radionukleotiden sind bioorthogonale Reaktionen kostengünstiger und vermeiden radioaktive Strahlenbelastung. Zur Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen existieren heutzutage zahlreiche Methoden.^[5] Das grün fluoreszierende Protein (GFP), erstmals von PRASHER *et al.* beschrieben, ist die am häufigsten verwendete Methode für die Markierung von Proteinen *in vivo*.^[6] Die Anwendung beschränkt sich jedoch auf Proteine, wodurch andere Molekülklassen wie Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren damit nicht untersucht werden können. BERTOZZI betonte, dass die Erforschung sämtlicher Biomoleküle für ein umfassendes biologisches Verständnis essenziell sei.^[7] Bioorthogonale Reaktionen können hierfür ihren Beitrag leisten.

Auch in der Medizin, insbesondere in der Krebsdiagnostik und -therapie, haben bioorthogonale Reaktionen bedeutende Fortschritte ermöglicht. Mit Hilfe der „Click“-Chemie können beispielsweise Glykane auf der Oberfläche von Krebszellen chemisch modifiziert und mit speziellen fluoreszierenden Molekülen sichtbar gemacht werden, was eine präzise Bildgebung von Tumorzellen ermöglicht.^[8] Auch für die Freisetzung von Wirkstoffen direkt in Tumorzellen konnten bioorthogonale Reaktionen bereits eingesetzt werden.^[9]

Einleitung

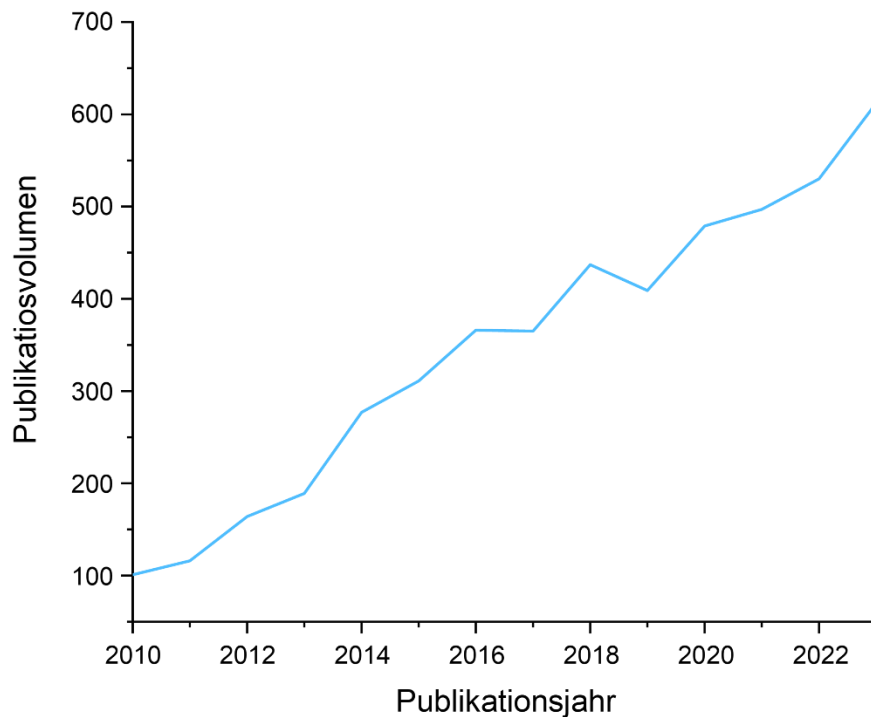


Abbildung 1 – Zahl der Publikationen pro Jahr zu bioorthogonalen Reaktionen in den Jahren 2010 bis 2023.^[10]

Wie in Abbildung 1 dargestellt, hat das Interesse an bioorthogonalen Reaktionen über die Jahre hinweg kontinuierlich zugenommen, was sich in der wachsenden Zahl an Publikationen pro Jahr widerspiegelt. Dies verdeutlicht die Relevanz dieser Reaktionen für das chemische und biologische Verständnis. Der Großteil dieser Studien fokussiert sich jedoch auf Proteine, während Arbeiten zu Nukleinsäuren lediglich 25 % betragen.^[11] Diese Arbeit zielt darauf ab, bioorthogonale Reaktionen für Nukleinsäuren weiterzuentwickeln. Der Fokus soll dabei auf Modifikationen liegen, welche bislang nur bei Proteinen eingesetzt wurden, um diese in verschiedenen bioorthogonalen Reaktionen zu untersuchen. Diese Modifikationen bieten den Vorteil, dass ein einziges Molekül für verschiedene bioorthogonale Reaktionen verwendet werden kann, was den Syntheseaufwand und die Kosten reduziert. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die metabolische Markierung von DNA *in vivo* mit diesen Modifikationen entwickelt werden.

2 Theoretischer Hintergrund

Die Modifizierung von Biomolekülen ist eine zentrale Methode, um zelluläre Prozesse gezielt aufzuklären und zu verstehen. Dies geschieht entweder durch den Einbau bereits modifizierter Monomere in das zu untersuchende Zielmolekül oder durch einen postsynthetischen Ansatz. Letzterer ist der elegantere Weg und zeichnet sich dadurch aus, dass eine reaktive Gruppe eingeführt wird, die spezifisch mit der gewünschten Funktionalität versehen werden kann. Um diese Methoden auch zellulär anwenden zu können, müssen bestimmte Kriterien der Bioorthogonalität erfüllt werden, welche im folgenden Abschnitt näher erläutert werden sollen.^[12]

2.1 Bioorthogonale Markierung

Die bioorthogonale Markierung stellt eine elegante Methode in der chemischen Biologie sowie der biomedizinischen Forschung dar, die es ermöglicht, zelluläre Prozesse präzise und störungsfrei zu untersuchen. Das Konzept der bioorthogonalen Markierung in lebenden Organismen wurde 2003 von BERTOZZI *et al.* geprägt und trug damit zu einer bedeutenden Entwicklung in der Molekularbiologie und Biochemie bei.^[13] Die bioorthogonale Markierung beschreibt einen zweigeteilten Mechanismus, der auf chemischen Reaktionen basiert, die spezifisch und selektiv innerhalb biologischer Systeme ablaufen, ohne die natürlichen Abläufe des Systems zu beeinträchtigen (Abbildung 2).^[14] Zunächst wird das Biomolekül (z.B. eine Aminosäure oder ein Nukleosid) mit einem chemischen Reporter modifiziert. Anschließend erfolgt der metabolische Einbau des modifizierten Biomoleküls durch zelleigene Enzyme in die DNA oder RNA.^[15] Der chemische Reporter stellt eine funktionelle Gruppe dar, die in der zellulären Umgebung nicht natürlich vorkommt. Um eine optimale Inkorporation zu gewährleisten, ist es notwendig, dass der chemische Reporter und die damit vorgenommene Modifikation so klein wie möglich ist, da somit die Chancen einer metabolischen Aufnahme durch die Zelle erhöht wird.^[16] Alternativ kann auch eine modifizierte DNA oder RNA mittels verschiedener Transfektionsmethoden in die Zelle eingeführt werden.

Theoretischer Hintergrund

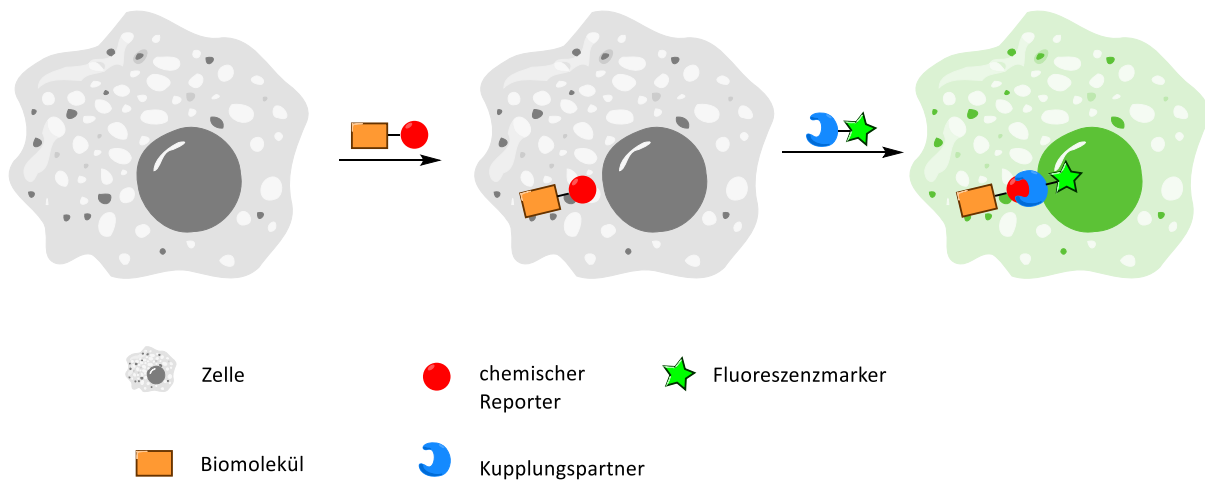


Abbildung 2 - Schematische Darstellung einer bioorthogonalen Reaktion. Zuerst erfolgt der metabolische Einbau des Bausteins in das Biomolekül, welches mit einem chemischen Reporter versehen ist. Anschließend erfolgt die Reaktion mit einem selektiven Kupplungspartner, welcher einen Fluoreszenzfarbstoff oder einen anderen Marker trägt.

Im zweiten Schritt der bioorthogonalen Markierung reagiert der chemische Reporter selektiv mit einem Kupplungspartner, der mit einem radioaktiven Marker, Fluoreszenzmarker oder einem anderen Detektionsmittel versehen ist und bildet eine neue kovalente Bindung. Neben Fluoreszenzmarkern und anderen Farbstoffen können auch Affinitätsmarker und Wirkstoffe in das System inkorporiert werden.^[17] Durch den an das Biomolekül gebundenen Marker kann das Molekül durch bildgebende Methoden in der Zelle verfolgt werden. Beispiele für bioorthogonale Markierungen sind unter anderem die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA)^[18] oder die Photoclick-Reaktion.^[19]

Damit bioorthogonale Reaktionen ihre Vorteile, wie Chemoselektivität und Biokompatibilität, entfalten können, müssen die verschiedenen Reaktionen bestimmte Kriterien erfüllen. So müssen diese unter anderem unter physiologischen Bedingungen in Wasser ablaufen können. Entscheidende Parameter sind hierbei ein neutraler pH-Wert, eine sauerstoffhaltige Atmosphäre und Temperaturen von 37 °C.^[11] Weiterhin ist es notwendig, dass die Reaktanden thermisch und metabolisch stabil sind, um in der zellulären Umgebung ihre chemischen Eigenschaften erhalten zu können.^[20] Weiterhin dürfen sie keine toxische Wirkung auf lebende Zellen haben und sollten hohe Ausbeuten in niedrigen Konzentrationen mit wenigen Nebenprodukten liefern. In einer komplexen zellulären Umgebung mit zahlreichen funktionellen Gruppen ist es notwendig, dass die bioorthogonalen Reaktionspartner selektiv miteinander reagieren, ohne die zelleigenen Mechanismen zu beeinträchtigen. Eine hohe Konzentration der inkorporierten Reporter kann zu Nebenwirkungen in der Zellphysiologie oder zur Apoptose der Zelle führen und sollte deshalb vermieden werden.^[21] Entscheidend für

die notwendige, geringe Konzentration der Reaktanden ist zudem eine hohe Geschwindigkeitskonstante. Die betrachteten modifizierten Reaktionen müssen schnell ablaufen, um die biologischen Prozesse nicht zu beeinträchtigen.^[22]

Die bioorthogonale Markierung hat in der modernen Forschung vielfältige Anwendung gefunden. Durch gezielte Modifikation und Markierung von Biomolekülen können zelluläre Prozesse im Detail sichtbar gemacht werden.^[23] So konnten MIKULA *et al.* mit Hilfe eines radioaktiven Tetrazin-modifizierten Kohlenstoffisotops bioorthogonale Reaktionen in Mäusen^[23] durchführen, welche zu gesteigerter Bildqualität führen, die vor allem in der Nuklearmedizin erforderlich ist, um bestimmte Krankheiten zu diagnostizieren und zu behandeln.^[24] So eröffnet die bioorthogonale Markierung neue Möglichkeiten für die Entwicklung innovativer Ansätze und ist somit unverzichtbar für das Verständnis chemisch-biologischer Mechanismen. Darüber hinaus kann durch die gezielte Adressierung von Wirkstoffen mit Hilfe der bioorthogonalen Markierung die Wirksamkeit und Spezifität von Medikamenten erhöht werden, was zu verbesserten Behandlungsstrategien für eine Vielzahl von Krankheiten führt.^[25]

Bis heute wurden zahlreiche Synthese- und Markierungsmethoden entwickelt, die diese Anforderungen erfüllen.^[26] Diese Methoden werden allgemein unter dem Begriff „Click-Chemie“ zusammengefasst und wurden in den letzten 25 Jahren maßgeblich von SHARPLESS und BERTOZZI geprägt, welche 2022 zusammen mit MELDAL den Nobelpreis für Chemie für ihre Arbeiten in der Click-Chemie erhalten haben.^[1] Einige Click-Reaktionen wie die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC), die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) sowie die Photoclick-Reaktion sollen im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

2.2 Click-Reaktionen für die bioorthogonale Markierung

Die wohl bekannteste Click-Reaktion stellt die CuAAC dar, welche nach dem Prinzip einer 1,3-dipolaren Cycloaddition abläuft. Sie wurde ursprünglich von MICHAEL vorgeschlagen und umfassend von HUISGEN *et al.* untersucht.^[27] Bei der CuAAC reagiert ein Azid mit einem Alkin zu einem 1,2,3-Triazol (Abbildung 3). Ohne den Einsatz von Kupfer als Katalysator läuft die Reaktion unter physiologischen Temperaturen nur langsam ab. Eine Erhöhung der

Theoretischer Hintergrund

Temperaturen führt andererseits zu einem Gemisch aus zwei Regioisomeren.^[28] Erst durch die Verwendung von Kupfer als Katalysator konnte die Reaktionsgeschwindigkeit und die Regioselektivität deutlich gesteigert werden.^[2] Durch die Bildung des Kupferacetylids wird die terminale Alkingruppe aktiviert, weswegen sich in der Folge ein Cu(III)-Metallzyklus bildet. Dieser weist eine niedrige Energiebarriere auf, weswegen dieser Mechanismus um sechs Größenordnungen ($k_2 = 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^[29] schneller abläuft als der katalysatorfreie Mechanismus.^[30] Aufgrund der Zytotoxizität des Katalysators ist die CuAAC in biologischen Systemen allerdings nur schwer umsetzbar.^[31] Um die CuAAC für Anwendungen *in vivo* zugänglich zu machen, wurde versucht, die Cu-Katalysatoren durch verschiedene Liganden zu stabilisieren, insbesondere über den Einsatz von Tris(triazolylmethyl)aminen.^[32] Diese Liganden konnten die Toxizität des Katalysators reduzieren, wobei eine vollständige Unterdrückung der Zytotoxizität nicht erreicht wurde.^[33] Dennoch zeigen Azid- und Alkingruppen in der bioorthogonalen Chemie ein erhebliches Potential auf, da sie in biologischen Systemen nur selten vorkommen und nicht mit Biomolekülen, wie Proteinen, Membranlipiden oder Nukleinsäuren reagieren.^[34]

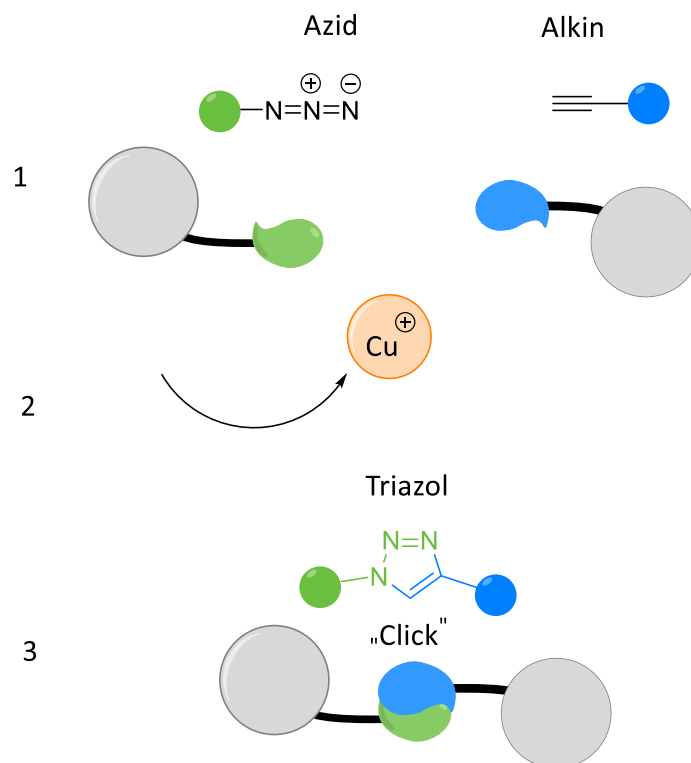


Abbildung 3 – Übersichtsreaktion eines Azids mit einem terminalen Alkin in einer Cu(I)-katalysierten [3+2]-Azid-Alkin-Cycloaddition.

2.2.1 Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

Die Diels-Alder Reaktion wurde bereits 1928 von OTTO DIELS und KURT ALDER eingeführt, welche 22 Jahre später durch den Erhalt des Nobelpreises in Chemie für ihre Entdeckung geehrt wurden.^[35] Die Diels-Alder [4+2] Cycloaddition (DA) beschreibt die Reaktion zwischen einem Dien und einem Dienophil unter Bildung eines sechsgliedrigen Rings durch die Wechselwirkung der vier π -Elektronen des Diens mit den zwei π -Elektronen des Dienophils. Es entstehen zwei neue σ -Bindungen, welche thermodynamisch begünstigt sind und das Gleichgewicht somit auf die Seite des Produkts verlagert.^[36] Obwohl die DA Reaktion sich vor allem durch hervorragende Atomökonomie, hohe Markierungsausbeuten, kontrollierbare Regioselektivität und Biokompatibilität auszeichnet, findet sie nur selten praktische Anwendung im Bereich der bioorthogonalen Chemie. Die größte Herausforderung für eine Anwendung *in vivo* stellen die hohen Temperaturen dar, welche in der DA mit normalem Elektronenbedarf benötigt werden.^[37] Eine besonders für die bioorthogonale Markierung geeignete Methode stellt die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) dar.

Die iEDDA-Reaktion läuft oftmals in wässrigem Milieu bei neutralen pH-Werten ab und kommt ohne Metallkatalysatoren aus, was einen großen Vorteil gegenüber der CuAAC darstellt.^[38] Abbildung 4 zeigt den allgemeinen Mechanismus einer iEDDA Reaktion mit einem 1,2,4,5-Tetrazin und einem Dienophil. Zuerst reagiert das Tetrazin mit dem Dienophil in einer [4+2]-Cycloaddition zu einem gespannten, bityklischen Intermediat. Anschließend spaltet sich Stickstoff in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion ab und es bildet sich das 4,5-Dihydropyridazin. Die durch den entstehenden Stickstoff nun irreversible Reaktion ist energetisch begünstigt. Anschließend findet eine Isomerisierung zum 1,4-Dihydropyridazin statt, welches langsam unter Oxidation zum Pyridazin reagiert und den aromatischen Charakter wiederherstellt

Theoretischer Hintergrund

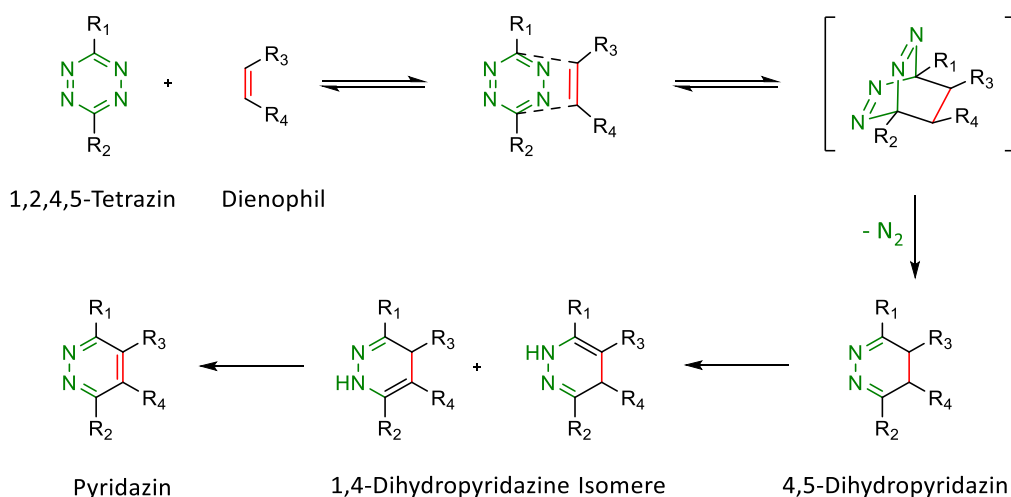


Abbildung 4 - Schematische Darstellung des Mechanismus einer Reaktion von einem 1,2,4,5-Tetrazin mit einem Dienophil in einer iEDDA-Reaktion.^[39]

Der Unterschied der beiden Diels-Alder Reaktionen kann am besten durch die unterschiedlichen Grenzorbitale beschrieben werden. Allgemein lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit auch nach der Energiedifferenz der HOMO (*highest occupied molecular orbital*) - LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) Lücke berechnen. Je geringer die Energiedifferenz der HOMO-LUMO Lücke ist, desto schneller ist die Geschwindigkeit der Reaktion.^[39] Bei der DA mit normalem Elektronenbedarf reagiert das HOMO des elektronenreichen Diens mit dem LUMO des elektronenarmen Dienophils, wobei in der iEDDA das HOMO eines elektronenreichen Dienophils mit dem LUMO eines elektronenarmen Diens wechselwirkt (Abbildung 5). Obwohl an beiden Reaktionsarten unterschiedliche Grenzorbitale beteiligt sind, erfolgt die Bildung des Produkts nach demselben Mechanismus.^[40] Die Energieniveaus der Grenzorbitale können durch Substituenten stark beeinflusst werden. Elektronenschiebende Gruppen (EDG) an den Molekülen führen zu einer Erhöhung der HOMO-Energie, wohingegen elektronenziehende Gruppen (EWG) die Energie des LUMOs absenken.^[41] Somit senkt ein Elektronenmangel die LUMO-Energie des Diens, was die iEDDA beschleunigt.^[42] Ein großer Einfluss auf die LUMO-Energie des Diens ergibt sich über Heteroatome in dessen π -System, was unter anderem SAUER *et al.* in einer Reaktivitätsstudie bestätigen konnten.^[43] Die Studie zeigt, dass das LUMO des Diens sich umso stärker absenkt je mehr Heteroatome sich im selben π -System befinden. 1,2,4-Triazine wurden von SAETZ *et al.* mit 1,2,4,5-Tetrazinen für verschiedene iEDDA-Reaktionen verglichen.

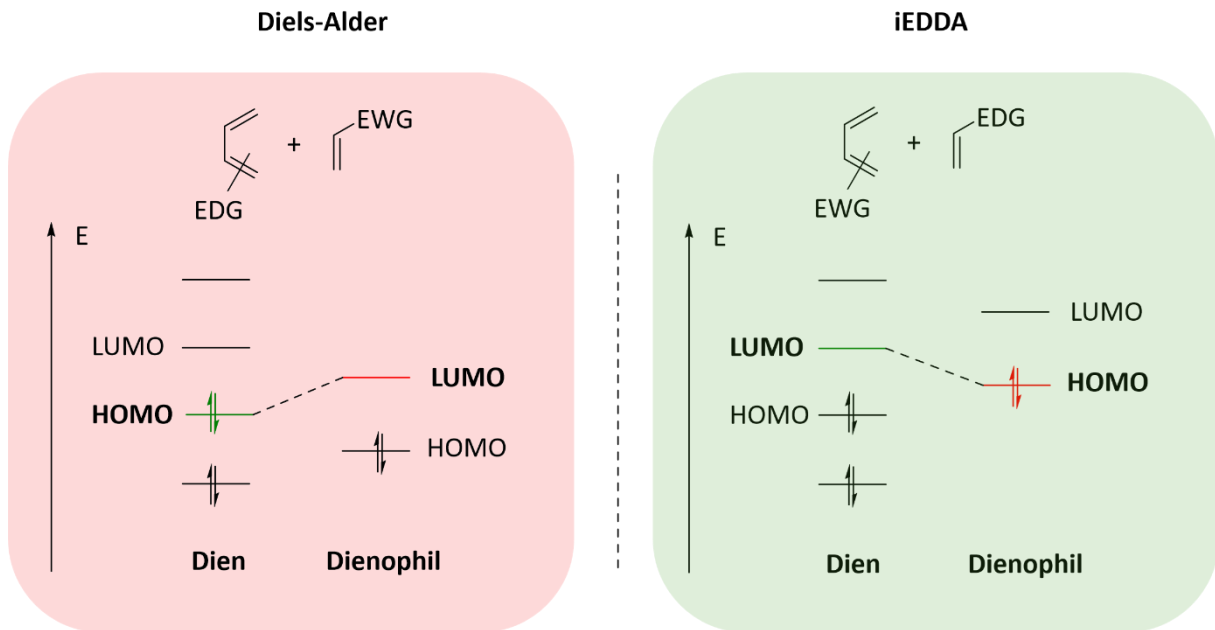


Abbildung 5 -Molekülorbitalschema der wechselwirkenden Grenzorbitale bei einer klassischen Diels-Alder (rot) vs. einer iEDDA-Reaktion (grün).

So beeinflussen Heteroatome und deren elektronische Eigenschaften nicht nur die Reaktionseigenschaften der Triazine und Tetrazine, sondern auch die Regioselektivität der Cycloaddition.^[41] Tetrazine sind Elektronenmangelaromaten, bei welchen die Elektronendichte durch erhöhte Elektronegativität des Stickstoffs auf das Heteroatom verschoben ist. Die Reaktionskinetik der Tetrazine kann durch ein Carboxylat erhöht werden, wohingegen Methoxygruppen die Reaktion verlangsamen.^[44]

Zudem können Substitutionen an der 3- und 6-Position des Tetrazins die LUMO-Energie weiter herabsenken und somit die Reaktivität steigern.^[42] BOGER *et al.* untersuchten die Reaktivität verschiedener 3,6-disubstituierter 1,2,4,5,-Tetrazine gegenüber N-Vinylpyrrolidinon und zeigten, dass die reaktivsten Tetrazine immer eine geringe LUMO-Energie besitzen.^[41] Mit erhöhter Reaktivität geht auch ein Verlust an Stabilität einher, weswegen vor allem bei Reaktionen *in vivo* das Verhältnis von Stabilität und Reaktivität abgewogen werden muss.^[45] LINDSEY *et al.* setzten als erste Arbeitsgruppe die Tetrazin-Ligation der 1,2,4,5-Tetrazine in einer iEDDA-Reaktion um^[46] und konnten sie auch zur bioorthogonalen Markierung von Proteinen^[47] und Nukleinsäuren^[48] nutzen. Die iEDDA-Reaktion zeichnet sich nicht nur durch Biokompatibilität und Selektivität, sondern auch durch hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aus. Die iEDDA-Reaktion konnte die höchsten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten aller Click-Reaktionen von bis zu $k_2 = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufweisen, was eine bis zu 10.000-fach schnellere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu CuAAC darstellt.^[39] Aufgrund der stark erhöhten

Reaktionskinetik stellt sie eine der beliebtesten Markierungsmethoden in der Click-Chemie dar, nicht zuletzt, weil mit extrem niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden kann.^[49] Zusätzlich führt die Verwendung von polaren Lösungsmitteln wie Puffer oder Wasser bei einer iEDDA-Reaktion zu einer schnelleren Reaktionsgeschwindigkeit, was vor allem bei Experimenten *in vivo* von Vorteil ist. Ein Vergleich der Kinetik der bekanntesten bioorthogonalen Reaktionen ist in Abbildung 6 dargestellt.

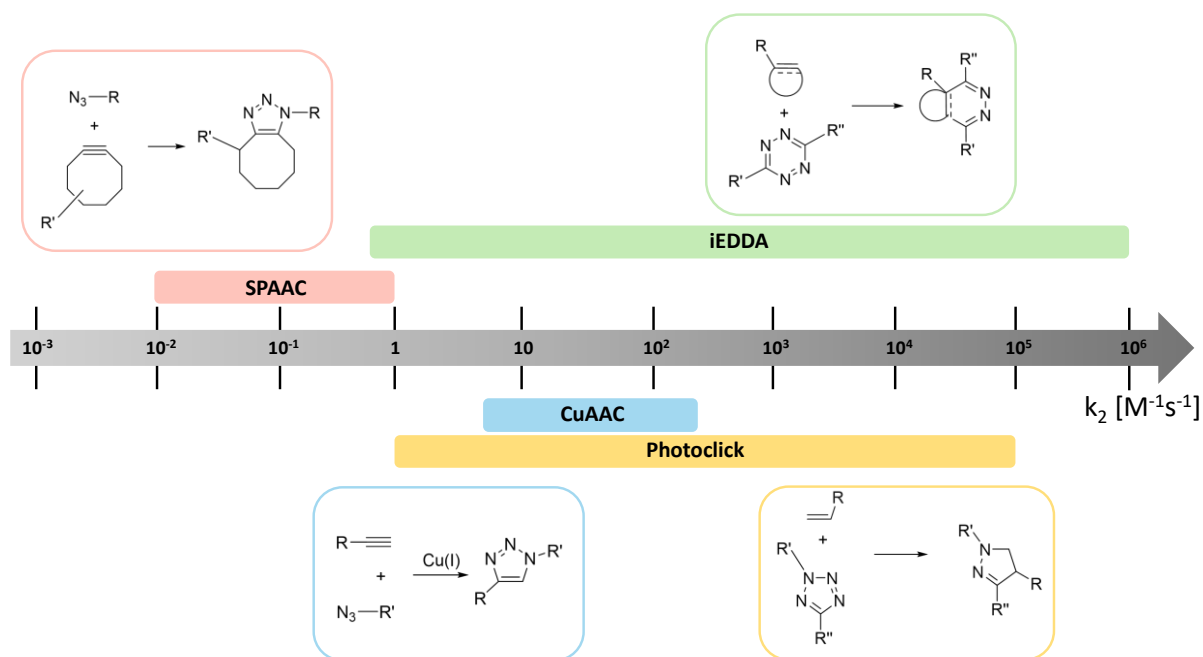


Abbildung 6 – Darstellung diverser Click-Reaktionen und deren Geschwindigkeitskonstanten. Spannungsgetriebene Azid-Alkin-Cycloaddition (rot), Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (blau), Photoclick-Reaktion (gelb) und die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (grün).^[50]

Tetrazine können bei der bioorthogonalen Markierung sowohl am Fluorophor als auch als chemischer Reporter an den Nukleinsäuren eingesetzt werden. Allerdings gelingt Letzteres aufgrund der harschen Bedingungen der automatisierten Oligonukleotidsynthese nicht, da vor allem die basischen Reaktionsbedingungen beim Abspalten der DNA von der Festphase die Stabilität der 1,2,4,5-Tetrazine beeinträchtigen.^[51] WAGENKNECHT *et al.* entwickelten spezielle Tetrazin-Cyanin-Styryl-Farbstoffe, die spezifisch zur Markierung von Nukleinsäuren als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden können. Die grün, gelb und rot fluoreszierenden Tetrazin-Fluorophore basieren auf Cyanin-Styryl-Farbstoffen,^[52] welche mit einer Methylentetrazinfunktion über eine Ethenylbrücke, nach einem Konzept von DEVARAJ *et al.*,^[53] an das Tetrazin kovalent gebunden wurden (Abbildung 7). Als grundlegende Eigenschaft zeigen diese Fluorophore eine hohe Photostabilität und wirken aufgrund ihres molekularen Aufbaus als Fluoreszenzquencher.^[54] Sobald das Tetrazin eine iEDDA-Reaktion eingeht, geht

das Fluoreszenzquenching verloren und resultiert in einer Steigerung der Fluoreszenzintensität (*Turn-On*). Eine Steigerung der Fluoreszenzintensität kann bei diesen Tetrazin-Fluorophoren zusätzlich über die Einschränkung der Rotation der Methylenbrücke durch einen sterisch anspruchsvollen Reaktionspartner erfolgen. Zusätzlich zeichnen sich diese Cyanin-Styryl-Farbstoffe durch hohe Stokes-Verschiebungen von bis zu 132 nm aus.^[55] Diese Stokes-Verschiebung hebt die Cyanin-Styryl-Farbstoffe von vergleichbaren Tetrazin-modifizierten Farbstoffen ab. So weisen die von WEISSELER *et al.*^[56] entwickelten Tetrazin-modifizierten BODIPY-Farbstoffe sowie die von WOMBACHER *et al.*^[57] entwickelten Rhodamin- und Fluorescein-Fluorophore lediglich eine Stokes-Verschiebung von 20 nm auf. Aufgrund dieser Zwei-Faktor-Fluorogenität und des sehr guten Signal zu Rausch Verhältnisses bei Experimenten *in vivo*, wurden diese Fluorophore auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.^[55]

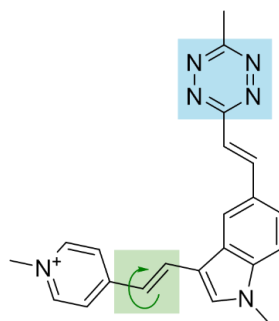


Abbildung 7 – Zwei-Faktor-Fluorogenität eines Tetrazin-modifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoffes. Das Tetrazin (blau) dient als reaktive Gruppe für die iEDDA-Reaktion und als Fluoreszenzlöcher. Die strukturelle Fluorogenität erhöht sich, wenn die Rotation um die Methylenbrücke eingeschränkt wird (grün) z.B. durch sterisch anspruchsvolle Reaktionspartner, wie DNA.

2.2.2 Photoclick-Reaktion

In der Natur ist Licht die Grundvoraussetzung für das Leben auf der Erde und beeinflusst eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Für fast alle Lebewesen ist Sonnenlicht eine der wichtigsten Energiequellen, um energiereiche Biomoleküle aus niedermolekularen, organischen und anorganischen Verbindungen aus der Umwelt aufzubauen. Licht spielt auch in der organischen Chemie eine zentrale Rolle. Es wird nicht nur in der Photochemie benutzt, sondern hat auch Anwendung in der bioorthogonalen Markierung gefunden.^[58] Ein großer Nachteil der bereits vorgestellten Methoden zur Modifizierung von Biomolekülen wie der iEDDA-Reaktion ist die fehlende räumliche und zeitliche Kontrolle, da die Reagenzien sofort miteinander reagieren. Im Hinblick auf Experimente *in vivo* kann das große Nachteile mit sich

bringen, da die modifizierte Verbindung möglicherweise noch nicht den zellulären Bestimmungsort erreicht hat, bevor sie mit dem Reaktionspartner interagiert. Durch die räumliche und auch zeitliche Kontrolle der lichtsensitiven Reagenzien kann gezielt gesteuert werden, wie lange die Reaktionszeit sein soll und an welcher Stelle die Reaktion stattfindet.^[59] Photoaktive Reaktionen besitzen darüber hinaus den Vorteil, dass kein Zusatz von Übergangsmetallen oder Katalysatoren benötigt wird.^[60] Durch die Anwendung der Kriterien der Click-Chemie^[61] entstand eine neue Klasse der photoinduzierten Reaktionen, die auch als Photoclick-Reaktionen bezeichnet werden.^[62] Die ersten lichtinduzierten Reaktionen wurden unter anderem von HUISGEN *et al.* untersucht. Er fand heraus, dass 2,5-Diphenyltetrazole zusammen mit einem elektronenarmen Alken unter Hitze (150 °C) und unter Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe zu einem Pyrazolin reagiert.^[63] Die lichtinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition ist in Abbildung 8 dargestellt. Zunächst erfolgt eine photoinduzierte Cycloreversion des Tetrazols, wobei unter Abspaltung von elementarem Stickstoff *in situ* ein hochreaktives Nitrilimin gebildet wird. Das Nitrilimin reagiert mit geeigneten elektronenarmen Dipolarophilen in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition zu einem Pyrazolin.^[64] Bekannte photoaktive Reagenzien sind unter anderem Tetrazole,^[65] Diarylsydnone^[66] und Cyclopropenone.^[67]

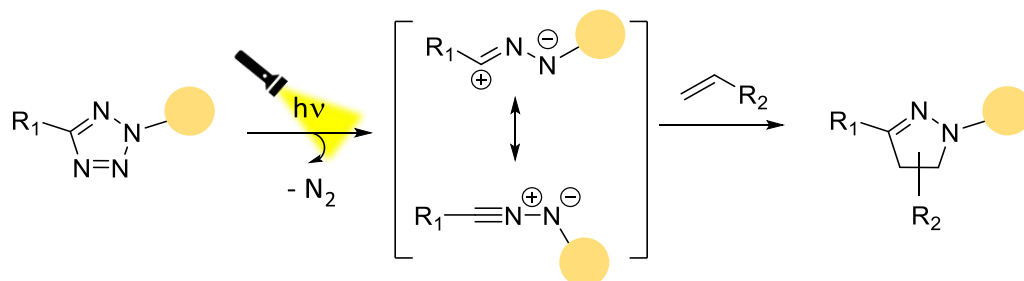


Abbildung 8 – Reaktionsschema einer Photoclick-Reaktion. Durch die Bestrahlung des Tetrazols (links) spaltet sich Stickstoff ab und es entsteht *in situ* ein hochreaktives Nitrilimin (Mitte), welches mit einem Alken zu einem Pyrazolin (rechts) weiterreagiert. In orange ist der mögliche Fluorophor am Tetrazol dargestellt.

Erste Anwendungen von Photoclick-Reaktionen in der bioorthogonalen Chemie wurden in den Arbeiten von LIN *et al.* publiziert.^[68] Durch Tetrazol-En-Reaktionen für biologische Anwendungen konnte eine genetische Kodierung durch den Einbau von Tetrazol- oder Alken-Einheiten in Proteine umgesetzt werden.^[69] Dabei nutzen LIN *et al.* die entstehende Fluoreszenz des Pyrazolins zur Detektion im Protein und später in Bakterien.^[70] 2019 konnten ZHANG *et al.* diese Anwendung noch weiter auf mehrzellige Organismen ausweiten, indem Vinyluracil in die DNA von Zebrafischen eingebaut wurde und unter Verwendung eines mit

Cumarin verknüpften Tetrazols in Echtzeit eine räumlich kontrollierte Darstellung der DNA ermöglicht werden konnte.^[71] Die anfangs geringe Geschwindigkeitskonstante des Alkens unter physiologischen Bedingungen ($k_2 = 0,002 \pm 0,0007 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) mit dem Tetrazol konnte durch Norbonene^[72] oder Cyclopropene ($k_2 = 58 \pm 16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als funktionelle Gruppen verbessert werden.^[73] WAGENKNECHT *et al.* konnten DNA durch eine Tetrazol-En-Reaktion mit Hilfe von Tetrazol-modifizierten Nukleosiden sowie Triphosphaten markieren.^[74] Die Markierung mittels Maleimid-Farbstoff-Konjugaten erfolgte durch LED-Anregung bei $\lambda = 365 \text{ nm}$ ($k_2 = 23 \pm 7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[74] Durch die Synthese eines Tetrazol-modifizierten 2'-Desoxyuridins konnte so eine modifizierte DNA hergestellt werden, welche mit einem Maleimid-funktionalisiertem Farbstoff zu einer ortsspezifischen Markierung führte. Die Fluoreszenzintensität durch das fluoreszierende Pyrazolin konnte durch Energietransfer auf den markierten Farbstoff noch verstärkt werden.^[75]

Neben der zeitlichen sowie räumlichen Kontrolle zeichnet sich die Photoclick-Reaktion auch durch hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aus. Abhängig von den Reaktionspartnern und Reaktionsbedingungen konnten bereits Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden.^[76] Als Reaktionspartner dienen meist aliphatische und cyclisch gespannte Alkene bzw. Alkine.^[77] Durch Untersuchungen von LIU *et al.* wurde die Nitrilbildung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der photoinduzierten 1,3-dipolaren Cycloaddition identifiziert.^[78] Da die photogenerierten Nitrilimindipole auch einen elektrophilen Charakter aufweisen, können Nitrilimine in Abwesenheit von geeigneten Dipolarophilen auch nukleophile Thiol-^[79] und Wasseradditionen^[80] eingehen und somit unerwünschte Nebenreaktionen hervorrufen (Abbildung 9). Darüber hinaus stellen auch Amine geeignete Reaktionspartner dar, was insbesondere die Anwendung *in vivo* zusätzlich erschwert.^[81]

Theoretischer Hintergrund

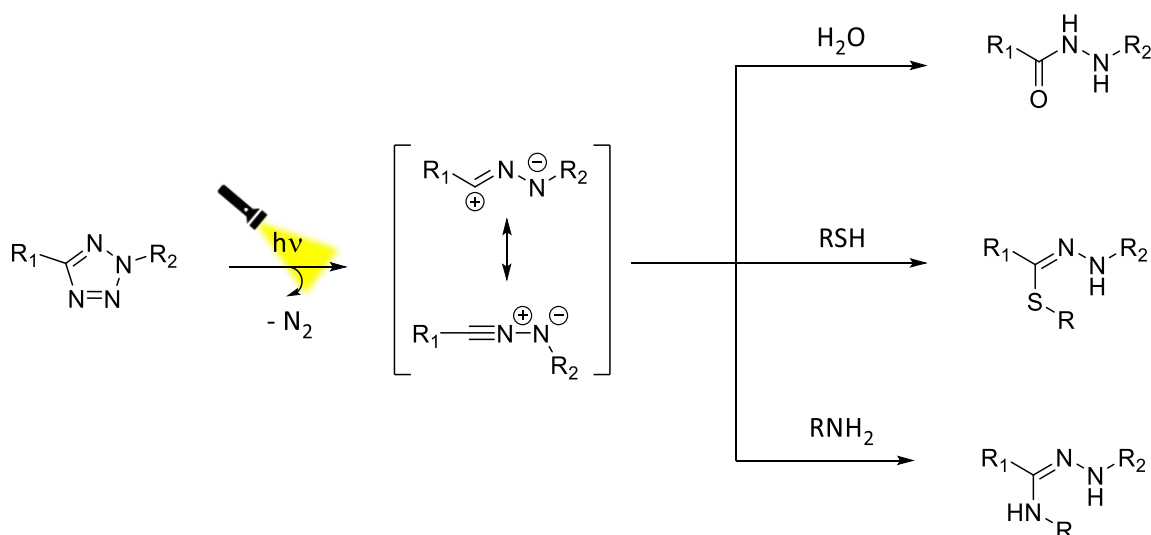


Abbildung 9 - Mögliche Nebenreaktionen von Nitrilimininen mit Wasser, Thiolen und Aminen.

Um die Nitriliminaktivität für bioorthogonale Reaktionen in lebenden Systemen nutzbar zu machen, ist es entscheidend, dass das Nitrilimin selektiv mit den Kupplungspartnern reagiert und gleichzeitig konkurrierende nukleophile Additionen unterdrückt. LIN *et al.* untersuchten 2018 den Einfluss verschiedener, sterisch gehinderter N-Aryl-Substituenten auf Selektivität und Reaktionsgeschwindigkeit des Tetrazols in einer Cycloaddition mit einem Spiro[2.3]hex-1-en.^[82] Es zeigte sich, dass vor allem N-Boc-Pyrrolyl-Gruppen sterisch derart gehindert sind, dass ungewünschte Additionsreaktionen zu verlangsamen.^[83] Neben dem Problem der Selektivität ist auch die Anregungswellenlänge eine Herausforderung im Hinblick auf die bioorthogonale Chemie. Typischerweise wurden Diaryltetrazole mit UV-B Licht (280-315 nm) bestrahlt, welche jedoch zu irreversiblen Photoschäden an lebenden Zellen führen.^[67] Der Einsatz von UV-Licht hat mehrere grundsätzliche Nachteile, zu denen nicht nur die Zellschädigung, sondern auch mangelnde Selektivität gehört, da nicht nur die Tetrazole, sondern auch viele Biostoffe in diesem Bereich angeregt werden. Für eine Anwendung *in vivo* werden daher Tetrazole benötigt, die durch Substituenten rotverschoben sind.^[84] Zur bathochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima wurden daher verschiedene Substituenten am Tetrazolrest eingeführt. Die Gruppe LIN *et al.* präsentierte 2013 eine Reihe von Tetrazolen mit Oligothiophen-Substituenten.^[85] Diese, teils wasserlöslichen Tetrazole, liefern unter Laserbestrahlung bei 405 nm eine ausgezeichnete Photoreaktivität ($k_2 = 1299 \pm 110 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[85] 2016 präsentierten BARNER-KOWOLLIK *et al.* weitere ins sichtbare Licht verschobene Tetrazole. Durch eine Pyrenyl-Einheit konnte die Anregungswellenlänge auf bis zu 410-420 nm erhöht werden.^[86] 2023 konnten WAGENKNECHT *et al.* ein

N,N-Dimethylamino-Pyren-modifiziertes Tetrazol entwickeln, das zur Markierung von zellulärer DNA eingesetzt werden konnte und im sichtbaren Bereich bei 450 nm angeregt wurde.^[87]

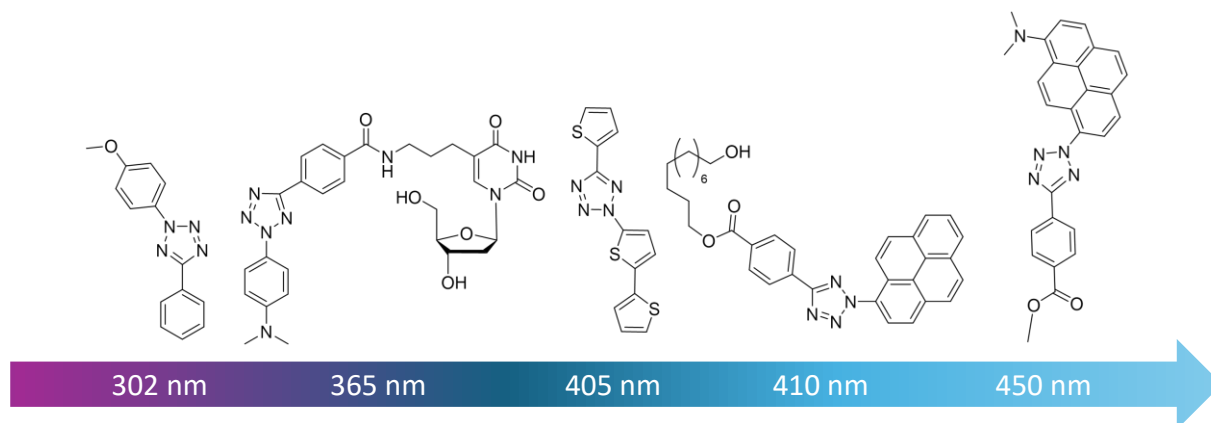


Abbildung 10 – Übersicht verschiedener Tetrazole für die Photoclick-Chemie und deren Anregungswellenlängen.

2.3 Cyclopropen vs. Spirohexen (SPH)

Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, ist für eine bioorthogonale Markierung eine Reaktion von einem chemischen Reporter mit einem Kupplungspartner notwendig, um zelluläre Prozesse besser zu verstehen und aufklären zu können.^[88] Die Verwendung von kleinen, gespannten chemischen Reportern zur Beschleunigung von bioorthogonalen Reaktionen ist dabei von großem Interesse. Einige der bekanntesten Vertreter sind Cyclooctine,^[89] Cyclopropene^[90] und Norbornene.^[91] Vergleicht man die kleineren Dienophile Cyclopropen und Norbornen miteinander, zeigt sich, dass Cyclopropene mit einer Ringspannung von 54,5 kcal/mol eine höhere Spannungsenergie aufweisen als Norbornene mit 21,6 kcal/mol. Diese erhöhte Ringspannung begünstigt eine schnellere Reaktivität von Cyclopropen in einer iEDDA-Reaktion.^[92] Cyclopropene eignen sich somit wegen ihrer geringen Größe und ihrer Reaktivität für bioorthogonale Markierungsmethoden. Die Reaktivität hängt dabei maßgeblich vom jeweiligen Substitutionsgrad ab. Unsubstituierte Cyclopropene sind hochreaktiv und neigen schon bei geringen Temperaturen zur Dimerisierung bzw. Polymerisation (Abbildung 11).^[93]

Theoretischer Hintergrund

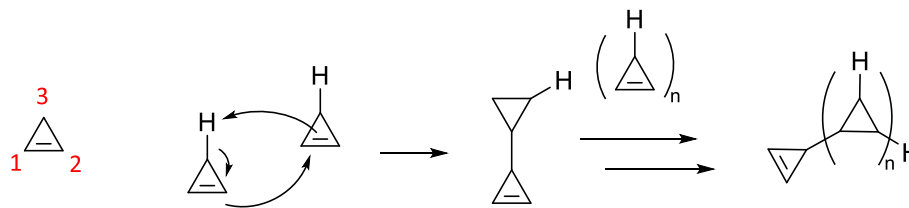


Abbildung 11 – Schematische Darstellung einer Polymerisation unsubstituierter Cyclopropene.

So zeigten SAUER *et al.* 1990 die Reaktion eines unsubstituierten Cyclopropens mit Tetrazinen im Bereich von $k_2 = 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ^[90], welche jedoch aufgrund ihrer geringen thermischen Stabilität für biologische Anwendungen nicht geeignet sind. Die Substitution an der 3-Position stellt einen entscheidenden Faktor in diesem Zusammenhang dar, da diese die Abstraktion eines Protons verhindern und somit keine Polymerisation mehr zu beobachten war.^[94] Es zeigte sich, dass eine Stabilitätszunahme durch Erhöhung des Substitutionsgrades gleichzeitig mit einer Abnahme der Reaktivität einhergeht. In einer Studie von DEVARAJ *et al.* wurde festgestellt, dass 1-Methylcyclopropene eine gute Balance zwischen Reaktivität und Stabilität aufweisen.^[95] Zusammen mit PRESCHER *et al.* etablierten sie dieses Molekül als chemischen Reporter.^[19] Durch die Verschiebung der Methylgruppe von der 1- auf die 3- Position können Cyclopropene auch als Dipolarophil für die Photoclick-Reaktion dienen. LIN *et al.* demonstrierten 2012 als erstes den Einbau einer mit 3-Methylcyclopropen modifizierten Aminosäure zur Markierung von Proteinen mittels Fluoreszenzmarkierung von 2,5-Diaryltetrazolen.^[96] Sie konnten zeigen, dass die 3-Methylcyclopropene höhere Geschwindigkeitskonstanten ($k_2 = 58 \pm 16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als Vinylene ($k_2 = 46 \pm 8,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) oder Norbornene ($k_2 = 32 \pm 12 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) aufweisen. PRESCHER *et al.* fanden 2014 heraus, dass das 3,3-Dimethylcyclopropen in einer iEDDA-Reaktion sehr viel langsamer reagiert als das 1,3-Dimethylcyclopropenderivat. Durch Modellierung der Übergangszustände konnte herausgefunden werden, dass die Geschwindigkeitskonstante bei einer iEDDA-Reaktion sich um fast fünf Größenordnungen unterschieden ($k_{\text{rel}} = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zu $k_{\text{rel}} = 8,5 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Grund hierfür ist die sterische Hinderung der Methylgruppe im Übergangszustand, welche eine günstige Orbitalüberlappung stört und somit die Reaktion verlangsamt.^[97]

Theoretischer Hintergrund

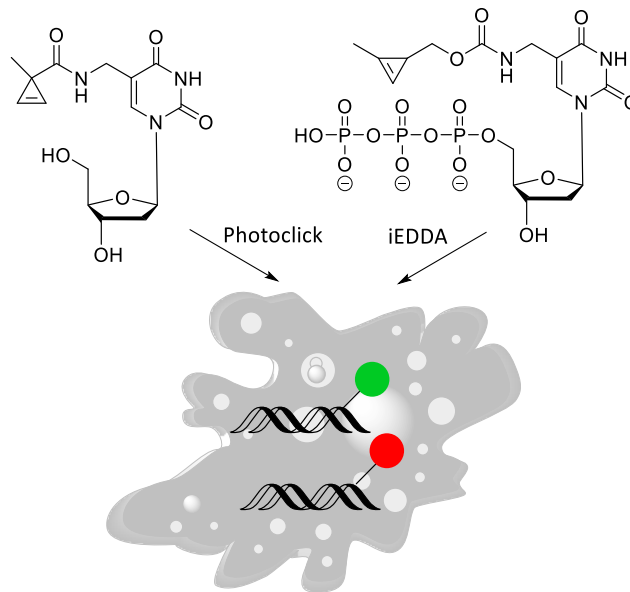


Abbildung 12 – Schematische Darstellung der dualen bioorthogonalen Markierung von DNA durch metabolischen Einbau von 1- und 3-Methylcyclopropenen mit Hilfe von 2'-Desoxynukleosiden und Triphosphaten in einer iEDDA- und Photoclick-Reaktion.

Durch den hohen Reaktivitätsunterschied lassen sich die zwei verschieden substituierten Cyclopropene als orthogonal zueinander klassifizieren. 2024 konnten WAGENKNECHT *et al.* diese Orthogonalität nutzen, um HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Cyclopropen-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden und Triphosphaten zu markieren. So wurden zwei isomere Methylcyclopropene über metabolische Markierung in die Zelle aufgenommen und anschließend mit einem fluorogenen Cyanin-Styryl-Tetrazin sowie Pyren-Tetrazol kombiniert. Die Zellen zeigten eine starke, aber nicht vollständig überlappende Fluoreszenz, welche im Zellkern detektiert wurde (Abbildung 12).^[98]

Eine besondere Klasse der Cyclopropenderivate stellen die Spirocyclen dar. Spiroverbindungen sind organische Moleküle, bei denen zwei Kohlenstoffzyklen an ein Atom gebunden sind.^[99] LIN *et al.* entwickelten 2014 ein Spiro[2,3]hex-1-en (SPH), welches sich als ausgesprochen reaktiv herausstellte und sich durch einen kleineren Bindungswinkel am C³-Atom (92,3°) als Cyclopropene (112,3°) auszeichnet.^[76] SPH zeigte dabei eine Minimierung der sterischen Hinderung, welche auf den verringerten Bindungswinkel der Kohlenstoffatome zurückgeführt werden konnte. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu einem mit 3,3-Dimethylcyclopropen modifiziertem Baustein. So war das SPH 17-mal schneller als vergleichbare Cyclopropene bei einer Photoclick-Reaktion mit einem 2,5-Diaryltetrazol (Abbildung 13). Auch bei Untersuchungen an GFP (*green fluorescent protein*) konnten Reaktionsgeschwindigkeiten von bis zu

$10.420 \pm 810 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden.^[76] Obwohl es sich bei SPH um ein 3,3-disubstituiertes Cyclopropen handelt, konnten LIN *et al.* 2017 die Reaktion eines mit SPH modifizierten Lysin in einer iEDDA-Reaktion beobachten, wobei dies deutlich schneller reagierte ($k_2 = 7900 \pm 1000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als das verglichene mit 1-Methylcyclopropen-modifizierte Lysin ($k_2 = 280 \pm 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[100] Trans-Cycloocten (TCO) wies in vergleichbaren Studien von SAUER *et al.* deutlich schnellere Reaktionsgeschwindigkeiten auf ($k_2 = 38.000 \pm 7000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ist aber aufgrund seiner speziellen Struktur in Gegenwart von Thiolen oder Kupfer sehr instabil und als cis-Cyclooctin 100.000 mal reaktionsträger.^[90] Darüber hinaus konnte eine höhere Einbaurrate und Fluoreszenzintensität von SPH im Vergleich zu TCO modifizierten Proteinen in Zellen nachgewiesen werden, weswegen SPH einen idealen chemischen Reporter für die bioorthogonale Chemie darstellt.

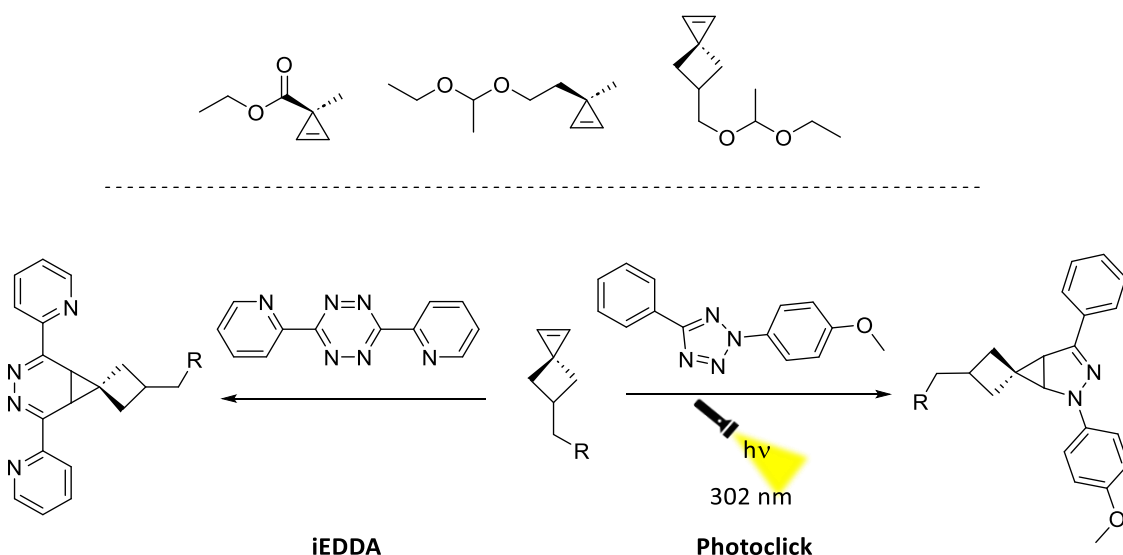


Abbildung 13 – Strukturen der von LIN *et al.* publizierten 3,3-disubstituierten Cyclopropene (oben links, Mitte), und SPH (oben, rechts); Reaktionsschema von SPH in einer iEDDA- und einer Photoclick-Reaktion (unten).

Um die Reaktivität von SPH als chemischen Reporter weiter zu verbessern, synthetisierten LIN *et al.* zusätzlich zwei weitere Spiroalkene. Durch Einführung von Stickstoff in das spirocyclische Ringsystem wurden die hydrophilen Analoga Azaspirohexen und Azaspirohepten synthetisiert. Kristallstrukturanalysen zeigten, dass die Bindungswinkel von Azaspirohexen zwischen den beiden C^3 -Atomen kleiner und die Länge der Doppelbildungen größer sind als bei SPH.^[101] Beides deutet auf eine gesteigerte Reaktivität in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition hin (Abbildung 14). So konnten gegenüber photoaktivierten 2,5-Diaryltetrazolen Geschwindigkeiten von $22.400 \pm 3500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das Azaspirohexen und $33.200 \pm 5500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das Azaspirohepten erhalten werden.^[101] Mit Azaspirohexen

modifizierte Lysinbausteine konnten zudem erfolgreich in sfGFP (*superfolder green fluorescent protein*) eingebaut und anschließend *in vivo* markiert werden. Das Azaspirohepten konnte jedoch nicht in sfGFP eingebaut werden, was auf eine geringere Stabilität dieser Modifikation hinweist.

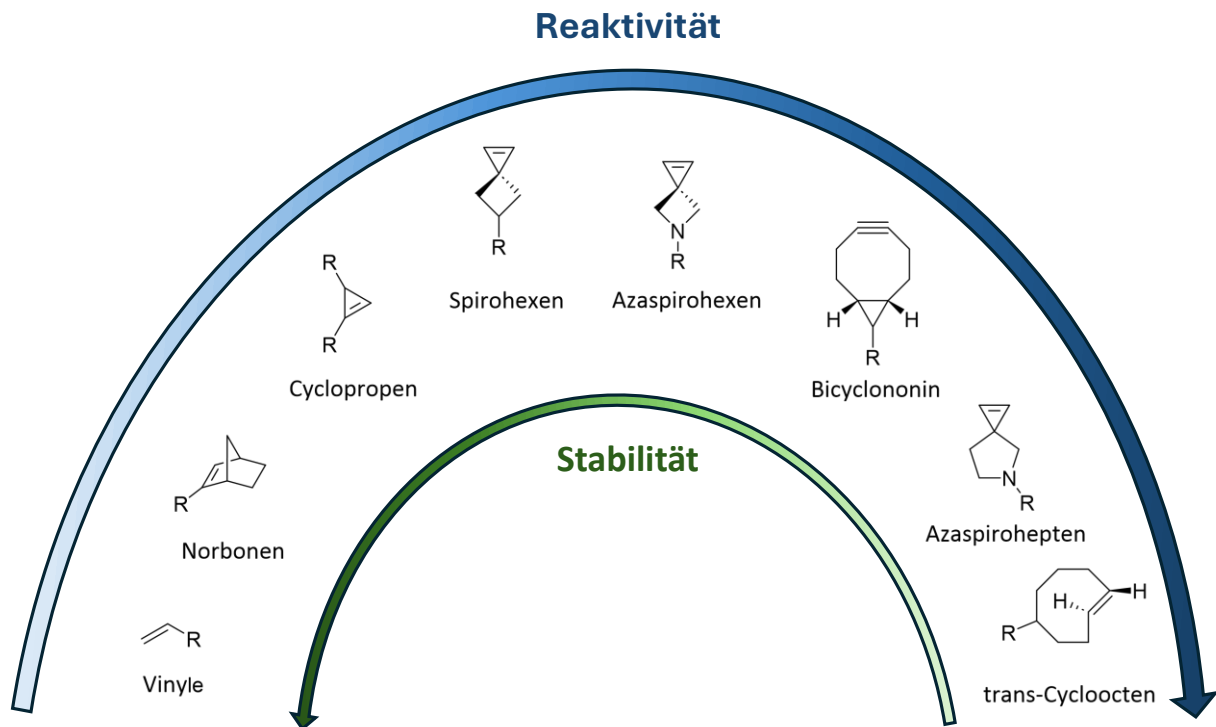


Abbildung 14 – Überblick verschiedener Dienophile für eine bioorthogonale Reaktion und deren Einordnung gegenüber Reaktivität und Stabilität.

2.4 Metabolische Markierung von DNA

Die metabolische Markierung beruht auf der Zellpermeabilität von 2'-Desoxynukleosiden, welche in der Zelle zu Triphosphaten durch zelluläre Kinasen umgewandelt werden, um anschließend in das genomische Material inkorporiert zu werden. Dies ist der eleganteste Weg ein modifiziertes Nukleosid mit einem chemischen Reporter *in vivo* einzuführen, um somit dynamische Stoffwechselprozesse zu beobachten und Aufschluss über die beteiligten Moleküle zu erhalten.^[102] Sobald das modifizierte Nukleosid phosphoryliert, in den Nukleus transportiert und dort in die genomische DNA eingebaut wurde, kann anschließend eine bioorthogonale Markierung erfolgen (Abbildung 15).^[103] Die Einschränkung dieser Methode besteht in der Größe der Modifikation. Je kleiner die Modifikationen des Nukleosids und der des chemischen Reporters sind, desto besser wird das Nukleosid von der Zelle akzeptiert und

Theoretischer Hintergrund

von den zellulären Kinasen und DNA/RNA-Polymerasen zu Triphosphaten phosphoryliert. Je ähnlicher das modifizierte Nukleosid dabei den natürlichen Nukleosiden ist, desto besser wird es phosphoryliert. Eine Herausforderung des ersten Phosphorylierungsschrittes besteht in der Substratspezifität der Nukleosidmonophosphatkinase. Anfangs wurden tritiiertes Thymidin und 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)^[104] verwendet, welche sich im Vergleich zu den natürlichen Nukleosiden nur in einem Atom unterscheiden. Diese Nukleinsäuren konnten mittels Autoradiographie oder durch spezifische Immunfärbung der Antikörper detektiert werden.^[105] Durch diese Methode ergeben sich jedoch viele Nachteile, denn neben den zytotoxischen und mutagenen Eigenschaften führt die Verwendung von ^3H und BrdU auch zu einer Destabilisierung der DNA. Somit ist die Anwendung nur auf bestimmte Zelltypen und einzelne Gewebeproben beschränkt.^[106]

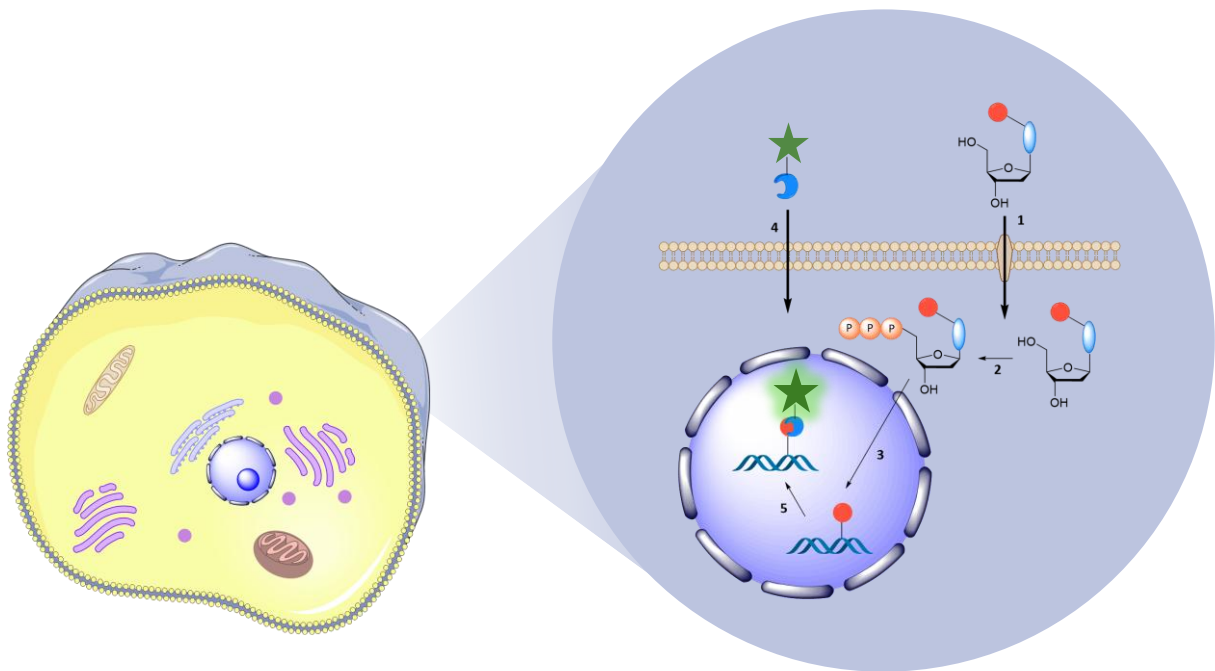


Abbildung 15 - Schematische Darstellung einer metabolischen Markierung von 2'-Desoxynukleosiden. 1) Das mit dem chemischen Reporter (rot) ausgestattete 2'-Desoxynukleosid wird über einen Ionenkanal durch die Zellmembran transportiert. 2) Phosphorylierung des modifizierten 2'-Desoxynukleosids. 3) Inkorporation des Triphosphats durch Polymerase in die DNA. 4) Einbringen des Fluorophors (grün) mit dem Kupplungspartner (blau). 5) Detektion der markierten DNA durch Click-Reaktion.

SPITALE *et al.* konnten 2019 mittels Kristallstrukturanalyse die bestmöglichen Positionen für chemische Modifikationen an Nukleosiden feststellen.^[107] Es zeigte sich, dass die Uridin-Cytidin-Kinase eine offene Tasche an der C5-Position sowie die Adenosin-Kinase an den Positionen C2, N6 und N7 aufweisen, weswegen Modifikationen an diesen Stellen des Moleküls besser toleriert werden (Abbildung 16). Seit 2008 konnten zahlreiche Modifikationen an Nukleosiden vorgenommen werden, welche durch metabolische

Markierung in der Zelle nachgewiesen wurden. DARZYNKIEWICZ *et al.* konnten ein Ethinyl-modifiziertes 2'-Desoxyuridin (EdU) herstellen, welches durch CuAAC *in vivo* markiert wurde, jedoch eine hohe Zytotoxizität aufwies.^[108] LUEDTKE *et al.* konnten mittels SPAAC ein Azid-modifiziertes 2'-Desoxyuridin (AdU) mit einem BCN-Fluorophor-Konjugat markieren.^[109] Noch im selben Jahr markierten sie außerdem ein 5'-Vinyl-2'-desoxyuridin (VdU) erstmals in einer iEDDA-Reaktion.^[110] Die Vinyl-Modifikation ist analog zur Ethinylgruppe klein genug, um von den Zellen phosphoryliert zu werden. VdU bietet im Vergleich zu EdU den Vorteil, dass es weniger zytotoxisch ist und im wässrigen Milieu stabiler ist als ein Azid-modifiziertes Nukleosid.^[109] Somit erwies sich eine Vinyl-Modifikation als ideal für metabolische Markierungsmethoden. 2023 konnten WAGENKNECHT *et al.* zudem das VdU in HeLa-Zellen mit einem Pyren-modifizierten Tetrazol in einer Photoclick-Reaktion markieren.^[87]

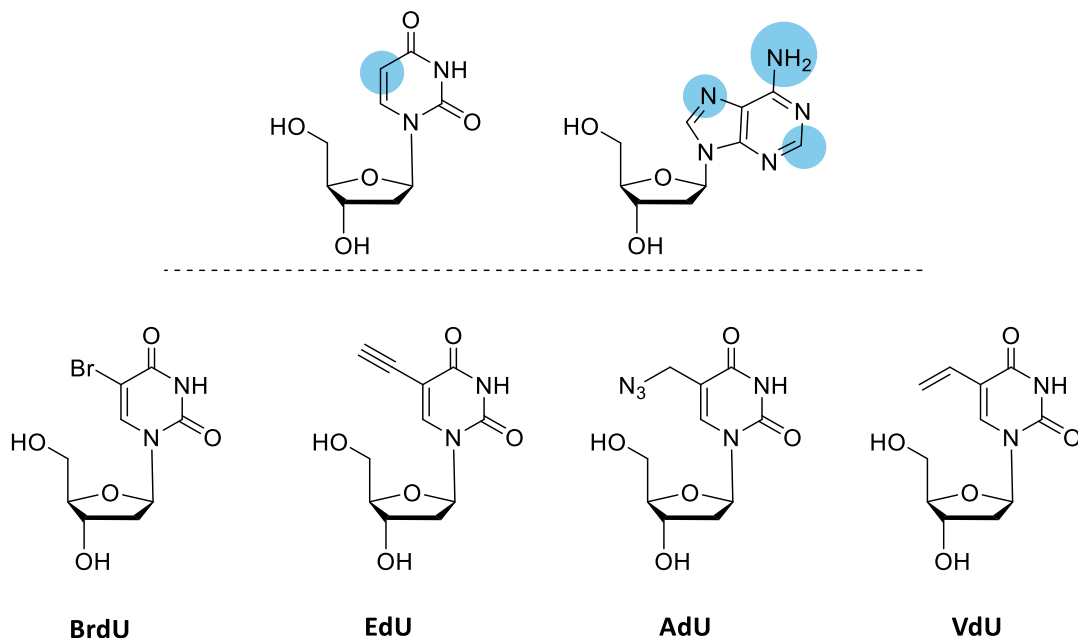


Abbildung 16 – Strukturen von 2'-Desoxyuridin und -Adenosin (oben) mit geeigneten Positionen für Modifikationen und erprobte Nukleoside für die metabolische Markierung (unten).

Obwohl VdU bereits mehrfach mit verschiedenen Fluorophoren *in vivo* markiert werden konnte, sind die Geschwindigkeitskonstanten bei der Visualisierung dynamischer zellulärer Prozesse meist nicht schnell genug. Bei niedriger Reaktionskinetik wird häufig eine höhere Konzentration an Farbstoff verwendet, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Dies kann jedoch zu einem störenden Hintergrundsignal durch den nicht umgesetzten Farbstoff führen. Daher sind höhere Reaktionskinetiken vorteilhaft, da sie den Einsatz von Farbstoffen reduzieren und somit Hintergrundsignale minimieren. Deswegen wird aktiv daran gearbeitet

auch größere chemische Reporter, die eine schnellere Markierung liefern würden, metabolisch zu markieren (siehe Kapitel 2.3). 2023 konnten WAGENKNECHT *et al.* eine Reaktivitätsstudie zu verschiedenen Nukleosiden durchführen. Es wurden verschiedene Vinyl-, 1-Methylcyclopropenyl- und Norbornenyl-modifizierte Nukleoside synthetisiert und deren metabolischen Einbau in HeLa-Zellen verfolgt.^[111] Durch Verwendung eines Mediums ohne Glutamin und ohne natürliche Nukleoside konnte ein verbesserter Einbau der modifizierten Nukleoside in die Zellen festgestellt werden. Jedoch konnten für sterisch stärker gehinderte Modifikationen wie die Norbornenyl-modifizierte Nukleoside keine effiziente metabolische Markierung im Vergleich zu VdU erreicht werden.^[111]

2.5 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von zellfremdem genetischem Material in Zellen, wobei zwischen biologischer-, chemischer- und physikalischer Transfektion unterschieden wird.^[112] Eine beliebte chemische Transfektionsmethode stellt die kationische Lipofektion dar. Hierbei bilden die positiv geladenen Lipide einen Komplex mit negativ geladenen Nukleinsäuren, welche anschließend die Zellmembran überwinden können. In der Folge kann die Nukleinsäure dann unter Auflösung des Lipoplexes in das Zytoplasma freigesetzt werden. Die transfizierte DNA migriert anschließend in den Zellkern und wird dort transkribiert (Abbildung 17, A).^[113] Das Verfahren ist in geringem Maße zytotoxisch, stellt keine Größenbeschränkung der transportierten Nukleoside dar und ist kommerziell erhältlich, was es zu einer der beliebtesten Transfektionsmethoden macht.^[114] Weitere Vorteile sind die einfache Umsetzung, hohe Reproduzierbarkeit und ein geringer Optimierungsaufwand. Die Transfektionseffizienz hängt jedoch weitgehend vom Verhältnis zwischen Nukleinsäure und Lipid, pH-Wert und Bedingungen der Zellmembran ab, weswegen vor allem das Verhältnis von Nukleinsäure und Lipid aufeinander abgestimmt werden muss, um eine erfolgreiche Transfektion zu gewährleisten

Eine weitere Möglichkeit der zellulären Aufnahme von modifizierten Biomolekülen ist die Verwendung von SNTT (*synthetic nucleoside triphosphate transporter*). Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, stellen vor allem die ersten Phosphorylierungsschritte mit der hohen Selektivität der zellulären Kinasen die größte Herausforderung dar. KRAUS *et al.* stellten diesen Transporter 2018 vor, welcher es ermöglicht, einen einfachen, selektiven und schnellen Transport der

Nukleotide in die Zelle, ohne offensichtliche Schädigung der Plasmamembran oder Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zelle, zu gewährleisten (Abbildung 17, B).^[115]

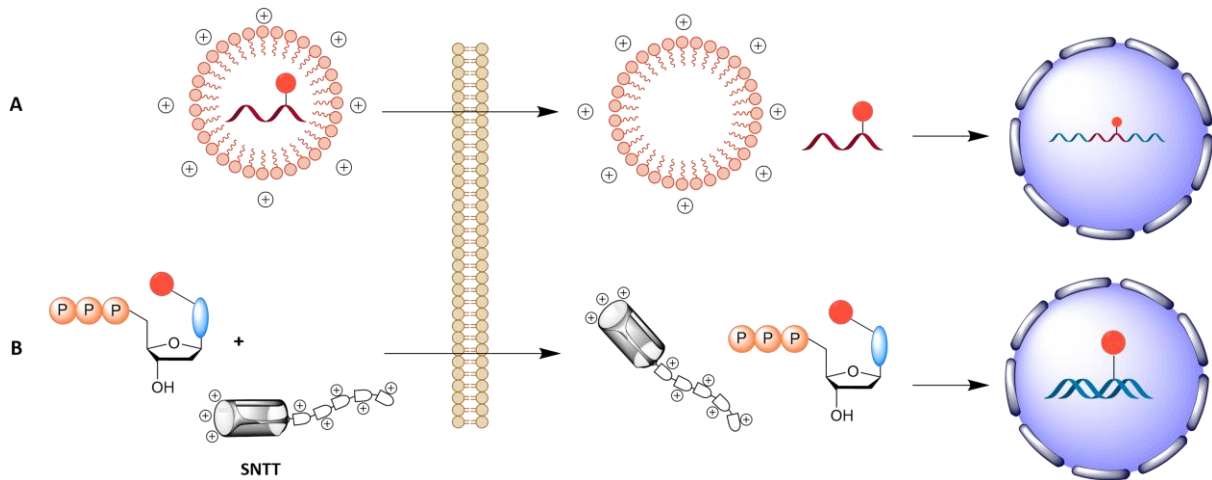


Abbildung 17 – Schematische Darstellung einer Lipofektion (A) und der Transport von modifizierten Nukleotiden über die Zellmembran mit Hilfe eines SNT-Transporters (B).

Anders als Nukleoside können Nukleotide die Zellmembran aufgrund ihrer negativen Ladung nicht passieren. Der Transporter besteht aus einem Rezeptor, welcher einen stabilen, nicht-kovalenten Komplex mit dem Triphosphat eingeht und einer zellpenetrierenden Einheit, welche den gesamten Komplex durch die Membran leitet. Den Rezeptor bilden Cyclodextrine und lange Arginin-Caprinsäureketten dienen als zellpenetrierende Einheit. Dieses Peptid zeigte in vorherigen Versuchen einen effizienten Transport von fluoreszenten Proben durch die Zellmembran.^[116] Die nicht kovalente Bindung des Triphosphats an den Transporter bietet verschiedene Vorteile. Zum einen kann auf die Synthese intrazellulär spaltbarer kovalenter Linker verzichtet werden, zum anderen ist das Triphosphat durch einen unbeständigen Verankerungspunkt im Transporter leicht wieder herauszulösen. Durch die hohe Dichte an Triphosphat in der Zelle durch ATP, findet eine kompetitive Verdrängung des modifizierten Triphosphates statt, welches anschließend in die Zelle entlassen und in die DNA inkorporiert wird.^[115] Auf diese Weise konnten KRAUS *et al.* eine erfolgreiche Inkorporation eines fluoreszierendes Alexa-488-2'-Desoxyuridin-Triphosphats in Zellen beobachten. Zusätzlich konnten weitere Nukleosid-Triphosphate, die mit sterisch gehinderten Modifikationen wie BCN oder TCO modifiziert wurden, mit Hilfe von SNTT in Zellen inkorporiert werden.^[117]

2.6 Peptid-Nukleinsäuren (PNA)

Die 1991 von NIELSEN *et al.* eingeführte PNA stellt heutzutage eine der wichtigsten Nukleinsäure-Analoga dar, welche sich durch hohe Affinität und Sequenzspezifität zu komplementären DNA- und RNA-Sequenzen auszeichnet.^[118] Die NIELSEN-PNA (aegPNA) ist ein künstliches Oligonukleotid, welches gegenüber dem 2'-Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA ein achirales 2-Aminoethyl-Glycin (aeg)-Rückgrat besitzt. Daher kombiniert sie die Eigenschaften von Peptiden und Nukleinsäuren.^[119] Das ungeladene Rückgrat resultiert in einer geringeren Abstoßung im Heteroduplex im Vergleich zum negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA. Die stabilen PNA/DNA und PNA/RNA-Duplexe weckten großes Interesse als Antisense- und Antigenwirkstoff, da die strukturelle Veränderung des Rückgrats zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Nukleasen und Proteasen führte.^[120] Durch das flexible Rückgrat der aegPNA konnte eine Triplexbildung oder Stranginvasion an DNA oder RNA-Doppelstränge beobachtet werden.^[121] Die Ausbildung von *Watson-Crick-Hoogsteen* (PNA)₂/DNA-Triplexen und die dadurch gegebene Möglichkeit zur parallelen und antiparallelen Bindung an Nukleinsäuren schränkte die Anwendung der aegPNA jedoch ein.^[119] Unmodifizierte PNA weist eine schlechte Wasserlöslichkeit, Selbstaggregation sowie eine geringe zelluläre Permeabilität auf, was frühere Forschungsbemühungen deutlich einschränkte. Es wurden zahlreiche Modifikationen des ursprünglichen PNA-Rückgrats und der Nukleobasen untersucht, um chemische und biologische Eigenschaften der aegPNA weiter zu verbessern. So wurden kationische Liganden wie Lysin oder Polyamin^[122] am Terminus eingeführt, welche die Hydrophilie steigern konnten.^[123] Permeable Peptide konnten die Zellpenetration durch Inkorporierung durch Transfermoleküle erhöhen und somit die biologische Anwendung der PNA verbessern.^[124] Auch durch Substituenten an der γ -Position konnten erhöhte Hybridisierungseigenschaften beobachtet werden. Die induzierte Chiralität an der γ -Position (γ PNA) durch eine Methylgruppe konnte mit einer verbesserten Selektivität für komplementäre DNA in Verbindung gebracht werden.^[125] Cyclische Modifikationen am PNA-Rückgrat hatten das Ziel, die Affinität und Selektivität von PNA zu erhöhen. Allerdings verschlechterten die meisten Modifikationen die Hybridisierungseigenschaften der PNA.^[126] Eine der erfolgreichsten Modifikationen von PNA ist die Einführung von Konformationsrestriktionen in das PNA-Rückgrat. Um die Entropieänderung während der Bildung des PNA-DNA-Duplexes zu reduzieren, wird unter anderem die Einführung von 2-Amino-1-Cyclopentacarbonsäure (acpc) verwendet. Ein Vergleich zwischen aegPNA, γ PNA,

acpcPNA und DNA ist in Abbildung 18 gegeben. Die acpcPNA als vielversprechende Innovation wird im folgenden Abschnitt weiter erläutert.

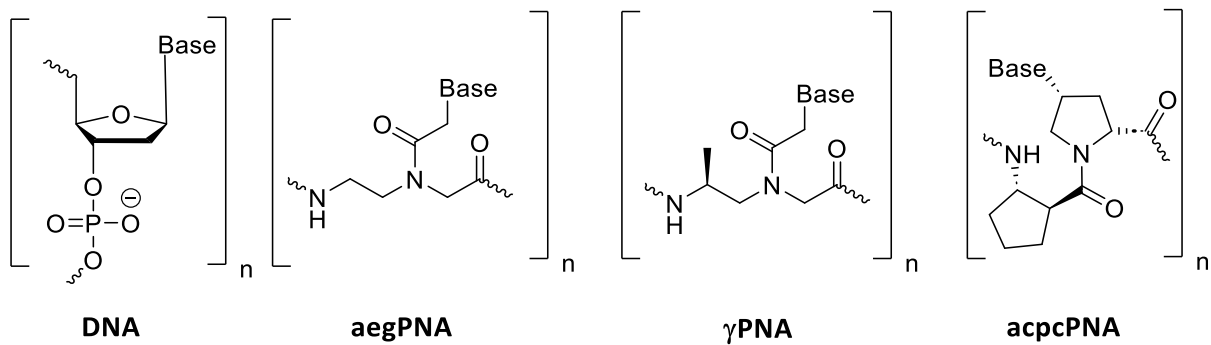


Abbildung 18 – Strukturvergleich zwischen DNA, aegPNA, γPNA und acpcPNA.

2.6.1 Pyrrolidiny-PNA (acpcPNA)

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene PNA-Modifikationen entwickelt, um Bindungsaffinität, Spezifität und Flexibilität der aegPNA zu verbessern. Die 2001 durch VILAIVAN *et al.* vorgestellte acpcPNA^[127], welche alternierend aus einem *D*-Prolin und (1*S*,2*S*)-2-Amino-1-cyclopentacarbonsäure aufgebaut ist, konnte diese Ansprüche erfüllen.^[128] Durch die entstehende Chiralität und eine für DNA weitaus passendere Form konnte die Modifikation die Flexibilität des PNA-Gerüsts einschränken und eine ausschließlich antiparallel angeordnete Bindung an die DNA gewährleisten. Darüber hinaus zeigte die acpcPNA geringe Neigung zur Selbsthybridisierung und tripelhelikalen Strukturen, was sie von anderen PNA-Gerüsten unterscheidet.^[129] Im Vergleich zur aegPNA konnte sich die acpcPNA durch exzellente Sequenzspezifität und Hybridisierungseffizienz sowie optimale Diskriminierung von Einzelbasenfehlpaarungen^[130] auszeichnen, weswegen bei PNA/RNA und vor allem PNA/DNA-Hybriden^[131] außerordentlich hohe Schmelztemperaturen verzeichnet werden konnten.^[132]

Theoretischer Hintergrund

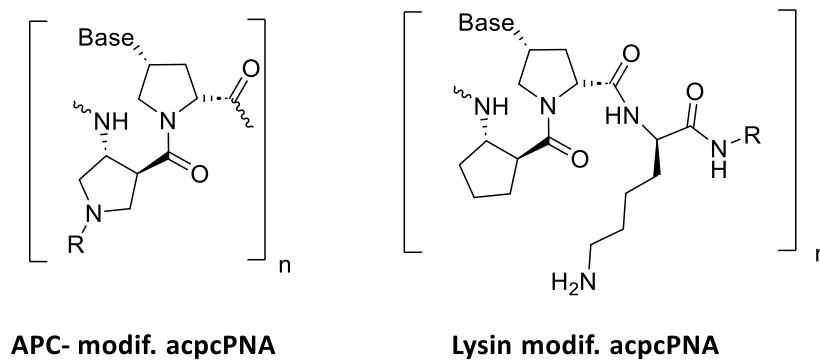


Abbildung 19 – Strukturvergleich zwischen APC-modifizierter acpcPNA und Lysin-modifizierter acpcPNA zur postsynthetischen Modifikation für Fluoreszenzmarkierungen.

Zusätzlich können die PNA-Stränge postsynthetisch über Lysinreste am N- bzw. C-Terminus der PNA und an den 3-Aminopyrrolidin-4-Carbonsäure-Einheiten (APC) postsynthetisch modifiziert werden. Diese Modifikationen erlauben es, die PNA postsynthetisch mit einem chemischen Reporter oder einem Fluoreszenzfarbstoff zu versehen (Abbildung 19).^[133] WAGENKNECHT *et al.* und VILAIVAN *et al.* konnten 2015 acpcPNA postsynthetisch mit verschiedenen Farbstoffen modifizieren und Strangaustauschexperimente mit doppelsträngiger DNA durchführen. Sie zeigten, dass acpcPNA in der Lage ist, einen DNA-strang *in vitro* aus einer doppelsträngigen DNA derselben Länge zu verdrängen.^[134] Durch Fluoreszenz-Farbveränderungen konnte zudem festgestellt werden, dass deutlich weniger acpcPNA benötigt wurde, um die DNA aus dem Doppelstrang zu verdrängen als herkömmliche PNA-Systeme.

2.7 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die *in-situ*-Hybridisierung (ISH) ist eine Methode zur Detektion und Lokalisation von RNA und DNA in Zellen oder Geweben. Dieses Verfahren basiert auf der Hybridisierung der Zielsequenz mit einer markierten Sonde, deren Signal anschließend sichtbar gemacht werden kann.^[135] 1969 wurde die erste ISH von GALL *et al.*^[136] und PARDUE *et al.*^[137] durch radioaktiv markierte RNA und DNA mittels Autoradiographie detektiert. Die radioaktiven Substanzen wiesen jedoch viele Nachteile auf. Die geringe Stabilität der Isotope, welche zu einem instabilen Signalnachweis führte, sowie die Gefährlichkeit radioaktiver Substanzen, die spezielle Sicherheitsvorkehrungen erforderlich machte, führten die moderne Forschung hin zu Antikörper-basierten Färbemethoden.^[138] Hierbei werden Oligonukleotide, die mit Haptinen wie Digoxigenin (DIG) modifiziert sind, durch spezifische Antikörper erkannt, die an Farbstoff-

modifizierte Reporterenzyme gebunden sind.^[139] Eine weitere Variante der klassischen ISH stellt die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dar. Diese Methode nutzt fluoreszierende Marker, die eine Verbesserung der Auflösung, eine quantitative Analyse sowie die Detektion mehrerer Zielsequenzen in lebenden Zellen ermöglichen.^[140] Diese Markierung kann sowohl indirekt als auch direkt erfolgen. Die indirekte Markierung erfolgt durch eine Sonde, welche ein Hapten enthält, die spezifisch an die Zielsequenz bindet, gefolgt von der Detektion mittels eines Antikörpers. Im Gegensatz dazu erfolgt die direkte Markierung durch ein kovalent gebundenes Fluorophor, welches direkt an die Zielsequenz bindet (Abbildung 20).^[141]

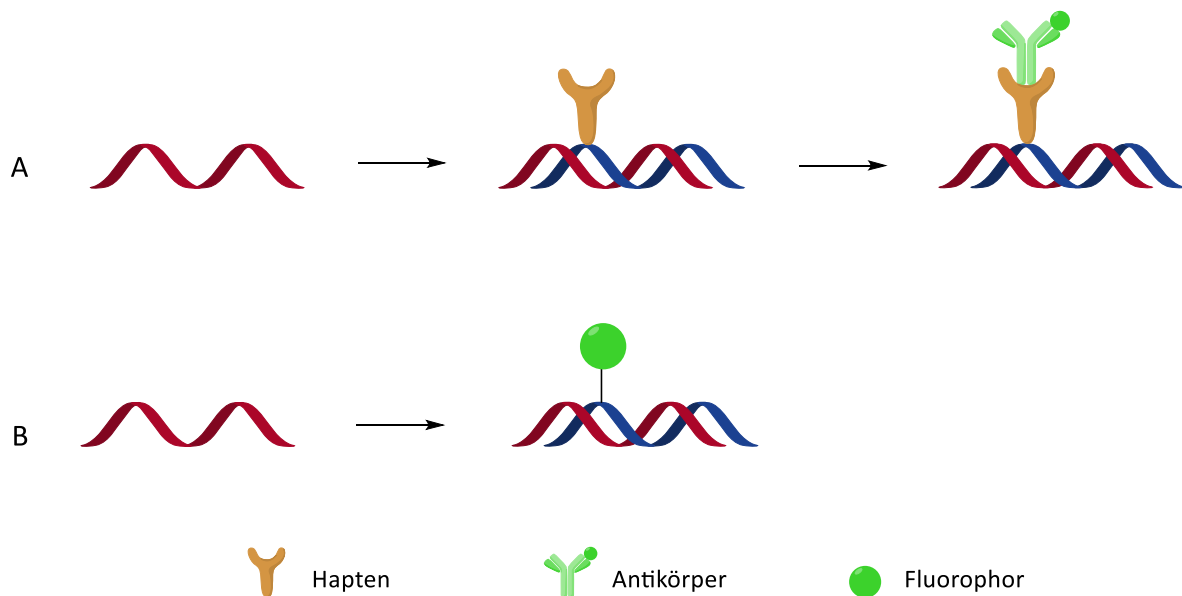


Abbildung 20 - Arten der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). A) indirekte Markierung der Zielsequenz über ein Hapten und einen Antikörper; B) direkte Markierung der Zielsequenz durch kovalent geknüpfte Fluorophore.

Im Jahr 1998 stellten SINGER *et al.* erstmals sensitive FISH-Sonden vor, mit denen einzelne mRNA-Stränge detektiert und analysiert werden konnten.^[142] Diese Sonden wurden mit bis zu fünf Fluorophoren ausgestattet, um eine erhöhte Emission und somit eine verbesserte Visualisierung zu ermöglichen. Allerdings führte dies auch zu Herausforderungen die Signale von ungebundenen Sonden von denen erfolgreich hybridisierter Sonden zu unterscheiden. Zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz entwickelten TYAGI *et al.* eine Methode, bei der mehrere FISH-Sonden verwendet wurden, welche jeweils komplementär zu verschiedenen Abschnitten der Ziel-mRNA waren und mit einzelnen Fluorophoren modifiziert wurden.^[143] Ein Emissionssignal konnte erst bei einer Mindestanzahl an hybridisierten Sonden detektiert werden, wodurch die Hintergrundfluoreszenz minimiert wurde. Eine weitere Möglichkeit, ein spezifisches Signal mit minimaler Hintergrundfluoreszenz zu erzeugen, ist mit Hilfe eines

Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET). Dieser von FÖRSTER im Jahr 1946 postulierte Mechanismus beschreibt einen strahlungslosen Energietransfer, bei dem ein elektronisch angeregter Donor seine Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen sich im Grundzustand befindenden Akzeptor überträgt.^[144] Dabei fällt der Donor in seinen Grundzustand zurück, während der Akzeptor in einen angeregten Zustand übergeht. Der Akzeptor kann anschließend entweder durch Emission bei einer anderen Wellenlänge oder strahlungslos in seinen Grundzustand zurückkehren (Abbildung 21).^[145]

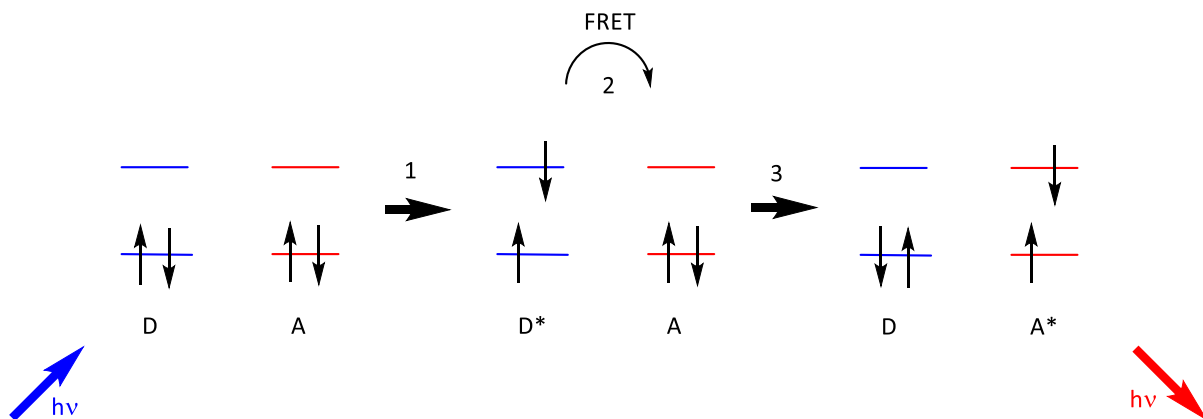


Abbildung 21 – Schematische Darstellung eines Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET). 1) Anregung des Donors (D) durch Absorption eines Photons, 2) Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor (A), 3) Rückkehr des Donors in den Grundzustand und Anregung des Akzeptors mit anschließender Emission des Akzeptors.

Damit dieser Energietransfer stattfinden kann, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, wobei das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ einen Wert größer als null aufweisen muss. Zudem sollte der Abstand zwischen Donor und Akzeptor zwischen 1 und 10 nm liegen, um die erforderlichen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu ermöglichen. Für einen effektiven Energietransfer müssen die Dipole von Donor und Akzeptor parallel zueinander ausgerichtet sowie die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors möglichst hoch sein.^[145] Die FRET-Effizienz E gibt das Verhältnis der Quanten wieder, welche vom Donor auf den Akzeptor übertragen wurden, zur Anzahl der Quanten, die vom Donor absorbiert wurden. Die FRET-Effizienz kann entweder aus dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, aus den Fluoreszenzintensitäten des Donors in Gegenwart und Abwesenheit des Akzeptors oder aus den Fluoreszenzlebenszeiten des Donors unter den gleichen Bedingungen berechnet werden.^[146]

Theoretischer Hintergrund

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

- r: Abstand zwischen Donor und Akzeptor
- R_0 : Förster-Radius (Abstand bei 50 % FRET-Effizienz)
- F_{DA} : Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
- F_D : Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
- τ_{DA} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
- τ_D : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

Aufgrund der Distanzabhängigkeit zwischen Donor und Akzeptor können bei der FISH Sequenzen eingesetzt werden, die mit zwei verschiedenen Fluorophoren modifiziert sind und in einem definierten Abstand zueinander an die Zielsequenz binden. Die erfolgreiche Hybridisierung an die Zielsequenz kann anschließend durch die Detektion eines FRET-Signals validiert werden.

3 Themenstellung

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in zwei Unterkapitel. Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit ist es Spirohexen-modifizierte Nukleoside und Oligonukleotide zu synthetisieren und deren Reaktivität in diversen iEDDA- und Photoclick-Reaktionen *in vitro* zu untersuchen. Dabei soll gezielt der Einfluss der Nukleobasen und der Linkerstruktur in Hinblick auf Kinetik und Fluoreszenzsteigerung berücksichtigt werden. Die Synthese der modifizierten Nukleoside sollte dabei einem modularen Aufbau folgen, der teilweise in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT etabliert ist. Durch ihren optimalen Kompromiss zwischen Reaktivität und Stabilität stellen Spirohexene einen interessanten chemischen Reporter dar, der bislang fast ausschließlich an Proteinen aber noch nie innerhalb von Oligonukleotiden erforscht wurde. Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide und Nukleoside sollen anschließend durch Transfektionsexperimente und durch metabolische Markierung in Zellen aufgenommen werden, um zelldynamische Prozesse zu visualisieren. Durch die erhöhte Ringspannung könnten Reaktionen schnell genug ablaufen, um hochdynamische Prozesse *in cellulo* besser zu visualisieren als kleinere und reaktionsträgere chemische Reporter. Im Vergleich zu ähnlichen funktionellen Gruppen wie Cyclopropenen, bieten Spirohexene zusätzlich den Vorteil, dass ein Molekül ausreichend ist, um eine duale Visualisierung mit einer iEDDA- oder einer Photoclick-Reaktion zu ermöglichen.

Der zweite Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die Synthese und Modifikation von acpcPNA mit dem Ziel einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) in Zebrafischen zu visualisieren. Hierfür sollen sechs verschiedene acpcPNA-Stränge synthetisiert und entweder mit einem Cy3-Farbstoff oder einem Atto647N-Farbstoff postsynthetisch modifiziert werden. Zuerst soll in Experimenten *in vitro* die optimalen Bedingungen für eine spätere Anwendung *in vivo* gefunden werden. Die modifizierten acpcPNA-Sonden sollen anschließend mittels FISH die sonic-hedgehog Sequenz im Zebrafisch-Embryo markieren. AcpcPNA bietet im Gegensatz zu normalen DNA- oder RNA-Hybridisierungen den Vorteil, dass die PNA/RNA und PNA/DNA Hybridisierung stärker ist, weswegen auch der Energietransfer und die damit verbundene Emission des Akzeptors deutlicher zu sehen sein sollte.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Design SPH-modifizierter Nukleoside

Im ersten Teil der Arbeit sollen verschiedene Spirohexen (SPH)-modifizierte Nukleoside und Oligonukleotide hergestellt werden, um herauszufinden, ob diese sich für bioorthogonale Reaktionen mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktionen eignen. Die Verknüpfung des SPHs an das Nukleosid soll über eine Carbamat-Gruppe erfolgen, welche vor allem die iEDDA-Reaktion durch ihren elektronenschiebenden Effekt beschleunigt. Um die Reaktivität bestmöglich zu untersuchen und deren Einflussfaktoren näher zu beleuchten, sollen zudem der Linker und die Art der Nukleobasen variiert werden. Hier sollte zwischen einem starren Alkinlinker sowie einer flexiblen Propylgruppe unterschieden werden. Ein starrer Alkinlinker bietet die Möglichkeit, die Ausrichtung des SPHs genau zu kontrollieren, wohingegen die flexible Propylgruppe höhere Beweglichkeit und somit potenziell bessere Zugänglichkeit für den Reaktionspartner bietet. Die Wahl dieser beiden Linkertypen beruht nicht nur auf strukturellen Unterschieden, sondern auch auf praktischen Überlegungen. Beide Varianten lassen sich mit geringem synthetischem Aufwand und kostengünstig herstellen. Zusätzlich zur Variation der Linker wurde die Auswirkung der Basen auf die Reaktivität untersucht. Es ist bekannt, dass der Einfluss der Nukleobasen Einfluss auf die Geschwindigkeit und auf die Fluoreszenzintensität mit diversen Click-Partnern haben kann.^[54] Unter diesem Aspekt wurden Uridin (**I** und **II**), 7-Deaza-2'-desoxyadenosin (**III** und **IV**) und 7-Deaza-adenosin (**V**) für diesen Vergleich herangezogen, welche unterschiedliche elektronische und strukturelle Eigenschaften durch ihre Purin- und Pyrimidingerüste aufweisen (Abbildung 22). Als Modifikationspunkte wurden die in der Literatur beschriebenen C5- bzw. N7-Positionen gewählt.^[107]

Für eine spätere metabolische Markierung der Nukleoside ist es entscheidend, dass der chemische Reporter so nah wie möglich an der Nukleobase positioniert ist. Nur so kann sichergestellt werden, dass die zellulären Kinasen das modifizierte Nukleosid akzeptieren und phosphorylieren, wodurch ein effizienter Einbau in die DNA und RNA ermöglicht wird.^[111] Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden zusätzlich weitere Nukleoside (**VI** und **VII**) synthetisiert, welche sich für metabolische Inkorporation eignen sollen und mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktionen visualisiert werden können.

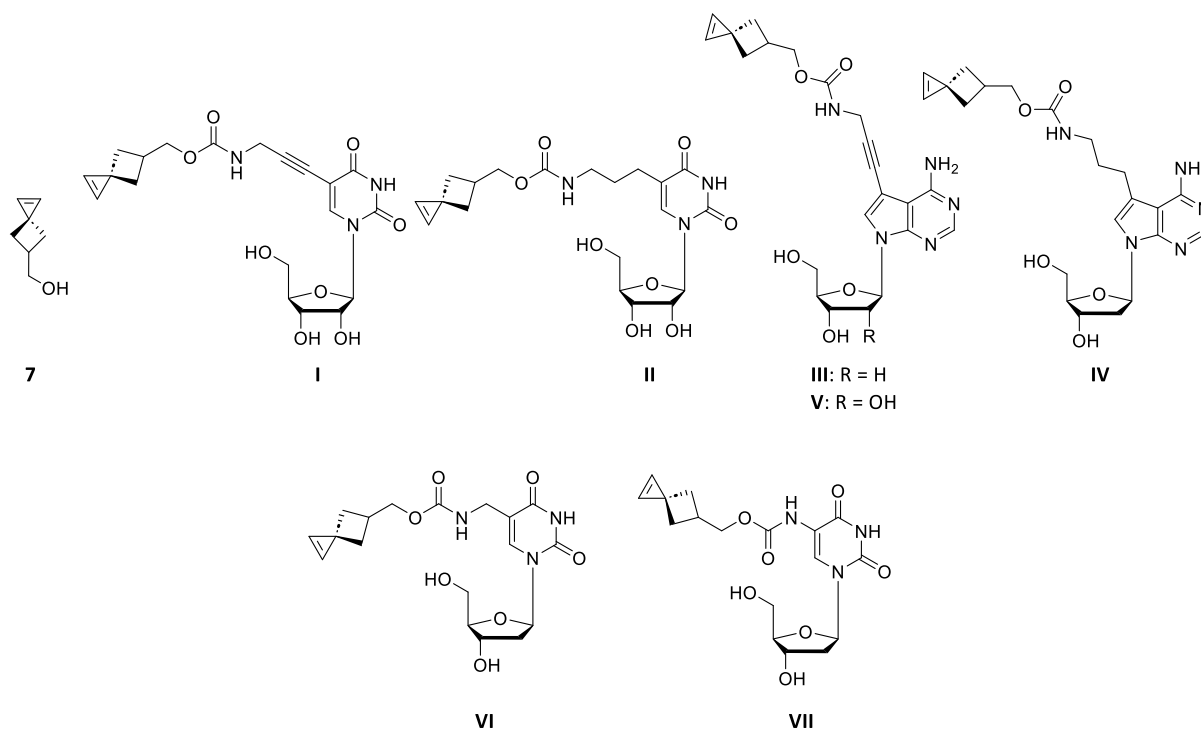


Abbildung 22 – Übersicht der SPH-modifizierten Nukleoside **I-V** und SPH-OH **7**, welche im Rahmen dieser Arbeit für die bioorthogonale Markierung mit Tetrazin- und Tetrazol-Derivaten in einer iEDDA- und Photoclick-Reaktion untersucht werden sollen. Nukleoside **VI** und **VII** sollen mittels metabolischer Markierung in HeLa-Zellen visualisiert werden.

Teile der folgenden Kapitel (4.2-4.5 und 4.7) und die dazugehörigen unterstützenden Informationen wurden bereits veröffentlicht:

“Two-Factor Fluorogenic Cyanine-Styryl Dyes with Yellow and Red Fluorescence for Bioorthogonal Labelling of DNA”, B. Pfeuffer, P. Geng, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem*, **2024**, 25, e202300739; DOI: 10.1002/cbic.202300739.^[55]

4.2 Synthese SPH-modifizierter Nukleoside

Zur Einführung der SPH-Einheit in die Nukleoside wurde die Reaktion eines NHS-Esters mit einer primären Aminogruppe gewählt, da sie aufgrund der einfachen Austauschbarkeit der Kupplungspartner und der allgemeinen Durchführung vorteilhaft ist. Daher wurde zunächst der SPH-NHS-Ester **8** als Vorläufer synthetisiert (Abbildung 23). Die Synthese des NHS-Esters **8** erfolgte nach einer literaturbekannten Methode von LIN *et al.*, ausgehend vom kommerziell erhältlichem 3-Methylcyclobutancarbonitril **1**.^[76] Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in Abbildung 23 nur eines der beiden entstehenden Diastereomere gezeigt. Im ersten Schritt erfolgte zuerst eine Cyclopropanierung mit Bromoform und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zu Verbindung **2**. Anschließend erfolgte eine Reduktion der Nitrilgruppe zu einem

Alkohol durch Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) und Natriumborhydrid (NaBH_4). DIBAL-H ist ein starkes Reduktionsmittel, welches die Nitrilgruppe zu einem Aldehyd reduziert. NaBH_4 reduziert den in der Reaktion entstandenen Aldehyd weiter zum Alkohol. Die Schützung der Hydroxygruppe erfolgt mittels Ethylvinylether zu **4**. Im Vergleich zu anderen Schutzgruppen zeichnet sich Ethylvinylether durch eine vorteilhafte Kombination aus Säurelabilität, Basenstabilität und geringem sterischen Anspruch aus. Durch Monodebromierung konnte erst das Mono-Spirohexan **5** und nach einer weiteren Eliminierungsreaktion das Spirohexen **6** erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde die Schutzgruppe durch HCl entfernt und nach Aufreinigung von **7** zum NHS-Ester **8** umgesetzt. Dieser konnte in einer Ausbeute von 53 % über zwei Stufen erhalten werden. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Entschützung der Schutzgruppe mit HCl und direkter Esterkupplung *in situ* das Succinimidylcarbonat-Derivat **8** in einer besseren Ausbeute von 74 % über zwei Stufen erhalten werden konnte. Durch die Vermeidung der Aufarbeitung der flüchtigen Verbindung **7** und die Verwendung von Diethylether anstelle von Ethylacetat im Vergleich zur Literatur^[76] konnte die Ausbeute um 21 % gesteigert werden.

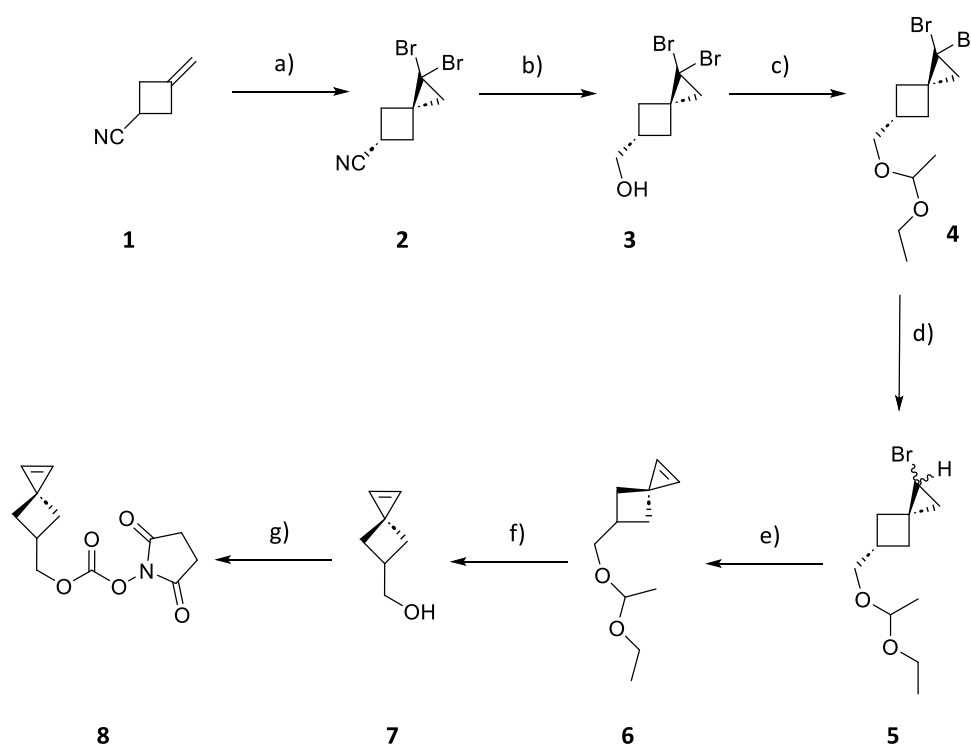


Abbildung 23 - Synthese des SPH-NHS-Esters **8**. a) CHBr_3 , 3-Methylcyclobutanecarbonitril, NaOH, CTAB, RT, 24 h, 74 %; b) -78°C , DIBAL-H, 3 h, HCl, EtOH, 0°C , NaBH_4 , 16 h, 67 %; c) p-TsOH, Et_2O , 0°C , Ethylvinylether, 16 h, 51 %, d) THF, $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$, 0°C , EtMgBr, 16h, 62 %; e) DMSO, KO^tBu , 0°C , 16 h, 63 %, f) MeCN, 1 M HCl, 1 h, 0°C , 72 %; g) MeCN, Et_3N , 0°C , Disuccinimidylcarbonat, 16 h, 74 %.

Für die spätere SPH-Modifikation des Nukleosids mit **8** sollte an der C5-Position des Uridins eine Aminpropylgruppe eingeführt werden. Diese dient als Linker zwischen dem Nukleosid und dem angebrachten Dienophil. Als Verknüpfung zwischen dem Linker und der SPH-Modifikation wurde eine Carbamatgruppe gewählt, da diese die Elektronendichte am Dienophil erhöht. Die daraus resultierende Erhöhung des HOMO des Dienophils führt zu einer gesteigerten Geschwindigkeit der geplanten iEDDA-Reaktionen. Hierfür wurde eine literaturbekannte Syntheseroute verwendet, die im Arbeitskreis WAGENKNECHT etabliert wurde.^[147] Zuerst wurde das kommerziell erhältliche 5'-Ioduridin **9** mit einer *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Gruppe in einer S_N2-Reaktion zu **10** geschützt. Die Einführung der Schutzgruppen an den Hydroxyfunktionen dient dazu, mögliche Nebenreaktionen zu unterbinden und die Ausbeute für die nachfolgenden Syntheseschritte deutlich zu verbessern. Dabei wurden unter Argonatmosphäre vier Äquivalente TBDMS-Cl mit Imidazol in trockenem THF für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Koevaporieren des Nukleosids mit Toluol konnte **10** mit einer Ausbeute von 66 % erhalten werden. Für den Propargyllinker **13** wurde Propargylamin **11** zusammen mit Trifluoressigsäureethylester **12** in Methanol für 24 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Nach der Aufreinigung konnte Verbindung **13** in einer Ausbeute von 72 % erhalten werden. Über eine Sonogashira-Kupplung mit CuI und Pd(PPh₃)₄ als Katalysatoren konnte Verbindung **10** an der C5-Position mit **13** zu **14** modifiziert werden.^[148] Das Alkin wurde im Anschluss mit Wasserstoff mit Pd/C über 7 h hydriert, wodurch Produkt **15** mit einer quantitativen Ausbeute erhalten wurde.

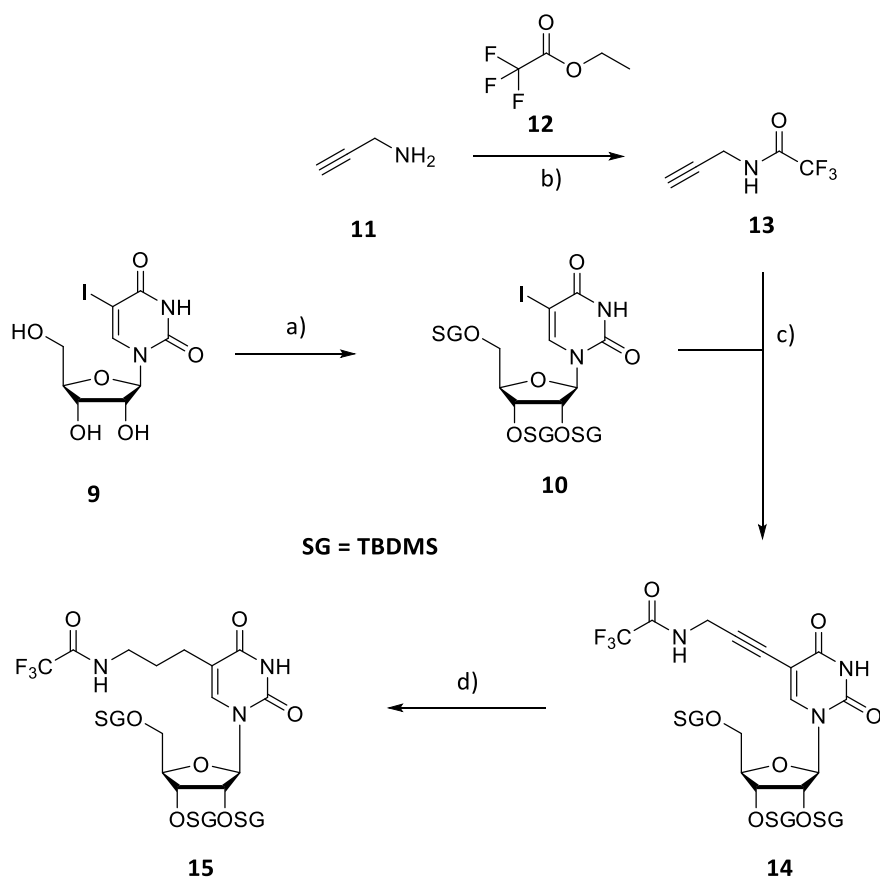


Abbildung 24 – Schützung von 5'-Ioduridin mit TBDMS und Kupplung des Trifluoracetat (TFac)-geschützten Propargyllinkers. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, 3h, RT, 66 %; b) MeOH, 24 h, RT, 72 %; c) CuI, Et₃N, DMF, Pd(PPh₃)₄, 16 h, RT, 74 %; d) Pd/C, MeOH, H₂, quant.

Die anschließende Entfernung der TFac-Gruppe für die nachfolgende Amidkupplung des SPH-NHS-Esters **8** an das primäre, aliphatische Amin des Nukleosids erfolgte unter basischen Bedingungen mittels NaOH für 3 h bei Raumtemperatur (Reaktion a), Abbildung 25). An dieser Stelle wurde vom eigentlichen Protokoll abgewichen, da eine Entschützung der TFac-Gruppe mit Ammoniumhydroxid zu viele Nebenprodukte lieferte. Die daraus erhaltenen Nukleoside **16** und **17** wurden unter Verwendung von Triethylamin zur Erhöhung der Nukleophilie desamins in einer Amidkupplungsreaktion mit NHS-Ester **8** für 16 h bei Raumtemperatur zu den Produkten **18** und **19** mit einer Ausbeute von 72 % und 38 % umgesetzt (Reaktion b), Abbildung 25). Abschließend wurden die TBDMS-Gruppen an den 2'-, 3'- und 5'-Hydroxygruppen mit Et₃N·3HF entfernt. Hierfür wurde Et₃N·3HF im Überschuss verwendet und die Reaktion 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach anschließender Aufarbeitung konnten die Zielmoleküle **I** und **II** mit einer Ausbeute von 18 % über sechs Stufen bzw. 13 % Ausbeute über sieben Stufen erhalten werden.

Ergebnisse und Diskussion

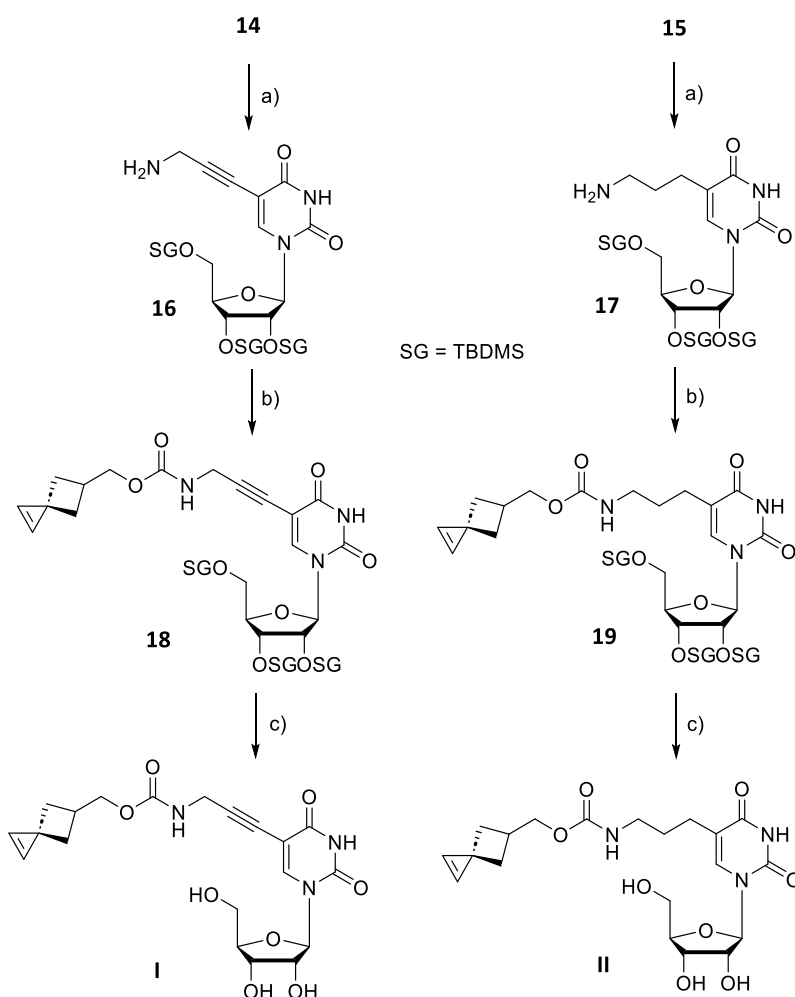


Abbildung 25 – Synthese von SPH-modifizierten Uridinen I und II. a) MeOH, 1 M NaOH, 3 h, RT, **16**: quant., **17**: quant.; b) Et₃N, DMF, **8**, 16 h, RT, **18**: 72 %, **19**: 38 %; c) THF, Et₃N·3HF, 16 h, RT, I: 70 %, II: quant.

Zur Synthese der SPH-modifizierten 7'-Deaza-2'-desoxyadenosine **III** und **IV** wurden die entsprechenden aminosubstituierten Bausteine **23** und **24** hergestellt (Abbildung 26). Diese wurden über eine bekannte Syntheseroute ausgehend von 6-Chlor-7-iod-7-deazapurin **21** und 1-Chloro-2-desoxy-3,5-di-O-toluoyl-D-ribofuranose, auch bekannt als „Hoffers Chlorzucker“ **20** erhalten.^[149] Dabei wurde **21** in MeCN gelöst und mit KOH und Tris[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]amin (TMEEA) versetzt. Nach Zugabe von **20** wurde die Reaktionslösung 3 h bei Raumtemperatur gerührt, mit heißem Aceton gewaschen und mit 7 M NH₃ 24 h bei 120 °C in einem Überdruckgefäß gerührt. Unter hohem Druck bei 120 °C in wässriger Ammoniaklösung erfolgte die Abspaltung der Toluoyl-Schutzgruppen und die Substitution des Halogens an der C6-Position durch ein primäres Amin. So konnte **22** in einer Ausbeute von 68 % erhalten werden.

Ergebnisse und Diskussion

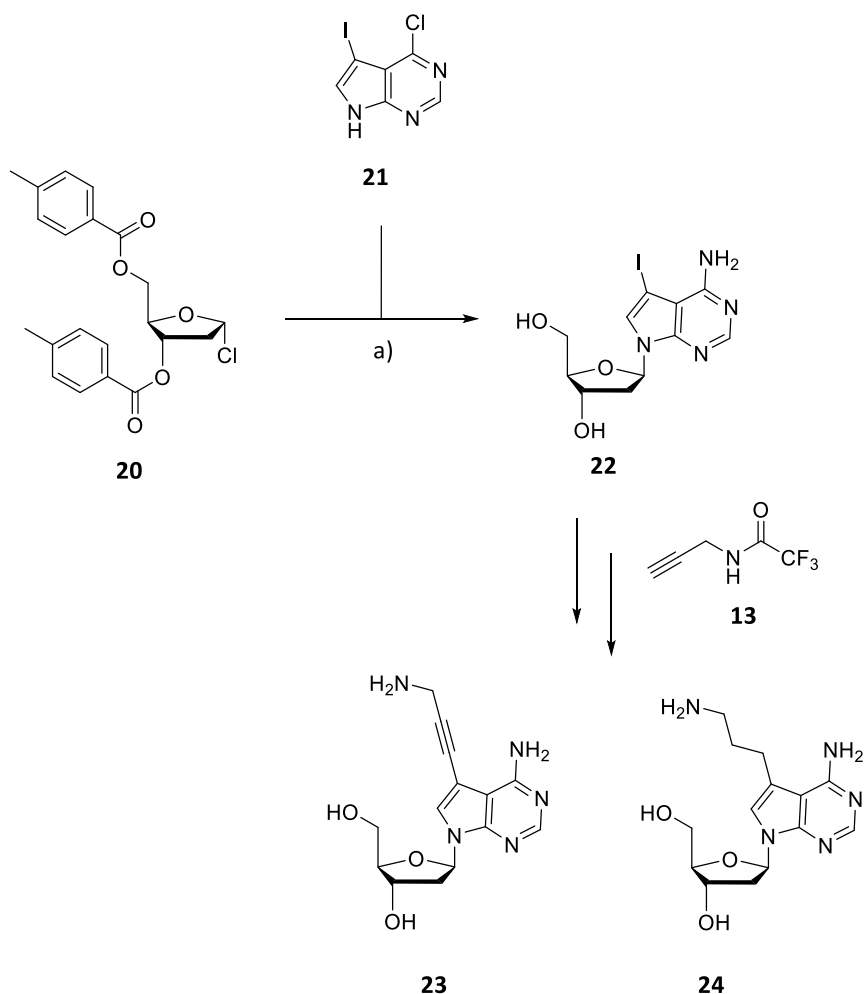


Abbildung 26 – Synthese der aminmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine **23** und **24**. a) MeCN, KOH, TMEEA, 3 h, RT, Aceton, 7 M NH₃, 24 h, 120 °C, 68 %.

Ausgehend von **22** wurde erfolgte zunächst eine Sonogashira-Kupplung mit dem TFAc-geschützten Propargylamin **13**. Nach anschließender Hydrierung des Alkins mit Wasserstoff wurden die TFAc-Schutzgruppen mittels wässriger NaOH-Lösung entfernt und die Nukleoside **23** und **24** erhalten. Ausgehend von **22** liegen die Ausbeuten mit 78 % über zwei Stufen für **23** und 77 % über drei Stufen für **24** in einem ähnlichen Bereich wie die der Uridine **16** und **17**.

Die 5-Aminpropyl-7-deaza-2'-desoxyadenosine **23** und **24** wurden analog zu Abbildung 25 in einer Amidkupplung mit **8** umgesetzt. Die Nukleoside wurden mit Triethylamin und **8** in trockenem DMF 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung konnten die SPH-modifizierten Nukleoside **III** und **IV** mit einer Ausbeute von 20 % und 33 % erhalten werden. Die schlechtere Ausbeute von 9 % über vier Stufen (**III**) und 15 % über fünf Stufen (**IV**) im Vergleich zu den Uridinen **I** und **II** lässt sich durch die fehlenden Schutzgruppen an den Hydroxygruppen sowie am freien Amin an der C6-Position erklären.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien **23** und **24** wurde auf das Einführen zusätzlicher Schutzgruppen verzichtet.

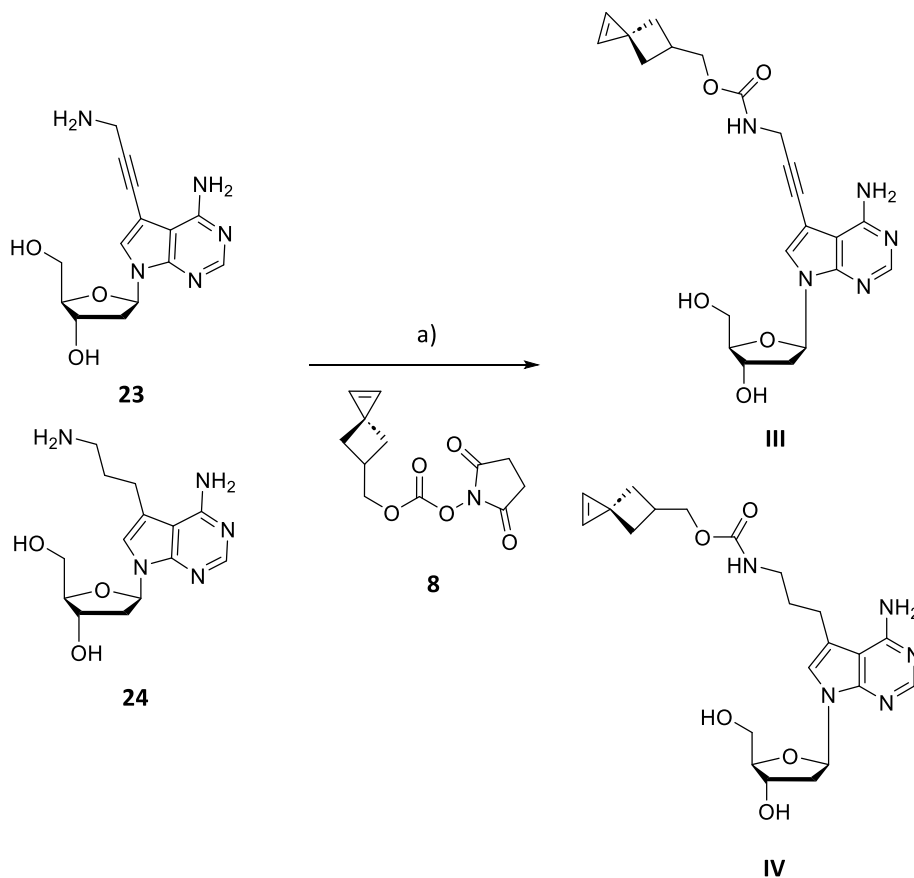


Abbildung 27 – Synthese der SPH-modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine **III** und **IV**. a) DMF, Et₃N, 16 h, RT, **III**: 20 %, **IV**: 33 %.

Um einen späteren Einfluss der fehlenden Hydroxygruppen der 7-Deaza-2'-desoxyadenosine **III** und **IV** im Vergleich zu den Uridinen **I** und **II** in iEDDA- und Photoclick-Reaktionen auszuschließen, wurde außerdem ein weiteres SPH-modifiziertes 7-Deazaadenosin **V** synthetisiert (Abbildung 28). Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 5-Iodtubercidin **25** wurde analog zu den vorherigen Synthesen die 2'-, 3'- und 5'-OH Gruppe zunächst mit TBDMS-Cl geschützt. Um nachfolgende Nebenreaktionen zu unterbinden, wurde ebenfalls das freie Amin an der C6-Position mit Dimethylformamid-dimethylacetal (DMF-DMA) geschützt. DMF-DMA wurde gewählt, da diese wie TFAC basenlabil ist und somit beide Schutzgruppen in der späteren Entschützung mit NaOH zeitgleich entfernt werden konnten. Das bereits TBDMS-geschützte Nukleosid **26** wurde in trockenem Methanol gelöst und mit DMF-DMA über Nacht bei 40 °C gerührt. Nach Aufarbeitung konnte das Nukleosid **27** mit einer Ausbeute von 86 % erhalten werden. Die nachfolgende Sonogashira-Kreuzkupplung und Entschützung der TFAC-

Gruppe erfolgte nach den gleichen Bedingungen wie mit den Uridin-Analoga. Nach der Amidkupplung des SPH-NHS-Esters **8** mit dem freien, aliphatischen Amin sowie der nachfolgenden Entschützung der TBDMS-Gruppen konnte das SPH-modifizierte Nukleosid **V** erhalten werden. Im Vergleich zu den 7-Deaza-2'-desoxyadenosinen **III** und **IV** konnte eine wesentlich bessere Ausbeute von 25 % über fünf Stufen erzielt werden.

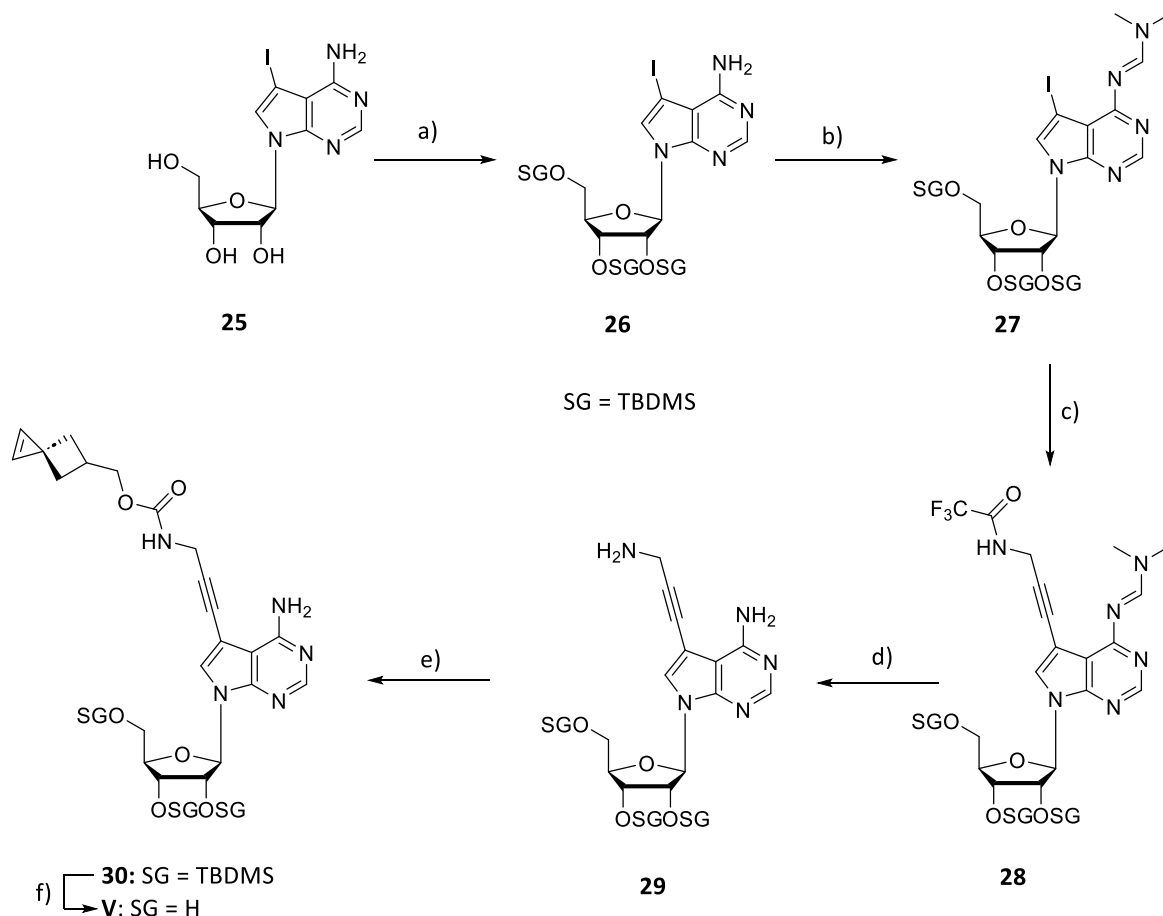


Abbildung 28 - Synthese des SPH-modifizierten 7-Deazaadenosins **V**, SG = TBDMS. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, 3 h, RT, 80 % b) MeOH, DMF-DMA, 16 h, 40 °C, 86 %; c) CuI, Et₃N, DMF, Pd(PPh₃)₄, **13**, 76 %; d) MeOH, NaOH, 16 h, RT, quant., e) DMF, Et₃N, **8**, 16 h, RT, 68 %; f) THF, Et₃N·3HF, 16 h, RT, 70 %.

Für die spätere metabolische Markierung sollten zusätzlich die Nukleoside **VI** und **VII** hergestellt werden, bei denen der chemische Reporter möglichst nahe an der Nukleobase positioniert ist (Abbildung 29). Hierfür wurden die bereits im Arbeitskreis vorhandenen Nukleoside benutzt, welche durch NICOLA SEUL (**31**) und MICHAELA MIJIC (**32**) synthetisiert wurden.^[98] So konnte direkt eine Amidkupplung mit dem SPH-NHS-Ester **8** durchgeführt werden. Hierfür wurde das Nukleosid **31** in trockenem DMF gelöst und mit Triethylamin versetzt. **8** wurde zur Reaktionslösung hinzugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung des Rohprodukts konnte **33** mit einer

Ausbeute von 82 % erhalten werden. Verbindung **34** wurde analog zu **33** durchgeführt, wurde aber wegen der geringen Menge an Ausgangsmaterial nicht aufgereinigt und deswegen sofort weiter umgesetzt. Die Entschützung der TBDMS-Gruppen erfolgte mit Hilfe von $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung konnte **VI** mit einer Ausbeute von 55 % und **VII** mit einer Ausbeute von 27 % über zwei Stufen erhalten.

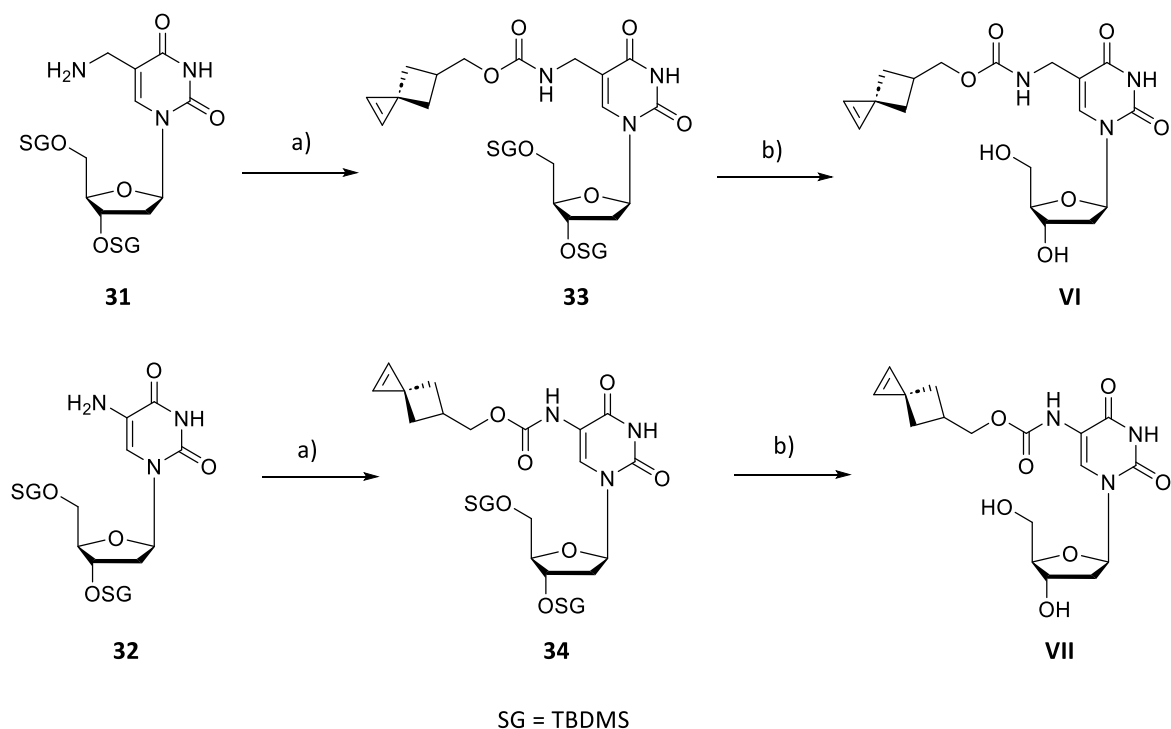


Abbildung 29 – Synthese SPH-modifizierter Nukleoside **VI** und **VII**. a) Et_3N , **8**, DMF, 16 h, RT, **33**: 83 %; b) THF, $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$, 16 h, RT, **VI**: 67 %, **VII**: 27% über zwei Stufen.

4.3 Charakterisierung der Nukleoside I-V mittels iEDDA-Reaktion *in vitro*

Die synthetisierten Nukleoside **I-V** wurden anschließend in einer iEDDA-Reaktion umgesetzt, um die Anwendungsmöglichkeiten von SPH als chemischen Reporter zu untersuchen. Für die nachfolgende Charakterisierung wurden im Arbeitskreis WAGENKNECHT speziell entwickelte Tetrazin-modifizierte Cyanin-Styryl-Farbstoffe für die iEDDA-Reaktionen verwendet. Diese von DR. PHILIPP GENG im Rahmen seiner Dissertation^[150] synthetisierten Tetrazin-Fluorophore bestehen aus einer methylysubstituierten Tetrazineinheit sowie schon vorher publizierten Fluoreszenzfarbstoffen im Emissionsbereich von 500-700 nm.^[151] Die Tetrazin-Fluorophore **A-D** (Abbildung 30) unterscheiden sich in der Anordnung des Stickstoffs in ortho- bzw. para-Position am Pyridin (**A** und **B**) sowie der angewinkelten Struktur am Indol (**C**) und einer

Chinolinium-Einheit anstelle des Pyridins (**D**), welche die Absorption sowie die Emission der Fluorophore bathochrom verschiebt. Sie zeichnen sich im Vergleich zu anderen Tetrazin-modifizierten Farbstoffen unter anderem durch ausgeprägte Stokes-Verschiebung von bis zu 0,77 eV, hohe Spezifität gegenüber DNA und hohe Stabilität in Wasser aus.^[55] Für biochemische Anwendungen sind vor allem große Stokes-Verschiebungen vorteilhaft, da sie eine deutliche Trennung der Emissionsbande von der Anregungswellenlänge ermöglichen. Dies minimiert das Risiko von Hintergrundsignalen, welche durch Streulicht oder Autofluoreszenz entstehen könnten. Zusätzlich verfügen die Fluorophore **A-D** über ein Fluoreszenzquenching durch das Tetrazin, welches bereits durch WEISSELER *et al.*^[152] und WOMBACHER *et al.*^[57] beschrieben wurde. Darüber hinaus bilden diese Fluorophore durch ihre speziellen Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit Methylenbrücken eine Zwei-Faktor-Fluorogenität aus (siehe Kapitel 2.2.1). Diese beiden Faktoren resultieren in einer signifikanten Fluoreszenzsteigerung nach erfolgter Click-Reaktion, weswegen die iEDDA-Reaktion durch Fluoreszenzmessung verfolgt werden kann. Ein weiterer Vorteil dieser Tetrazin-Fluorophore ist, dass bei späteren Experimenten *in cellulo* keine Waschschrte nach erfolgter Click-Reaktion notwendig sind.^[111]

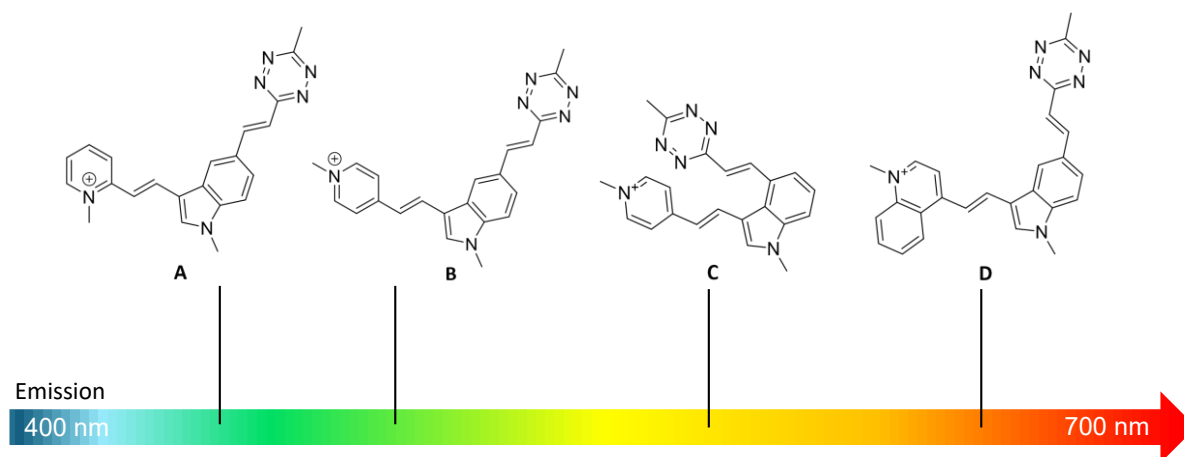


Abbildung 30 – Übersicht der Tetrazin-modifizierten Fluorophore **A-D** mit ihrer jeweiligen Emission.^[55]

Für eine Evaluation des Einflusses eingesetzter Nukleobasen bzw. der Linkerstruktur des Dienophils auf die Reaktivität und die Fluoreszenzsteigerung der einzelnen Nukleoside, wurde als Referenz zuerst iEDDA-Reaktionen mit SPH-OH **7** durchgeführt (Abbildung 31).

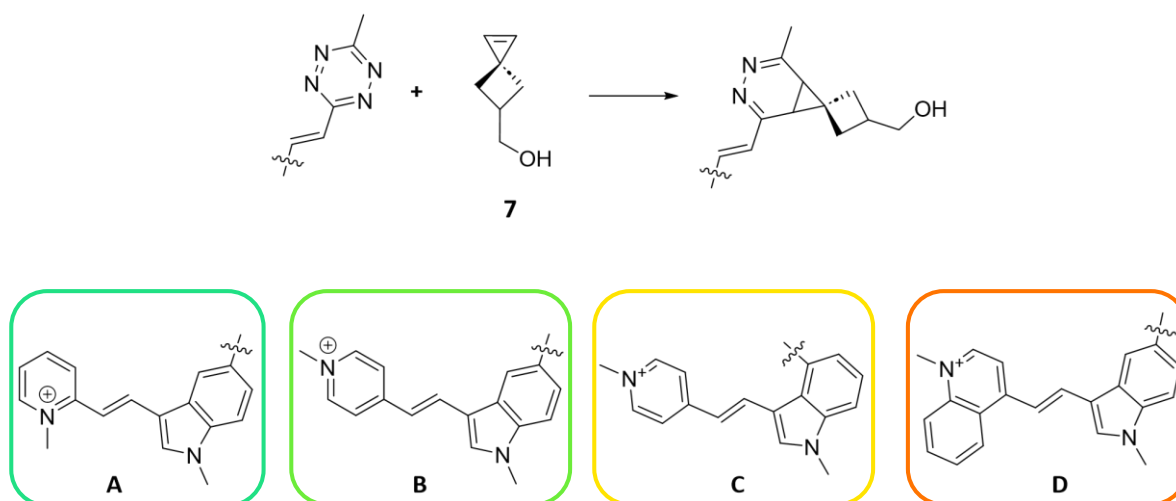


Abbildung 31 – Übersicht der iEDDA-Reaktionen der Tetrazin-Fluorophore **A-D** mit **7** zu den Click-Produkten **7+A-7+D**.

Um den Fortschritt der Reaktion zu verfolgen, wurde der Fluoreszenzanstieg (*Turn-On*) über Fluoreszenzspektroskopie gemessen. Der *Turn-On* wurde über das Verhältnis der integrierten Fluoreszenz nach der vollständigen Reaktion von **7** mit **A-D** zu der integrierten Fluoreszenz von nicht umgesetztem Fluorophor vor der Reaktion berechnet. Hierfür wurde eine Stammlösung von **7** sowie der Tetrazin-Fluorophore **A-D** in DMSO angefertigt. Um die Messergebnisse für die spätere Anwendung in biologischen Systemen vergleichbar zu halten, wurden alle Messungen in einem H₂O/DMSO-Gemisch im Verhältnis 99:1 (Vol%) durchgeführt. Die Durchführung in protischen Lösungsmitteln ist zudem vorteilhaft für die Geschwindigkeit der iEDDA-Reaktionen, da diese vor allem in wässriger Lösung schneller ablaufen.^[153] Um die Auswertung der Reaktionskinetik zu vereinfachen, wurde das Dienophil in fünffachem Überschuss hinzugegeben, sodass von einer Reaktionskinetik pseudo erster Ordnung ausgegangen werden kann. Ein Überschuss des Dienophils ist zudem für die vollständige Umsetzung der Farbstoffe essenziell, da nur so eine Endpunktbestimmung der Fluoreszenz und somit ein kompletter Umsatz erreicht werden kann. Abbildung 32 zeigt beispielhaft die Reaktion von **7** mit Tetrazin-Fluorophor **B** in einer iEDDA-Reaktion. Vor der eigentlichen Reaktion wurde zunächst die Eigenfluoreszenz des Tetrazin-Fluorophors **B** in Abwesenheit des Dienophils gemessen. Diese Messung dient als Referenz zur Bewertung der Fluoreszenzsteigerung in der anschließenden Reaktion zwischen **7** und **B**. Um die Genauigkeit der Ergebnisse sicher zu stellen, wurde vor jeder Messung die Eigenfluoreszenz des Fluorophors erneut aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

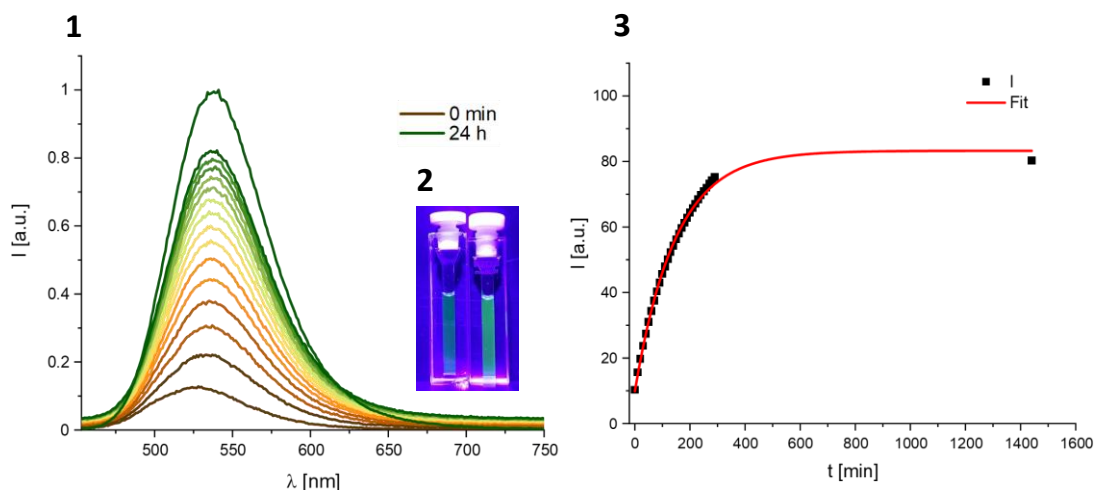


Abbildung 32 –Beispiel einer iEDDA-Reaktion zwischen **7** und **B**. 1) Anstieg der normierten Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm) während der Reaktion zwischen Dienophil **7** (100 μM , 5,00 $\text{\AA}\text{q}$) und Fluorophor **B** (20 μM , 1,00 $\text{\AA}\text{q}$) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%); 2) sichtbarer *Turn-On* Effekt, **B** vor Reaktion mit **7** (links) und nach Reaktion mit **7** (rechts); 3) kinetische Darstellung der Fluoreszenzsteigerung gegen die Zeit, exponentieller Fit, $y = a + b \exp(-k \cdot x)$.

Bei den erhaltenen Messungen lässt sich ein Fluoreszenzanstieg über 24 h spektroskopisch und optisch nachverfolgen (Abbildung 32, 1+2). Durch kontinuierliche Fluoreszenzmessung nach definierten Zeitintervallen konnte zusätzlich zu jeder Reaktion die Geschwindigkeitskonstante k_2 berechnet werden, indem die integrierten Flächen gegen die Zeit aufgetragen wurden (Abbildung 32, 3). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 ergibt sich aus der Krümmung der monoexponentiellen Fit-Funktion, indem unter Berücksichtigung der Konzentration des Dienophils k_2 errechnet wird (Für die Berechnung siehe Kapitel 6.4).

Tabelle 1: Übersicht der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F , Fluoreszenzsteigerungen und der Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Tetrazin-modifizierten Fluorophore **A-D** (20 μM) nach vollständigem Umsatz mit **7** (100 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%).

Fluorophor	Dienophil	Produkt	λ_{exc} [nm]	$\Phi_F^{[a]}$ [%]	<i>Turn-On</i>	k_2 [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
A	7	7+A	424	0,3	4	$0,97 \pm 0,04$
B	7	7+B	437	0,4	7	$1,10 \pm 0,03$
C	7	7+C	423	0,3	4	$0,60 \pm 0,01$
D	7	7+D	467	0,4	2	$2,65 \pm 0,20$

[a] Quantenausbeute, gemessen in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 99:1 (Vol%).

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, weisen alle Tetrazin-Fluorophore durch eine iEDDA-Reaktion mit **7** eine Fluoreszenzsteigerung im Vergleich zu ihrer Anfangsfluoreszenz auf. Den geringsten *Turn-On*-Wert von 2 zeigte SPH-OH **7** mit dem rot fluoreszierenden Fluorophor **D**, wohingegen ein *Turn-On* von 7 mit dem grünen Fluorophor **B** gemessen werden konnte. Dieser Trend konnte in der Literatur bereits beschrieben werden und lässt sich auf die

Überlappungsintegrale der Absorptionsbande des Methyltetrazins und der Emissionsbande der Farbstoffe zurückzuführen.^[150] So hat Fluorophor **B** das größte Überlappungsintegral, gefolgt von **A** und **C**, wohingegen **D** das geringste Überlappungsintegral aufweist. Größere Überlappungsintegrale deuten auf ähnliche Energieniveaus hin, wodurch es zu einem effizienteren Energietransfer vom Farbstoff-Donor auf den Tetrazin-Akzeptor kommt. Der effizientere Energietransfer verstärkt den fluoreszenzlöschenden Effekt, wodurch ein höherer *Turn-On* generiert wird. In der weiteren Betrachtung ist zu erkennen, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten im Bereich von $0,60\text{--}2,65\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ im unteren Bereich typischer iEDDA-Reaktionen liegen. Der Unterschied der Reaktionsgeschwindigkeiten kann mit dem unterschiedlichen sterischen Anspruch der Fluorophore erklärt werden. So zeigt Fluorophor **C** durch seine gewinkelte Struktur die geringste Geschwindigkeitskonstante, wohingegen die beiden grünen Fluorophore **A** und **B** durch ihren ähnlichen molekularen Aufbau fast identische Geschwindigkeitskonstanten von $0,97 \pm 0,04$ und $1,10 \pm 0,03\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ besitzen. Bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute konnten nur sehr geringe Werte bis 0,4 % gemessen werden. Die Ursachen hierfür sind zum einen die generell niedrigen Quantenausbeuten der Fluorophore **A-D** sowie das verwendete Lösungsmittelgemisch der Reaktion. Der hohe Wasseranteil darin fungiert als Fluoreszenzlöschler und reduziert somit die Fluoreszenzquantenausbeute.^[154]

Nachdem mit **7** und den Fluorophoren **A-D** eine Vergleichsbasis für weitere Experimente geschaffen wurde, wurden die in Abschnitt 4.2 synthetisierten Nukleoside unter den gleichen Bedingungen umgesetzt und spektroskopisch untersucht. Abbildung 33 zeigt beispielhaft die Umsetzung von Nukleosid **I** mit Fluorophor **B**.

Ergebnisse und Diskussion

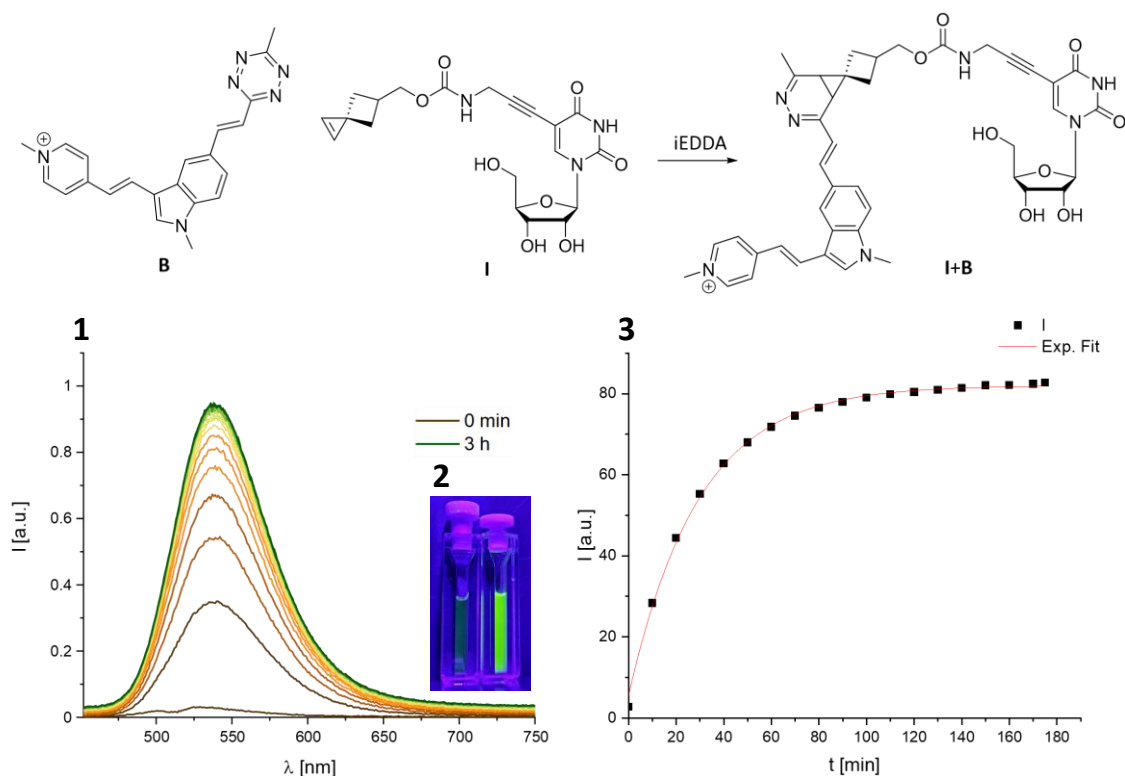


Abbildung 33 - Beispiel einer iEDDA-Reaktion zwischen **I** und **B**. 1) Anstieg der normierten Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$) während der Reaktion zwischen Dienophil **I** (100 μM , 5,00 \AA q) und Fluorophor **B** (20 μM , 1,00 \AA q) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%); 2) sichtbarer Turn-On-Effekt, **B** vor Reaktion mit **I** (links) und nach Reaktion mit **I** (rechts); 3) kinetische Darstellung der Fluoreszenzsteigerung gegen die Zeit, exponentieller Fit, $y = a + b \exp(-k \cdot x)$.

Nach fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu SPH-OH **7** in Reaktion mit **B** der Turn-On um über ein Vierfaches auf 30 anstieg, welcher optisch deutlich in der Küvette (Abbildung 33, 2) nachverfolgt werden konnte. Diese Fluoreszenzsteigerung kann mit der erhöhten sterischen Hinderung, den das Nukleosid als Reaktionspartner einnimmt, erklärt werden. Cyanin-Styryl-Fluorophore können im ungebundenen Zustand strahlungsfrei Energie durch Rotation entlang der zentralen Methylenbrücke abgeben und so nach Anregung vom angeregten Zustand in den Grundzustand übergehen. Eine Einschränkung der intramolekularen Rotation, beispielsweise durch den Einsatz viskoser Lösungsmittel oder sterisch gehinderter Reaktionspartner, verhindert die vibronische Relaxation und resultiert in einer erhöhten Fluoreszenzintensität.^[155]

Zudem kann festgestellt werden, dass die Reaktion deutlich schneller abläuft als die Vergleichsreaktion mit **7+B**. Die vollständige Umsetzung des Diens konnte bei Nukleosid **I+B** bereits nach drei h Reaktionszeit beobachtet werden, wohingegen bei **7+B** erst nach knapp 16 h ein vollständiger Umsatz des Diens erzielt werden konnte. Der Anstieg der

Geschwindigkeit ist zum einen auf die Carbamat-Funktion zurückzuführen, welche den Alkinlinker mit dem chemischen Reporter SPH verknüpft. Die elektronenschiebende Eigenschaft der Carbamat-Gruppe erhöht die HOMO-Energie des Dienophils. Dies resultiert in einer kleineren HOMO-LUMO-Lücke und erhöht dementsprechend die Reaktionsgeschwindigkeit der iEDDA-Reaktion. Ein weiterer Grund liegt in der Nukleobase, welche zusätzlich zu einer verringerten HOMO-LUMO-Lücke beiträgt.^[107]

Im Anschluss wurden die Nukleoside **I-V** mit den Fluorophoren **A-D** umgesetzt und ebenfalls fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (Tabelle 2). Im Vergleich zu **7+A** bis **7+D** fällt auf, dass bei den Fluoreszenzquantenausbeuten, vor allem bei den grün fluoreszierenden Fluorophoren **A** und **B**, deutlich höhere Werte von bis zu 2,3 % gemessen werden konnte. Insgesamt konnte eine bis zu siebenfachen Steigerung bei **I+B** im Vergleich zu **7+B** erreicht werden. Diese Werte korrelieren wie zu erwarten in einem allgemein gesteigerten *Turn-On* der Nukleoside mit den Fluorophoren. Bei den Fluorophoren **C** und **D** konnte nur eine minimale Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute beobachtet werden. Dieser Effekt ist vor allem für das rote Fluorophor **D** stark ausgeprägt. Es wurde bereits in der Literatur gezeigt, dass vor allem Wasser bei rot emittierenden Fluorophoren durch Energieübertragung des angeregten Fluorophors auf das Lösungsmittel zu einem Fluoreszenzquenching führt.^[156]

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2 Übersicht der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F , Fluoreszenzsteigerungen und der Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Tetrazin-modifizierten Fluorophore **A-D** (20 μ M) nach vollständigem Umsatz mit **I-V** (100 μ M) in H₂O/DMSO (99:1 Vol%).

Fluorophor	Dienophil	Produkt	$\Phi_F^{[a]}$ [%]	Turn-On	k_2 [$M^{-1}s^{-1}$]
A	I	I+A	0,9	11	$5,52 \pm 0,03$
B	I	I+B	2,3	30	$5,67 \pm 0,11$
C	I	I+C	0,5	23	$12,6 \pm 0,40$
D	I	I+D	0,3	19	$8,97 \pm 0,45$
A	II	II+A	0,5	10	$2,03 \pm 0,04$
B	II	II+B	0,1	27	$2,33 \pm 0,03$
C	II	II+C	0,4	14	$4,80 \pm 0,01$
D	II	II+D	0,4	6	$14,1 \pm 0,82$
A	III	III+A	0,6	13	$15,2 \pm 0,45$
B	III	III+B	0,5	31	$20,6 \pm 0,76$
C	III	III+C	0,4	38	$22,9 \pm 0,70$
D	III	III+D	0,3	14	$31,0 \pm 1,20$
A	IV	IV+A	0,4	10	$11,7 \pm 0,20$
B	IV	IV+B	1,4	16	$20,5 \pm 0,55$
C	IV	IV+C	0,3	23	$24,6 \pm 0,81$
D	IV	IV+D	0,4	4	$38,1 \pm 2,30$
A	V	V+A	0,6	18	$19,2 \pm 0,42$
B	V	V+B	0,7	37	$14,4 \pm 0,57$
C	V	V+C	0,5	36	$27,0 \pm 0,23$
D	V	V+D	0,3	14	$17,4 \pm 0,98$

[a] Quantenausbeute, gemessen in H₂O/DMSO 99:1 (Vol%).

Aus übersichtlichen Gründen wurde der *Turn-On* aus Tabelle 1 und Tabelle 2 in Abbildung 34 gegenübergestellt und die Werte gegenüber den Referenzwerten von **7+A** bis **7+D** verglichen.

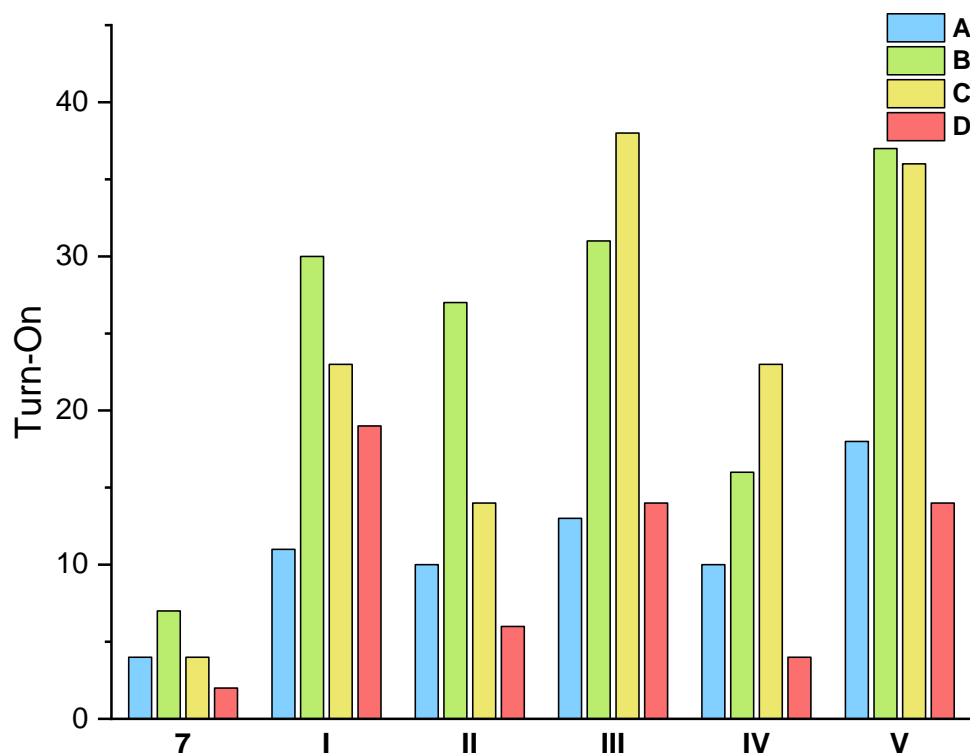


Abbildung 34 – *Turn-On*-Werte der Nukleoside I-V (100 μ M) nach vollständigem Umsatz mit A-D (20 μ M) in H₂O/DMSO (99:1 Vol%).

Im Allgemeinen lassen sich deutliche Steigerungen um das Zwei- bis Neunfache des *Turn-Ons* von I-V mit A-D im Vergleich zu 7+A bis 7+D feststellen und korreliert dabei mit der Erwartung eines verstärkten Fluoreszenzanstiegs der SPH-Nukleoside. Im nächsten Schritt wurden die Nukleoside I-V hinsichtlich des Einflusses der Linkerstruktur und der Nukleobasen auf den Fluoreszenzanstieg miteinander verglichen. Sowohl beim Vergleich von I und II mit A-D als auch bei III mit IV mit A-D konnte jeweils eine höhere Fluoreszenzsteigerung mit den starren Linkern erreicht werden. So konnte für das gelbe Fluorophor C in Reaktion mit I und II ein *Turn-On* von 23 bzw. 14 beobachtet werden. Noch deutlicher war der Unterschied bei III und IV, bei denen eine Fluoreszenzsteigerung von 38 bzw. 23 erreicht wurde. Ähnlich verhält sich der Unterschied bei Umsetzung mit dem Fluorophor D. So konnte bei der Reaktion mit I bzw. II eine Fluoreszenzsteigerung von 19 bzw. 6 und mit den Nukleosiden III und IV ein *Turn-On* von 14 bzw. 4 beobachtet werden. Bei der Betrachtung der Fluorophore A und B zeigt sich, dass der Unterschied in der Linkerstruktur weniger ausgeprägt ist als bei den gelben und roten Fluorophoren C und D. Dennoch konnten auch hier höhere *Turn-On*-Werte mit den starren Linkermolekülen im Vergleich zu den flexiblen erzielt werden. Bei der Gesamtbetrachtung der Fluoreszenzsteigerungen von III im Vergleich zu V, so sind die Unterschiede lediglich minimal. Dies korreliert mit der Annahme, dass die zusätzliche 2'-Hydroxygruppe des Nukleosids V

durch die räumliche Entfernung zum reaktiven Zentrum vernachlässigt werden kann. Der Einfluss der Nukleobasen auf die Fluoreszenzsteigerung zeigt hingegen unterschiedliche Verläufe. Die höchsten *Turn-On*-Werte wurden bei den flexiblen Linkerstrukturen (II und IV) mit SPH-modifiziertem Uridin II erzielt, wohingegen die starre Linkerstruktur (I, III und V) mit den 7-Deazaadenosinen III und V die höchste Fluoreszenzsteigerung aufwies. Eine Ausnahme stellt hierbei das Fluorophor C dar, das in Kombination mit Nukleosid II einen *Turn-On*-Wert von 14 erreichte, während das Nukleosid IV einen höheren Wert von 23 zeigte.

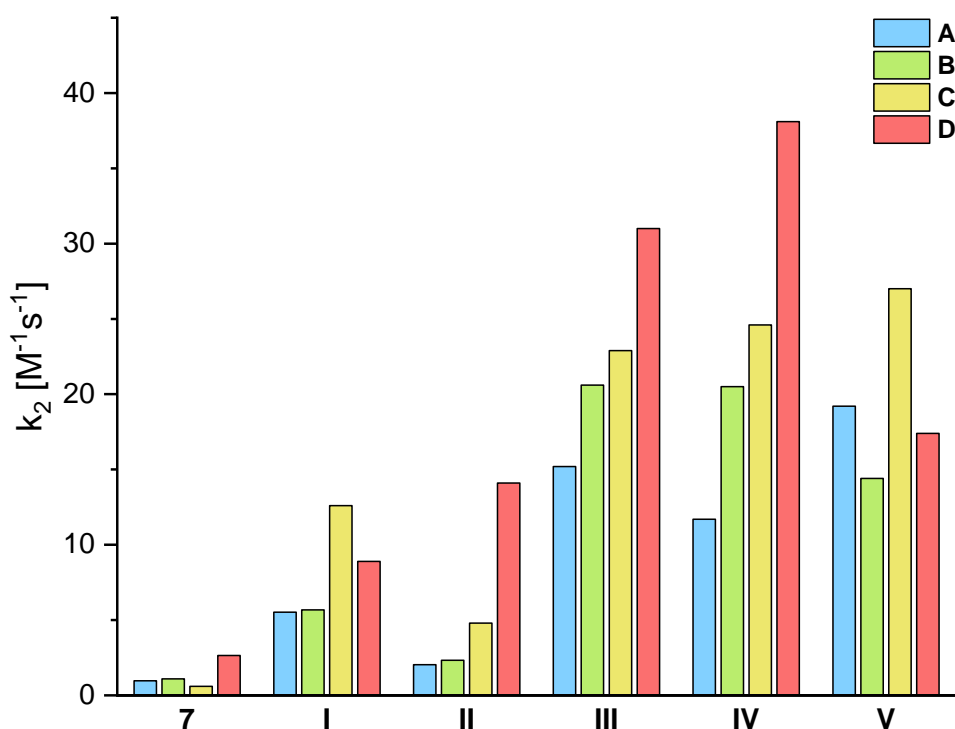


Abbildung 35 – Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 der Nukleoside I-V (100 μM) nach vollständigem Umsatz mit A-D (20 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%).

Im Anschluss wurden die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten miteinander verglichen (Abbildung 35). Auch hier zeigt sich ein allgemeiner Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten der Nukleoside I-V im Vergleich zu 7 um das Drei- bis 45-fache. Interessant ist die Beobachtung, dass im Gegensatz zu den Fluoreszenzanstiegen die Nukleobasen einen deutlich größeren Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben als die Linkersysteme. Bei den Uridinen I und II konnte mit Ausnahme des Fluorophors D eine schnellere Reaktion mit dem starren Linker I erzielt werden. Bei den 7-Deaza-2-desoxyadenosinen III, IV und dem 7-Deazaadenosin V konnte, ebenfalls mit Ausnahme des Fluorophors D, kein deutlicher Unterschied in den Linkersystemen erkannt werden. Im Vergleich der Nukleoside I und II zu III-V fällt jedoch auf, dass die Adenosin-Derivate deutlich höhere

Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erzielt. Die ausgewerteten Daten sind im Vergleich zu den Uridinen um das bis zu Neunfache größer. Grund hierfür ist bei den Adenosin-Derivaten die geringere HOMO-LUMO Lücke, welche die Reaktivität beschleunigt.^[157]

Beim Vergleich der Nukleoside **I-V** im Hinblick auf Fluoreszenzsteigerung und Reaktionsgeschwindigkeit fällt auf, dass Nukleosid **II** durch den flexiblen Linker sowie Uridin als Nukleobase die geringste Effizienz aller getesteten Linker-Nukleobasen-Konjugaten aufweist. Im Gegensatz dazu weisen Nukleoside **I** und **IV** eine verbesserte Linker-Nukleobasen-Effizienz mit den Fluorophoren **A-D** auf. Die Kombination aus starrem Linker und Uridin als Nukleobase bei **I** führte zu hohen *Turn-On*-Werten, zeigte jedoch im Vergleich eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit, was bei **IV** genau in entgegengesetzter Weise bewertet werden kann. **IV** konnte durch die Nukleobase Adenosin schnelle Reaktionsgeschwindigkeiten erzielen, durch das flexible Linkersystem dennoch nur einen geringeren *Turn-On*. Als effizienteste Kombination haben sich die Adenosin-Derivate mit starrem Linker **III** und **V** herausgestellt. Diese lieferten die höchsten Fluoreszenzanstiege sowie mit Ausnahme von **IV+D** die höchste Reaktionskinetik aller untersuchten Nukleoside. Diese Erkenntnisse sollten weiterführend bei der Synthese von Oligonukleotiden für weitere spektroskopische Untersuchungen angewendet werden. In Abbildung 36 sind exemplarisch die optischen Fluoreszenzunterschiede von Nukleosid **III** mit den Fluorophoren **A-D** vor und nach der vollständigen Umsetzung mit dem Dien gezeigt.

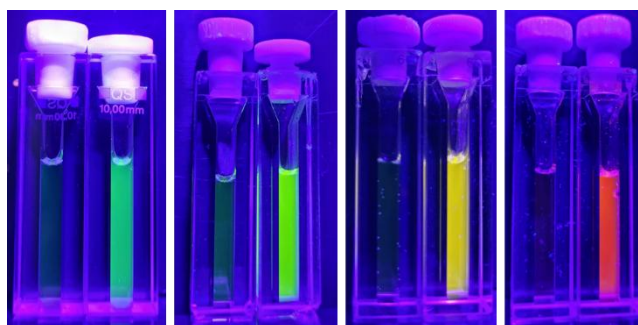


Abbildung 36 – Optisch sichtbare Fluoreszenzsteigerung der Fluorophore **A-D** nach vollständigem Umsatz mit **III** durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 395 nm (von links nach rechts). Die linken Küvetten repräsentieren jeweils das Fluorophor ohne Dienophil, die rechte Küvette nach Umsetzung mit Dienophil **III**.

4.4 Synthese SPH-modifizierter Oligonukleotide

Nach der Charakterisierung der Nukleoside **I-V** *in vitro* mit den Fluorophoren **A-D** erfolgte die Synthese von SPH-modifizierten Oligonukleotiden, um den chemischen Reporter SPH sowohl *in vitro* als auch später *in cellulo* weiter zu untersuchen.

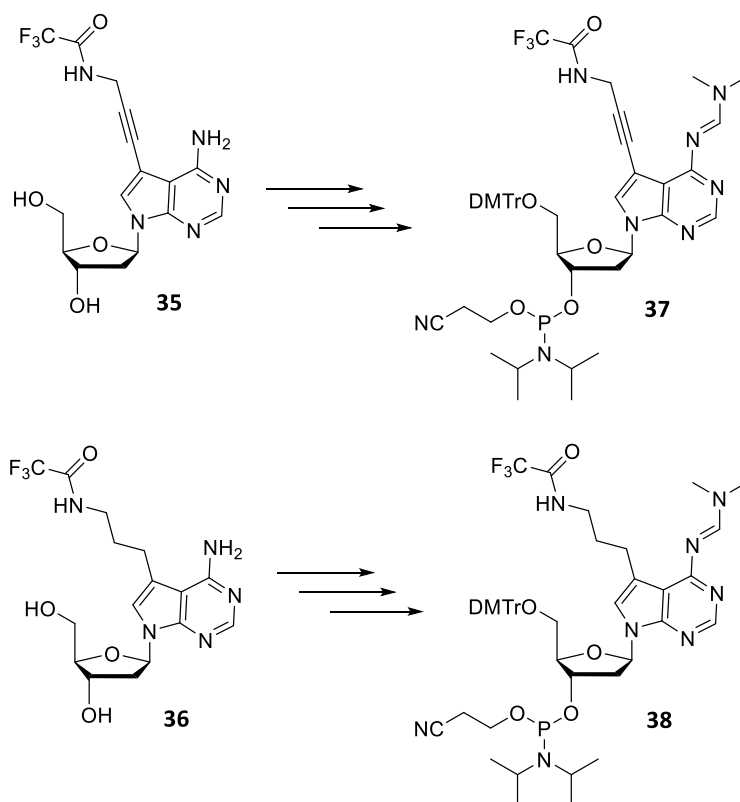


Abbildung 37 – Synthese der aktivierten Phosphoramidite **37** und **38**.

Da Nukleosid **III** *in vitro* mit **A-D** als effizienteste Linker-Nukleobasen-Konjugat identifiziert wurde, wurden Oligonukleotidstränge mit einem modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosin mit starrem Linker synthetisiert. Zusätzlich sollte noch eine flexible Linkerstruktur in die DNA integriert werden, um in den folgenden Experimenten eine umfassende Vergleichbarkeit der DNA-Stränge sicherzustellen.

Es wurden analog zur Syntheseroute von Abbildung 26 die 7-Deaza-2'-desoxyadenosine **35** und **36** hergestellt (Abbildung 37). Die TFAc-Gruppe am Linker wurde jedoch nicht entschützt, da eine postsynthetische Modifikation mit dem SPH-NHS-Ester **8** erfolgen sollte. Es wurde ein im Arbeitskreis WAGENKNECHT etabliertes Standard-Festphasensynthese-Protokoll verwendet, um DNA-Einheiten mit 17 Basenpaaren herzustellen.^[158] Hierfür musste das freie Amin der Purinbase zunächst mit DMF-DMA geschützt sowie die 5'-Hydroxygruppe mit einer Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) versehen werden. Im letzten Schritt wurde die

3'-Hydroxygruppe der 7-Deaza-2'-desoxynukleoside durch nukleophile Substitution mit DIPEA und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit zu **37** und **38** umgesetzt. Aufgrund der geringen Stabilität der Phosphoramiditgruppen wurden die Nukleoside **37** und **38** sofort durch automatisierte DNA-Synthese zu den DNA-Strängen **DNA1** und **DNA2** umgesetzt (Abbildung 38). Die DNA-Sequenz wurde dabei aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT entnommen.^[159] Die DNA-Stränge **DNA1** und **DNA2** wurden anschließend mittels DMT-Affinitätssäulen aufgereinigt. Die postsynthetische Modifikation der Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des SPH-NHS-Esters **8**. Dabei wurden die DNA-Stränge **DNA1** und **DNA2** in DMSO gelöst und mit einem Überschuss von 10,0 Äquivalenten **8** sowie DIPEA in einem Mikroreaktionsgefäß für 16 h bei Raumtemperatur zu **DNA3** und **DNA4** umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte anschließend mittels RP-HPLC und die DNA-Stränge wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen (siehe Kapitel 6.3.1).

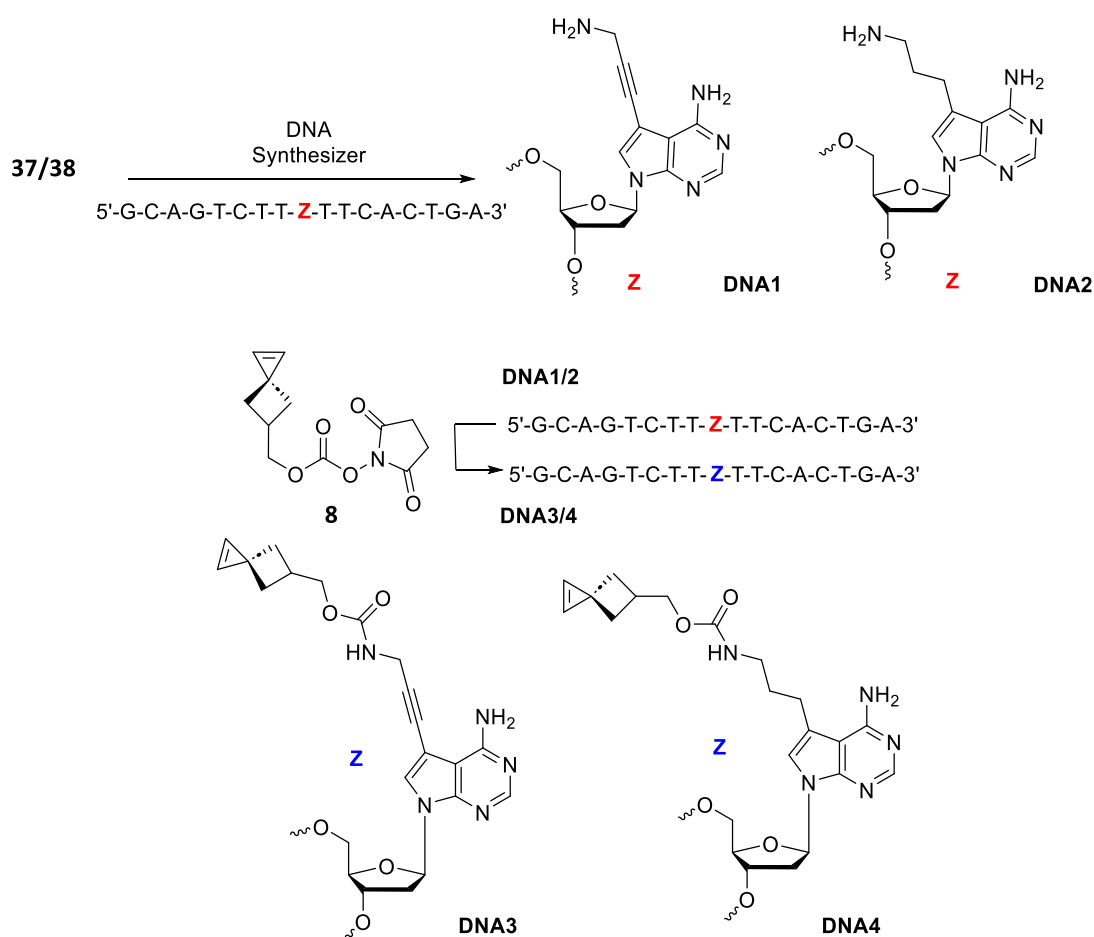


Abbildung 38 – Synthese der SPH-modifizierten DNA-Stränge **DNA3** und **DNA4** mittels postsynthetischer Modifikation von **DNA1** und **DNA2** mit **8**.

Ergebnisse und Diskussion

Um zusätzlich die iEDDA-Reaktion mit doppelsträngiger DNA zu untersuchen, wurde ein komplementärer DNA-Gegenstrang synthetisiert und **DNA3** mit diesem hybridisiert. Hierfür wurde **DNA3** mit 1,20 Äquivalenten des Gegenstrangs für 10 min bei 90 °C erhitzt und langsam über Nacht abgekühlt. Der Erfolg der Hybridisierung wurde anschließend über die Schmelztemperatur der doppelsträngigen **dsDNA3** bestimmt (Kapitel 6.3.1).

4.5 Charakterisierung SPH-modifizierter DNA mittels iEDDA-Reaktion *in vitro*

Die Charakterisierung der SPH-modifizierten Oligonukleotide **DNA3**, **DNA4** und **dsDNA3** wurde analog zu den Experimenten in Kapitel 4.3 durchgeführt. Da für die iEDDA-Experimente eine geringere Stoffmenge zur Verfügung stand als für die Charakterisierung der Nukleoside **I-V**, mussten die Ansatzgrößen dementsprechend reduziert werden. Die Konzentrationen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Um die Vergleichbarkeit mit den Nukleosid-Experimenten zu gewährleisten, wurde das Verhältnis zwischen Fluorophor und Dienophil weiterhin bei 1:5 gehalten sowie der DMSO-Anteil bei 1 %.

Tabelle 3: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F und *Turn-On*-Werte der SPH-modifizierten Oligonukleotide **DNA3** und **DNA4** (10 μ M) nach vollständigem Umsatz mit **A-D** (2 μ M) in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) sowie **dsDNA3** (10 μ M) nach vollständigem Umsatz mit **A-D** (2 μ M) in H₂O/DMSO (99:1 Vol%, 250 mM NaCl, 10 mM NaP_i-Puffer).

Fluorophor	Dienophil	Produkt	$\Phi_F^{[a]}$ [%]	<i>Turn-On</i>
A	DNA3	DNA3+A	3,6	69
B	DNA3	DNA3+B	4,2	120
C	DNA3	DNA3+C	2,0	130
D	DNA3	DNA3+D	1,8	60
A	DNA4	DNA4+A	2,7	48
B	DNA4	DNA4+B	3,6	58
C	DNA4	DNA4+C	1,6	89
D	DNA4	DNA4+D	1,2	42
A	dsDNA3	dsDNA3+A	6,9	113
B	dsDNA3	dsDNA3+B	8,5	245
C	dsDNA3	dsDNA3+C	4,0	251
D	dsDNA3	dsDNA3+D	1,6	90

[a] Quantenausbeute, gemessen in H₂O/DMSO 99:1 (Vol%).

Bei den iEDDA-Reaktionen der SPH-modifizierten Oligonukleotide konnten deutlich höhere Fluoreszenzquantenausbeuten als bei ihren entsprechenden Nukleosid-Analoga gemessen werden (Tabelle 3). So konnten für **DNA3** und **DNA4** im Vergleich zu den Nukleosiden **III** und **IV** eine drei- bis achtfache Steigerung gemessen werden. Die doppelsträngige **dsDNA3** zeigt zudem nochmal insgesamt eine Verdopplung der Fluoreszenzquantenausbeute im Vergleich zum Einzelstrang **DNA3**. Dieser deutliche Anstieg kann auch hier wieder über den gesteigerten sterischen Anspruch der Oligonukleotide im Vergleich zu den Nukleosiden erklärt werden. Die

DNA-Stränge führen durch Anlagerung von **A-D** zu einer weiteren Einschränkung der Rotationsfreiheit der Fluorophore und damit zu einer weiteren Verringerung der vibronischen Relaxation aus dem ersten angeregten Zustand. Diese Werte korrelieren mit dem allgemein gesteigerten *Turn-On* der Oligonukleotide.

Wird zunächst der Fluoreszenzanstieg des 7-Deaza-2'-desoxyadenosins mit flexiblem Linker **IV** mit der entsprechenden **DNA4** verglichen, fällt zuerst der größere *Turn-On* aller vier Fluorophore auf (Abbildung 39). So konnte ein 2,5-facher Fluoreszenzanstieg von 16 (**IV+B**) auf 58 (**DNA4+B**) und ein bis zu 9,5-facher Anstieg von 4 (**IV+D**) auf 42 (**DNA4+D**) erzielt werden. Zudem konnte auch eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzerhöhung mit dem gelben Fluorophor von 23 (**IV+C**) auf 89 (**DNA4+C**) beobachtet werden. Diese deutlichen Anstiege können durch den größeren Einfluss der räumlichen Einschränkung durch die DNA-Stränge erklärt werden. Vor allem bei Fluorophor **C** können die hohen Fluoreszenzsteigerungen zusätzlich zu dem großen Überlappungsintegral^[150] auch auf die gewinkelte Tetrazinfunktionalität an der 4-Position zurückgeführt werden. Die prozentual hohen Fluoreszenzanstiege mit Fluorophor **D** können dabei auf eine sterisch gehinderte Struktur durch die Chinolinium-Gruppe erklärt werden. Ähnlich verhält es sich im Vergleich von Nukleosid **III** mit **DNA3**. Auch hier konnte eine deutliche Steigerung des *Turn-Ons* um das Vierfache auf 69 (**III+A** vs. **DNA3+A**) beobachtet werden. Die größte Fluoreszenzsteigerung wurde mit **DNA3+C** erzielt, wobei ein Anstieg von 130 im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz des Fluorophors verzeichnet werden konnte. Ebenso konnte ein *Turn-On* von 120 mit dem grünen Fluorophor **B** erreicht werden. Wie bei den Nukleosiden **III** und **IV** lässt sich der allgemeine Trend beobachten, dass **DNA3** mit starrem Linker im Vergleich zu **DNA4**, welche einen flexiblen Linker trägt, insgesamt höhere Fluoreszenzsteigerungen mit allen getesteten Fluorophoren erzielte. So kann auch hier davon ausgegangen werden, dass das Linkersystem großen Einfluss auf die *Turn-On*-Werte der DNA hat.

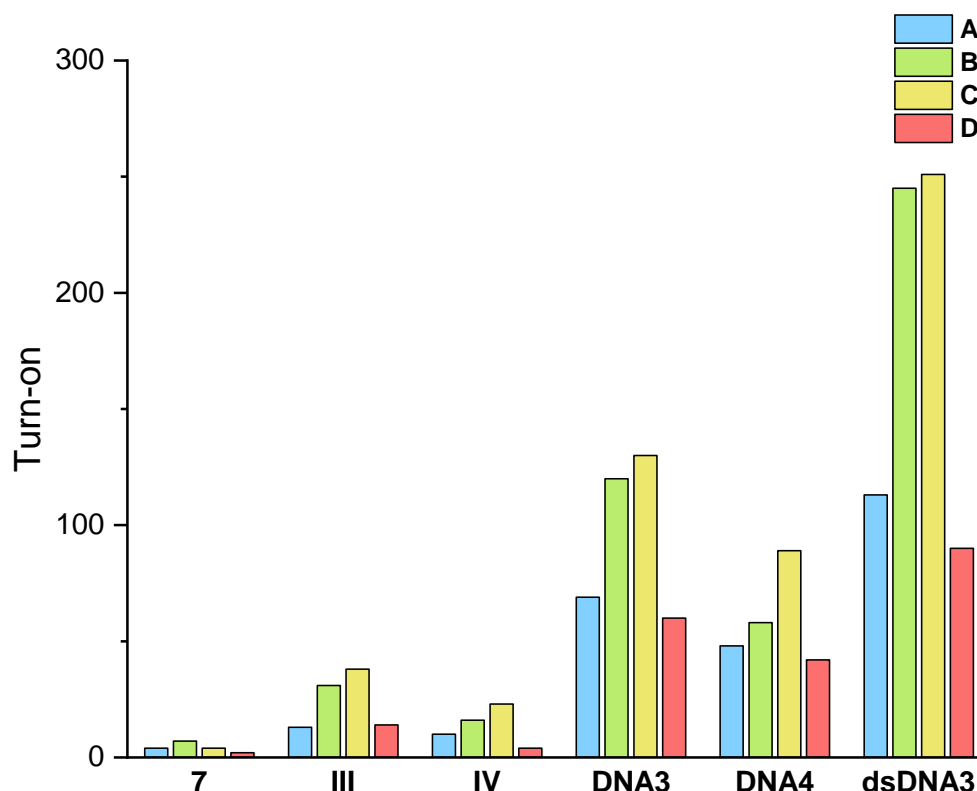


Abbildung 39 – Vergleich der *Turn-On*-Werte zwischen **7**, den Nukleosiden **III** und **IV** (jeweils 100 μ M in H₂O/DMSO, 99:1 Vol%), den DNA-Strängen **DNA3**, **DNA4** (jeweils 10 μ M in H₂O/DMSO, 99:1 Vol%) und **dsDNA3** (10 μ M in H₂O/DMSO, 99:1 Vol%, 250 mM NaCl, 10 mM NaP_i-Puffer) nach vollständiger Umsetzung mit den Fluorophoren **A-D** (20/2 μ M).

In Abbildung 39 sind die *Turn-On*-Werte der SPH-modifizierten DNA-Stränge mit den SPH-modifizierten Nukleosiden **III** und **IV** sowie SPH-OH **7** gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzsteigerungen mit doppelsträngiger **dsDNA3** im Vergleich zur einzelsträngigen **DNA3** nochmal erheblich ansteigen. So konnte bei **dsDNA3+B** bzw. **D** ein *Turn-On* von 245 bzw. 251 erreicht werden, was einen Anstieg um den Faktor 35 bzw. 63 im Vergleich zu SPH-OH **7** darstellt.

Anders als bei den Reaktionen zwischen SPH-OH **7** und den Nukleosiden **I-V** mit den Fluorophoren **A-D**, konnte bei den SPH-modifizierten Oligonukleotiden keine aussagekräftige Geschwindigkeitskonstante ermittelt werden. Grund hierfür war, dass anders als bei den Reaktionen mit den Nukleosiden **I-V** oder **7** kein deutlicher Fluoreszenzanstieg bei Raumtemperatur beobachtet werden konnte. Ein geringer *Turn-On* konnte direkt nach der Zugabe der Reaktanden gemessen werden, was jedoch ausschließlich auf die nicht kovalente Vorkoordination zwischen der negativ geladenen DNA und den positiv geladenen Fluorophoren zurückzuführen ist.^[54] Eine Hypothese lautet, dass der relativ kleine chemische Reporter SPH eine so enge Konformation in der DNA-Lösung induziert, dass keine Reaktion

zwischen SPH und den Fluorophoren **A-D** stattfinden kann. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass auch nach mehreren Stunden bei Raumtemperatur keine Fluoreszenzsteigerung gemessen werden konnte. Durch kurzzeitige Erwärmung der SPH-modifizierten DNA und der Fluorophoren auf 60 °C konnte nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur ein deutlicher *Turn-On* detektiert werden. Die externe Wärmezufuhr bewirkt eine Entfaltung der DNA-Konformation, wodurch die Reaktion zwischen dem Dien und dem Dienophil ermöglicht wurde. Nach wiederholtem Erwärmen und Erkalten auf Raumtemperatur wurden die Fluoreszenzsteigerungen, wie in Tabelle 3 dargestellt, ermittelt. Aussagen zu Reaktionsgeschwindigkeiten konnten jedoch nicht präzise getroffen werden. Es wird angenommen, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten sich um den Bereich 10^4 - 10^5 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bewegen,^[55] da vergleichbare Experimente mit BCN-modifizierter DNA und den Fluorophoren **A-D** eine Reaktionsgeschwindigkeit von bis zu $k_2 = 284.000$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufwiesen.^[54]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Nukleosid **III** als bestes Linker-Nukleobasen-Konjugat hinsichtlich Reaktivität und Fluoreszenzsteigerung die besten Ergebnisse mit den Fluorophoren **B** und **C** erzielte. Durch den erhöhten sterischen Anspruch der anschließend synthetisierten Oligonukleotide konnten *Turn-On*-Werte von bis zu 251 (**dsDNA3+C**) verzeichnet werden. Um weitere Erkenntnisse über die Reaktivität SPH-modifizierter Nukleoside zu erhalten, sollen diese im folgenden Kapitel mit Tetrazolen in einer Photoclick-Reaktion untersucht werden.

4.6 Charakterisierung modifizierter Nukleoside mittels Photoclick-Reaktion

4.6.1 Photoclick-Reaktion mit 2-(4-Methoxyphenyl)-5-phenyl-2*H*-tetrazol

In den vorherigen Kapiteln wurde die Reaktivität von SPH-modifizierten Nukleosiden und Oligonukleotiden mit Tetrazin-modifizierten Cyanin-Styryl-Fluorophoren untereinander verglichen. Dieses Kapitel konzentriert sich auf den Vergleich des SPH-modifizierten Nukleosids **1** mit anderen im Arbeitskreis WAGENKNECHT etablierten Nukleosiden, welche mittels Photoclick-Reaktion mit einem in der Literatur oft genutztem Tetrazol umgesetzt wurden.^[160] Das Ziel dieser Experimente ist es, das SPH-modifizierte Nukleosid **1** zu charakterisieren und gegenüber den etablierten modifizierten Nukleosiden **39** und **40** zu bewerten (Abbildung 40). In den folgenden Analysen soll besonderen Wert auf die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten gelegt werden, um das Potenzial von Nukleosid **1** in einer Photoclick-Reaktion zu evaluieren. Als Referenz wurde das 3-Methylcyclopropen-modifizierte Nukleosid **39** gewählt, da es große strukturelle Ähnlichkeiten mit SPH aufweist und kürzlich erfolgreich mittels Photoclick-Reaktion in metabolischen Markierungsexperimenten nachgewiesen wurde.^[98] Zusätzlich wurde ein BCN-modifiziertes Nukleosid **40** zum Vergleich herangezogen, da diese Modifikation außergewöhnlich hohe Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in Photoclick-Reaktionen ($k_2 = 39.200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) erreicht.^[161] Allerdings ist BCN aufgrund seiner großen sterischen Hinderung für eine spätere zelluläre Anwendung mittels metabolischer Markierung weniger geeignet. Bislang wurde BCN lediglich in Markierungsexperimenten verwendet, bei denen BCN-modifizierte Nukleoside oder Triphosphate mit Hilfe von Transporter in die Zelle eingebracht wurden.^[117] Die Nukleoside **39** und **40** wurde von EILEEN LIST aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT zur Verfügung gestellt.

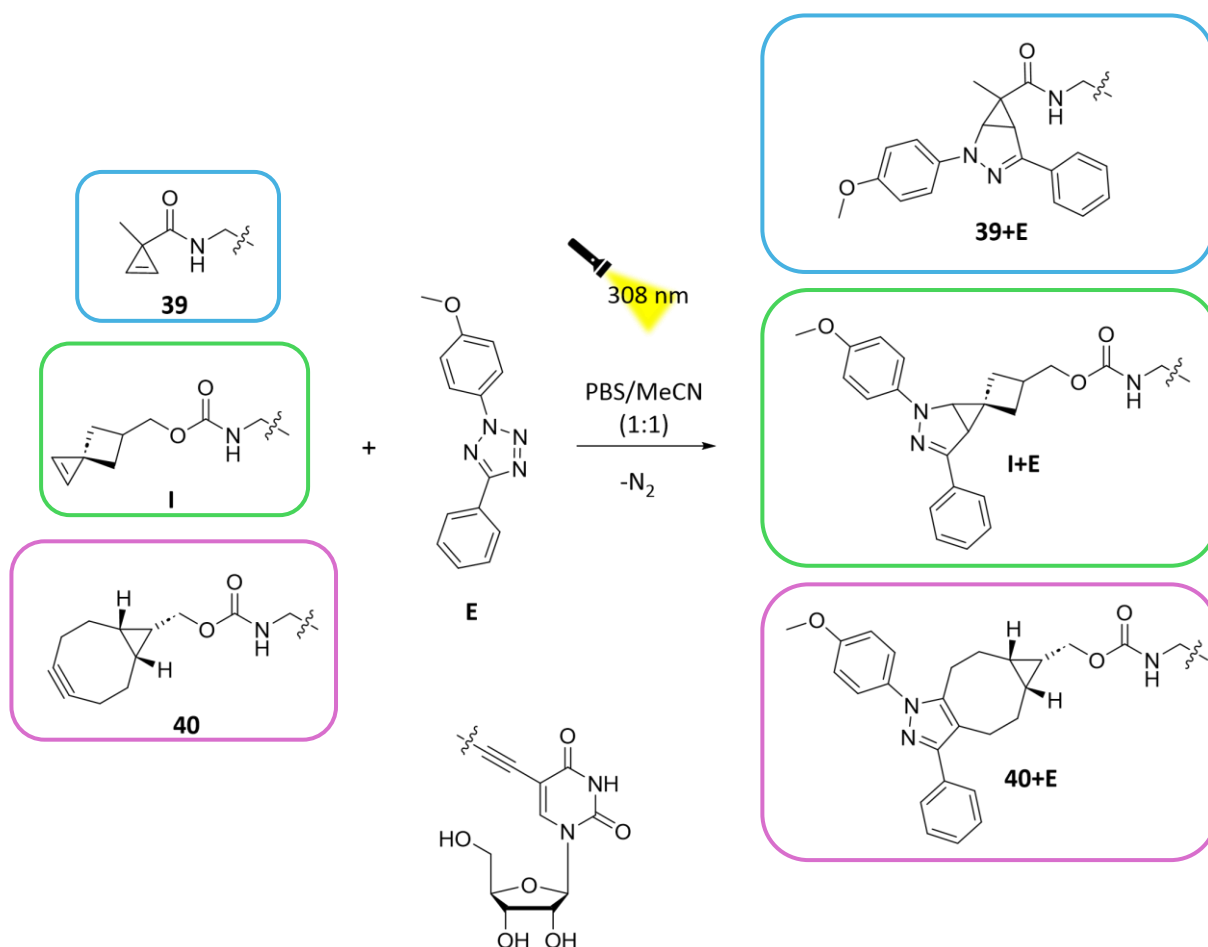


Abbildung 40 – Reaktion der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside **39**, **I** und **40** (jeweils 500 μ M) mit Tetrazol **E** (100 μ M) zu den Produkten **39+E**, **I+E** und **40+E** unter Belichtung mit einer 308 nm LED in PBS/MeCN 1:1. Aus übersichtlichen Gründen ist bei Photoclick-Produkt **I+E** nur eines der beiden entstehenden Diastereomere gezeigt.

Zur Untersuchung der Photoclick-Reaktion wurde das jeweilige Nukleosid sowie das Tetrazol **E** in einem Verhältnis von 5:1 in eine Küvette mit einem 1:1 Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gegeben und mit einer 308 nm LED mit einer Leistung von 235 μ W für verschiedene Reaktionsdauern (0 – 320 s) belichtet. Wie bei den iEDDA-Experimenten wurde auch hier das Dienophil in fünffachem Überschuss hinzugegeben, sodass von einer Reaktionskinetik pseudo erster Ordnung ausgegangen werden kann. Anschließend wurde mittels RP-HPLC die Reaktion analysiert. Um apparative Schwankungen in der Analyse auszugleichen, wurde der Reaktionsmischung zusätzlich Thymidin (500 μ M) als interner Standard (IS) zugesetzt.

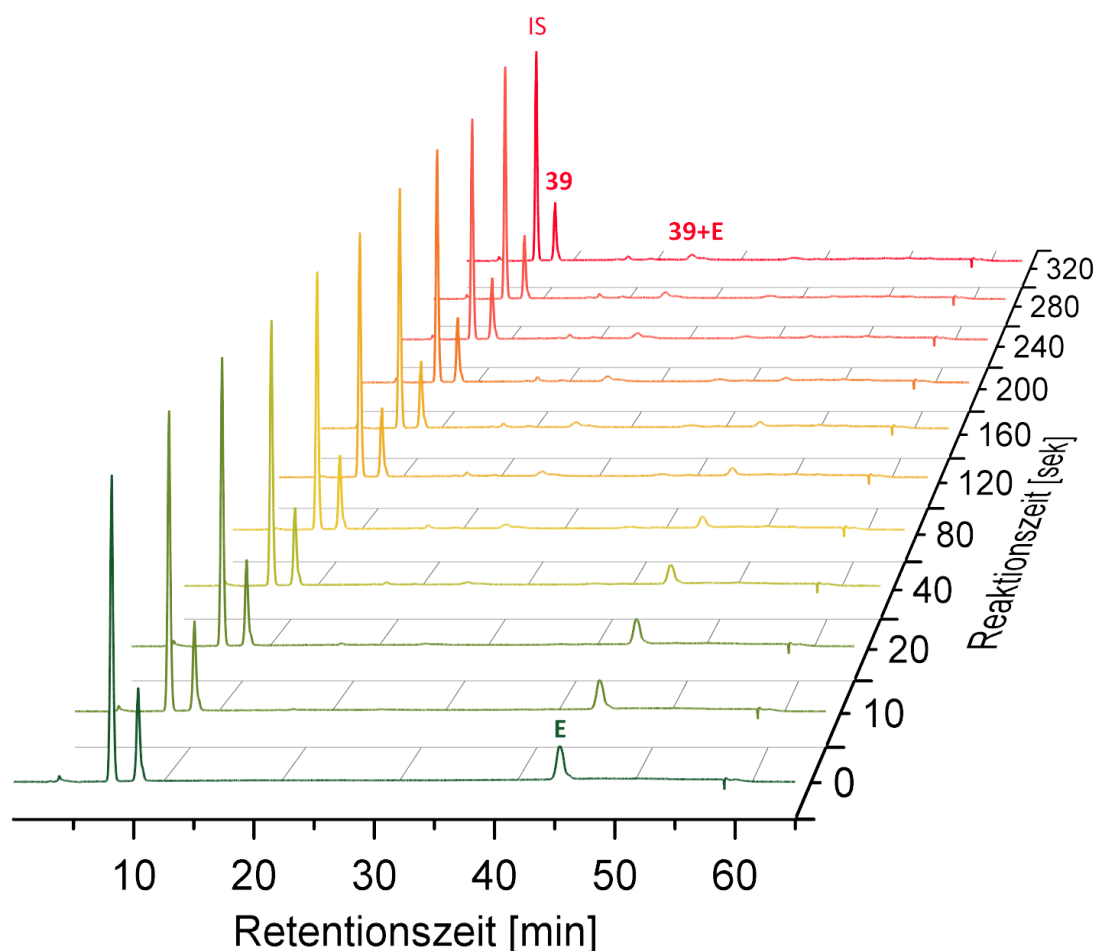


Abbildung 41 – Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion von Nukleosid **39** (500 μM) und Tetrazol **E** (100 μM) zu Photoclick-Produkt **39+E** in PBS/MeCN 1:1 nach Belichtung mit einer 308 nm LED für insgesamt 320 Sekunden. Analyse *via* RP-HPLC.

Das Chromatogramm der Reaktionsmischung von **39** und **E** zeigt im Vergleich zu den Chromatogrammen der Edukte einen neuen Peak bei 26,5 min (Abbildung 41). Dieser konnte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie dem Reaktionsprodukt **39+E** zugeordnet und somit eine erfolgreiche Click-Reaktion nachgewiesen werden. Zusätzlich ist zu erkennen, dass der Peak des Nukleosids bei 10,5 min kontinuierlich abnimmt. Der Tetrazol-Peak von **E** bei 45,5 min ist nach 320 s Reaktionszeit komplett verschwunden, was auf eine vollständige Reaktion des Tetrazols zurückzuführen ist. Der Peak des internen Standards bei 8 min ist, wie zu erwarten, unverändert während der gesamten Reaktionsdauer. Ein kleinerer Peak 19 min konnte nicht vollständig zugeordnet werden, es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich um ein Hydrolyseprodukt des Tetrazols **E** handelt. Durch die Integration der Flächen unter den Peaks wurde das zeitliche Integral des Produkts bestimmt. Durch Auftragen dieser Werte gegen die Reaktionszeit konnte eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k_2 = 23,4 \pm 0,80 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden (siehe Tabelle 4).

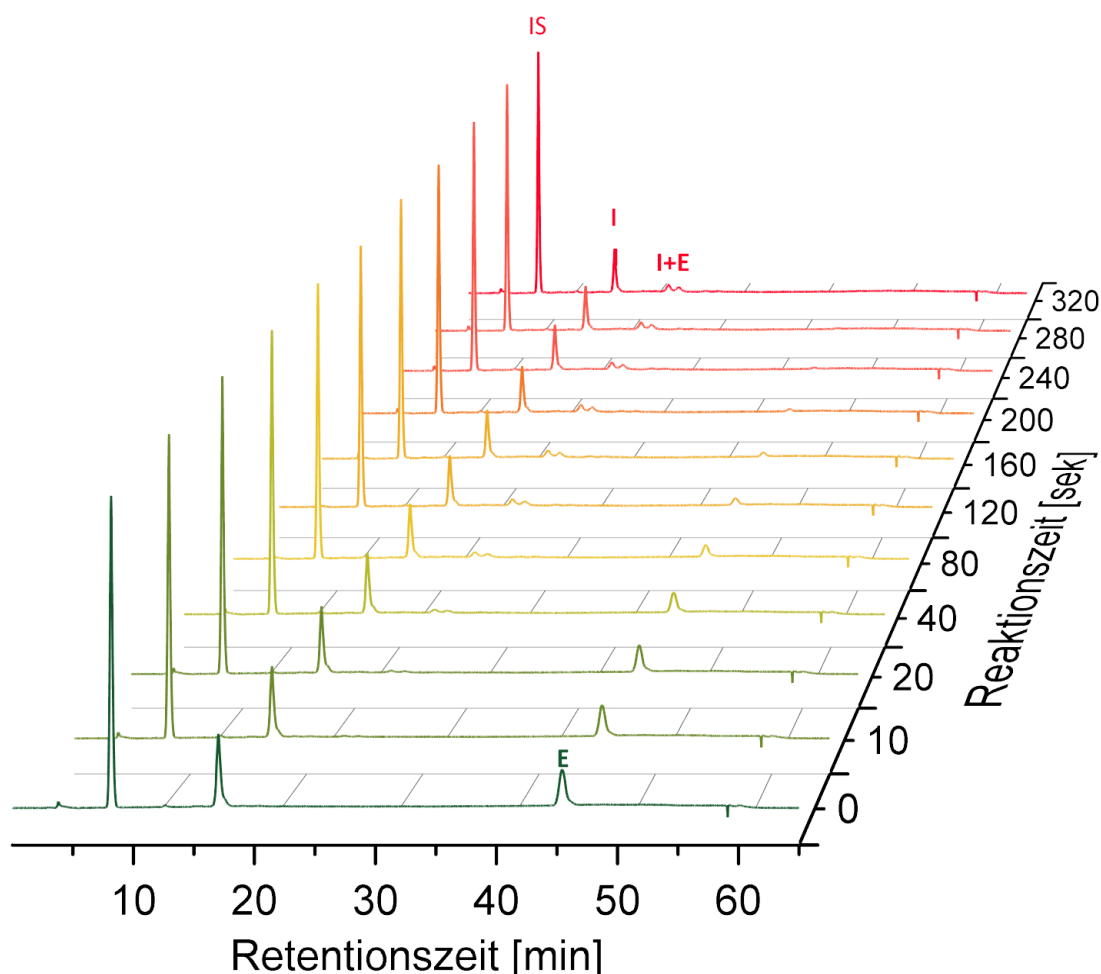


Abbildung 42 – Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion von Nukleosid **I** (500 μ M) und Tetrazol **E** (100 μ M) zu Photoclick-Produkt **I+E** in PBS/MeCN 1:1 nach Belichtung mit einer 308 nm LED für insgesamt 320 Sekunden. Analyse *via* RP-HPLC.

Auch bei der Untersuchung der Reaktion zwischen dem SPH-modifizierten Nukleosid **I** und Tetrazol **E** konnten neue Verbindungen im Chromatogramm detektiert werden (Abbildung 42). Auffällig im Vergleich zu dem Chromatogramm von **39+E** ist der Produktpeak, welcher sich nicht nur von der Retentionszeit, sondern auch in seiner Form unterscheidet. Der Produktpeak bei 24 min Retentionszeit konnte im Chromatogramm als ein Doppelpeak detektiert werden. Der Doppelpeak deutet auf die Bildung zwei isomerer Produkte hin, welche sich leicht in der Retentionszeit unterscheiden. Wie im vorherigen Chromatogramm beschrieben, sinkt der Nukleosidpeak bei 17 min im Laufe der Reaktionszeit, wohingegen der des internen Standards bei 8 min konstant bleibt. Der Tetrazol-Peak bei 45,5 min ist bei der Reaktion mit **I** bereits nach 240 s Reaktionszeit verschwunden, was auf eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit als mit Nukleosid **39** hindeutet. Durch Auftragen der integrierten Werte gegen die Zeit konnte für **I+E** eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von

$k_2 = 31,4 \pm 1,90$ ermittelt werden. Zusätzlich zu den beschriebenen Peaks konnten keine weiteren Nebenprodukte detektiert werden.

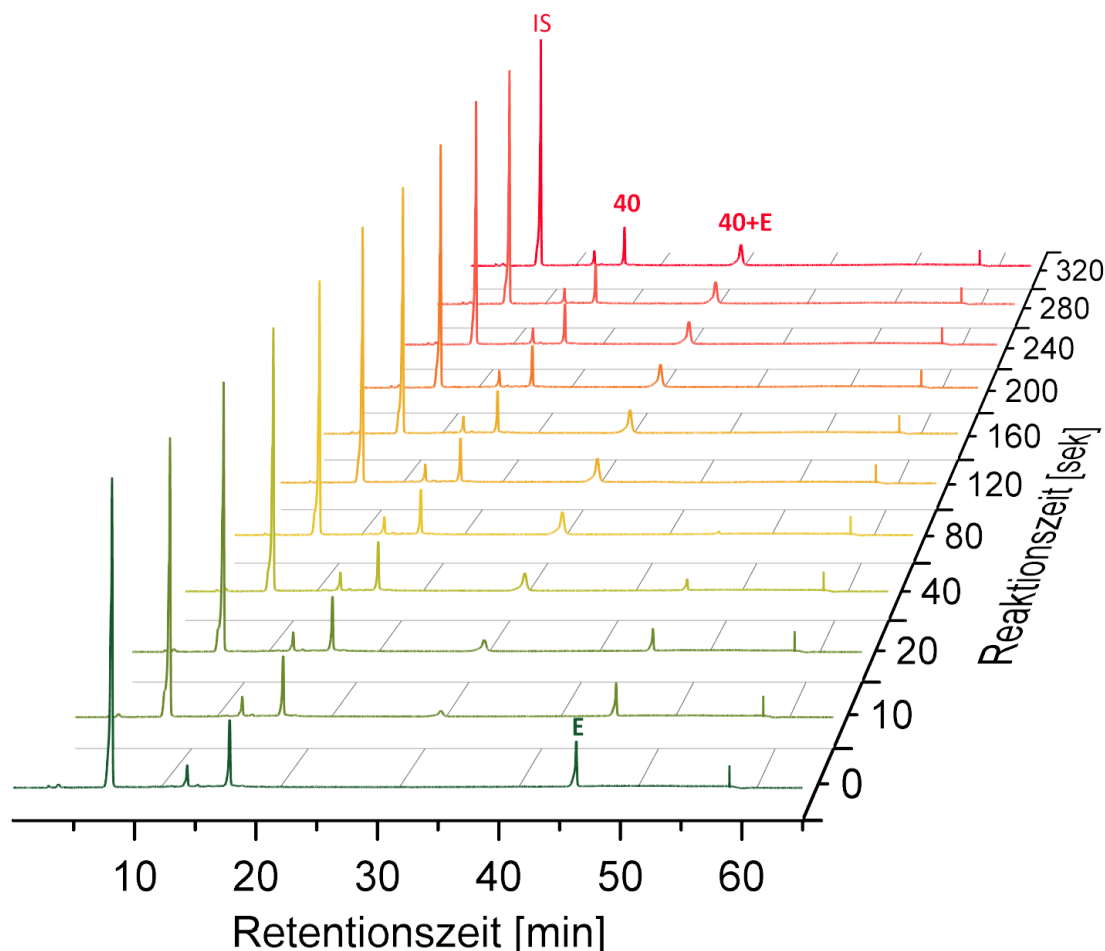


Abbildung 43 - Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion von Nukleosid **40** (500 μM) und Tetrazol **E** (100 μM) zu Photoclick-Produkt **40+E** in PBS/MeCN 1:1 nach Belichtung mit einer 308 nm LED für insgesamt 320 Sekunden. Analyse *via* RP-HPLC.

Die Untersuchung des BCN-modifizierten Nukleosids **40** mit Tetrazol **E** erfolgte analog zu den vorangegangenen Durchführungen. Auch hier konnte in der HPLC-Analyse im Laufe der Reaktionszeit ein neuer Peak bei 31 min Retentionszeit detektiert werden, welcher dem Produkt zugeordnet werden konnte. Auffällig ist, dass die Peakintensität des Tetrazols bei einer Retentionszeit von 45,5 min deutlich schneller abnimmt als in den zuvor aufgezeichneten Chromatogrammen. Bereits nach 160 s Reaktionszeit konnte keine Tetrazol-Absorption mehr nachgewiesen werden. Auch die Intensität des Nukleosid-Peaks bei 18 min Retentionszeit nimmt bis 160 s Reaktionszeit ab und bleibt danach konstant, was auf eine vollständige Umsetzung des Tetrazols hinweist. Der bei 14 min detektierte Peak konnte einem Nebenprodukt bei der Synthese von Nukleosid **40** zugeordnet werden, welches jedoch nicht

an der Photoclick-Reaktion beteiligt ist. Dies lässt sich durch die konstante Intensität des Peaks während der gesamten Reaktionsdauer begründen.

Nachdem alle Nukleoside erfolgreich in einer Photoclick-Reaktion mit Tetrazol **E** umgesetzt werden konnten, wurden die Reaktionen kinetisch analysiert und die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Über die HPLC-Peakflächen der Produkte in Abhängigkeit der Reaktionszeit konnten unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt werden (Tabelle 4). Die Messdaten der Photoclick-Reaktionen wurden monoexponentiell angepasst. Basierend auf der Krümmung der erhaltenen Funktion und unter Berücksichtigung der Konzentration wurde die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung k_2 berechnet.

Tabelle 4 – Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Photoclick-Reaktionen **39+E**, **I+E** und **40+E** in MeCN/PBS 1:1 (Dienophil: 500 μ M, **E**: 100 μ M).

Photoclick-Produkt	k_2 [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
39+E	$23,4 \pm 0,8$
I+E	$31,4 \pm 1,9$
40+E	$61,7 \pm 2,0$

Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten liegen im Bereich um $k_2 = 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und ordnen sich damit eher im unteren Geschwindigkeitsbereich aller Photoclick-Reaktionen ein. Es ist zu erkennen, dass SPH-Nukleosid **I** eine höhere Kinetik aufweist als das 3-Methylcyclopropen-modifizierte Nukleosid **39**. Dies korreliert mit den Erwartungen, in denen Photoclick-Reaktionen durch gesteigerte Ringspannung und reduzierte sterische Hinderung beschleunigt werden können.^[162] Durch die fehlende Methylgruppe an der C³-Position des SPHs im Vergleich zu 3-Methylcyclopropen und die damit geringere sterische Hinderung resultiert in einer gesteigerten Reaktivität in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition. Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit von **I+E** im Vergleich zu **39+E** lässt sich ebenfalls durch den geringeren Bindungswinkel von 92,3° am C³-Atom des SPHs im Vergleich zu 113,5° bei 3-Methylcyclopropen erklären, was ebenfalls zu einer beschleunigten Kinetik beiträgt.^[76] So konnten in der Literatur bereits Reaktionsgeschwindigkeiten von bis zu $k_2 = 3100 \pm 600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mit Tetrazol **E** und SPH in PBS:MeCN (1:1 Vol%) erreicht werden.^[83] Nukleosid **40** zeigte im Vergleich zu **I** nochmals eine deutliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Aufgrund

seiner großen sterischen Hinderung ist **40** jedoch für die zelluläre Anwendung im Hinblick auf metabolische Markierung weniger geeignet. Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeiten von SPH in der Literatur von bis zu $k_2 = 3100 \pm 600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nicht erreicht werden konnten, erweist sich SPH dennoch als attraktive Alternative für zukünftige Zellexperimente, da es die Vorteile eines schnellen Dienophils mit einer geringen sterischen Hinderung vereint. Im folgenden Kapitel sollen die Nukleoside **39**, **I** und **40** in einer Photoclick-Reaktion mit Pyren-modifizierten Tetrazolen weiter untersucht werden.

4.6.2 Photoclick-Reaktion mit Pyren-modifizierten Tetrazolen

Teile dieses Kapitels und die dazugehörigen unterstützenden Informationen wurden bereits veröffentlicht:

„Metabolic labelling of DNA in cells by means of the “photoclick” reaction triggered by visible light”, L. Rieger, B. Pfeuffer, H.-A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.*, **2023**, *4*, 1037-1042, DOI: 10.1039/D3CB00150D.^[87]

Für die Durchführung einer bioorthogonalen Reaktion in zellulären Systemen, ist es erforderlich, dass die Kriterien der Click-Chemie erfüllt werden. Dazu zählen unter anderem ein neutraler pH-Wert, Stereospezifität sowie der Ausschluss zytotoxischer Reagenzien.^[163] Bei einer Photoclick-Reaktion, wie beispielsweise mit Tetrazol **E**, wird primär UV-Licht verwendet, um das Tetrazol in das reaktive Nitrilimin umzuwandeln. Die Verwendung von Licht im UV-Bereich hat mehrere grundsätzliche Nachteile, darunter Sicherheitsrisiken, Zelltoxizität und fehlende chemische Selektivität, da UV-Strahlung zahlreiche biologische Verbindungen in der Zelle anregen.^[164] Daher ist es sinnvoll die Anregungswellenlänge von Tetrazolen in den sichtbaren Spektralbereich zu verschieben. Dies kann durch die Einführung verschiedener Substituenten am Tetrazol, wie beispielsweise mit Pyrenen, erreicht werden. Hierdurch kann die Anregung ins sichtbare Licht verschoben werden, wodurch potenzielle Zellschäden minimiert werden. Das Pyren-Tetrazol **F** und das *N,N*-Dimethylaminopyren-Tetrazol **G** wurden von LISA RIEGER in der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT synthetisiert und sollten für Photoclick-Reaktionen mit **39**, **I** und **40** genutzt werden. Die Tetrazole **F** und **G** wurden an der N¹-Position mit einer Pyrenylgruppe modifiziert, wobei **G** zusätzlich eine

Dimethylaminingruppe trägt. Vor der Photoclick-Reaktion wurden Extinktionsmessungen der Tetrazole **F** und **G** durchgeführt (Abbildung 44). Tetrazol **F** zeigt drei charakteristische Maxima bei $\lambda_{\text{max}} = 235 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$ und ein lokales Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$ mit einem Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{343\text{nm}} = 2,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Tetrazol **G** zeigt vier Maxima bei $\lambda_{\text{max}} = 251 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 291 \text{ nm}$ und ein doppeltes lokales Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$ sowie $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$ mit einem Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{405\text{nm}} = 1,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Pyrenylgruppe der Tetrazole **F** und **G** bewirkt eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge von bis zu $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (**F**) und $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ (**G**), wodurch beide Tetrazole potenziell für zelluläre Anwendung im sichtbaren Spektralbereich geeignet sind.

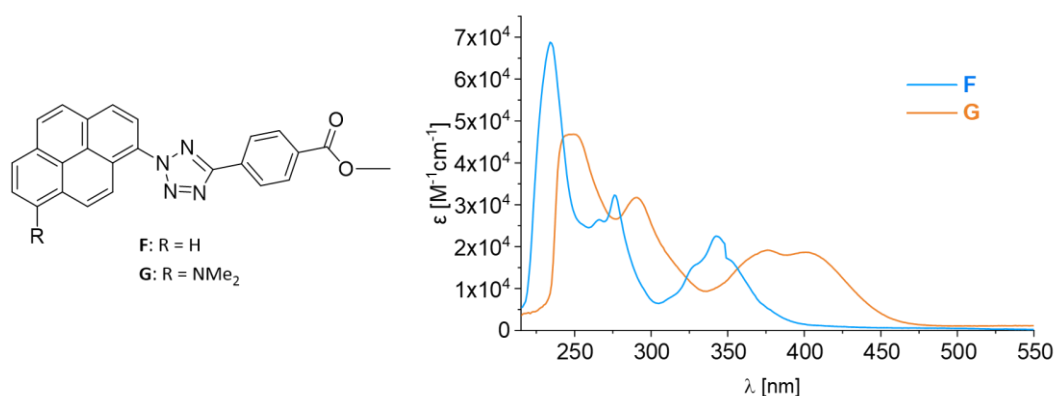


Abbildung 44 - UV/Vis-Extinktion der Tetrazole **F** und **G** (25 μM) in MeCN.

Die 1,3-dipolare Cycloaddition der Tetrazole **F** und **G** mit **39**, **I** und **40** wurden mit UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzmessungen während der verschiedenen Belichtungszeiten (0-600 s für **F** und 0-100 min für **G**) verfolgt. Für die jeweiligen Photoclick-Reaktionen mit den Nukleosiden wurden die Tetrazole **F** und **G** mit einer $\lambda = 405 \text{ nm}$ LED belichtet, um einen direkten Vergleich der Pyrentetrazole zu ermöglichen. Die Photoclick-Reaktion wurde in Acetonitril unter Verwendung eines zehnfachen Überschusses an Dienophil (250 μM) im Verhältnis zum Tetrazol (25 μM) durchgeführt. Im Unterschied zum vorherigen Kapitel war eine Überprüfung der Photoclick-Reaktion mittels RP-HPLC nicht möglich, da aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Tetrazole **F** und **G** keine effiziente Trennung von Edukten und Produkten erreicht werden konnte.

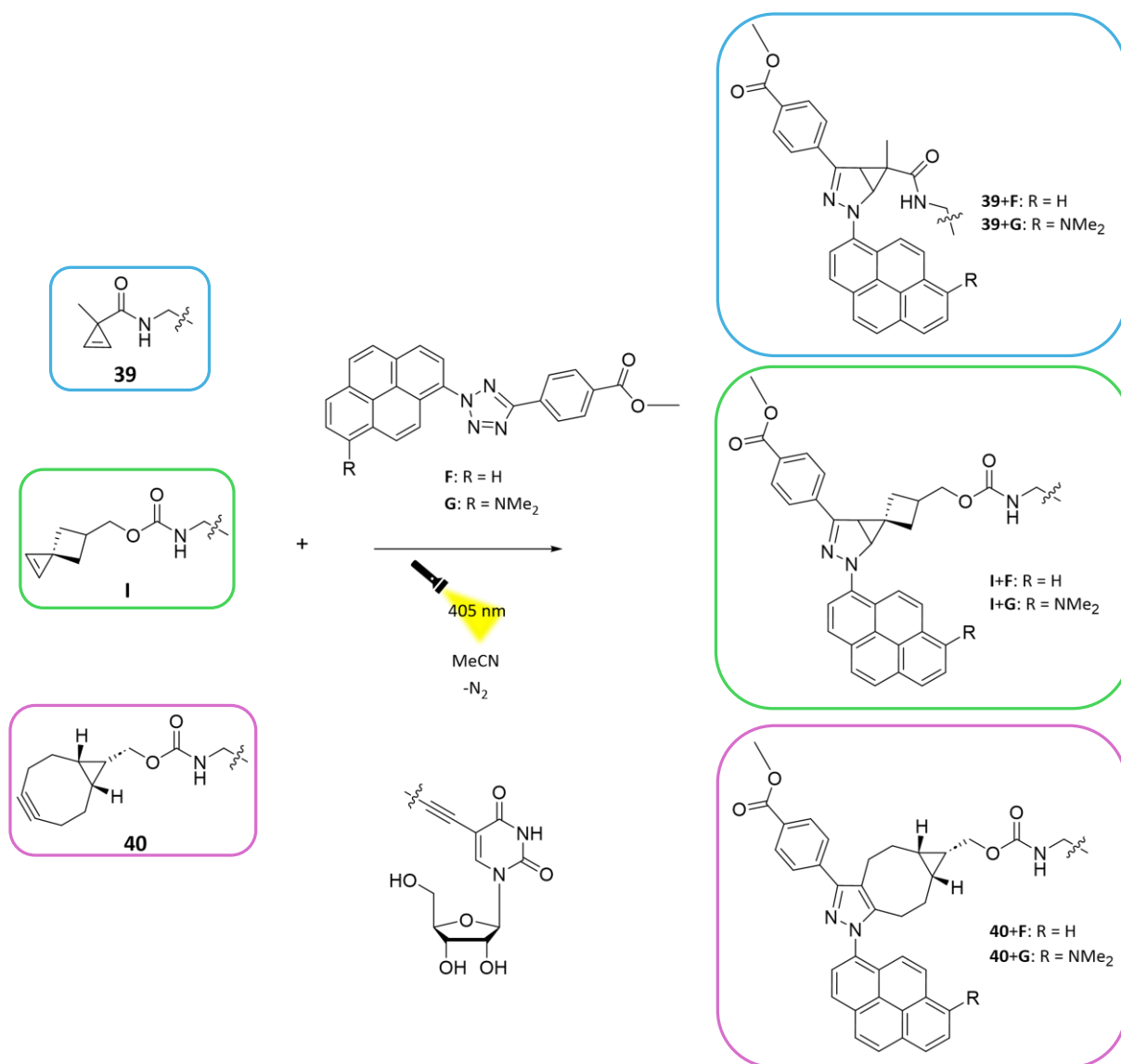


Abbildung 45 – Photoclick-Reaktion der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside **39**, **I** und **40** (jeweils 250 μ M) mit Tetrazol **F** bzw. **G** (jeweils 25 μ M) zu den Produkten **39+F/G**, **I+F/G** und **40+F/G** durch Belichtung mit einer $\lambda = 405$ nm LED in MeCN. Aus übersichtlichen Gründen ist bei Photoclick-Produkt **I+F/G** nur eines der beiden entstehenden Diastereomere gezeigt.

Zur weiteren Übersichtlichkeit wird im Folgenden ausschließlich auf die Absorptionsspektren der Reaktionen eingegangen, während die entsprechenden Fluoreszenzspektren im Anhang zu finden sind (siehe Kapitel 7). Zunächst wurde die photoinduzierte Reaktion von Tetrazol **F** mit den Nukleosiden **39**, **I** und **40** untersucht (Abbildung 46). Bei allen drei Absorptionsspektren ist eine deutliche Abnahme des charakteristischen Maximums von Tetrazol **F** bei $\lambda_{\max} = 343$ nm zu beobachten, welches sich im Lauf der photoinduzierten Reaktion bathochrom zu $\lambda_{\max} = 450$ nm verschiebt. Ein isosbestischer Punkt bei $\lambda = 375$ nm deutet darauf hin, dass die Reaktion bereits nach 60 s ohne die Bildung von Nebenprodukten abgeschlossen ist. So ist bei der Photoclick-Reaktion des Nukleosids **39** mit Tetrazol **F**

(Abbildung 46, oben links) nach 60 s keine signifikante Erhöhung der Absorption bei $\lambda = 450$ nm mehr zu beobachten. Dies deutet auf die extreme Kurzlebigkeit des *in situ* generierten Nitrilimins hin. Bei der Photoclick-Reaktion von **I**+**F** (Abbildung 46, oben rechts) zeigt das Absorptionsspektrum nach 60 s ein lokales Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 434$ nm, welches sich nach 600 s bathochrom nach $\lambda_{\text{max}} = 450$ nm verschiebt. Die bathochrome Verschiebung des lokalen Maximums sowie des isosbestischen Punkts in der Zeitspanne von 60 bis 600 s Reaktionszeit deuten auf eine nachfolgende Reaktion hin. Durch weitere, hier nicht gezeigte Kontrollexperimente, konnte belegt werden, dass die zweite Reaktion eine lichtinduzierte Dehydrierung des entstandenen Pyrazolins zum Pyrazolchromophor darstellt. Der Reaktionsverlauf von **40** mit Tetrazol **F** (Abbildung 46, unten Mitte) zeigt ebenfalls eine Abnahme des lokalen Maximums des Tetrazols bei $\lambda_{\text{max}} = 343$ nm sowie die bathochrome Verschiebung zu $\lambda_{\text{max}} = 450$ nm. Hier zeigt sich ebenfalls keine signifikante Änderung des Absorptionsspektrums nach 60 s, was ebenfalls auf eine vollständige Umsetzung des Tetrazols zurückzuführen ist.

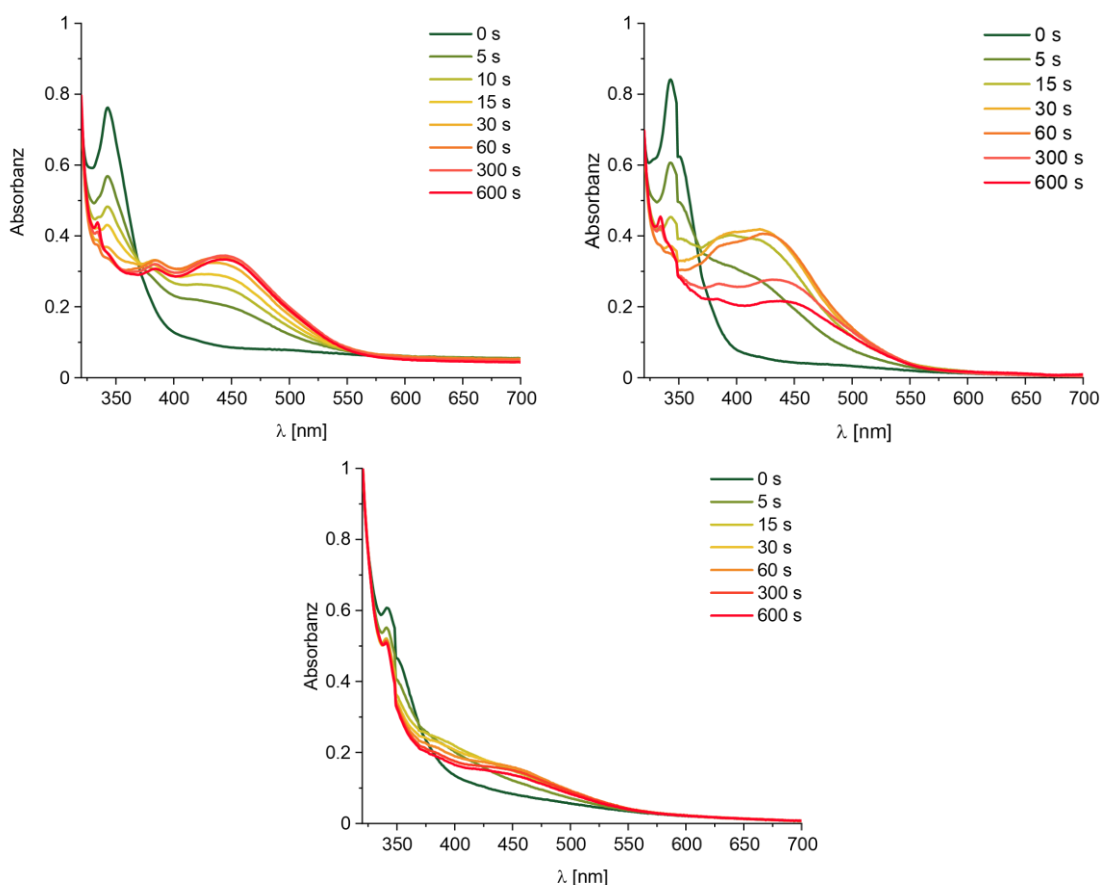


Abbildung 46 – UV/Vis Absorptionsspektren der Photoclick-Reaktionen der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside **39**, **I** und **40** (jeweils 250 μM) mit Tetrazol **F** (25 μM) zu den Produkten **39**+**F** (oben, links), **I**+**F** (oben, rechts) und **40**+**F** (unten, Mitte) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN.

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 erfolgte über die Absorptionsabnahme des charakteristischen Maximums des Tetrazols **F** bei $\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$, die der Photolyse des Tetrazols und dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt entspricht. So konnten Reaktionsgeschwindigkeiten von $k_2 = 4600$ bis $6800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Nukleoside **39**, **I** und **40** mit Tetrazol **F** berechnet werden (Tabelle 5). Alle Photoclick-Produkte **39+F**, **I+F** und **40+F** konnten mittels Elektronenspray-Ionisierung-Massenspektrometrie (ESI) nachgewiesen werden (siehe Anhang, Tabelle 9). Im nächsten Schritt wurden die drei Nukleoside mit Tetrazol **G** untersucht.

Der Absorptionsverlauf von Tetrazol **G** mit den Nukleosiden **39**, **I** und **40** zeigt einen Abfall der charakteristischen Absorptionsbanden bei $\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$. Zusätzlich wird ein isosbestischer Punkt bei 450 nm beobachtet (Abbildung 47).

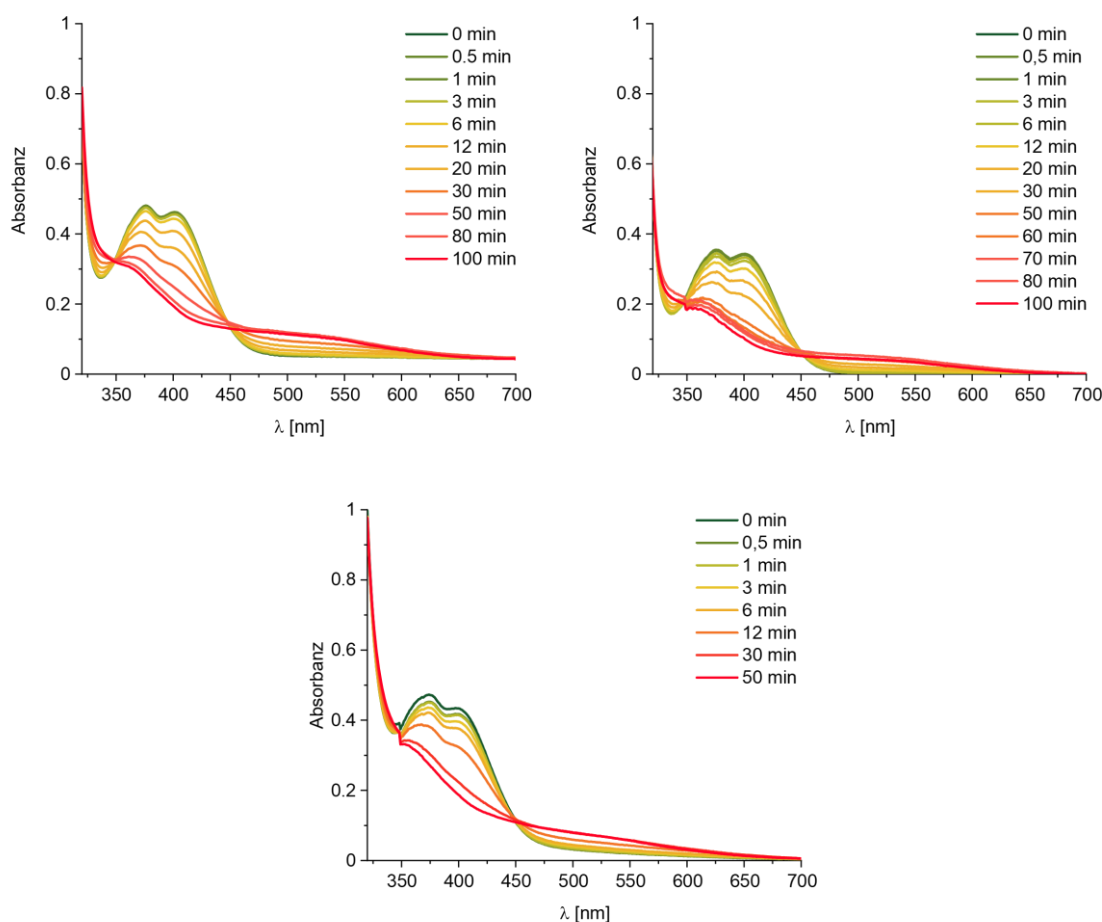


Abbildung 47 - UV/Vis-Absorptionsspektren der Photoclick-Reaktionen der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside **39**, **I** und **40** (jeweils $250 \mu\text{M}$) mit Tetrazol **G** ($25 \mu\text{M}$) zu den Produkten **39+G** (oben, links), **I+G** (oben, rechts) und **40+G** (unten, Mitte) mit Belichtung einer $\lambda = 405 \text{ nm}$ LED in MeCN.

Auffällig ist bei allen UV/Vis-Spektren mit zunehmendem Reaktionsverlauf die Bildung einer neuen Bande bei $\lambda = 450\text{-}650\text{ nm}$, welche dem Pyrazolinprodukt zugeordnet werden konnte. Die Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, dass bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 500\text{ nm}$ die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzspektrum nach 100 min Reaktionszeit um den Faktor 23 größer war als zu Beginn der Reaktion. Somit ist die Zunahme der Fluoreszenz auf die Bildung des Pyrazolins zurückzuführen. Die kontinuierliche Abnahme der charakteristischen Tetrazol-Absorptionsbanden bei $\lambda_{\text{max}} = 375\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}} = 405\text{ nm}$ sowie der Anstieg der Pyrazolin-Bande bei $\lambda = 450\text{-}650\text{ nm}$ deutet auf eine erfolgreiche Umsetzung der Nukleoside mit Tetrazol **G** hin. Im Vergleich zu Tetrazol **F** fällt auf, dass für die Bildung des gewünschten Photoclick-Produkts mit Tetrazol **G** eine längere Reaktionszeit erforderlich ist. Gründe hierfür könnte die zusätzliche sterische Hinderung sowie die Stabilisierung des Nitrilimins durch den elektronenschiebenden Effekt der Dimethylamingruppe sein.^[165] Die Photoclick-Produkte **39+G**, **I+G** und **40+G** konnten mittels ESI- und MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden (siehe Anhang, Tabelle 9).

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 erfolgte, wie bei Tetrazol **F**, über die Absorptionsabnahme der charakteristischen Maxima des Tetrazols **G** bei $\lambda_{\text{max}} = 375\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}} = 405\text{ nm}$ (Tabelle 5).

Tabelle 5 – Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Photoclick-Reaktionen **39+F/G**, **I+F/G** und **40+F/G** mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405\text{ nm}$ LED in MeCN (Dienophil: 250 μM , **F** bzw. **G**: 25 μM).

Dienophil	F $k_2 [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$	G $k_2 [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
39	4600 ± 240	$9,1 \pm 0,8$
I	5000 ± 390	$11 \pm 0,8$
40	6800 ± 700	$15 \pm 1,0$

In Tabelle 5 ist zu erkennen, dass das Tetrazol **F** wesentlich höhere Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten mit den Nukleosiden aufweist, als Tetrazol **G**. Grund hierfür könnte, wie oben schon beschrieben, die sterische Hinderung der Dimethylamingruppe sein. Allgemein kann der beobachtete Trend, der bereits bei den Reaktionen mit Tetrazol **E** beschrieben wurde, für die Reaktionen mit den Tetrazolen **F** und **G** fortgeführt werden. Die niedrigste Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit dem

3-Methylcyclopropen-modifizierten Nukleosid **39** gemessen, während das SPH-modifizierte Nukleosid **I** sowie das BCN-modifizierte Nukleosid **40** eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit mit den Tetrazolen **F** und **G** aufwiesen. Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit von **I** im Vergleich zu **39** kann auch hier ebenfalls über den geringeren Bindungswinkel am C³-Atom sowie der höheren Ringspannung erklärt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass SPH einen ausgewogenen Kompromiss zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und sterischer Hinderung darstellt. Es reagierte mit allen Tetrazolen schneller als das 3-Methylcyclopropen-modifizierte Nukleosid **39**. Für die nachfolgenden Zellexperimente sollen nun SPH-modifizierte Oligonukleotide und Nukleoside mit den Tetrazin-Fluorophoren **A-D** und Tetrazol **G** untersucht werden. Es wurde Tetrazol **G** anstelle von **F** bevorzugt, da frühere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT gezeigt haben, dass Tetrazol **G** bessere Markierungseigenschaften in zellulären Systemen aufweist als das Tetrazol **F**.^[87, 98]

4.7 Zellbiologische Untersuchungen

4.7.1 Transfektionsexperimente

Als letzten Schritt sollten die SPH-modifizierten Nukleoside und Oligonukleotide *in cellulo* mit den Fluorophoren **A-D** und **G** markiert werden. Hierfür wurde zuerst eine Transfektion mittels Lipoplexen von **DNA3** in HeLa Zellen angestrebt. Es wurde **DNA3** ausgewählt, da diese im Vergleich zu **DNA4** höhere *Turn-On*-Werte aufwies, welche bei den zellulären Click-Experimenten von Vorteil sind. Bei der Lipofektion bilden die positiv geladenen Lipide einen Komplex mit der negativ geladenen **DNA3**, welche anschließend die Zellmembran überwinden, in der Zelle freigesetzt werden und anschließend mittels iEDDA-Reaktion *in cellulo* markiert werden kann (vgl. Kapitel 2.5). In diesem Experiment soll in erster Linie die Stabilität und Reaktivität SPH-modifizierter Oligonukleotide für bioorthogonale Reaktionen auf Zellebene bestimmt sowie die Membrangängigkeit der Fluorophore **A-D** untersucht werden.

Zunächst wurde **DNA3** mit dem Fluorophor **B** untersucht. Hierfür wurde zuerst **DNA3** mittels Lipofectamine™ 2000 und Endoporten in HeLa-Zellen über 24 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorophor **B** inkubiert, um eine bioorthogonale Markierung der transfizierten **DNA3** zu ermöglichen, bevor eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der lebenden Zellen ohne weitere Waschschrte erfolgte. Parallel wurde eine Negativkontrolle mit Fluorophor **B** sowie eine Positivkontrolle von *in vitro* umgesetzter **DNA3+B** unter denselben Bedingungen untersucht. Die Negativkontrolle dient dazu, die Autofluoreszenz der Zelle sowie die Grundfluoreszenz des Fluorophors **B** auszuschließen, während die Positivkontrolle einen Vergleich zu der Click-Reaktion von transfizierter **DNA3+B** *in cellulo* ermöglicht. Es wurde festgestellt, dass die Positivkontrolle ein vergleichbares Fluoreszenzsignal wie das in der Zelle durchgeführte Click-Experiment lieferte (Abbildung 48), wohingegen kein Fluoreszenzsignal bei der Negativkontrolle ohne **DNA3** beobachtet werden konnte. Daraus ergibt sich, dass die gesamte in der Zelle beobachtete Fluoreszenz auf die Fluoreszenzsteigerung infolge der iEDDA-Reaktion zwischen dem Fluorophor **B** und **DNA3** in lebenden HeLa-Zellen zurückgeführt werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

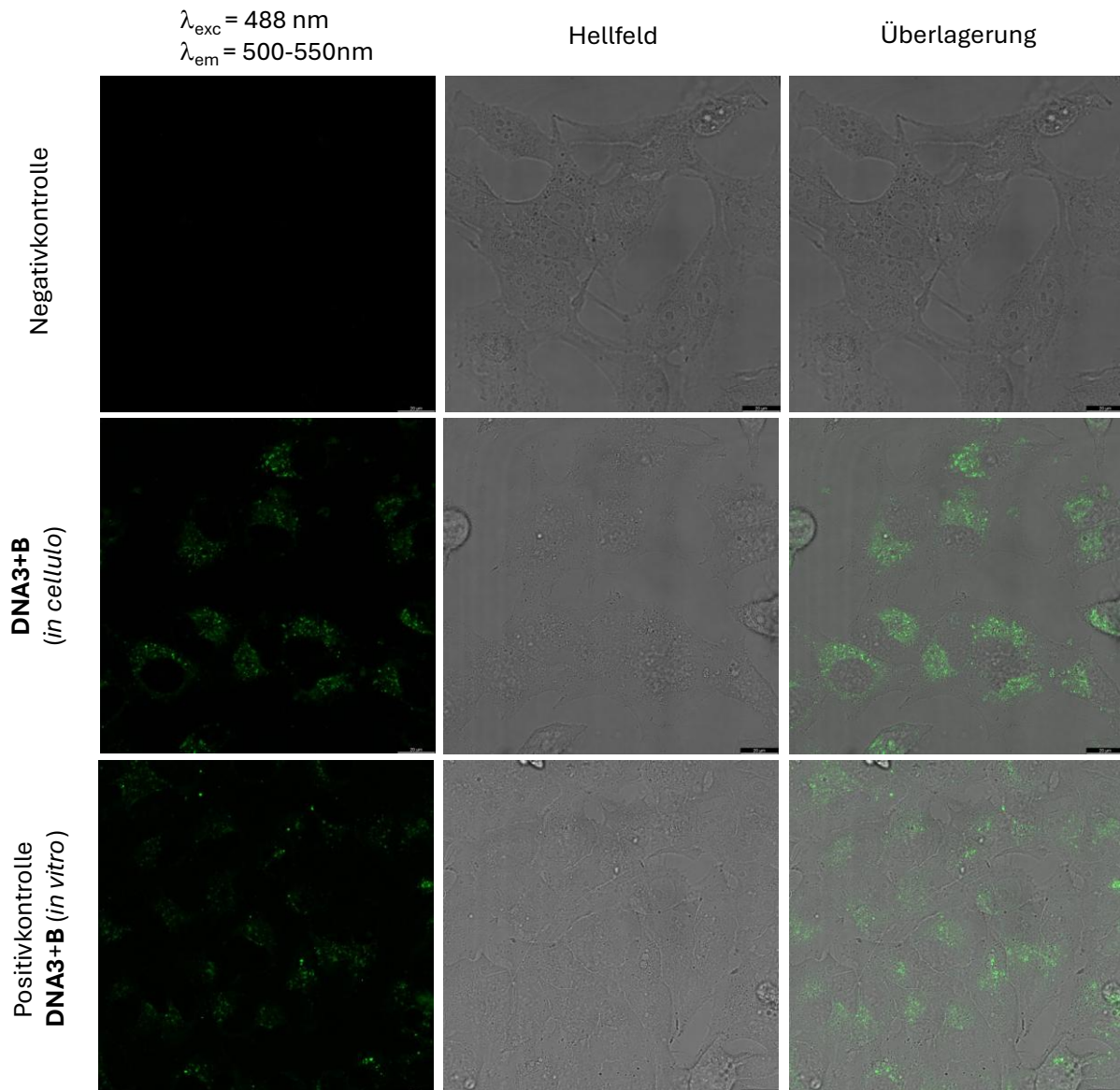


Abbildung 48 - HeLa-Zellen nach 24 h Transfektion mit **DNA3** (75 nM) und Click-Reaktion *in cellulo* mit Fluorophor **B** (150 nM). Negativkontrolle mit **B**, ohne **DNA3** (oben), **DNA3+B** Click *in cellulo* (Mitte) und Positivkontrolle **DNA3+B** Click *in vitro* (unten). Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500-550 \text{ nm}$, Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm .

Die Ergebnisse zeigen, dass Fluorophor **B** membrangängig ist und dass die SPH-Modifikation am Oligonukleotid in zellulärer Umgebung stabil bleibt, wodurch eine Click-Reaktion mit Fluorophor **B** ermöglicht wird. Zur weiteren Validierung wurden die Folgeexperimente mit den Fluorophoren **A**, **C** und **D** gemäß der zuvor beschriebenen Methodik analog durchgeführt. Auf eine Positivkontrolle wurde wegen der Ergebnisse von **DNA3+B** *in cellulo* verzichtet. Durch die zellbiologischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass auf zusätzliche Waschschrte durch die Zwei-Faktor-Fluorogenität der Fluorophore verzichtet werden kann, was einen Vorteil in den weiteren Experimenten darstellt.

Ergebnisse und Diskussion

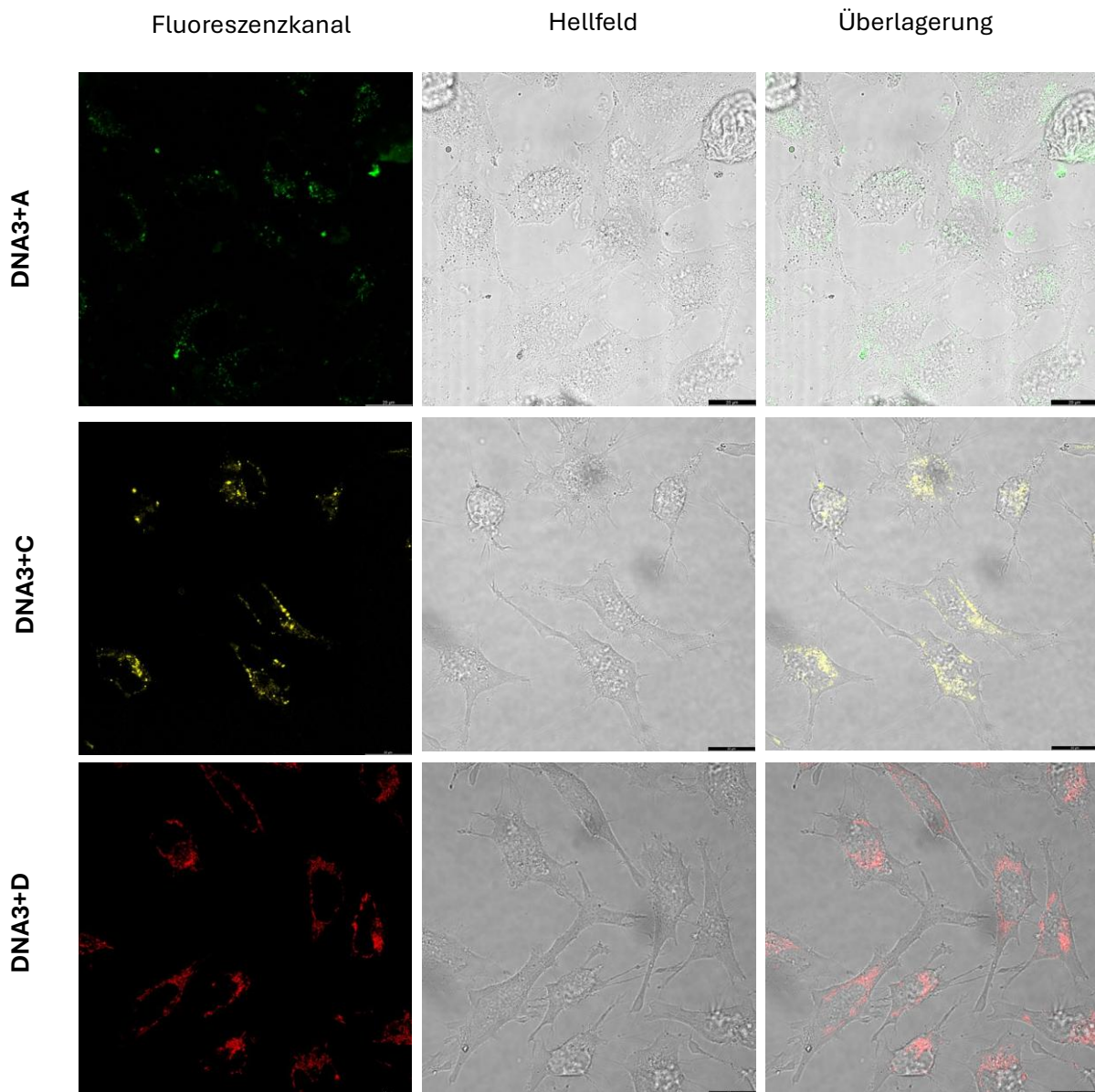


Abbildung 49 - HeLa-Zellen nach 24 h Transfektion mit **DNA3** (75 nM) und Click-Reaktion *in cellulo* mit Fluorophor **A**, **C** und **D** (jeweils 150 nM). Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ (**A**), $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}600 \text{ nm}$ (**C**), $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}650 \text{ nm}$ (**D**), Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm .

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abbildung 49 nur die Zellbilder von der in HeLa-Zellen durchgeführten iEDDA-Click-Reaktion von **DNA3+A**, **DNA3+C** und **DNA3+D** gezeigt (für die Negativkontrollen siehe Anhang, Abbildung 87). Im Vergleich von **DNA3+A** zu **DNA3+B** lässt sich feststellen, dass die Fluorophore den in den Experimenten *in vitro* beobachteten Trend fortsetzen. So zeigt die Transfektion rein optisch ein höheres Fluoreszenzsignal bei einer iEDDA-Reaktion in lebenden Zellen. Während für **DNA3+A** lediglich eine punktuelle Fluoreszenz detektiert werden konnte, zeigt **DNA3+B** eine rein optisch deutlich stärkere Fluoreszenzintensität. Eine Ursache könnte in der Transfektionseffizienz liegen. So ist es möglich, dass für den Versuch von **DNA3+A in cellulo** nur ein geringerer Teil der modifizierten

DNA in die Zelle gelangt, wodurch weniger Fluorophor mit der DNA reagieren kann. Durch die analoge Vorgehensweise ist dies jedoch unwahrscheinlich. Eine weitere Erklärung könnte durch den deutlichen *Turn-On*-Unterschied der beiden Fluorophore mit den Experimenten *in vitro* begründet werden, wo ein Unterschied von 69 zu 120 festgestellt werden konnte (Experimente *in vitro* **DNA3+A** vs. **DNA3+B**, Kapitel 4.5). Die Fluorophore **C** und **D** zeigen mit **DNA3** ebenfalls eine deutliche optische Fluoreszenz. Interessanterweise konnte mit Fluorophor **D** optisch ein ähnlich gutes Signal wie mit **C** beobachtet werden. Dies könnte an einer besseren Membrangängigkeit des Farbstoffs **D** liegen. Eine alternative Erklärung könnte darin liegen, dass Fluorophor **D** nahe seinem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{exc}} = 467 \text{ nm}$ angeregt wird, wohingegen die anderen Fluorophoren **A-C**, die mit dem verwendeten $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ Laser um bis zu 65 nm von ihrem Absorptionsmaximum abweichen. Es kann somit festgestellt werden, dass Fluorophor **B** die höchste optische Fluoreszenz in Zellen zeigte. Auf dieser Grundlage wurden die weiterführenden Zellexperimente mit Fluorophor **B** durchgeführt. Bemerkenswert ist bei allen Experimenten das Ausbleiben störender Hintergrundfluoreszenz, welches zu einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt. Es konnte zudem festgestellt werden, dass die SPH-Modifikation in zellulärer Umgebung stabil bleibt sowie iEDDA-Reaktionen mit den Fluorophoren eingehen kann. Auf dieser Basis sollten im Folgenden metabolische Markierungsexperimente mit Nukleosiden durchgeführt werden.

4.7.2 Metabolische Markierung mittels SPH-modifizierter Nukleoside

Zum Schluss wurde die Anwendung von SPH-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden zur metabolischen Markierung von Zellen untersucht. Bei der metabolischen Markierung werden der Zelle ausschließlich modifizierte 2'-Desoxynukleoside zur Verfügung gestellt. Diese sollten von der Zelle aufgenommen werden und als Substrat von den zellulären Kinasen akzeptiert, phosphoryliert und anschließend in die genomische DNA inkorporiert werden. Die Einbaueffizienz steht dabei jedoch in Abhängigkeit zur Größe der Modifikation, da nur Nukleoside mit kleinen Modifikationen von den metabolischen Enzymen als Substrat akzeptiert werden.^[111] Anschließend sollte die Modifikation mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktionen in der Zelle nachgewiesen werden. Da **III** und **IV** in den Versuchen *in vitro* die höchste Fluoreszenzsteigerung und Reaktionsgeschwindigkeiten aufwiesen, wurden diese zunächst für die metabolische Markierung mit Fluorophor **B** eingesetzt. Hierbei wurde nach einem Protokoll von WAGENKNECHT *et al.* gearbeitet, welches bereits erfolgreich den metabolischen Einbau von 1-Methylcyclopropen- und Norbornen-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden ermöglichte.^[111] Als Positivkontrolle wurde **VdU** mitgeführt, welches bereits 2014 von LUEDTKE *et al.* für metabolische Markierungen von DNA genutzt wurde.^[110] Hierfür wurden die Nukleoside **III** bzw. **IV** in einem Medium ohne Glutamine und ohne natürliche Nukleoside (No/No-Medium) für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mitgeführt, welche keine modifizierten 2'-Desoxynukleoside enthielten. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit **B** über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

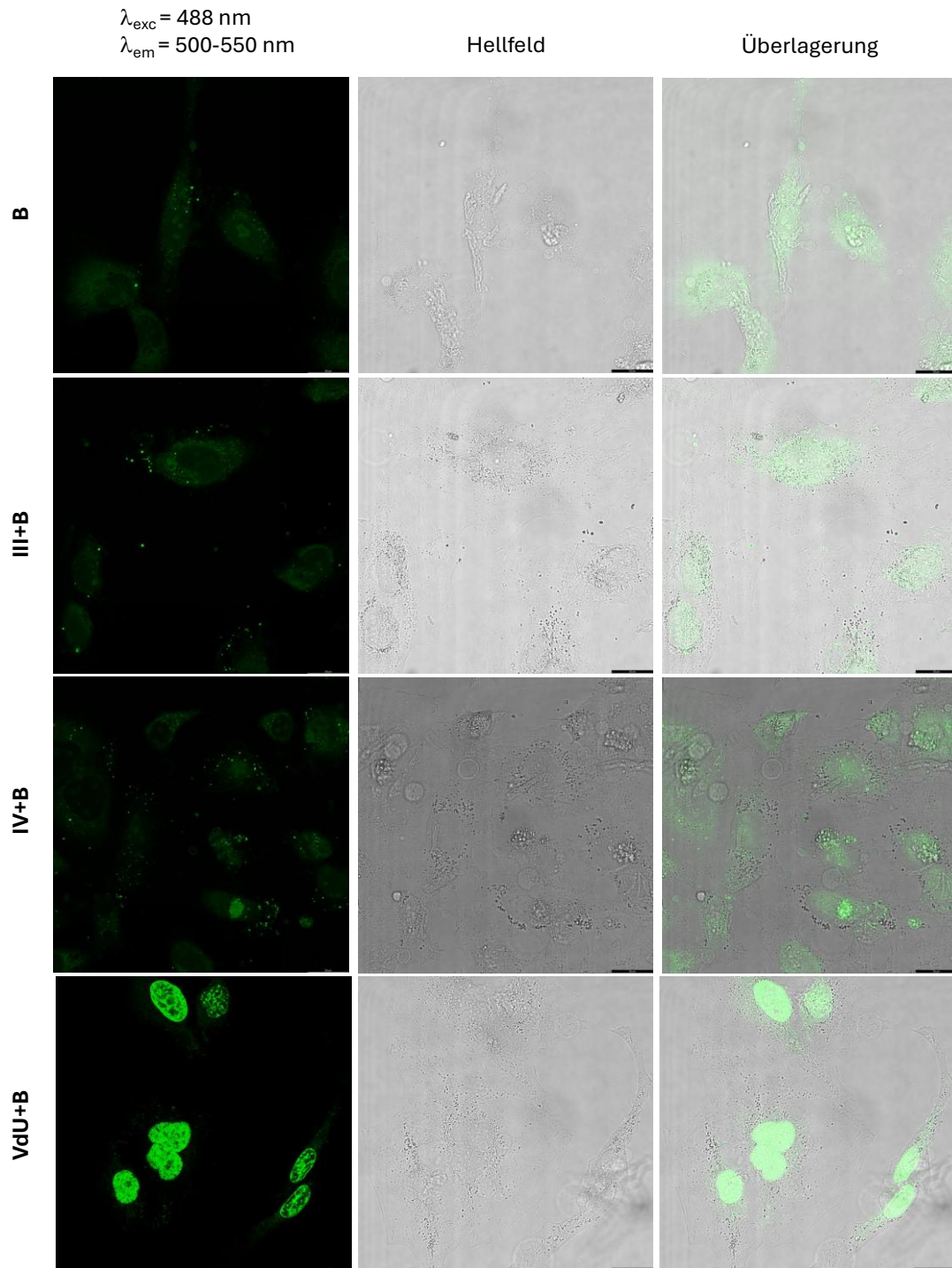


Abbildung 50 - HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 24 h Inkubation mit **III**, **IV** und **VdU** (100 μM) und Click-Reaktion *in cellulo* mit Fluorophor **B**, Negativkontrolle (oben) ohne modifizierte 2'-Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500-550 \text{ nm}$. Laser-Intensität 10 %. Maßstab: 20 μm .

Die erhaltenen Aufnahmen zeigten für **VdU+B** ein spezifisches Fluoreszenzsignal im Zellkern, was darauf schließen lässt, dass **VdU** durch die kleine Modifikation von den zellulären Enzymen akzeptiert und in die genomische DNA inkorporiert wurde. Im Gegensatz zu **VdU** konnte allerdings kein spezifisches Signal im Zellkern bei **III+B** und **IV+B** detektiert werden. Vergleiche mit der Negativkontrolle lassen darauf schließen, dass keine Inkorporation in die

genomische DNA stattgefunden hat, da alle drei Aufnahmen ein vergleichbares Fluoreszenzsignal aufweisen. Gründe hierfür könnten sein, dass die SPH-Modifikation inklusive der Carbamat-Funktion und der Linkerlänge eine zu große Abweichung von den natürlichen 2'-Desoxynukleosiden darstellt. Somit konnten diese nicht von den zellulären Kinasen akzeptiert und phosphoryliert werden.

Im nächsten Schritt sollten die 2'-Desoxynukleoside **VI** und **VII** (siehe Kapitel 4.2) mittels metabolischer Markierung und anschließender iEDDA- bzw. Photoclick-Reaktionen untersucht werden. Durch die SPH-Modifikation, welche aufgrund der reduzierten Linkerlänge näher an der Nukleobase ist als bei **III** und **IV**, soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Länge des Linkers und somit die Größe der Modifikation ausschlaggebend für den erfolgreichen Einbau der modifizierten Nukleoside mittels metabolischer Markierung ist.

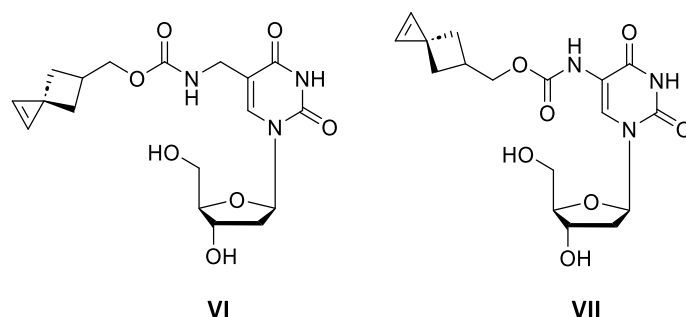


Abbildung 51 - 2'-Desoxynukleoside **VI** und **VII** für die metabolische Markierung mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktion.

WAGENKNECHT *et al.* zeigten 2024 die duale metabolische Markierung von DNA mit einem 3-Methylcyclopropen-modifizierten 2'-Desoxynukleosid sowie einem 1-Methylcyclopropen-modifiziertem Triphosphat mittels Photoclick- und iEDDA-Reaktion.^[98] Durch den ähnlichen molekularen Aufbau der 2'-Desoxynukleoside **VI** und **VII** im Vergleich zu dem metabolisch eingebauten 3-Methylcyclopropen-modifizierten 2'-Desoxynukleosid wurde nach der gleichen Methode gearbeitet, weswegen zuerst die metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion nachgewiesen werden sollte.^[98]

Die Durchführung erfolgte wie in dem vorherigen Experiment in No/No-Medium, welches durch die künstliche Knappheit an Nukleosiden den Druck zur Inkorporation des modifizierten 2'-Desoxynukleosid erhöht. Zuerst wurden 250 μM **VI** bzw. **VII** wurden für 48 h mit HeLa-Zellen in No/No-Medium inkubiert. Durch eine Inkubationszeit von 48 h kann sichergestellt werden, dass ein Zellzyklus mit dem modifizierten Nukleosid durchlaufen wird. Die Zellen wurden anschließend mit PFA fixiert, mit PBS gewaschen und die Zellmembran mittels

Triton-X-100 permeabilisiert. Nach DNA-Denaturierung mittels HCl wurde erneut mit PBS gewaschen. Für die folgende Photoclick-Reaktion wurde Tetrazol **G** verwendet, da dieses bereits zuvor erfolgreich in metabolischen Markierungsexperimenten mit **VdU** eingesetzt wurde.^[87] Das Zellmedium wurde anschließend durch **G** (30 μ M) in Acetonitril ersetzt, da keine Photolyse des Tetrazols **G** in wässrigem Medium stattfindet. Die Zellen wurden anschließend für eine h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 20 min mit einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED belichtet und ungebundener Farbstoff durch zweimaliges Waschen mit Acetonitril entfernt. Als Positivkontrolle wurde **VdU** mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 52).

Die Positivkontrolle mit **VdU+G** zeigt die erwartete spezifische Färbung des Nukleus im Detektionsbereich von $\lambda = 420$ bis 500 nm, wohingegen bei der Negativkontrolle ohne modifizierte 2'-Desoxynukleoside kein Fluoreszenzsignal wahrgenommen werden konnte. Die Probe **VI+G** zeigt wie die Negativkontrolle nur sehr geringe optische Fluoreszenz, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass **VI** nicht von den zelleigenen Enzymen akzeptiert und somit keine Inkorporation in die neu gebildete DNA stattfinden konnte. **VII+G** zeigt hingegen eine signifikante Färbung des Nukleus, welche vergleichbar mit dem Fluoreszenzsignal der Positivkontrolle **VdU+G** ist. Dies lässt auf eine erfolgreiche Inkorporation von **VII** in die zelluläre DNA und eine anschließende photoinduzierte Markierung mit Tetrazol **G** schließen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass der Unterschied von **VI** zu **VII** in nur einer CH₂-Gruppe liegt, welche ausschlaggebend für die Akzeptanz und die Phosphorylierung der 2'-Desoxynukleoside zu sein scheint. Dies deckt sich mit anderen Ergebnissen der Arbeitsgruppe WAGENKNECHT, in denen selbst ein 3-Methylcyclopropen-modifiziertes Nukleosid mit drei CH₂-Gruppen am Linker metabolisch eingebaut werden konnte.^[166] Durch die größere SPH-Modifikation im Vergleich zur 3-Methylcyclopropen-Modifikation am Nukleosid ist dementsprechend eine geringere Linkerlänge nötig, um von den zelleigenen Enzymen akzeptiert zu werden.

Ergebnisse und Diskussion

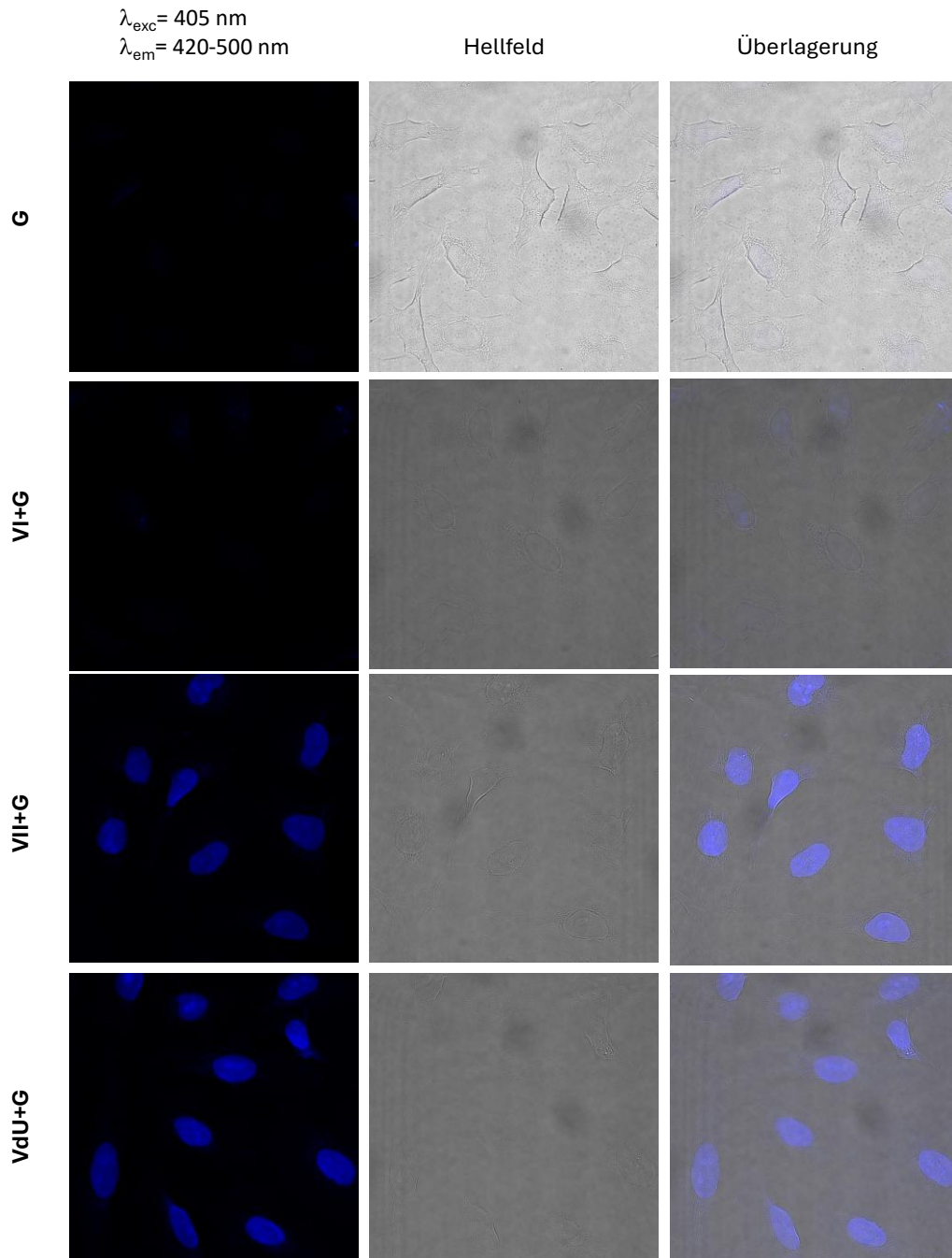


Abbildung 52 – Metabolische Inkorporation von **VI** und **VII** in zelluläre DNA mit anschließender Visualisierung *via* Photoclick-Reaktion mit Tetrazol **G**. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 48 h Inkubation mit **VI**, **VII** und **VdU** (250 μM), Fixierung, Permeabilisierung und Denaturierung der DNA. Photoclick-Reaktion *in cellulo* mit Fluorophor **G**, 1h Inkubation bei Raumtemperatur und Belichtung für 20 min bei 405 nm. Negativkontrolle (oben) ohne modifizierte 2'-Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420-500 \text{ nm}$. Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm .

Die beobachtete Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns konnte durch Gegenfärbung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DRAQ5 bestätigt werden (Abbildung 88). Im nächsten Schritt sollte der metabolische Einbau von **VII** in zelluläre DNA mittels iEDDA-Reaktion mit dem Tetrazin-Fluorophor **B** bestätigt werden. Auch hier wurde sich an das Protokoll von WAGENKNECHT *et al.* gehalten.^[98]

Ergebnisse und Diskussion

Zur experimentellen Durchführung wurden HeLa-Zellen mit den 2'-Desoxynukleosiden **VI**, **VII** und **VdU** als Positivkontrolle (jeweils 500 μM) für 48 h inkubiert, um eine Inkorporation der modifizierten 2'-Desoxynukleoside zu ermöglichen. Die Zellen wurden anschließend mit PFA fixiert, mit Triton-X-100 permeabilisiert und die zelluläre DNA mit HCl denaturiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 μM **B** über Nacht inkubiert, eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342 vorgenommen und im Anschluss mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 53).

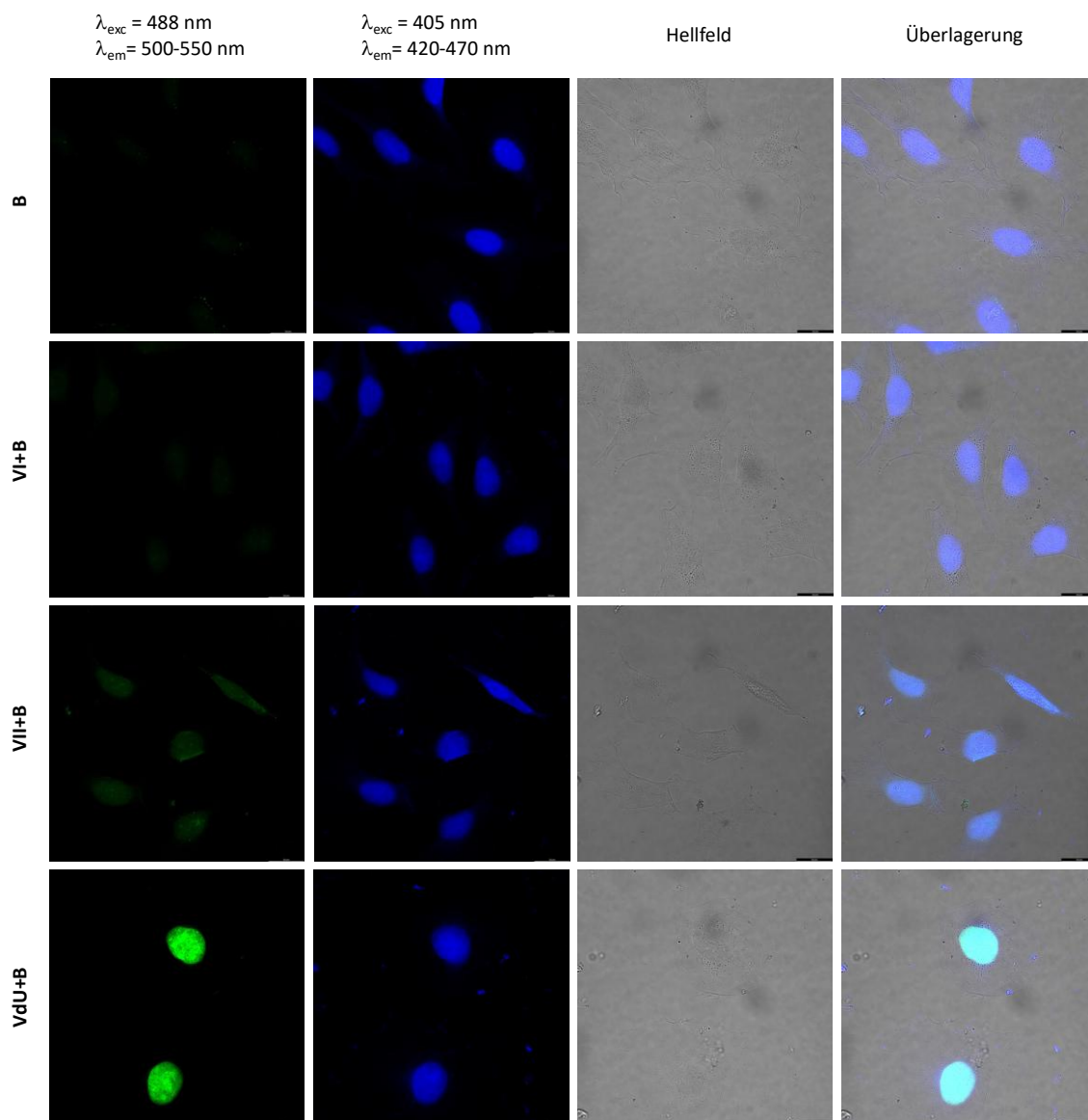


Abbildung 53 - Metabolische Inkorporation von **VI** und **VII** via iEDDA-Reaktion mit Fluorophor **B**. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 48 h Inkubation mit **VI**, **VII** und **VdU** (500 μM), Fixierung, Permeabilisierung und Denaturierung der DNA. iEDDA-Reaktion *in cellulo* mit Fluorophor **B**, 24 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂. Gegenfärbung mit Hoechst 33342 (zweite Spalte). Negativkontrolle (oben) ohne 2'-Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500-550 \text{ nm}$ für **B**, $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420-470 \text{ nm}$ für Hoechst 33342. Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm .

In den erhaltenen Zellbildern (Abbildung 53) ist eine deutliche Färbung des Zellkerns bei der Positivkontrolle mit **VdU+B** zu erkennen, welche durch die Gegenfärbung mit Hoechst 33342 bestätigt werden kann. Die Negativkontrolle ohne modifizierte 2'-Desoxynukleoside zeigt wie erwartet kein Fluoreszenzsignal im Emissionsbereich des Fluorophors **B** von $\lambda_{em} = 500-550$ nm. Analog verhält es sich bei **VI+B**, wo ebenfalls keine optische Fluoreszenz zu beobachten ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem vorherigen Experiment von **VI+G** und verstärkt die Hypothese, dass **VI** nicht von den zelleigenen Kinasen phosphoryliert und in die genomische DNA inkorporiert werden kann. Bei **VII+B** ist im Vergleich zu **VII+G** ein deutlich geringeres Fluoreszenzsignal erkennbar. Ein Grund hierfür könnte das Problem mit der DNA-Konformation darstellen. Wie in Kapitel 4.5 erwähnt, konnten Fluoreszenzsteigerungen mit SPH-modifizierten Oligonukleotiden *in vitro* nur mit externer Wärmezufuhr von 60 °C detektiert werden. Das SPH als Reaktionspartner könnte für das Fluorophor **B** durch die dicht gepackte Chromatinstruktur nur bedingt zugänglich sein, weswegen nur ein sehr geringes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte.

Zusammenfassend konnten SPH-modifizierte Oligonukleotide erfolgreich mittels Transfektion in die Zelle eingebracht und mit den Fluorophoren **A-D** in einer iEDDA-Reaktion *in cellulo* markiert werden. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die SPH-Modifikation in zellulärer Umgebung stabil bleibt sowie die Membrangängigkeit der Fluorophore nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine erfolgreiche metabolische Markierung mit dem SPH-modifizierten Nukleosid **VII** und Tetrazol **G** mittels Photoclick-Reaktion beobachtet werden. Bei der metabolischen Markierung mit Fluorophor **B** und Nukleosid **VII** mittels iEDDA-Reaktion konnte aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit des Dienophils in der DNA-Konformation nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden.

4.8 FISH im Zebrafisch mit „Click“-modifizierten acpcPNA-Sonden

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Synthese und Anwendung von modifizierten acpcPNA-Sonden, welche später mittels FISH in Zebrafisch-Embryos visualisiert werden sollen. In Zusammenarbeit mit PROF. DR. TIRAYUT VILAIVAN wurden Pyrrolidinyl-PNA-Sonden (acpcPNA-Sonden) synthetisiert und anschließend mittels CuAAC postsynthetisch mit den Farbstoffen Cy3 und Atto647N modifiziert. Die Synthese der acpcPNA erfolgte während eines vom KHYS geförderten dreimonatigen Aufenthalts an der Chulalongkorn-Universität in Bangkok, Thailand. Im Rahmen dieser Kooperation wurde angestrebt, einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen zwei acpcPNA-Sonden zu etablieren, die jeweils mit einem der beiden Farbstoffe markiert sind, um die *shha*-Sequenz (*sonic hedgehog signaling molecule a*) im Zebrafisch zu detektieren (Abbildung 54). Aufgrund der hohen Selektivität und Bindungsaffinität der acpcPNA gegenüber RNA und DNA (siehe Kapitel 2.6.1) sollte ein intensiveres Signal als bei herkömmlichen RNA- oder DNA-Hybridisierungen mit denselben Farbstoffen erzeugt werden.

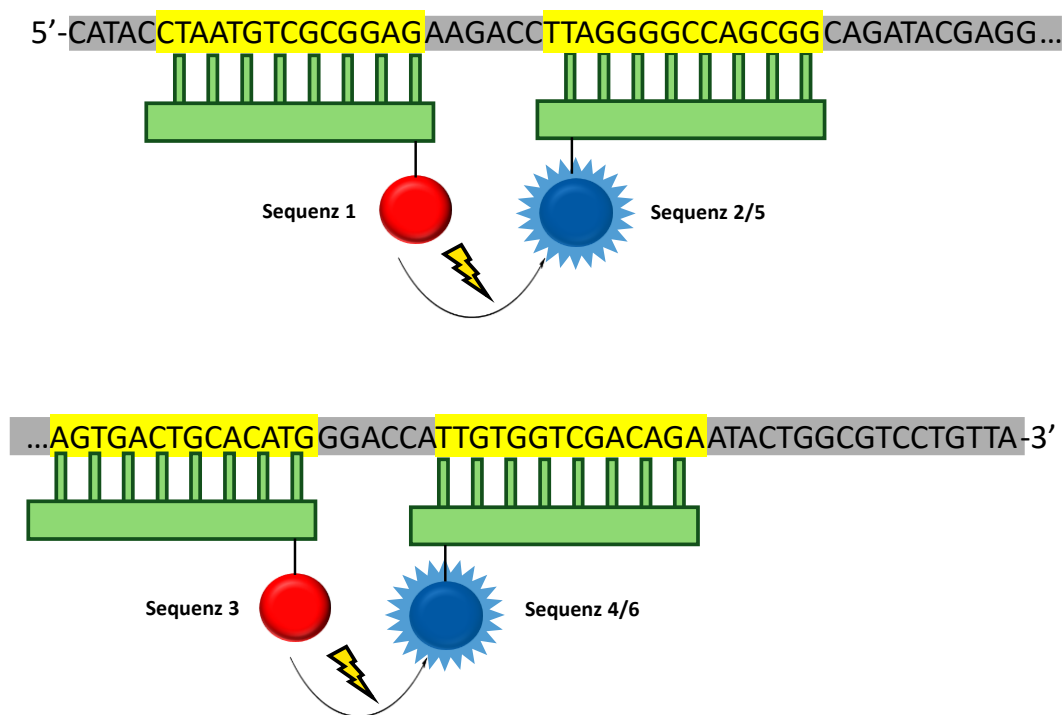


Abbildung 54 – Übersicht des FRETs mittels acpcPNA-Sonden (grün), welche mit Cy3 (rot) bzw. Atto647N (blau) modifiziert sind sowie einen Ausschnitt der *shha*-Sequenz (grau). Die gelb markierten Sequenzabschnitte stellen die Hybridisierungspunkte der acpcPNA-Sonden dar.

4.8.1 Synthese und Modifikation von acpcPNA-Sonden

Die acpcPNA wurde unter Verwendung eines *Tentagel-S-RAM*-Harzes aus den einzelnen Fmoc-geschützten Monomeren synthetisiert. Der Syntheseprozess, bestehend aus Entschützung, Kupplung und Schützung der nicht umgesetzten PNA mittels Essigsäureanhydrid, folgte einem von VILAIVAN *et al.* etablierten Protokoll.^[167] Die acpcPNA besteht aus zwei alternierenden cyclischen Bausteinen, der Aminosäure *D*-Prolin und der (1*S*,2*S*)-2-Amino-1-cyclopentancarbonsäure (Spacer). Der C- bzw. N-Terminus der acpcPNA ist mit drei Lysinresten versehen, welche die Wasserlöslichkeit der acpcPNA erhöhen. Zusätzlich fungiert das Lysin am C-Terminus als Modifikationspunkt für die postsynthetische Cu(I)-Click-Reaktion zwischen der acpcPNA und dem Fluorophor. Insgesamt wurden zwei Sequenzen mit dem Cy3-Farbstoff (**Seq1** und **Seq3**) und vier Sequenzen mit dem Atto647N-Farbstoff (**Seq2**, **Seq4**, **Seq5** und **Seq6**) modifiziert, die jeweils eine Länge von 14 Basenpaaren aufweisen. Die Atto647N-modifizierten **Seq2** und **Seq5** bzw. **Seq4** und **Seq6** unterscheiden sich hierbei im Basenabstand zu den Cy3-modifizierten **Seq1** und **Seq3** (**Seq2** bzw. **Seq4**: 16 Basenpaare, **Seq5** bzw. **Seq6**: 6 Basenpaare). Dadurch soll die Effizienz des FRETs auch distanzabhängig untersucht werden. Abbildung 55 zeigt die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden Farbstoffe, welche die FRET-Kompatibilität bestätigen.

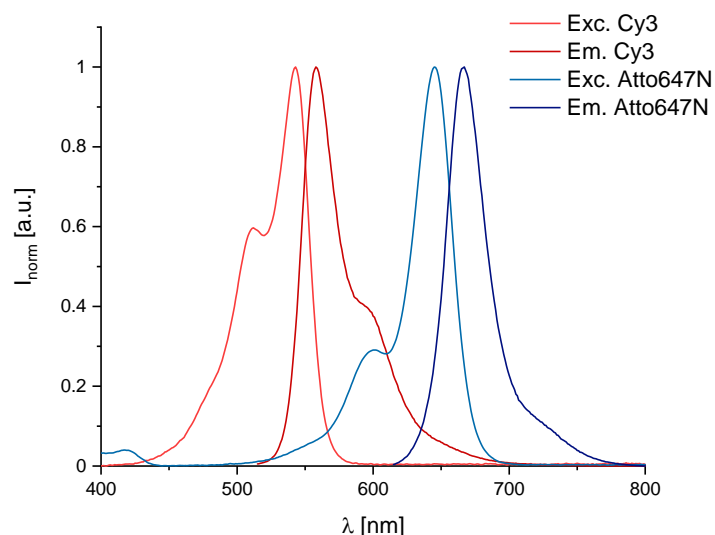


Abbildung 55 – Anregungs- und Emissionssignal der Farbstoffe Cy3 und Atto647N (jeweils 5 μ M in H₂O bei 20 °C). Die überlappende Fläche zwischen der Emission des Cy3-Farbstoffs und der Anregung des Atto647N-Farbstoffs zeigt die FRET-Kompatibilität der beiden Farbstoffe.

Nach erfolgreicher PNA-Synthese von **Seq1** und **Seq3** wurde der N-Terminus der acpcPNA für die postsynthetische CuAAC mittels 5-Hexinsäure mit einem terminalen Alkin-Linker funktionalisiert (Abbildung 56). Anschließend wurden die Schutzgruppen der Nukleobasen-

Ergebnisse und Diskussion

Seitenketten durch eine Mischung aus Ammoniak und 1,4-Dioxan bei 60 °C über Nacht entfernt. Die anschließende CuAAC erfolgte unter Verwendung eines Cu(I)-Katalysator und Cy3-Azid, gefolgt von der Abspaltung der acpcPNA von der festen Phase mittels Trifluoressigsäure (TFA). Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC konnte die Cy3-modifizierte acpcPNA mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie nachgewiesen werden (siehe Anhang, Tabelle 10).

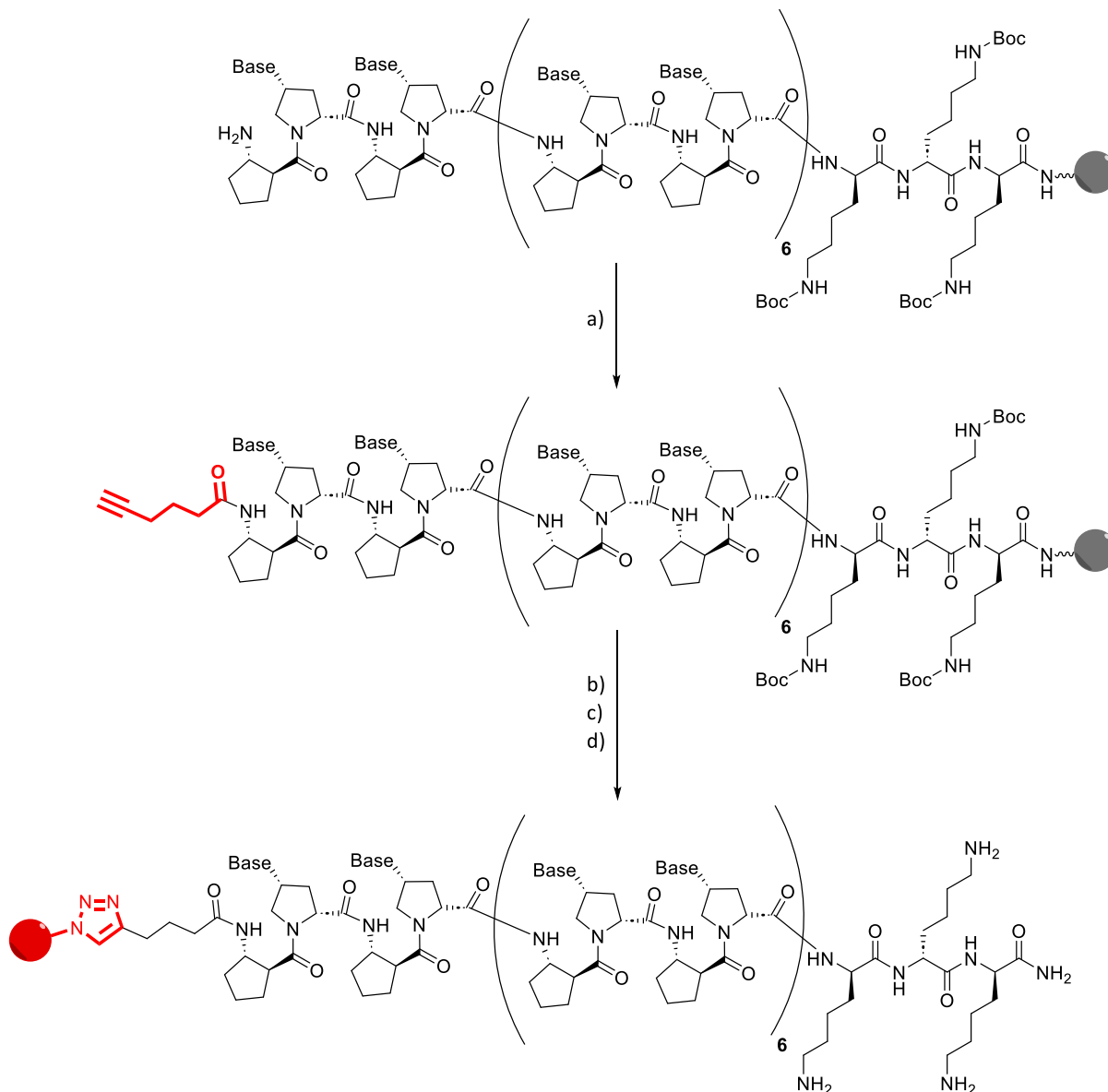


Abbildung 56 – Cy3-Modifikation der der Sequenzen **Seq1** und **Seq3** mittels CuAAC und Abspaltung von der Festphase. a) HATU, DIPEA, 5-Hexinsäure, DMF; b) Ammoniak/1,4-Dioxan 1:1 (Vol%), 60 °C, 16 h; c) CuAAC: Natriumascorbat, Trisbenzylmethylamin, Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, Cy3-Azid, t-BuOH, DMSO; d) TFA.

Die Sequenzen **Seq2**, **Seq4**, **Seq5** und **Seq6** wurden am C-Terminus mit dem Atto647N-Farbstoff modifiziert. Hierfür wurde direkt nach der Festphase ein MTT-geschütztes Lysin eingeführt, bevor die Strängerweiterung mit der Basensequenz fortgesetzt wurde. Zur

Erhöhung der Hydrophilie der acpcPNA wurden am N-Terminus der Sequenzen drei Lysinreste integriert (Abbildung 57).

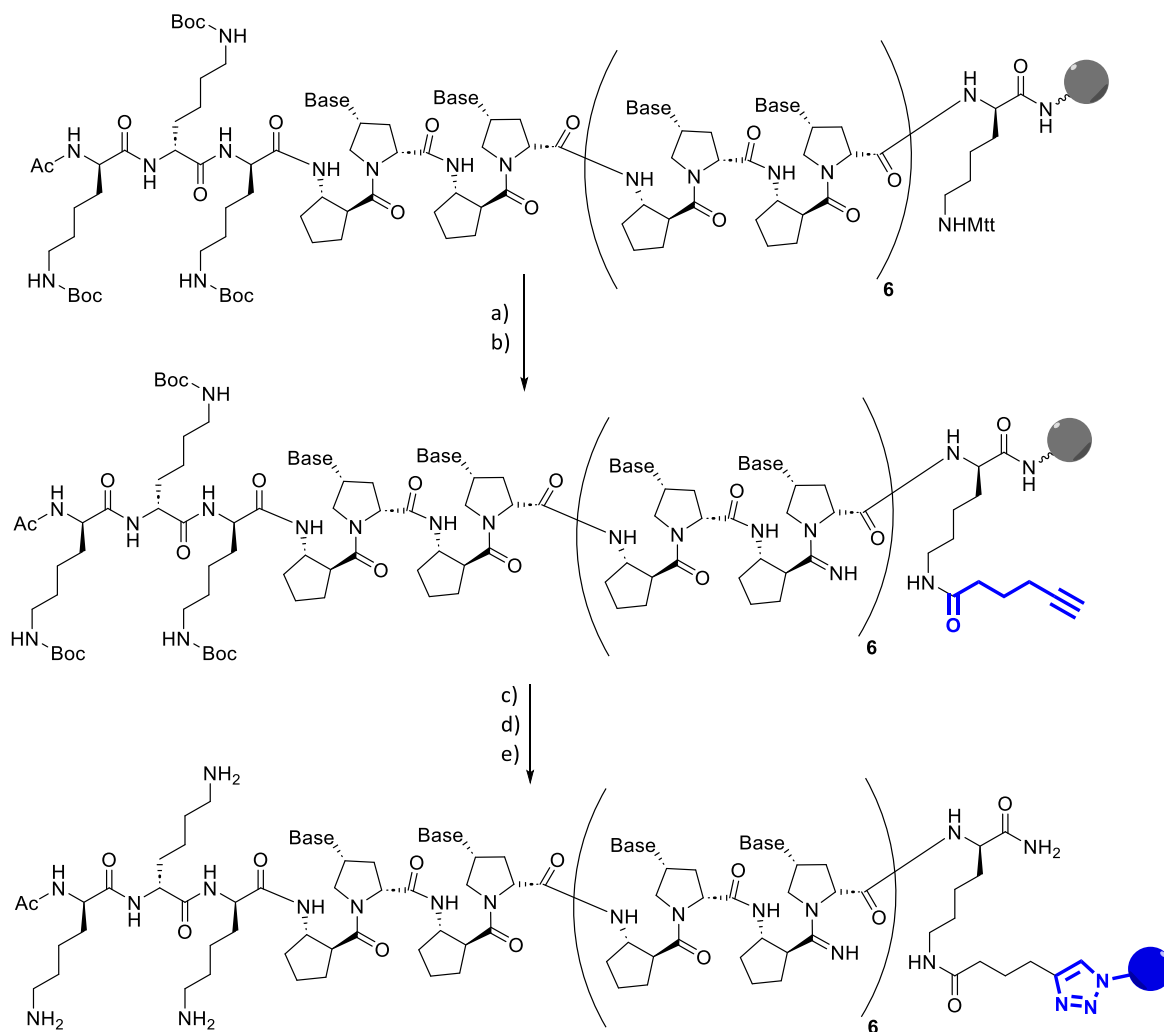


Abbildung 57 – Atto647N-Modifikation der Sequenzen **Seq2**, **Seq4**, **Seq5** und **Seq6** mittels CuAAC und Abspaltung von der Festphase. a) TES, HFIP, TFE, DCM; b) HATU, DIPEA, 5-Hexinsäure, DMF; c) Ammoniak/1,4-Dioxan 1:1 (Vol%), 60 °C, 16 h; d) CuAAC: Natriumascorbat, Trisbenzylmethylamin, Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, Atto647N-Azid, t-BuOH, DMSO; e) TFA.

Nach vollständiger Synthese der PNA wurde die MTT-Gruppe mit einer Lösung aus Triethylsilan (TES), Hexafluoroisopropanol (HFIP) und Trifluoroethanol (TFE) in DCM entfernt. Nach wiederholtem Waschen mit DCM und DMF wurde die Alkylierung analog zu **Seq1** und **Seq3** durchgeführt, um die terminale Alkinfunktion für die CuAAC mit dem Farbstoffazid bereitzustellen. Nach Entschützung der Seitenketten mittels Ammoniaks und 1,4-Dioxan bei 60 °C über Nacht wurde die CuAAC mit Atto647N-Azid analog zur Modifikation von **Seq1** und **Seq3** durchgeführt. Die resultierende blau gefärbte acpcPNA wurde mit TFA von der Festphase abgespalten und anschließend über RP-HPLC aufgereinigt. Es konnten die Sequenzen **Seq2**, **Seq4**, **Seq5** und **Seq6** mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

4.8.2 Charakterisierung FRET *in vitro*

Zunächst wurden die acpcPNA-Sonden mit kommerziell erworbenen komplementären und nicht komplementären DNA- und RNA-Strängen *in vitro* hybridisiert und anschließend mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert. Zur besseren Übersicht werden im Folgenden nur die Fluoreszenzspektren dargestellt. Es wurde erwartet, dass bei den komplementären Strängen ein FRET-Signal detektiert werden kann, während bei den nicht-komplementären Strängen kein Effekt zu beobachten sein sollte. Die Experimente wurden zunächst ausschließlich mit DNA-Strängen durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln, bevor diese auf RNA übertragen wurden. Da die finale Zielsetzung, die Detektion von RNA mittels FISH im Zebrafisch ist, wurden die Vorversuche mit DNA durchgeführt, da diese wesentlich kostengünstiger ist. Im ersten Schritt wurden exemplarisch drei komplementäre DNA-Stränge mit jeweils 1,00 Äquivalent **Seq3**, **Seq6** sowie **Seq3+Seq6** unter Zugabe von 250 mM NaCl und 10 mM NaP_i-Puffer bei 90 °C über Nacht hybridisiert.

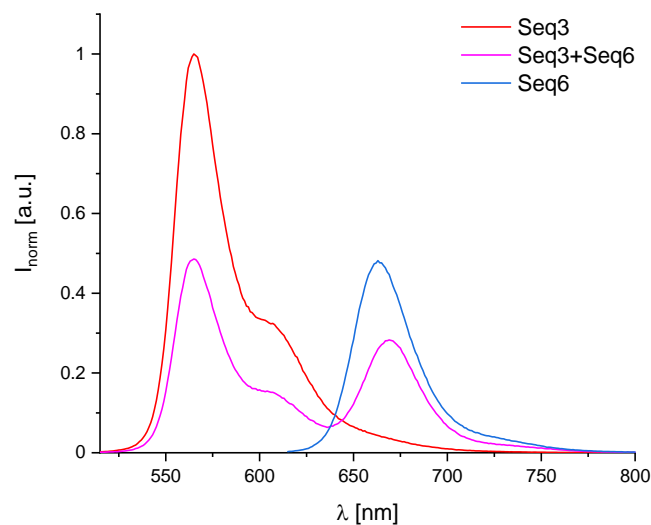


Abbildung 58 – Fluoreszenzspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit **Seq3** und **Seq6**. $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq6}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+Seq6}) = 500 \text{ nm}$; 250 mM NaCl, 2,5 μM in 10 mM NaP_i, pH = 7, 20 °C.

Abbildung 58 zeigt die drei Fluoreszenzspektren der Hybridisierungen von **Seq3**, **Seq6** sowie **Seq3+Seq6** mit komplementärer DNA. Die Hybridisierungen von **Seq3** und **Seq3+Seq6** mit komplementärer DNA wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ sowie **Seq6** mit komplementärer DNA bei $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$ angeregt, welche jeweils spezifisch für die eingesetzten Farbstoffe sind. Die Fluoreszenzspektren zeigen eine deutliche Emission der beiden Farbstoffe bei $\lambda_{\text{em}} = 565 \text{ nm}$ für Cy3 und $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$ für Atto647N. Auffällig ist die

signifikant höhere Emission des Cy3-Farbstoffs im Vergleich zu Atto647N. Durch den identischen Extinktionskoeffizient ist dies damit zu begründen, dass die Absorption des Cy3-Farbstoffs bei $\lambda = 500$ nm stärker ist als die des Atto647N-Farbstoffs bei $\lambda = 600$ nm (siehe Abbildung 55).^[168] Die mit **Seq3+Seq6** hybridisierte DNA-Probe zeigt Emissionsbanden bei $\lambda = 565$ nm und $\lambda = 670$ nm, welche der Emission der beiden Farbstoffe entsprechen (Abbildung 58, lila). In Kontrollversuchen mit **Seq6** und hybridisierter DNA konnte bei Anregung mit $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm keine signifikante Emission des Atto647N-Farbstoffs nachgewiesen werden. Daher kann die in Abbildung 58 (lila) beobachtete Emission mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 670$ nm auf einen FRET vom Cy3 auf den Atto647N-Farbstoff zurückgeführt werden. WAGENKNECHT *et al.* zeigten 2015, dass bei Strangaustauschexperimenten von acpcPNA mit DNA ohne Zugabe von NaCl bei der DNA/PNA-Hybridisierung höhere Emissionsintensitäten erzielt wurden.^[134] Basierend auf diesen Ergebnissen wurden erneut analoge Hybridisierungsexperimente ohne die Zugabe von NaCl, ausschließlich in NaPi -Puffer durchgeführt (Abbildung 59).

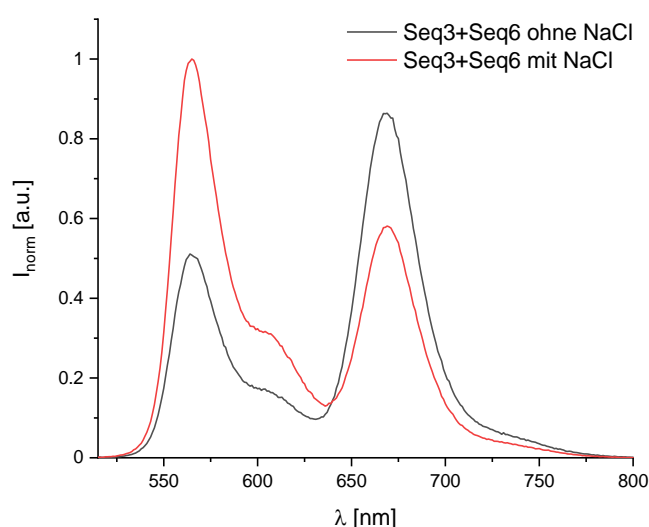


Abbildung 59 – Vergleich der Fluoreszenzspektren von hybridisierter, komplementärer DNA mit **Seq3+Seq6** mit NaCl (rot) und ohne NaCl (schwarz), $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+Seq6}) = 500$ nm, 2,5 μM in 10 mM NaPi , pH = 7, 20 °C.

Abbildung 59 zeigt, dass die Emissionsbande bei $\lambda = 670$ nm bei Anregung der hybridisierten DNA mit **Seq3+Seq6** bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm in Abwesenheit von NaCl eine höhere Fluoreszenzintensität aufweist als in Gegenwart von NaCl. Dieses Verhalten ist auf die veränderte elektrostatische Interaktion zwischen DNA und PNA zurückzuführen. Mit zunehmender Ionenstärke nimmt die elektrostatische Interaktion zwischen DNA und PNA ab,

was zu einer Erweiterung des Donor-Akzeptor-Abstandes führt. Diese Distanzveränderung resultiert anschließend in einem verminderten Energietransfer.^[169] Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden alle nachfolgenden Hybridisierungen ohne NaCl durchgeführt. Anschließend wurde die Effizienz des Energietransfers zwischen **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6** verglichen. Die Sequenzen **Seq3** und **Seq4** wurden, analog zum vorherigen Experiment, ohne NaCl mit der komplementären DNA hybridisiert und mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert.

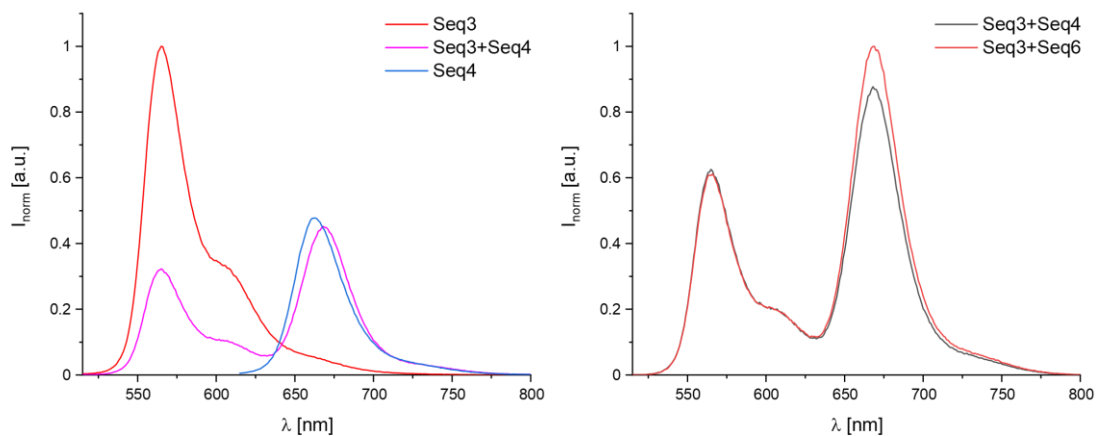


Abbildung 60 – links: Fluoreszenzspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit **Seq3**, **Seq4** und **Seq3+Seq4**. $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq4}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+4}) = 500 \text{ nm}$ ($2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi), rechts: Vergleich der Fluoreszenzspektren von hybridisierter komplementärer DNA mit **Seq3+Seq4** (schwarz) und mit **Seq3+Seq6** (rot), $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ ($2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi), $\text{pH} = 7$, 20°C .

Das linke Spektrum in Abbildung 60 zeigt die Fluoreszenz der Hybride aus komplementärer DNA mit **Seq3**, **Seq4** und **Seq3+Seq4**. Bei den Hybriden aus DNA mit **Seq3+Seq4** konnte ebenfalls eine Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ detektiert werden. Der Vergleich der Distanzabhängigkeit zeigt, dass der Energietransfer bei **Seq3+Seq6** etwas stärker ist, da im Vergleich zu **Seq3+Seq4** eine größere Fluoreszenzintensität gemessen werden konnte (Abbildung 60, rechts). Somit konnte ein effizienterer Energietransfer des FRET über sechs Basenpaare (**Seq3+Seq6**) als über 16 Basenpaare (**Seq3+Seq4**) nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit der Literatur, in der die Effizienz des Energietransfers entweder über den Abstand von Donor und Akzeptor oder über die Löschung der Donorfluoreszenz bestimmt werden kann.^[170]

Um zu zeigen, dass der FRET ausschließlich bei Hybridisierung von PNA mit DNA erfolgt, wurde im Folgenden ein nicht-komplementärer DNA-Strang mit den Sequenzen **Seq3**, **Seq4** und **Seq6**

hybridisiert und anschließend mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Hierfür wurden die Hybridisierungsbedingungen analog zu den vorherigen Experimenten gewählt und die nicht-komplementäre DNA einzeln mit **Seq3**, **Seq4** bzw. **Seq6** und **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6** hybridisiert.

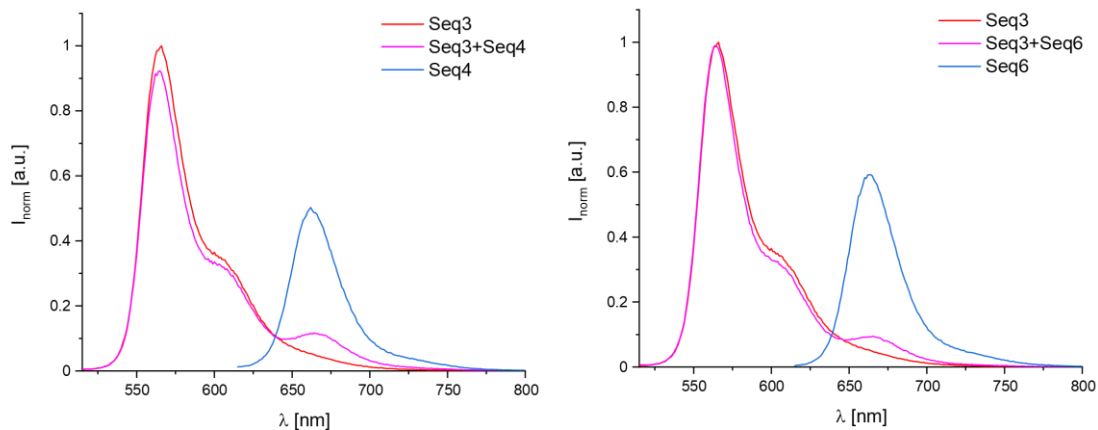


Abbildung 61 - Fluoreszenzspektren der hybridisierten, nicht-komplementären DNA mit **Seq3**, **Seq4/Seq6** und **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6**. $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq4/Seq6}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+Seq4/Seq6}) = 500 \text{ nm}$; $2,5 \text{ } \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi , $\text{pH} = 7$, $20 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Die Hybride mit nicht-komplementärer DNA zeigte im Vergleich zu der komplementären DNA nur eine geringe Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ mit **Seq3+Seq4/Seq6** (Abbildung 61, lila). Da keine spezifische Hybridisierung der PNA mit DNA stattfindet, kommt es zu keinem zwischen Donor und Akzeptor, wobei kein spezifischer FRET detektiert werden konnte. Der beobachtete geringe Anstieg der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ ist auf die diffusionsgetriebene Wechselwirkung der ungebundenen PNA-Fluorophore in Lösung zurückzuführen. Aufgrund der zufälligen Annäherung der Farbstoffe in Lösung kann ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden, welches jedoch deutlich geringer ausfällt als bei einer spezifischen Bindung an die komplementäre DNA.

Nach der Optimierung der Bedingungen wurden die Experimente mit RNA durchgeführt. Die Hybridisierungen mit den acpcPNA-Sequenzen und den RNA-Strängen erfolgten analog zu den DNA-Experimenten. Es wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Materialien mit Ethanol desinfiziert sowie RNase-freies Wasser und Pufferlösung frisch hergestellt wurden. In den erhaltenen Fluoreszenzspektren konnten starke Parallelen zu den DNA-Hybridisierungen festgestellt werden (Abbildung 62).

Ergebnisse und Diskussion

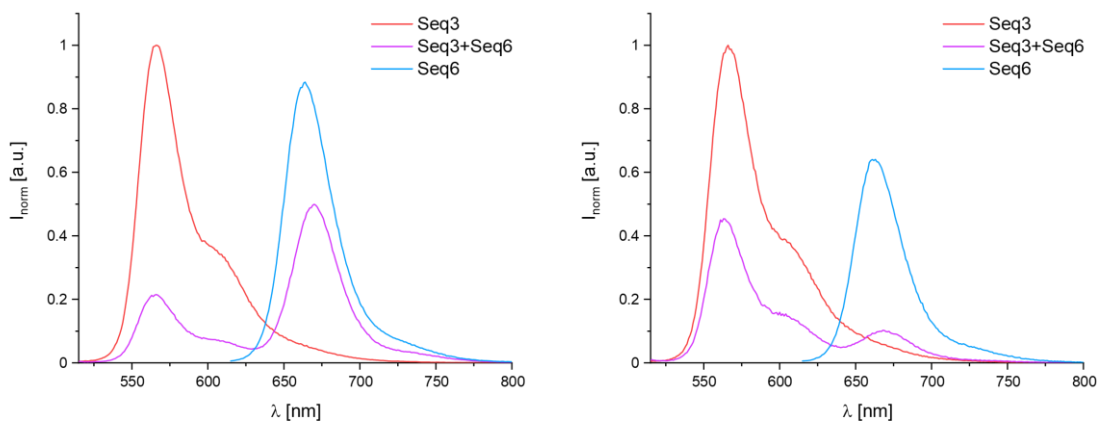


Abbildung 62 – Vergleich der Fluoreszenzspektren von komplementärer RNA (links) mit nicht-komplementärer RNA (rechts) mit **Seq3**, **Seq6** und **Seq3+Seq6**, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq6}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+6}) = 500 \text{ nm}$ (2,5 μM in 10 mM NaPi), pH = 7, 20 °C.

Auch bei den RNA-Hybridisierungen zeigt sich, dass die Emission des Cy3-Farbstoffs eine höhere Intensität als die des Atto647N-Farbstoffes aufweist. Dies kann erneut mit der höheren Absorption der Farbstoffe bei der jeweiligen Anregungswellenlänge erklärt werden. Ebenfalls konnte ein FRET mit dem komplementären RNA-Strang und den hybridisierten acpcPNA-Sequenzen **Seq3+Seq6** detektiert werden, welcher mit dem nicht-komplementären RNA-Strang sehr schwach ausfällt. Auch hier kann die leichte Emissionsintensität bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ durch die willkürliche Anordnung der Farbstoffe in Lösung erklärt werden. Zur vollständigen Aufarbeitung der Daten wurden ebenfalls **Seq3** und **Seq4** analog mit komplementären und nicht-komplementären RNA-Strängen hybridisiert. Abbildung 63 (links) zeigt, dass bei den Hybriden von **Seq3+Seq6** mit dem komplementären RNA-Strang eine höhere Emissionsintensität bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ detektiert wurde als mit **Seq3+Seq4**. Dies deckt sich mit den Messungen der DNA-Hybridisierungsexperimente. Im Vergleich der RNA- und DNA-Hybride mit **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6** lässt sich erkennen, dass die Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor mit den DNA-Hybridisierungen stärker ausfällt als bei den RNA-Hybridisierungen, was durch ein erhöhtes Emissionssignal bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ bei einer Anregung von $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ zu erkennen ist (Abbildung 63, rechts). Dies kann dadurch erklärt werden, dass acpcPNA eine höhere Bindungsaffinität zu DNA als zu RNA besitzt.^[131] Durch die höhere Bindungsaffinität wird demzufolge ein erhöhtes Emissionssignal detektiert.

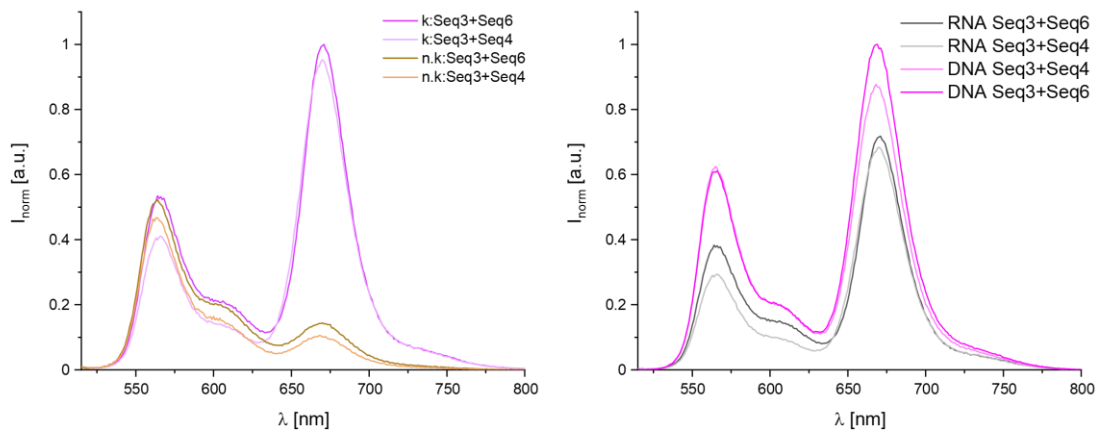


Abbildung 63 – links: Vergleich der Fluoreszenzspektren von komplementärer (k., lila) und nicht-komplementärer (n.k., braun) RNA mit **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6** bei $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm (2,5 μ M in 10 mM NaPi); rechts: Vergleich Fluoreszenzspektren von komplementärer RNA (grau) und DNA (lila) mit **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6** bei $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm (2,5 μ M in 10 mM NaPi), pH = 7, 20 °C.

Zum Schluss sollten die acpc-Sequenzen **Seq1**, **Seq3**, **Seq5** und **Seq6** mittels FISH in Zebrafisch-Embryos eingesetzt werden.

4.8.3 FISH in Zebrafisch-Embryos *in vivo*

Die FISH-Experimente im Zebrafisch wurden in Zusammenarbeit mit MELINA KÖHLER in der Arbeitsgruppe RASTEGAR durchgeführt. Es wurde nach einem Standard-Protokoll von VANESSA GERBER gearbeitet.^[171] Für die FISH in Zebrafisch-Embryos wurden sechs verschiedene Proben untersucht, um die Hybridisierungseffizienz und die Intensität des FRETs *in vivo* zwischen der zu detektierenden shha-Sequenz und den acpcPNA-Strängen zu charakterisieren. Zur Validierung der Methodik diente Probe eins als Positivkontrolle, bei der ein Anti-Digoxigenin-Antikörper- gekoppelter Cy3-Farbstoff mittels Tyramidfärbung verwendet wurde, während Probe zwei als Negativprobe ohne jegliche Zugaben fungierte. Probe drei bildete ein RNA-PNA Hybrid (**Seq1+Seq5** und **Seq3+Seq6**), welches bereits bei den Experimenten *in vitro* hybridisiert und untersucht wurde. Probe vier enthielt lediglich **Seq1** und **Seq3**, welche ausschließlich die Emission des Cy3 Farbstoffs zeigen sollte, während bei Probe fünf durch Zugabe von **Seq5** und **Seq6** nur die Emission des Atto647N Farbstoffs erwartet wurde. Probe sechs enthielt **Seq1**, **Seq3**, **Seq5** und **Seq6**, bei der ein FRET-Signal wie in den Experimenten *in vitro* erwartet wurde. Alle PNA-Sequenzen wurden mit einer Konzentration von 40 ng in 400 μ L mit den Zebrafisch-Embryos für 48 h hybridisiert, gewaschen und anschließend mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

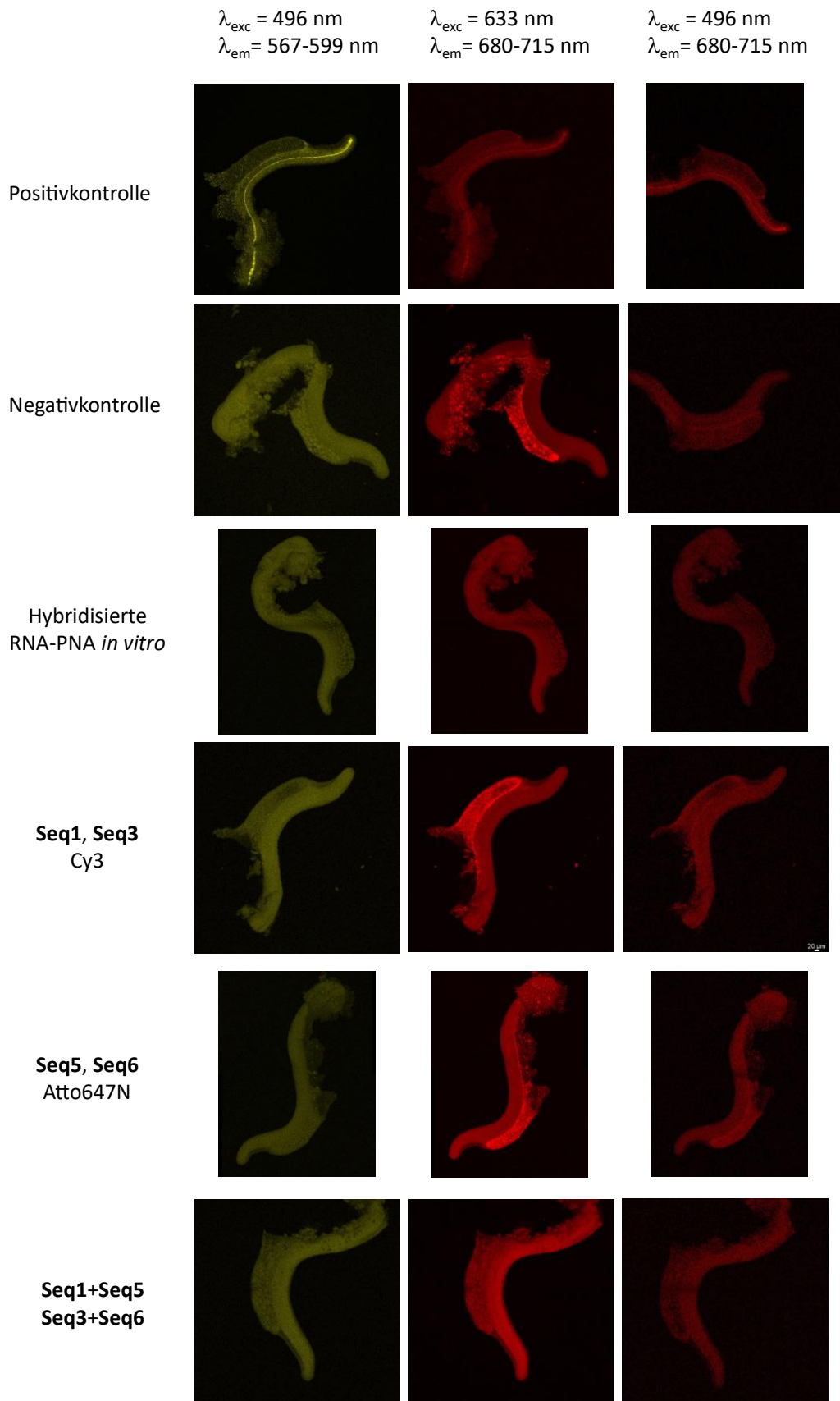


Abbildung 64 – FISH der Proben eins bis sechs zur Detektion der shha-Sequenz in Zebrafisch-Embryos. Spalte eins zeigt den Cy3-Emissionskanal ($\lambda_{\text{exc}} = 496 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 567\text{-}599 \text{ nm}$), Spalte zwei den Atto647N-Emissionskanal ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 680\text{-}715 \text{ nm}$) und Spalte drei den Emissionskanal des Atto647N-Farbstoffs unter Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 496 \text{ nm}$. Alle Proben wurden mit einer Konzentration von 40 ng in 400 μL verwendet, 48 h inkubiert und anschließend mit PTW gewaschen.

Abbildung 64 zeigt die sechs zuvor beschriebenen Proben mit den Zebrafisch-Embryos, welche in drei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen untersucht wurden. Fluoreszenzkanal eins zeigt die Emission des Cy3-Farbstoffs ($\lambda_{\text{exc}} = 496 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 567\text{-}599 \text{ nm}$), Fluoreszenzkanal zwei die Emission des Atto647N-Farbstoffs ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 680\text{-}715 \text{ nm}$) sowie Fluoreszenzkanal drei den Emissionskanal des Atto647N-Farbstoffs bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 496 \text{ nm}$, bei welchem der zu detektierende FRET erwartet wurde. Wie erwartet, weist die Negativkontrolle in keinem der Fluoreszenzkanäle ein spezifisches Fluoreszenzsignal auf. Die Positivkontrolle hingegen zeigt eine spezifische Färbung entlang des Rückgrats des Zebrafisch-Embryos im ersten Fluoreszenzkanal. Dies bestätigt eine erfolgreiche Hybridisierung der Positivkontrolle mit der zu detektierenden shha-Sequenz, welche durch die Tyramidfärbung den Cy3-Farbstoff trägt. Aufgrund der leichten Emission des Cy3-Farbstoffs bis $\lambda = 700 \text{ nm}$, ist dieser zudem schwach im zweiten Fluoreszenzkanal sichtbar. In allen anderen Proben konnte in keinem Fluoreszenzkanal ein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Weder in Probe vier, welche durch **Seq1** und **Seq3** ausschließlich den Cy3-Farbstoff trägt, noch in Probe fünf, welche durch **Seq5** und **Seq6** den Atto647N-Farbstoff beinhaltet, konnte eine spezifische Färbung im jeweiligen Fluoreszenzkanal detektiert werden. Darüber hinaus konnte in Probe sechs kein FRET-Signal visualisiert werden. Dies könnte auf suboptimale Hybridisierungsbedingungen oder unzureichende Konzentration der verwendeten acpcPNA-Sequenzen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die acpcPNA-Sequenzen **Seq1-Seq6** erfolgreich synthetisiert und mit den jeweiligen Farbstoffen modifiziert werden konnten. Durch Hybridisierungsexperimente *in vitro* mit komplementären und nicht-komplementären DNA- und RNA-Strängen konnte ein FRET zwischen den Farbstoffen detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Energieübertragung über sechs Basenpaare ein effizienteres Emissionssignal bei $\lambda = 670 \text{ nm}$ lieferte als über 16 Basenpaare. Zudem konnte gezeigt werden, dass der FRET bei Hybridisierung der acpcPNA-Stränge mit DNA durch die höhere Bindungsaffinität stärker ausgeprägt ist als mit komplementären RNA-Strängen. Bei den Hybridisierungsexperimenten *in vivo* mit Zebrafisch-Embryos konnte jedoch kein FRET bzw. ein spezifisches Fluoreszenzsignal mit den jeweiligen Proben erreicht werden. Hierfür müssten weitere Experimente erfolgen, wobei verschiedene Parameter wie die Konzentration, Hybridisierungsbedingungen oder die Länge der acpcPNA variiert werden sollten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene SPH-modifizierte Nukleoside und Oligonukleotide umfassend mittels Cyanin-Styryl-Fluorophoren in iEDDA-Reaktionen sowie mit fluorogenen Tetrazolen in Photoclick-Reaktionen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die sterische Hinderung und die Linker-Nukleobasen-Struktur erheblichen Einfluss auf die Fluoreszenzsteigerungen und die Reaktionskinetik der iEDDA-Reaktionen aufweisen. Darüber hinaus konnten SPH-modifizierte Oligonukleotide und Nukleoside in lebenden und fixierten HeLa-Zellen mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktionen visualisiert werden.

Zu Beginn wurde eine kleine Bibliothek mit SPH-modifizierten Nukleosiden synthetisiert, welche sich in ihrer Linkerstruktur und Nukleobasen unterscheiden, um diese für spätere Anwendung *in cellulo* zu optimieren. Hierbei wurden flexible und starre Linker gewählt sowie die Nukleobasen Uridin und Adenosin und diese mit Tetrazin-Fluorophoren in iEDDA-Reaktionen charakterisiert. Als Bewertungsgrundlage diente die Reaktion zwischen SPH-OH **7** mit den Fluorophoren **A-D**. Es konnte gezeigt werden, dass die Nukleoside **I-V** im Vergleich zu **7** eine erhöhte Fluoreszenzsteigerung und verbesserte Kinetik mit den Fluorophoren **A-D** aufwiesen. Die Verwendung eines starren Linkers ermöglichte die höchsten Fluoreszenzsteigerungen, wohingegen Adenosin als Nukleobase durch Verringerung der HOMO/LUMO Lücke die iEDDA-Reaktion deutlich beschleunigte. So konnten Fluoreszenzsteigerungen von bis zu 38 im Vergleich zur Eigenfluoreszenz der Fluorophore und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 38,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden.

Die *Turn-On*-Werte konnten durch SPH-modifizierte Oligonukleotide als Dienophil nochmal deutlich gesteigert werden. So konnten die Fluoreszenzsteigerungen um das bis zu 9,5-fache im Vergleich zu den Nukleosiden auf bis zu 130 beobachtet werden. Dies bestätigt die klare Korrelation zwischen den SPH-modifizierten Dienophilen, wobei eine erhöhte Fluoreszenzsteigerung der Fluorophore mit der Zunahme des sterischen Anspruchs des Dienophils einhergeht. Weiterhin konnte durch Hybridisierung der DNA-Einzelstränge durch den entsprechenden Gegenstrang *Turn-On*-Werte von bis zu 251 gemessen werden. Im Gegensatz zu den Nukleosiden konnte jedoch keine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ermittelt werden, da die Konformation des kleinen chemischen Reporters SPH in der DNA die iEDDA-Reaktion mit dem Dien bei Raumtemperatur verhindert.

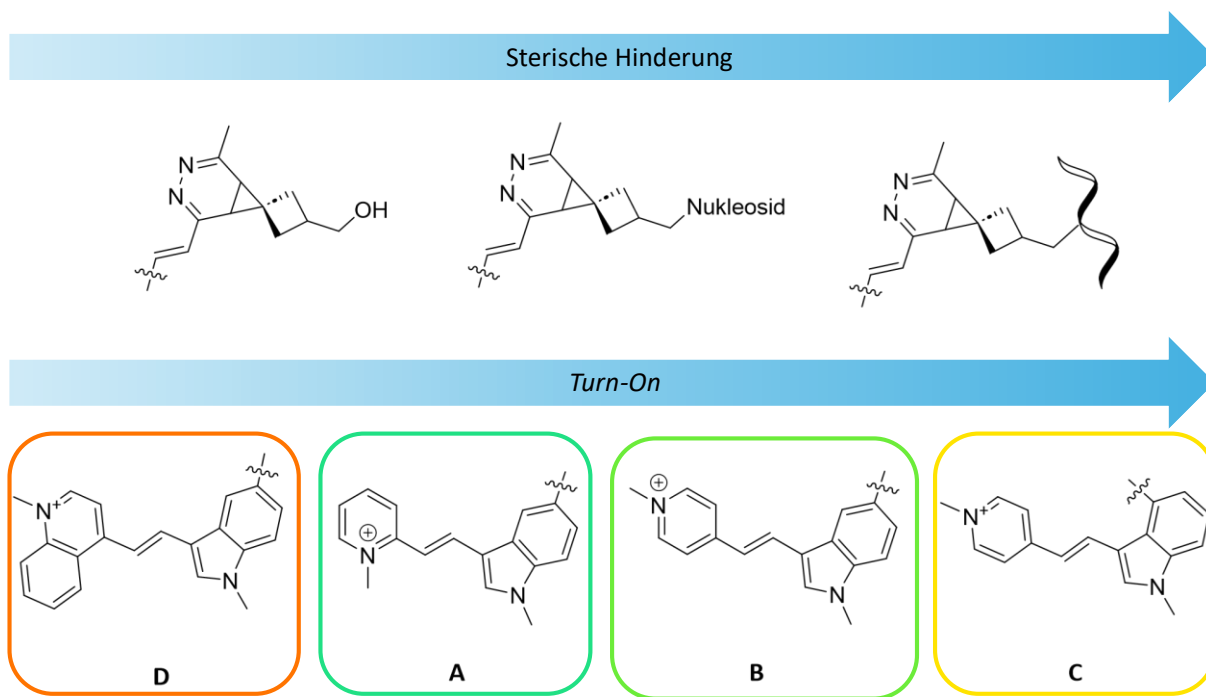


Abbildung 65 – Schematische Darstellung der iEDDA-Reaktionen zwischen SPH-OH **7**, SPH-modifizierten Nukleosiden und SPH-modifizierten Oligonukleotiden mit den Fluorophoren **A-D**, wobei eine klare Korrelation zwischen sterischer Hinderung des Dienophils und den *Turn-On*-Werten mit den Fluorophoren zu erkennen ist. Die höchsten Fluoreszenzsteigerungen wurden mit **dsDNA3** mit Fluorophor **C** erzielt, gefolgt von **B**, **A** und **D**.

Da Spirohexene sowohl in einer iEDDA-Reaktion als auch in einer Photoclick-Reaktion als Dienophil reagieren können, wurde die Reaktivität von Nukleosid **I** mit anderen Dienophilen, welche im Arbeitskreis WAGENKNECHT etabliert sind, verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass SPH-modifizierte Nukleoside eine höhere Reaktivität als die strukturell ähnlichen 3-Methylcyclopropen-modifizierten Nukleoside mit den verwendeten Tetrazolen aufweisen. Nukleosid **I** konnte zudem erfolgreich mit den Pyren-modifizierten Tetrazolen **F** und **G** umgesetzt werden, welche beide im sichtbaren Spektralbereich mit $\lambda = 405$ nm anregbar sind. Dabei konnte die Photoclick Reaktion von **I+F** mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k_2 = 5000 \pm 390 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ohne Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden.

In den darauffolgenden Zellexperimenten konnten SPH-modifizierte Oligonukleotide erfolgreich mittels Transfektion in die Zelle eingebracht und mittels iEDDA-Reaktionen mit den Fluorophoren **A-D** markiert werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die SPH-Modifikation in zellulärer Umgebung stabil bleibt und sich für bioorthogonale Reaktionen *in cellulo* eignet. Im Anschluss wurde die Anwendung von SPH-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden zur metabolischen Markierung in Zellen untersucht. Es konnte eine erfolgreiche metabolische Markierung mit dem SPH-modifizierten Nukleosid **VII** und Tetrazol **G** mittels Photoclick-Reaktion beobachtet werden. Die Modifikation des SPH mit stark

reduzierter Linkerlänge wird offenbar von den zelleigenen Kinasen akzeptiert und in die genomische DNA inkorporiert. Ebenfalls konnte ein schwaches Fluoreszenzsignal bei der metabolischen Markierung zwischen Nukleosid **VII** und Fluorophor **B** beobachtet werden.

2018 zeigten LIN *et al.* die Synthese und Charakterisierung von hydrophilen Azaspiroalkenen mittels bioorthogonaler Markierung von Proteinen.^[101] Sie synthetisierten ein Azaspiro[2,3]hexen sowie ein Azaspiro[2,4]hepten, welche sich durch verbesserte Kinetik und Wasserlöslichkeit im Vergleich zu SPH auszeichnen. Für zukünftige Experimente bietet dies die Möglichkeit die Reaktivität von SPH-modifizierten Nukleosiden durch die Verwendung dieser neuartigen Azaspiroalkene weiter zu optimieren. Insbesondere Azaspiro[2,3]hexen könnte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu SPH ebenso von den Zellen als Substrat akzeptiert werden. Zudem könnte eine verbesserte Reaktionskinetik des Azaspiro[2,3]hexens zu einer schnelleren und effizienteren Detektion in zellulären Systemen führen. Weitere Untersuchungen sollten darauf abzielen, das Potenzial in der Markierung und die Detektion von Biomolekülen mittels Azaspiroalkene zu charakterisieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden sechs acpcPNA-Stränge mit einer Länge von jeweils 14 Basenpaaren synthetisiert, von denen zwei mit einem Cy3-Farbstoff und vier mit einem Atto647N-Farbstoff modifiziert wurden. Ziel war es, einen Förster-Resonanzenergietransfer sowohl *in vitro* als auch später *in vivo* in Zebrafisch-Embryos nachzuweisen. In den Experimenten *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die acpcPNA-Sonden sowohl mit DNA als auch RNA als Gegenstränge hybridisieren und ein Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor beobachtet werden konnte. Es konnte nachgewiesen werden, dass der FRET über eine Distanz von sechs Basenpaaren effizienter verläuft als über 16 Basenpaare, weshalb diese Sequenzen für die Detektion der shha-Sequenz in Zebrafisch-Embryos *in vivo* eingesetzt wurden. Allerdings konnte im Zebrafisch-Embryo kein FRET nachgewiesen werden, was möglicherweise auf suboptimale Hybridisierungsbedingungen zurückzuführen ist. Ein weiterer möglicher Grund könnte die zu niedrige Konzentration der acpcPNA und somit das zu geringe Fluoreszenzsignal sein. Um diese Herausforderungen zu überwinden, sind weitere Experimente erforderlich. Anpassungen könnten durch Variation der Hybridisierungszeiten, Erhöhung der Konzentrationen sowie Optimierung der Waschschrte vorgenommen werden.

6 Experimentaltteil

6.1 Materialien und Methoden

Lösemittel und Reagenzien

Die innerhalb der Synthese und Analytik verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR, Acros Organics (Thermo Fischer), Alfa Aesar, Carl Roth, Fluka, Merck, Sigma Aldrich (Merck), TCI und VWR* bezogen. Es wurden Qualitätsstufen von mindestens „zur Synthese“ verwendet. Die Chemikalien wurden bei Bedarf unter Argonatmosphäre und niedrigen Temperaturen gelagert.

Reaktionsführung

Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsschluss wurden unter Argon-Atmosphäre (Schweißargon 5.0, 99,999 % Reinheit) durchgeführt. Die dafür verwendeten Glasgeräte wurden im Hochvakuum ausgeheizt.

Flüssigkeiten wurden mithilfe von Kunststoffspritzen und V2A-Stahlkanülen überführt. Feststoffe wurden in pulverisierter Form eingesetzt.

Umsetzungen ohne Temperaturangabe wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Für Reaktionen bei tiefen Temperaturen wurde folgende Kältemischung verwendet:

- 0 °C Eis in Wasser
- -78°C Trockeneis in Isopropanol

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

Lösungsmittel wurden bei 40 °C bzw. 50 °C am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Bei Einsatz von Lösemittelgemischen wurden die verwendeten Lösemittel einzeln volumetrisch abgemessen.

Chromatographie

- **Dünnschichtchromatographie (DC):**

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck (Kieselgel 60, F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm) für die DC verwendet. UV-aktive Substanzen wurden mit UV-Licht, durch Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm, detektiert. Die visuelle Auswertung von UV-inaktiven Verbindungen erfolgte mithilfe einer Kaliumpermanganat-Lösung (1.50 g KMnO₄, 10.0 g K₂CO₃, 1.25 mL 10 % NaOH-Lösung, 200 mL H₂O), zuckerhaltige Verbindungen wurden mit einer Lösung aus Schwefelsäure in Methanol (3 % H₂SO₄) angefärbt, Amine mittels Ninhydrin-Lösung (3,0 g Ninhydrin in 200 mL EtOH).

- **Flash-Chromatographie (FC):**

Es wurde Kieselgel 60 der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Korngröße von 40-63 μ m verwendet. Die Säulen wurden nass gepackt und mit leichtem Überdruck mittels einer Handpumpe durchgeführt. Des Weiteren wurde Seesand (geglüht, mit HCl gereinigt) der Firma *Bernd Kraft Laborchemikalien* als Schutzschicht verwendet. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert.

- **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Zur Verfolgung und Auswertung der Experimente wurde ein *Ultimate 3000* HPLC-System der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Dieses setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen: Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AD*, Entgaser *DGU-14A*, Säulenofen *CTO-10AS*, Multidiodenarray *SPD-M20A*, Steuereinheit *SCL-10A*, Software *Chromeleon*. Die Trennung erfolgte über eine analytische *reversed-phase* Chromatographiesäule der Firma VDSpher, Modell *OptiBio PUR 300 S18- SE* (250 x 4.6 mm, 5 μ m). Die Analysen wurden mit meist 300 μ l Injektionsvolumen bei einer Temperatur von 40 °C und mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,50 mL/min bzw. 1,00 mL/min durchgeführt. Zur Elution des Produkts wurde ein Gradient aus MeCN (Laufmittel B) in dd-H₂O (Laufmittel A) verwendet. Der Verlauf der chromatographischen Trennung wurde mithilfe eines Multiwavelength Detektors

anhand der UV-Vis-Absorption bei 260 nm und 290 nm verfolgt. Bei der Aufreinigung der PNA-Sequenzen wurde dd-H₂O + 0,1 % TFA und MeOH + 0,1 % mit einer Flusgeschwindigkeit von 2,00 mL/min bzw. 0,80 mL/min verwendet. Anschließend wurden die einzelnen Produktfraktionen über Massenspektrometrie analysiert.

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff an einer Lyophilisierungsanlage *Alpha 1- 2 LD Plus* von *Christ* oder in einem Vakuumkonzentrator (*Alpha RVC*) von *Christ* getrocknet. Zum Lyophilisieren wurden die Reaktionsprodukte in absolutem Benzol der Firma *VWR* gelöst, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Hochvakuum getrocknet.

Festphasensynthese

Die Festphasensynthese von DNA erfolgte an einem *H-6 Synthesizer* der Firma *K&A-Laborgeräte*. Die Synthese wurde unter Verwendung von Argon als Schutzgas durchgeführt. Als feste Phase wurde CPG (*controlled pore glass*) mit einer Belegung von 1 µmol (500 Å) verwendet. Die benötigten Phosphoramidite, Reagenzien und CPG-Säulen wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *ChemGenes*, *Proligo* und *Glen Research* bezogen.

NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden an einem *Bruker Avance 400* Gerät in deuteriertem Lösungsmittel der Firma *eurisotop* aufgenommen. Dafür befanden sich etwa 5-10 mg der zu messenden Substanz, gelöst in 0,4 bis 0,5 mL deuteriertem Lösungsmittel, in einem Probenröhrchen von 5 mm Durchmesser. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in *parts per million* (ppm) angegeben in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) als Referenz. Zur Kalibrierung wurde das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels verwendet:

CDCl₃: ¹H-NMR: δ = 7,26 ppm

DMSO-d₆: ¹H-NMR: δ = 2,50 ppm ¹³C-NMR: δ = 39.52 ppm

Experimentalteil

D₂O: ¹H-NMR: $\delta = 4,79$ ppm

Die gemessenen Signale wurden anhand ihrer Aufspaltung charakterisiert und die Multiplizität wie folgt abgekürzt: s (Singulett), br (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett). Die Kopplungskonstante J wurde als Betrag in Hz angegeben.

Zur Auswertung der Spektren wurde das Programm *MestReNova* verwendet.

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 und ein *Finnigan MAT95*, wobei Fast Atom Bombardement (FAB) als Ionisationsmethode eingesetzt wurde. Des Weiteren wurden MALDI-TOF Spektren an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer der Firma Shimadzu aufgenommen. Als Matrix diente hierbei 6-Aza-2-thiothymin (ATT, ges. in Acetonitril) für kleine Moleküle und Nukleoside, sowie Hydroxypicolinsäure (HPA, ges. in Acetonitril/Wasser 1:1) für Oligonukleotide und 2'4'6'-Trihydroxyacetophenon-Monohydrat (THAP, ges. Acetonitril/Wasser 1:1 + 0,1 % TFA). Die aufgenommenen Peaks wurden im Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) angegeben.

Optische Spektroskopie

Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/VIS-Absorptionsspektroskopie wurde an einem *Cary 100 Scan* Spektrophotometer von Varian mit Temperaturregler (*Cary 100 Temperature Controller*), sowie *Cary 3500 Scan* der Firma *Agilent* mithilfe der Steuersoftware *Cary WinUV Scan Application*, durchgeführt. Für alle

Experimentaltteil

Messungen wurden folgende Parameter verwendet: *Slit bandwidth (SBW)* 2.0 nm, *Average time* 0.1 s, *Data interval* 1.0, *Scan rate* 600 nm/min, *Light source changeover* 350 nm.

Für die Schmelzpunktmessungen der Oligonukleotiden und der PNA-Stränge wurde die Absorption in einem Temperaturbereich von 5-90 °C (Heiz- bzw. Kühlrate 0,5 °C/min) gemessen. Der Schmelzpunkt wurde als Wendepunkt über die erste Ableitung der Schmelzpunktkurve ermittelt.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-4 Fluorimeter* von *Horiba-Scientific* mit Peltier-Element (*LFI-3751*) sowie einem *FluoroMax Plus* von *Horiba-Scientific* aufgenommen. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Messungen mit einer Toleranz von 0.1 °C bei 20 °C durchgeführt und gegen die Raman-Streuung des Lösungsmittels korrigiert. Es wurden folgende Parameter verwendet: *Increment* 1,0 nm, *Increment time* 0,2 s, *Integration time* 0,1 s, *Slits* 2 bzw. 3 nm.

Fluoreszenzquantenausbeuten

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

Nanodrop

Die Konzentrationsbestimmung der ss- und ds-DNA-Stränge erfolgte an einem NANODROP™ *ND-1000* Spektrometer im Nukleinsäure-Modus über Absorption bei $\lambda = 260$ nm. Hierfür wurde der Modus „*Nucleic Acid*“ verwendet. Es wurde 1 μ L der Probe aufgetragen und mittels dem LAMBERT-BEER'SCHEN-GESETZES die Konzentration berechnet.

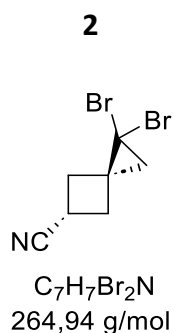
Ionenaustauscher

Die Bicarbonatform von Amberlite IRA-402 zur Entfernung von Triethylammoniumsalzen wurde vor jeder Verwendung frisch hergestellt, indem Amberlite IRA-402 Chloridform mit

Experimentalteil

gesättigter Natriumbicarbonatlösung 30 Minuten lang gerührt wurde. Das Harz wurde gründlich mit Wasser gewaschen und über Nacht bei 60 °C getrocknet.

6.2 Synthesevorschrift



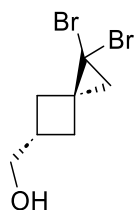
Unter Argonatmosphäre wurden 3,60 mL 3-Methylcyclobutancarbonitril (3,29 g; 35,4 mmol; 1,00 Äq.) und 129 mg Cetyltrimethylammoniumbromid (0,354 mmol; 0,01 Äq.) in 6,18 mL Bromoform (17,9 g; 70,7 mmol; 2,00 Äq.) gelöst. Eine konzentrierte NaOH-Lösung (15 g NaOH in 15 mL Wasser) wurde tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT gerührt und anschließend mit 100 mL Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3x mit 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 3x mit 15 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Hexan/EE 15:1-4:1) aufgereinigt. Es wurden 6,87 g (25,9 mmol; 74 %) eines leicht gelblichen Feststoff erhalten.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.28-3.21 (m, 1H), 2.89-2.84 (m, 2H), 2.46-2.41 (m, 2H), 1.72 (s, 2H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

Experimentaltteil

3



$C_7H_{10}Br_2O$
269,96 g/mol

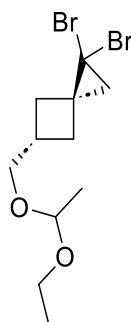
Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung von 4,77 g **2** (18,0 mmol; 1,00 Äq.) in 5 mL trockenem Toluol bei $-78^{\circ}C$ langsam 30,0 mL 1,2M Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung in Toluol (36,1 mmol; 2,00 Äq.) zugetropft und die Lösung über 2 Stunden langsam auf $0^{\circ}C$ erwärmt. Zu der Reaktionslösung wurden 30 mL 1 M HCl hinzugegeben und 3x mit 50 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden 3x mit 10 mL Wasser und 20 mL NaCl-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingeeengt. Der vorliegende Aldehyd wurde in 4 mL Ethanol aufgenommen und portionsweise 1,03 g $NaBH_4$ (29,1 mmol; 1,50 Äq.) bei $0^{\circ}C$ hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Es wurde 50 mL 1 M HCl zur Reaktionslösung gegeben. Die Lösung wurde 5x mit 10 mL DCM extrahiert und die organische Phase mit 10 mL Wasser und 10 mL NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 3,24 g (12,0 mmol; 67 %) eines gelblichen Öls erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.76-3.73 (m, 2H), 2.61-2.57 (m, 1H), 2.55-2.49 (m, 2H), 2.17-2.15 (m, 2H), 1.89-1.85 (m, 1H), 1.63 (s, 1H), 1.60 (s, 1H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

Experimentaltteil

4



$C_{11}H_{18}Br_2O_2$
342,07 g/mol

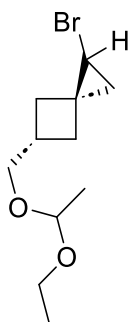
Unter Argonatmosphäre wurden 3,82 g **3** (14,2 mmol; 1,00 Äq.) und 135 mg Paratoluolsulfonsäure-Monohydrat (0,71 mmol; 0,05 Äq.) in 25 mL trockenem THF bei 0°C gelöst. Es wurden 8,16 mL Ethylvinylether (6,12 g; 84,9 mmol; 6,00 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung bei 0°C gerührt und anschließend auf RT erwärmt und für 16 h gerührt. Die Lösung wurde mit 100 mL Hexan verdünnt. Die Reaktionslösung wurde über Aluminiumoxid abgesaugt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Hexan/EE 50:1-9:1) aufgereinigt. Es wurden 2,47 g (7,22 mmol; 51 %) eines gelblichen Öls erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 4.77-4.71 (m, 1H), 3.73-3.63 (m, 2H), 3.55-3.47 (m, 2H), 2.66-2.58 (m, 1H), 2.55-2.49 (m, 1H), 2.17-2.15 (m, 2H), 1.88-1.84 (m, 1H), 1.61 (s, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.34 (dd, J = 10.5, 5.3 Hz, 1H), 1.22 (q, J = 7.2 Hz, 1H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

Experimentaltteil

5



$C_{11}H_{19}BrO_2$
263,18 g/mol

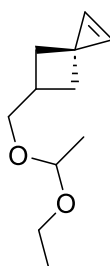
2,91 g **4** (8,10 mmol; 1,00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 40 mL trockenem THF gelöst. Es wurden 240 μ L $Ti(O^iPr)_4$ (0,81 mmol; 0,10 Äq.) bei RT hinzugegeben. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und tropfenweise 310 μ L (2,39 mmol; 0,300 Äq.) Ethylmagnesiumbromid hinzugegeben und für 30 min gerührt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und anschließend erneut 3,13 mL Ethylmagnesiumbromid hinzugegeben (23,9 mmol; 3,00 Äq.) und für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit NH_4Cl -Lösung versetzt und org. Phase mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/ EE = 99:1-15:1). Es wurden 1,32 g (5,02 mmol; 62 %) eines gelben Öls erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 4.74-4.70 (m, 1H), 3.71-3.61 (m, 2H), 3.54-3.46 (m, 2H), 2.93-2.86 (m, 1H), 2.67-2.62 (m, 1H), 2.22-2.16 (m, 2H), 1.88-1.84 (m, 1H), 1.33-1.31 (m, 3H), 1.26-1.19 (m, 3H), 1.19-1.15 (m, 2H), 0.80-0.76 (m, 1H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

Experimentaltteil

6



$C_{11}H_{18}O_2$
182,26 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 1,32 g **5** (5,02 mmol; 1,00 Äq.) in 20 mL trockenem DMSO tropfenweise 901 mg t BuOK (8,03 mmol; 1,60 Äq.), gelöst in 10 mL trockenem DMSO, bei 0°C hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 0°C für 16 h gerührt. Am nächsten Tag wurden kleine Aliquoten mit gesättigter NH_4Cl -Lösung versetzt, mit Et_2O extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und mittels 1H -NMR Spektroskopie analysiert. Nach vollständigem Umsatz wurde die gesamte Reaktion mit gesättigter NH_4Cl -Lösung versetzt und mit 3x mit 50 mL Et_2O/DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Hexan/ Et_2O 20:1) aufgereinigt. Es wurden 572 mg (3,14 mmol; 63 %) einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.43 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 4.73 (q, J = 5.3 Hz, 1H), 3.70-3.62 (m, 2H), 3.52-3.45 (m, 2H), 2.47-2.46 (m, 1H), 2.26-2.21 (m, 2H), 1.88-1.82 (m, 2H), 1.32 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 1.22-1.19 (m, 3H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

Experimentaltteil

7



$C_7H_{10}O$
110,16 g/mol

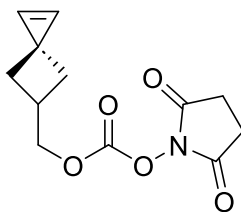
572 mg **6** (0,987 mmol; 1,00 Äq.) wurden in 7,00 mL Acetonitril gelöst. Bei 0°C wurden 7,00 mL 1M HCl langsam hinzugegeben. Die Lösung wurde langsam auf RT erwärmt und 1 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung versetzt und 6x mit je 20 mL Et_2O extrahiert. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Pentan/ Et_2O = 3:1-1:1) aufgereinigt. Es wurden 250 mg (2,28 mmol; 72 %) einer klaren Flüssigkeit erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.43 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 3.69 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 2.43-2.36 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 2H), 1.87-1.83 (m, 2H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

Experimentaltteil

8



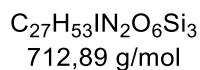
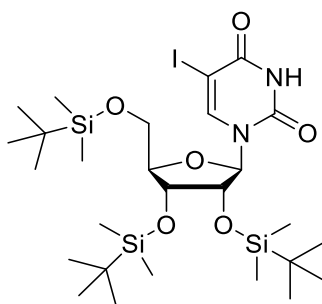
$C_{12}H_{13}NO_5$
251,24 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 240 mg **7** (2,18 mmol; 1,00 Äq.) in 5 mL trockenem MeCN, 0,650 mL Et₃N (475 mg; 4,68 mmol; 2,15 Äq.) bei 0°C hinzugegeben. Bei 0°C wurde portionsweise 838 mg Disuccinimidylcarbonat (3,27 mmol; 1.50 Äq.) hinzugegeben und die Lösung unter Argonatmosphäre für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die Lösung anschließend säulenchromatographisch (Hexan/EE/DCM = 2:1:1-1:2:1) aufgereinigt. Es wurden 405 mg eines weißen Feststoffs (1,61 mmol; 74 %) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.40 (s, 2H), 4.40 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.66-2.58 (m, 1H), 2.33-2.27 (m, 2H), 1.96-1.91 (m, 2H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[76]

10

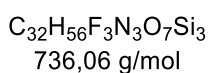
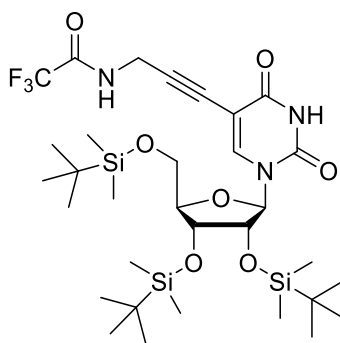


Unter Argonatmosphäre wurden 2,00 g Iodouridin (5,40 mmol; 1,00 Äq.), 3,26 g TBDMS-Cl (21,6 mmol, 4,00 Äq) und 2,20 g Imidazol (32,4 mmol, 6,00 Äq) in 25 mL trockenem DMF gelöst und für 3h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde 3x mit 20 mL Toluol koevaporiert. Es wurden 2.56 g (3.59 mmol; 66 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.22 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 6.03 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.12-4.10 (m, 1H), 4.06-4.04 (m, 2H), 3.90 (dd, J = 11.6, 1.9 Hz, 1H), 3.74 (dd, J = 11.7, 1.8 Hz, 1H), 0.99 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.20 (s, 6H), 0.10 (s, 3H), 0.08 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), -0.05 (s, 3H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[172]

14

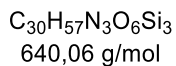
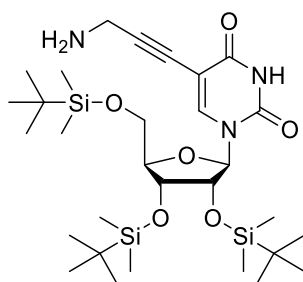


Unter Argonatmosphäre wurden 2,56 g (3,59 mmol; 1,00 Äq.) **10**, 1,63 g **13** (10,8 mmol; 3,00 Äq.), 152 mg CuI (0,799 mmol; 0,220 Äq.) und 2,01 mL Triethylamin (14,4 mmol; 4,00 Äq.) in 25 mL trockenem DMF gelöst. Die Lösung wurde entgast und anschließend 415 mg Pd(PPh₃)₄ (0,359 mmol; 0,100 Äq) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 10 mL MeOH gelöst und 30 min mit Amberlite-IRA 402 Bicarbonat gerührt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM:EE = 9:1) aufgereinigt. Es wurden 1,95 g (2,66 mmol; 74 %) eines weißen Schaums erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.21 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 5.99 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.12-4.10 (m, 1H), 4.06-4.04 (m, 2H), 3.94 (dd, *J* = 11.7, 2.0 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 11.7, 1.6 Hz, 1H), 0.97 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.17 (d, *J* = 3.2 Hz, 6H), 0.07 (d, *J* = 3.8 Hz, 6H), 0.04 (s, 3H), -0.02 (s, 3H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[54]

16

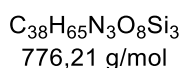
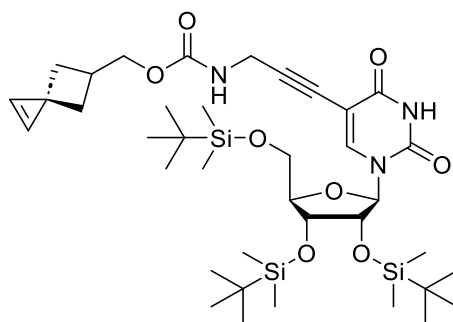


In einem Kolben wurden 466 mg **14** (0,633 mmol; 1,00 Äq.) in 5 mL MeOH gelöst. Dazu wurden 1,90 mL einer 1M NaOH-Lösung gegeben und bei RT für 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 mL DCM aufgenommen. Es wurde 2x mit 10 mL NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 405 mg (0,633 mmol; quant.) eines weißlichen Schaums erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.96 (s, 1H), 5.97 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.10-4.09 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.94 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.75 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 1.84 (bs, 1H), 0.97 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.18 (d, *J* = 4.2 Hz, 6H), 0.09-0.07 (m, 6H), 0.03 (s, 3H), -0.01 (s, 3H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[54]

18



170 mg **16** (0,266 mmol; 1,00 Äq.) und 0,147 mL Triethylamin (107 mg; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. 100 mg **8** (0,398 mmol; 1,50 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 50:1) aufgereinigt. Es wurden 148 mg (0,191 mmol; 72 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

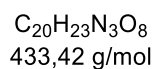
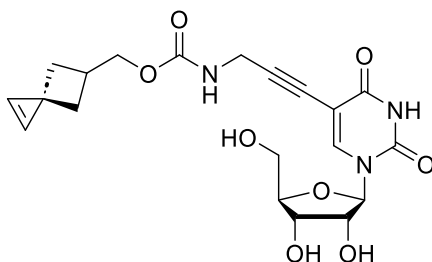
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.03 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.40 (dd, J = 8.5, 1.3 Hz, 2H), 5.99 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.21-4.19 (m, 2H), 4.15-4.10 (m, 3H), 4.05 (s, 2H), 3.94-3.91 (m, 1H), 3.76-3.73 (m, 1H), 2.88 (s, 1H), 2.48-2.46 (m, 1H), 2.25-2.19 (m, 2H), 1.89-1.84 (m, 2H), 0.97 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 0.17 (d, J = 4.1 Hz, 6H), 0.08 (d, J = 7.4 Hz, 6H), 0.03 (s, 3H), -0.03 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ = 162.6, 161.3, 156.2, 149.1, 143.0, 121.7, 121.4, 99.6, 89.9, 88.2, 86.1, 76.1, 74.6, 72.2, 69.8, 62.8, 38.3, 36.5, 31.7, 27.0, 26.2, 25.8, 25.7, 21.1, 18.6, 18.1, 17.9, -4.4, -4.6, -4.7, -5.4.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{38}H_{66}N_3O_8Si_3^+$: 776.4079; gefunden: 776.4139.

Experimentaltteil

I



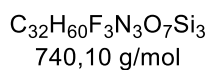
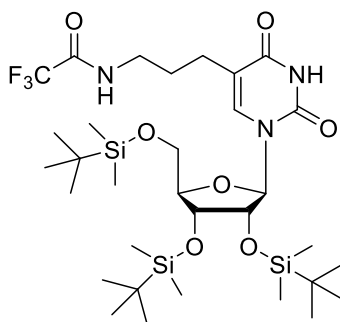
Es wurden 148 mg **18** (0,190 mmol; 1,00 Äq.) unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF gelöst. Zu der Lösung wurde langsam 0,335 mL Et₃N·3HF (0,330 g; 1,90 mmol; 10,0 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 6:1). Es wurden 58 mg (0,133 mmol; 70 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.63 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 5.75 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.39 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.17 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.05-4.03 (m, 3H), 3.99-3.94 (m, 3H), 3.67-3.63 (m, 1H), 3.58-3.54 (m, 1H), 2.18-2.14 (m, 2H), 1.83-1.79 (m, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 162.0, 156.7, 150.2, 144.2, 122.3, 121.9, 98.7, 90.5, 88.6, 85.4, 74.7, 74.2, 70.1, 69.0, 61.0, 46.2, 38.5, 31.0, 27.2, 20.6.

HR-ESI-MS (m/z): [M]⁺ berechnet für C₂₀H₂₄N₃O₈⁺: 434.4170; gefunden C₂₀H₂₃N₃O₈Na⁺: 456.1270.

15

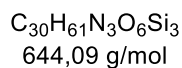
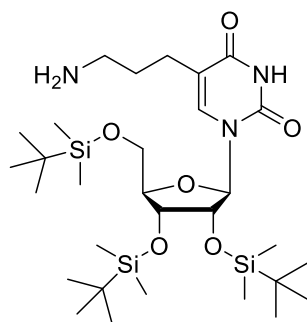


1,00 g **14** (1,36 mmol; 1,00 Äq.) und 217 mg Pd/C (10% Pd; 0,15 Äq.) wurden für 16 h unter Vakuum vorgetrocknet. Anschließend wurden 20 mL trockenes MeOH hinzugegeben und über 7 h H₂ in die Lösung geleitet. Die Lösung wurde über Celite abgesaugt und mit 20 mL MeOH nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1,00 g (1,36 mmol; quant.) eines weißen Feststoffs erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.27 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 6.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.12-4.03 (m, 3H), 3.88 (dd, *J* = 11.6, 2.4 Hz, 1H), 3.74 (dd, *J* = 11.5, 2.1 Hz, 1H), 3.39-3.25 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 1.80-1.68 (m, 2H), 0.96 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.14 (s, 6H), 0.10 (s, 6H), 0.02 (s, 3H), -0.07 (s, 3H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[54]

17

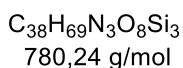
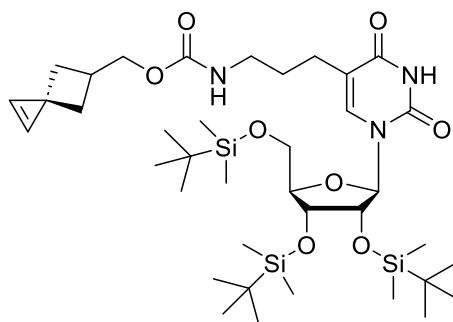


Es wurden 500 mg **15** (0,676 mmol; 1,00 Äq.) in 10 mL MeOH gelöst. Dazu wurden 4 mL einer 1M NaOH-Lösung gegeben und für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 mL DCM aufgenommen. Es wurde 2x mit 10 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 308 mg eines weißen Feststoffs (0,479 mmol; 70 %) erhalten.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.90 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.03 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.14-4.11 (m, 1H), 4.06-4.02 (m, 3H), 3.88-3.85 (m, 1H), 3.75-3.72 (m, 1H), 2.71 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.37-2.33 (m, 3H), 1.67-1.61 (m, 2H), 0.96 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.14 (s, 6H), 0.10 (s, 6H), 0.01 (s, 3H), -0.06 (s, 3H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[54]

19



170 mg **15** (0,266 mmol; 1,00 Äq.) und 0,147 mL Triethylamin (107 mg; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. Es wurden 100 mg **8** (0,398 mmol; 1,50 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde anschließend in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 50:1) aufgereinigt. Es wurden 78 mg (0,100 mmol; 38 %) eines gelblichen Feststoffs erhalten.

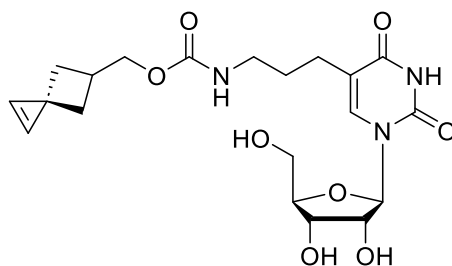
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.86 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.41-7.40 (m, 2H), 6.03 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.13-4.11 (m, 3H), 4.06-4.02 (m, 3H), 3.88-3.85 (m, 2H), 3.75-3.75 (m, 3H), 3.17 (s, 2H), 2.25-2.20 (m, 2H), 1.89-1.86 (m, 2H), 1.70-1.68 (m, 2H), 0.96 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.14 (s, 6H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), -0.07 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 176.7, 161.5, 149.1, 143.1, 111.9, 111.9, 99.6, 90.2, 88.3, 86.1, 77.4, 77.0, 76.7, 76.2, 74.4, 72.2, 62.8, 30.5, 26.2, 25.8, 25.8, 25.7, 22.6, 21.1, 18.6, 18.1, 17.9, -4.4, -4.6, -4.7, -5.4, -5.4.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{38}H_{69}N_3O_8Si_3^+$: 779.4392; gefunden: $C_{38}H_{69}N_3O_8Si_3Na^+$ 802.405.

Experimentaltteil

II



$C_{20}H_{27}N_3O_8$
437,45 g/mol

Es wurden 78 mg **19** (0,190 mmol; 1,00 Äq.) unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF gelöst. Zu der Lösung wurde langsam 0,176 mL $Et_3N \cdot 3HF$ (174 mg; 1,00 mmol; 10,0 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 48 h lang gerührt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 6:1). Es wurden 44 mg (0,190 mmol; quant.) eines leicht gelblichen Schaums erhalten.

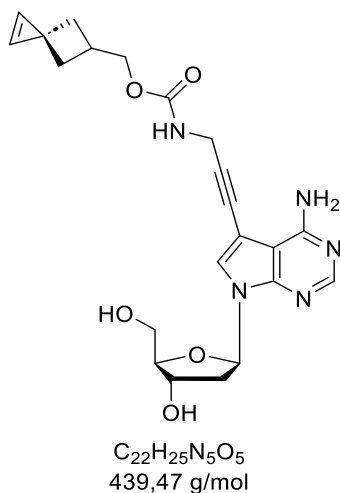
1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 11.19 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.11-7.08 (m, 1H), 5.77 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.33 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 5.07-5.05 (m, 2H), 4.09-4.04 (m, 2H), 3.99-3.95 (m, 3H), 3.83-3.81 (m, 1H), 3.63-3.61 (m, 1H), 3.57-3.53 (m, 1H), 3.17 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 2.99-2.93 (m, 2H), 2.20-2.13 (m, 3H), 1.83-1.78 (m, 2H), 1.55-1.52 (m, 2H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 163.8, 157.0, 151.1, 141.4, 137.0, 122.3, 121.9, 113.4, 88.1, 85.2, 73.8, 70.4, 68.5, 61.5, 57.3, 38.6, 28.8, 27.3, 24.2, 20.6.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{20}H_{28}N_3O_8^+$: 438.1798; gefunden: 438.1872.

Experimentaltteil

III



25 mg **23** (81,3 μ mol; 1,00 Äq.) und 45 μ L Triethylamin (32,8 mg; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. 25 mg **8** (97,6 μ mol; 1,20 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 20:1) aufgereinigt. Es wurden 7 mg (16,5 μ mol; 20 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

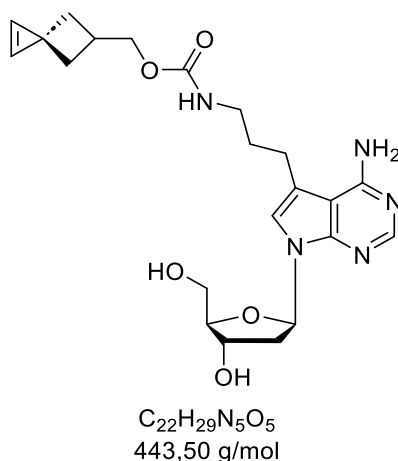
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.10 (s, 1H), 7.74 (s, 2H), 7.70 (s, 1H), 6.48-6.45 (m, 1H), 5.26 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.34-4.32 (m, 1H), 4.08-4.06 (m, 2H), 4.03-4.02 (m, 2H), 3.82 (s, 1H), 3.58-3.55 (m, 1H), 3.51-3.48 (m, 1H), 2.19-2.14 (m, 3H), 1.84-1.80 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 158.0, 157.1, 153.1, 150.0, 126.8, 122.3, 121.9, 102.9, 95.0, 89.7, 87.72 85.7, 75.7, 74.5, 71.0, 69.0, 62.0, 38.5, 27.2, 20.6.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{22}H_{25}N_5O_5^+$: 439.4720; gefunden: $C_{22}H_{26}N_5O_5^+$ 440.1926.

Experimentaltteil

IV



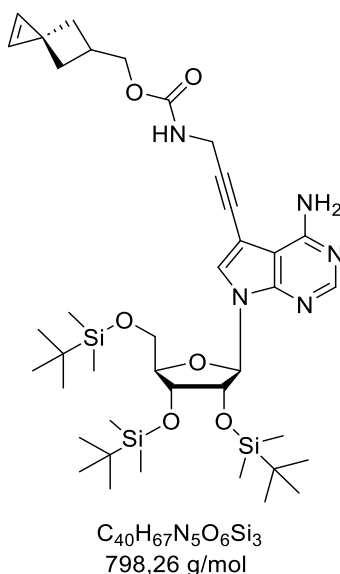
25,0 mg **24** (81,3 μ mol; 1,00 Äq.) und 45 μ L Triethylamin (32,8 mg; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. 25 mg **8** (97,6 μ mol, 1,20 Äq) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt säulenchromatographisch (DCM/MeOH =20:1) aufgereinigt. Es wurden 12 mg (26,9 μ mol; 33 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.01 (s, 1H), 7.74 (s, 2H), 7.17-7.15 (m, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.55 (s, 2H), 6.48-6.44 (m, 1H), 5.21 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.05 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.31-4.30 (m, 1H), 4.01 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.79-3.77 (m, 1H), 3.57-3.51 (m, 1H), 3.49-3.45 (m, 1H), 3.06-3.04 (m, 2H), 2.74- 2.70 (m, 2H), 2.18-2.09 (m, 4H), 1.83-1.79 (m, 2H), 1.69-1.67 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 162.8, 158.0, 157.0, 151.8, 150.9, 122.3, 121.9, 119.2, 115.1, 102.5, 87.6, 83.2, 71.6, 68.6, 62.7, 38.6, 36.3, 31.2, 30.9, 27.3, 23.6, 20.6.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{22}H_{28}N_5O_5^-$: 443.212; gefunden: $C_{22}H_{29}N_5O_5^-$ 444.2236.

30



150 mg **29** (0,226 mmol; 1,00 Äq.) und 0,125 mL Triethylamin (91 mg; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. 57 mg **8** (0,226 mmol; 1,00 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 50:1) aufgereinigt. Es wurden 123 mg (0,155 mmol; 68 %) eines hellbraunen Feststoffs erhalten.

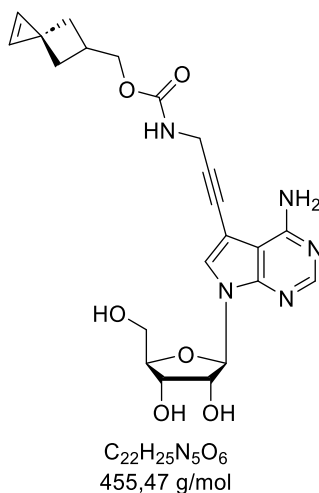
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.25 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.40 (dd, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 2H), 6.17 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.03 (s, 1H), 4.41 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.26 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H), 4.09-4.07 (m, 1H), 3.97 (dd, *J* = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 11.4, 2.5 Hz, 1H), 2.51-2.47 (m, 1H), 2.26-2.20 (m, 2H), 1.90-1.85 (m, 2H), 0.97 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.80 (s, 9H), 0.14 (d, *J* = 5.2 Hz, 6H), 0.09 (d, *J* = 3.3 Hz, 6H), -0.06 (s, 3H), -0.20 (s, 3H),

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.5, 157.2, 152.9, 150.0, 132.16, 132.0, 128.5, 128.4, 126.2, 121.6, 121.3, 103.7, 88.1, 84.9, 77.3, 77.0, 76.7 71.9, 69.9, 62.6, 38.2, 36.5, 31.9, 31.4, 27.0, 26.2, 25.9, 25.7, 21.1, 18.6, 18.1, 17.9, -4.3, -4.8, -5.0, -5.4.

HR-ESI-MS (m/z): [M]⁺ berechnet für C₄₀H₆₇N₅O₆Si₃⁺: 797.4399, gefunden: C₄₀H₆₈N₅O₆Si₃⁺: 798.4464.

Experimentaltteil

V



Es wurden 123 mg **30** (0,154 mmol; 1,00 Äq.) unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF gelöst. Zu der Lösung wurden langsam 0,248 mL Et₃N·3HF (1,54 mmol; 10,0 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 9:1). Es wurden 49 mg (0,180 mmol; 70 %) eines rosanen Feststoffs erhalten.

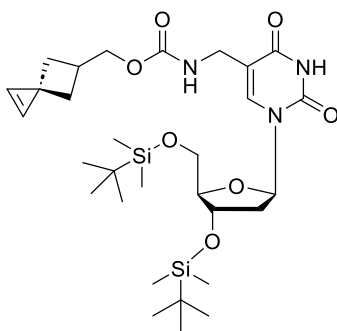
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.10 (s, 1H), 7.74 (s, 2H), 7.71 (s, 1H), 6.00 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.21-5.18 (m, 1H), 5.10 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.36-4.33 (m, 1H), 4.08-4.07 (m, 2H), 4.04-4.02 (m, 2H), 3.89-3.88 (m, 1H), 3.62-3.60 (m, 1H), 3.54-3.53 (m, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.19 (s, 1H), 2.16-2.14 (m, 2H), 1.84-1.80 (m, 2H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 158.0, 157.0, 153.1, 150.0, 126.8, 122.2, 121.8, 102.8, 95.0, 89.7, 87.7, 85.7, 75.6, 74.4, 70.9, 69.0, 61.9, 38.5, 31.3, 27.2, 20.5.

HR-ESI-MS (m/z): [M]⁺ berechnet für C₂₂H₂₅N₅O₆⁺: 455.1805, gefunden C₂₂H₂₆N₅O₆⁺: 456.1887

Experimentaltteil

33



$C_{30}H_{51}N_3O_7Si_2$
621,92 g/mol

100 mg **31** (0,205 mmol; 1,00 Äq.) und 0,113 mL Triethylamin (82 mg; 0,820 mmol; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. 62 mg **8** (0,247 mmol, 1,20 Äq) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt säulenchromatographisch (DCM/MeOH = 50:1) aufgereinigt. Es wurden 106 mg (0,171 mmol; 83 %) eines gelblichen Feststoffs erhalten.

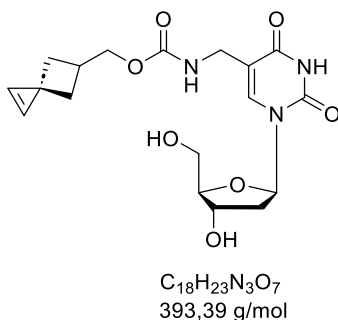
1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.16 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.41-7.38 (m, 2H), 6.27-6.24 (m, 1H), 5.38-5.37 (m, 1H), 4.41-4.39 (m, 1H), 4.33 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 4.00 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 3.96-3.95 (m, 1H), 2.57-2.55 (m, 1H), 2.46-2.43 (m, 1H), 2.30-2.25 (m, 1H), 2.23-2.18 (m, 2H), 2.05-2.01 (m, 1H), 1.87-1.82 (m, 2H), 0.92 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.12 (d, J = 2.5 Hz, 6H), 0.08 (d, J = 6H).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.5, 158.6, 153.9, 150.5, 133.2, 133.1, 125.9, 124.3, 123.8, 120.6, 120.5, 103.7, 87.4, 76.3, 76.2, 75.7, 71.5, 68.1, 61.6, 37.3, 36.5, 31.3, 30.2, 26.8, 20.2, 17.3, 16.7, -4.4, -4.8, -5.2.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{30}H_{51}O_7N_3Si_2$: 621.3266; gefunden: $C_{30}H_{52}O_7N_3Si_2$ 622.3334.

Experimentaltteil

VI



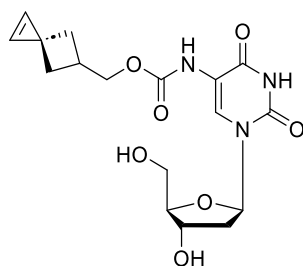
Es wurden 106 mg **33** (0,170 mmol; 1,00 Äq.) unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF gelöst. Zu der Lösung wurden langsam 0,300 mL $Et_3N \cdot 3HF$ zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 6:1). Es wurden 44,0 mg (0,114 mmol; 67 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.38 (s, 1H), 7.73-7.66 (m, 2H), 7.27-7.24 (m, 1H), 6.16 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 5.27-5.26 (m, 1H), 4.92 (s, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.22 (s, 1H), 4.02-4.00 (m, 1H), 3.96-3.91 (m, 2H), 3.80-3.76 (m, 3H), 3.53-3.50 (m, 2H), 2.42-2.38 (m, 1H), 2.15-2.03 (m, 3H), 1.84-1.78 (m, 1H).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 163.2, 150.7, 138.0, 122.3, 121.9, 111.3, 87.9, 84.5, 72.7, 71.0, 62.0, 60.7, 46.1, 38.5, 37.3, 27.2, 20.6.

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{18}H_{23}N_3O_7$: 393.1536; gefunden: $C_{18}H_{24}N_3O_7$ 394.16072.

VII



$C_{17}H_{21}N_3O_7$
379,37 g/mol

36 mg **32** (80,0 μ mol; 1,00 Äq.) und 44,0 μ L Triethylamin (32,0 mg; 0,320 mmol; 4,00 Äq.) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. 30 mg **8** (0,120 mmol; 1,50 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde in 20 mL MeOH gelöst und mit Amberlite IRA 402 Bicarbonat für 30 min gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde unter Argonatmosphäre in 5 mL trockenem THF gelöst. Zu der Lösung wurden langsam 0,300 mL $Et_3N \cdot 3HF$ zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 6:1). Es wurden 8,19 mg (21,6 μ mol; 27 % über zwei Stufen) eines gelblichen Feststoffs erhalten.

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 11.60 (s, 1H), 7.99 (s, 2H), 7.75 (s, 1H), 6.18 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 5.27-5.26 (m, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.22-4.20 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 3H), 3.78-3.77 (m, 2H) 3.53 (s, 2H), 2.10-2.04 (m, 3H), 1.85-1.82 (m, 2H),

HR-ESI-MS (m/z): $[M]^+$ berechnet für $C_{17}H_{21}N_3O_7$ 379.1380; gefunden: $C_{17}H_{22}N_3O_7$ 380.1449.

6.3 Oligonukleotide

6.3.1 Synthese von DNA1 bis DNA4

Die automatisierten Festphasensynthesen der Oligonukleotide wurden an einem *H-6 DNA/RNA Synthesizer* der Firma K&A LABORGERÄTE unter Argon-Schutzgas durchgeführt. Als Festphase wurde CPG (*Controlled Pore Glass*) der Firma SIGMA-ALDRICH mit einer Beladung von 1 μmol (500 Å) verwendet. Die verwendeten, gewerblich erhältlichen Phosphoramidite und Reagenzien wurden von den Firmen CHEMGENES und GLENRESEARCH bezogen. Die Phosphoramidite **37** bzw. **38** wurden in Acetonitril (0.067 M) gelöst und in den Synthesizer eingesetzt. Als feste Phase dienten CPG-Säulchen von SIGMA ALDRICH mit einer Belegungsdichte von 1 μM .

Die Synthesesyklen erfolgten nach Folgendem Kopplungsprotokoll:

Schritte	Zeit [0,1 s]	Reagenzien	Zielort	S.Col.Ptr.	Totzeit [s]	Branch
Entschützen						
1	4	TCA	COL			
2	30	TCA	TRM	ON		
3				ON		
4					15	
5	25	TCA	TRM	ON		
6				ON		
7					15	
8	25	TCA	TRM	ON		
9				ON		
10					15	
11	25	TCA	TRM	ON		
12				ON		
13					15	
14	25	TCA	TRM	ON		
15				ON		
16					15	
17	30	GAS	TRM			

Experimentaltteil

18	10	ACN	M_W			
19	20	ACN	COL	ON		
20				ON		
21					4	
22	30	GAS	COL			
23	2	ACN	M_W			
24	20	ACN	COL	ON		
25				ON		
Kupplung						
1	15	GAS	COL		2	
2	2	TET	COL	ON		
3				ON		
4					2	1
5	10	ACN	M_W		50	
6	10	ACN	COL	ON		
7				ON		
8	35	GAS	COL			
9	20	GAS	M_W			
Branch						
1	4	TET	COL	ON		
2	8	AMD +TET	COL			
3				ON		
4					10	
5	6	AMD + TET	COL	ON		
6				ON		
7					5	
8	10	ACN	M_W			
9	10	GAS	M_W			
Capping						
1	20	CP_A + CP_B	COL	ON		
2				ON		

Experimentaltteil

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

Experimententeil

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

Abspaltung der Oligonukleotide:

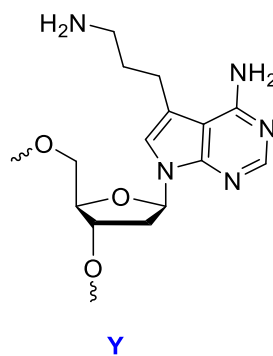
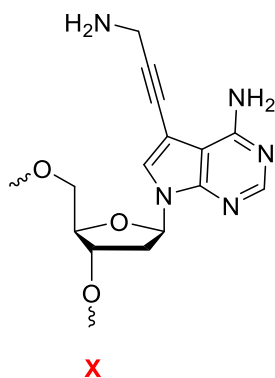
Nach beendeter Synthese der modifizierten Oligonukleotide wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet. Um die DNA-Stränge von der festen Phase abzuspalten, wurde das Säulenmaterial in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 700 µL 25 %iger Ammoniumhydroxid-Lösung versetzt und die Suspension für 16 h bei 55 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben vom Ammoniak (35 min, 35 °C, 100 mbar) befreit. Der flüssige Rückstand wurde abgenommen, das CPG dreimal mit je 100 µL *MilliQ*-Wasser gewaschen.

Aufreinigung der synthetisierten DNA:

Die abgespalteten, modifizierten Oligonukleotide wurden über DMT-Affinitätssäulen der Firma GLEN RESEACH (*Glen-pak™ DNA Purification Cartridges*) aufgereinigt.

Zu der in 1 mL dd-H₂O gelösten Oligonukleotide wurde 1 mL NaCl-Lösung (100 mg/mL) gegeben für ein Gesamtvolumen von 2 mL. Es wurde darauf geachtet, dass die Salzkonzentration bei ca. 50 mg/mL lag. Die Affinitätssäule wurde zunächst mit 0,5 mL Acetonitril und 1 mL 2 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 7) kalibriert. Anschließend wurde die Oligonukleotid-Salzlösung in 1 mL Aliquoten auf die Säule aufgetragen. Danach wurde zweimal mit jeweils 1 mL einer Salzwashlösung (100 mg/mL NaCl-Lösung mit 5 % MeCN) gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit zweimal 1 mL 2 % TFA-Lösung und zweimal mit 1 mL dd-H₂O gewaschen. Das noch auf der Säule befindliche Oligonukleotid wurde mit 1 mL Elutionslösung (50 % MeCN in dd-H₂O mit 0,5 % Ammoniumhydroxid) eluiert und anschließend unter Vakuum bei 0,1 mbar und 25 °C für 16 h getrocknet. **DNA1** und **DNA2** wurden in Form eines weißen Pulvers erhalten.

Die erhaltenen DNA-Stränge sind in Abbildung 66 aufgeführt.



DNA1 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**X**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'

DNA2 5'-G-C-A-G-T-C-T-T-**Y**-T-T-C-A-C-T-G-A-3'

Abbildung 66 Modifizierte DNA-Einzelstränge **DNA1** und **DNA2**.

Die erhaltenen Oligonukleotide wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht (Tabelle 6).

Postsynthetische Modifikation von DNA1 und DNA2:

Ungefähr 1 μmol **DNA1** bzw. **DNA2** wurde in 300 μL trockenem DMSO gelöst. 2,00 mg des SPH-NHS-Esters **8** wurden in 100 μL trockenem DMSO gelöst und zu der Oligonukleotidlösung gegeben. 5,00 μL DIPEA wurden hinzugegeben und die Eppendorf-Gefäße für 16 h auf einem Laborschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuumkonzentrator entfernt (∞min , 25°C, 0.1 mbar). **DNA3** und **DNA4** wurden als leicht gelber Feststoff erhalten (siehe Abbildung 67).

Aufreinigung der postsynthetisch modifizierten DNA:

Die Aufreinigung der postsynthetisch modifizierten DNA erfolgte über eine semi-präparative RP-HPLC. Zur Trennung wurde eine *VDSphere OptiBio PUR 300 C18-SE*-Säule (30 x 8.0 mm, 5 μm) der Firma VDS OPTILAB mit einer Flussrate von 2,5 mL/min bei einer Temperatur von 40 °C verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit dem Gradient 0-30 % Acetonitril über 30 min zusammen mit 0,1 M NH_4OAc -Puffer. Die modifizierte DNA wurde mit einem Injektionsvolumen von 295 μL injiziert und bei Wellenlängen von 260 nm und 290 nm detektiert und fraktioniert gesammelt. Anschließend wurde die aufgereinigten Oligonukleotide mittels MALDI-TOF auf ihre Masse untersucht.

Experimentaltteil

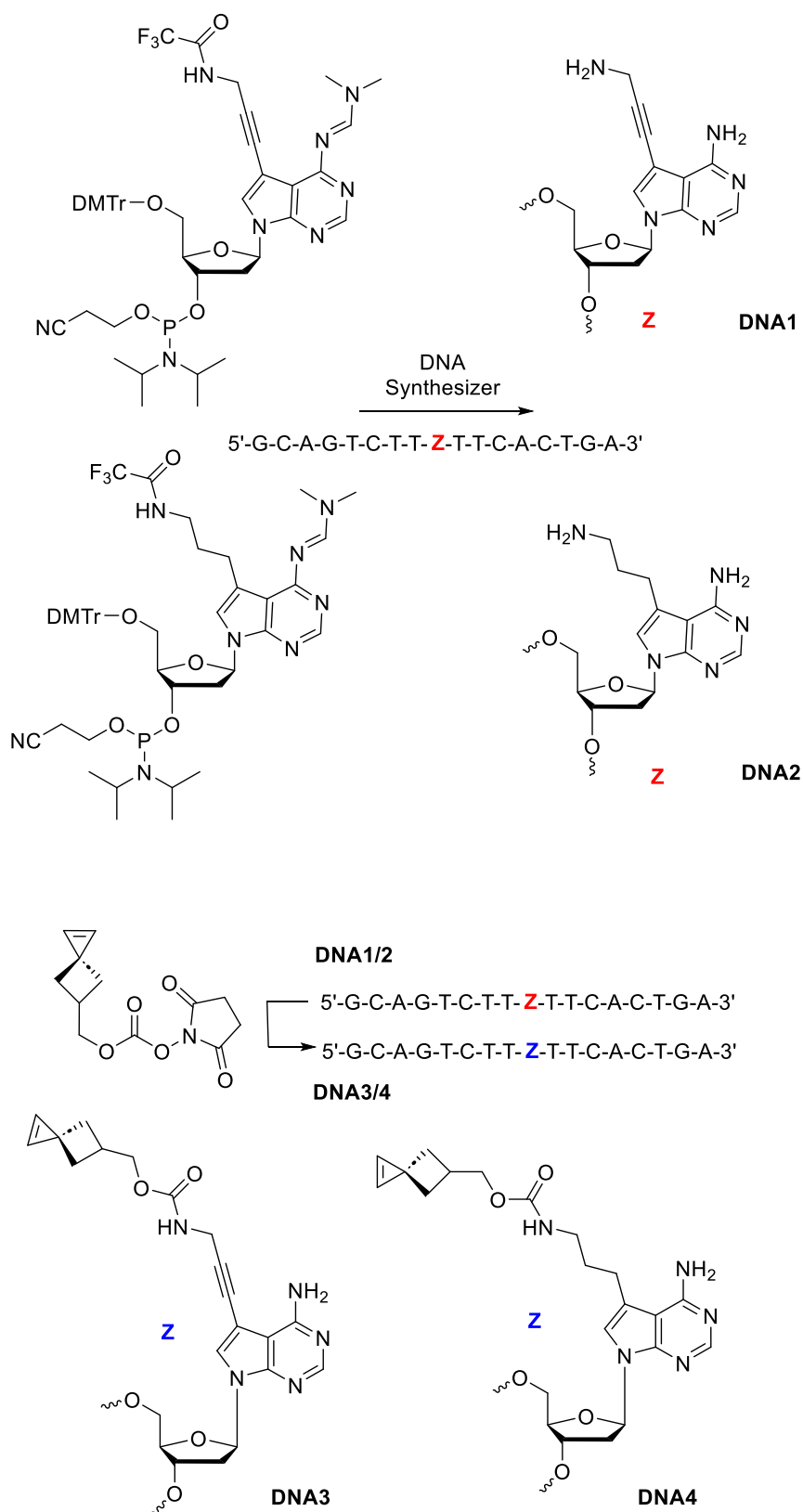


Abbildung 67 Postsynthetische Modifikation von **DNA1** und **DNA2** mit SPH-NHS-Ester **8** zu **DNA3** bzw. **DNA4**.

Experimentaltteil

Tabelle 6: Berechnete und gefundene Masse von **DNA1-DNA4**.

	Berechnete Masse m/z	Gefundene Masse m/z
DNA1	5214 [M] ⁺	5214 [M] ⁺
DNA2	5210 [M] ⁺	5210 [M] ⁺
DNA3	5346 [M] ⁺	5347 [M] ⁺
DNA4	5350 [M] ⁺	5349 [M] ⁺

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von **DNA3** und **DNA4** wurden über die Absorption an einem *NS-1000 Spektrophotometer* NANO DROP der Firma THERMO SCIENTIFIC im Modus „Nucleic Acids“ bestimmt. Die hierfür notwendigen Extinktionskoeffizienten der Nukleoside **III** und **IV** wurden aus einer in DMSO angefertigten Stammlösung bestimmt. Je Nukleosid wurden neun Absorptionsmessungen durchgeführt und die Absorptionsmaxima gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Unter der Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes und der Berücksichtigung der Wechselwirkung der benachbarten Nukleotide ergeben sich mit der nachfolgenden Formel folgende Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon_{260} = (X_{dA} * \epsilon_{dA} + X_{dG} * \epsilon_{dG} + X_T * \epsilon_{dT} + X_{dC} * \epsilon_{dC} + \epsilon_{16/17}) * 0.9$$

$$X_x = \text{Menge jedes Bausteins}$$

$$\epsilon_{dA} = 15.400 \text{ L/mol*cm} \quad \epsilon_{dG} = 11.500 \text{ L/mol*cm}$$

$$\epsilon_{dC} = 7.200 \text{ L/mol*cm} \quad \epsilon_{dT} = 8.800 \text{ L/mol*cm}$$

$$\epsilon_{III} = 6144 \text{ L/mol*cm} \quad \epsilon_{IV} = 5946 \text{ L/mol*cm}$$

Tabelle 7: Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide **DNA3** und **DNA4**.

Oligonukleotid	ϵ_{260} [L/mol*cm]
DNA3	153114
DNA4	152916

Hybridisierung:

Für die Hybridisierung wurde **DNA3** (10 μM) zusammen mit 1,20 Äq des entsprechend komplementären Oligonukleotids in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP_i , pH 7) und 250 mM NaCl-Lösung für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Tabelle 8: Schmelztemperatur der hybridisierten doppelsträngigen **dsDNA3**.

Oligonukleotid	Schmelztemperatur [°C]
dsDNA3	63,5

6.4 *In vitro* „Click“-Experimente

iEDDA-Experimente *in vitro*

Die Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der Reaktionskinetik und des Fluoreszenzanstiegs der einzelnen *iEDDA*-Reaktionen wurde an einem Fluoromax-4 Spektrofluorometer der Firma HORIBA-SCIENTIFIC durchgeführt. Für die Messungen wurden Quarz-Küvetten der Firma STARNA GmbH mit einer Schichtdicke von 10mm und einem Probenvolumen von 1,00 mL bzw. 500 μ L verwendet. Nukleoside wurden vor der Messung in einer Stammlösung von 40 mM in DMSO und die Tetrazin-modifizierten Farbstoffe in einer Stammlösung von 4 mM in DMSO vorbereitet. Es wurde jeweils 5 μ L der Stammlösungen mit doppelt destilliertem Wasser auf 1,00 mL aufgefüllt, sodass in der Küvette eine Konzentration von H₂O/DMSO von 99:1 vorlag, bzw. ein Verhältnis von Fluorophor/Dienophil von 1:5. Alle Nukleoside wurden in diesem Verhältnis mit allen Tetrazin-modifizierten Farbstoffen umgesetzt der Fluoreszenzanstieg in regelmäßigen Zeitabständen verfolgt. Zur Korrektur der Eigenfluoreszenz des unreaktierten Fluorophors und des Lösungsmittels, wurden zwei Blanks aufgenommen. Sobald kein Fluoreszenzanstieg mehr zu messen war, wurde der *Turn-On* über die normierten Integrale der Anfang- und Endmessung berechnet. Hierfür wurden die durch den Blank korrigierten Fluoreszenzspektren normiert und integriert. Der *Turn-On* wurde über folgende Formel berechnet:

$$TO = \frac{A(I_c)}{A(I_0)}$$

TO *Turn-On*

A(I_c) normiertes Fluoreszenz-Integral Endpunktmessung

A(I₀) normiertes Fluoreszenz-Integral Startmessung

Die Reaktionskinetik wurde ebenfalls in genau definierten Zeitabständen aufgenommen und die jeweilige Fluoreszenzintensität integriert, normiert und mit Hilfe der Blanks korrigiert. Das durch die Intensität gegen die Zeit aufgetragene Punktdiagramm liefert durch Monoexponentialfunktion die Reaktionsgeschwindigkeit (M⁻¹s⁻¹) in welcher der Fluoreszenzanstieg abläuft. Hierfür muss jedoch zunächst die Krümmung der aus der Monoexponentialfunktion k_{obs} über die Konzentration zurückgerechnet werden.

$$y = a + be^{-k_{obs}x}$$

Photoclick-Experimente *in vitro*

Die UV/Vis und Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der Reaktionskinetik der Photoclick-Reaktionen wurden mittels Quarz-Küvetten der Firma STARNA GmbH mit einer Schichtdicke von 10mm und einem Probenvolumen von 1,00 mL durchgeführt. Die Nukleoside wurden in einer Stammlösung von 40 mM in DMSO sowie die Tetrazole **F** und **G** in einer Stammlösung von 6,33 mM in DMSO vorbereitet. Es wurden 250 µM des zu untersuchenden Nukleosids mit 25 µM des jeweiligen Tetrazols auf 1 mL mit MeCN in einer Küvette aufgefüllt. Anschließend wurde mit einer $\lambda = 405$ nm LED für definierte Reaktionsabstände belichtet und nach jeder Belichtung ein UV/Vis bzw. ein Fluoreszenzspektrum der Reaktionslösung aufgenommen. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 wurden über die Photolyse des Tetrazols durch die Abnahme der jeweiligen Absorptionsmaxima gegen die Reaktionszeit über die Krümmung der Monoexponentialfunktion berechnet.

$$y = a + be^{-k_{obs}x}$$

Tabelle 9 – Berechnete sowie gefundene Massen der Photoclick-Produkte der Dienophile **39**, **I** und **40** mit den Pyren-Tetrazolen **F** und **G**.

	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
39+F	C ₄₃ H ₃₇ N ₅ O ₉ [M] ⁺ : 767,2591	[M] ⁺ : 767,2582
39+G	C ₄₅ H ₄₂ N ₆ O ₉ [M] ⁺ : 810,3013	[M-H] ⁺ : 809,2833
I+F	C ₄₅ H ₄₁ N ₅ O ₁₀ [M] ⁺ : 811,2853	[M] ⁺ : 811,5176
I+G	C ₃₉ H ₃₃ N ₄ O ₄ [M] ⁺ : 719,28	[M-3H] ⁺ : 716,75
40+F	C ₄₈ H ₄₅ N ₅ O ₁₀ [M] ⁺ : 851,3266	[M-H] ⁺ : 850,3086
40+G	C ₅₀ H ₄₉ N ₆ O ₁₀ [M] ⁺ : 892,3432	[M-H+Na] ⁺ : 914,3239

AcpcPNA-Sonden *in vitro*

Synthese und Modifikation der acpcPNA

Das Syntheseprotokoll folgte einer allgemeinen Methode von VILAIVAN *et al.*^[127]

Die CuAAC zur Modifikation der acpcPNA am N- bzw. C-Terminus wurde an der festen Phase vorgenommen. Dazu wurden folgende Lösungsmittel vermischt:

- 0,125 µmol acpcPNA an der festen Phase
- 6,5 µL Natriumascorbat-Lösung (400 mM)
- 4,5 µL Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM)
- 8,5 µL Tris-[(1-Benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (100 mM)
- 2,5 µL Atto647N/Cy3-Azid (100 mM)

Natriumascorbat-Lösung in H₂O, die restlichen Lösungen wurden in einem DMSO/^tBuOH-Lösungsmittelgemisch von 3:1 angesetzt.

Die Lösungen wurden gründlich gemischt und die acpcPNA an der festen Phase damit getränkt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 60 °C belassen. Im Anschluss wurde nach Abkühlen die Reaktionslösung entfernt und mit DMF, MeCN und MeOH nachgewaschen und unter einem N₂-Strom getrocknet. Danach wurde drei Mal mit je 300 µL TFA die modifizierte acpcPNA vom Harz abgespalten, die Trifluoressigsäure-Lösungen vereinigt und im N₂-Strom zur Trockene eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde drei Mal mit Diethylether gewaschen und erneut getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde in 200 µL Wasser aufgenommen und mittels RP-HPLC aufgereinigt.

Aufreinigung acpcPNA mittels RP-HPLC

Die Oligonukleotide wurden über RP-HPLC aufgereinigt mittels Eluent A (H₂O + 0,1 % TFA), Eluent B (MeOH + 0,1 % TFA) mit einer Flussrate von 2,0 mL/min für semipräparative Trennungen. Methode: 20-90 % MeOH in 70 min, mit UV/Vis-Detektion bei 260 nm, 290 nm, 530 nm und 650 nm. Es wurde fraktionsweise das Produkt gesammelt und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt.

Experimentaltteil

Nach erfolgreicher Synthese der acpcPNA-Sequenzen **Seq1-Seq6** wurde der Syntheserfolg mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie verifiziert.

Tabelle 10 – Sequenzabfolge sowie berechnete und gefundene Masse der acpcPNA-Sequenzen **Seq1-Seq6**.

	Sequenzabfolge (C' - N')	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
Seq1	GATTACAGCGCCTC	5715 [M] ⁺	5715 [M] ⁺
Seq2	CGCCGTCTATGCTC	6159 [M] ⁺	6157 [M-2H] ⁺
Seq3	TCACTGACGTGTAC	5731 [M] ⁺	5734 [M+3H] ⁺
Seq4	GTCTTATGACCGCA	6207 [M] ⁺	6206 [M-H] ⁺
Seq5	AATCCCCGGTCGCC	6154 [M] ⁺	6141 [M] ⁺
Seq6	AACACCAGCTGTCT	6176 [M] ⁺	6179 [M+3H] ⁺

Für die Hybridisierung mit den komplementären und nicht komplementären DNA- und RNA-Strängen wurden die acpcPNA-Sequenzen (jeweils 2,50 µM) zusammen mit 1,00 Äq. des entsprechend komplementären bzw. nicht-komplementären Oligonukleotids in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPi, pH 7) für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mittels Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen untersucht.

6.5 Zelleexperimente

Allgemeines

Alle Zelleexperimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Materialien und Schutzhandschuhe wurden vor Benutzung und Einführung in die Sterilbank mit 80%igen Ethanol desinfiziert. Sterile Lösungen, Materialien und Kultivierungsmittel wurden erst unter der Sterilbank geöffnet. Nach Beendigung der Experimente wurden alle Abfälle und Verbrauchsmaterialien gesondert gesammelt und autoklaviert. Für die Zelleexperimente wurden humane Cervix-Karzinomzellen vom Typ HeLa wt (Gebärmutterhalskrebszellen) verwendet, welche dauerhaft bei 37°C und 5% CO₂ mit einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert wurden.

Zellkultivierung

Für die Subkultivierung wurden die adhärenenten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels 1 mL Trypsin (0.25 %) von der Oberfläche abgelöst und nach einigen Minuten die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 9 mL Medium inhibiert. Schließlich wurde das gewünschte Teilvolumen der Zellsuspension in ein entsprechendes Kulturgefäß überführt und weiterverwendet.

Transfektion mit markierten Oligonukleotiden

Für die Transfektionsexperimente wurden $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Well in einem Volumen von 200 µL in eine IBIDI (µ-Slide 8 well ibiTreat, IBIDI) Platte ausgesät. Gleichzeitig wurde das Oligonukleotid mithilfe von Lipofectamine (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen) transfiziert. Dazu wurde eine Lipofectamine™-Lösung hergestellt, indem 0,15 µL Lipofectamine™ (1mg/mL) und 4,85 µL Opti-MEM™ (serumreduziertes Medium, Gibco™) pro Well mit 75 nM des Oligonukleotids oder des *in vitro* umgesetzten Oligonukleotids (Positivkontrolle, in Opti-MEM™ verdünnt) vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die resultierende Lipoplexlösung wurde anschließend mit der entsprechenden Zellsuspension und 2 µL Endo-Porter pro Well (GENE TOOL) vermischt und in einem Endvolumen von 200 µL pro Well auf die IBIDI-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium entfernt und

150 nM des Tetrazin-modifizierten Fluorophors (4 μ M Stammlösung in DMSO, in DMEM verdünnt) hinzugefügt. Eine Stunde später wurden die lebenden Zellen mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI8, TCS SP8 Inversmikroskop) mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv mikroskopiert. Die gebildeten Fluorophor-Konjugate wurden mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität) angeregt und die Fluoreszenzemission wurde im Bereich von 500-550 nm (grün fluoreszierende Fluorophore **A** und **B**), 550-600 nm (gelb fluoreszierendes Fluorophor **C**) und 600-650 nm (rot fluoreszierendes Fluorophor **D**) gemessen.

Metabolische Markierung

Zur metabolischen Markierung von Nukleinsäuren mit den modifizierten Nukleosiden **VI** und **VII** wurde No/No Medium verwendet. Dieses Medium enthält weder Glutamin noch Nukleoside, welche die Zelle dazu bewegt, bevorzugt das zugesetzte, modifizierte Nukleosid einzubauen. Es wurden $1 \cdot 10^4$ HeLa-Zellen/Well mit einem Volumen von 250 μ L/Well in ein 8-Well IBIDI-Platte überführt. Die entsprechende Konzentration (siehe 4.7.2) an modifizierten Nukleosiden wurde hinzugegeben und für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden PBS gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler mit PFA (4 % in DPBS, pH 6,90) inkubiert, gefolgt von Glycin/NH₄Cl-Lösung (jeweils 50 mM in DPBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweifachem Waschen mit PBS wurde Triton-X (0,1 % in DPBS) für 5 min hinzugegeben und anschließend HCl (2 M in H₂O) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde für 10 min eine Natrium Tetraborat-Lösung (0,1 M in H₂O) zur Neutralisation hinzugegeben und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Für die metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion wurde **G** (30 μ M in MeCN) zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer 405 nm LED für 20 min belichtet. Nach zweimaligem Waschen mit MeCN wurden die Zellen mit einem Konfokalfluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 52). Im Falle der metabolischen Markierung mittels iEDDA wurde Farbstoff **B** in entsprechender Konzentration in No/No Medium zur Zelle gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Abbildung 53).

7 Anhang

7.1 Ergänzende Kinetik- und Fluoreszenzspektren

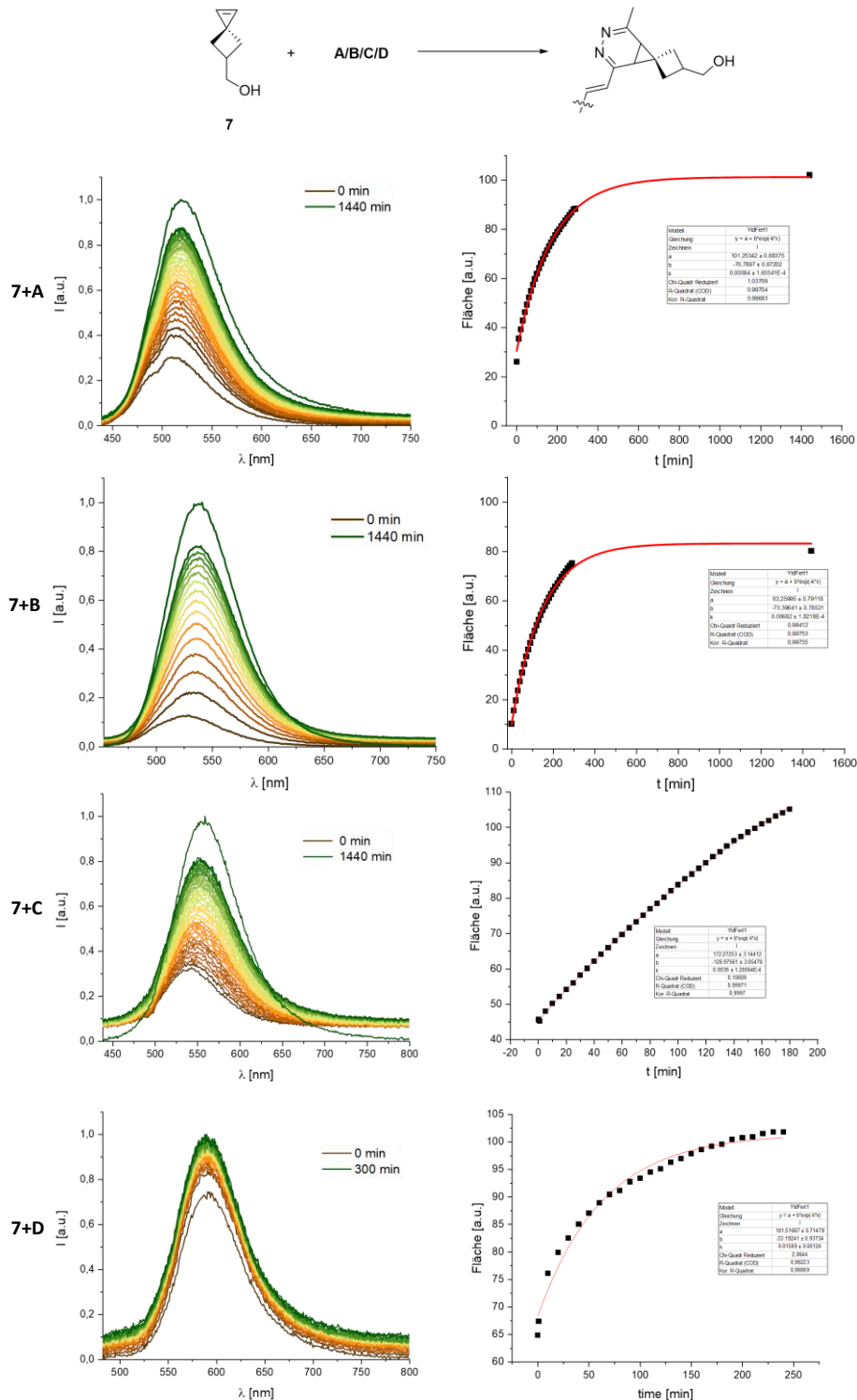


Abbildung 68 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **7** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 20 μM Fluorophor, 100 μM **7** (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$.

Anhang

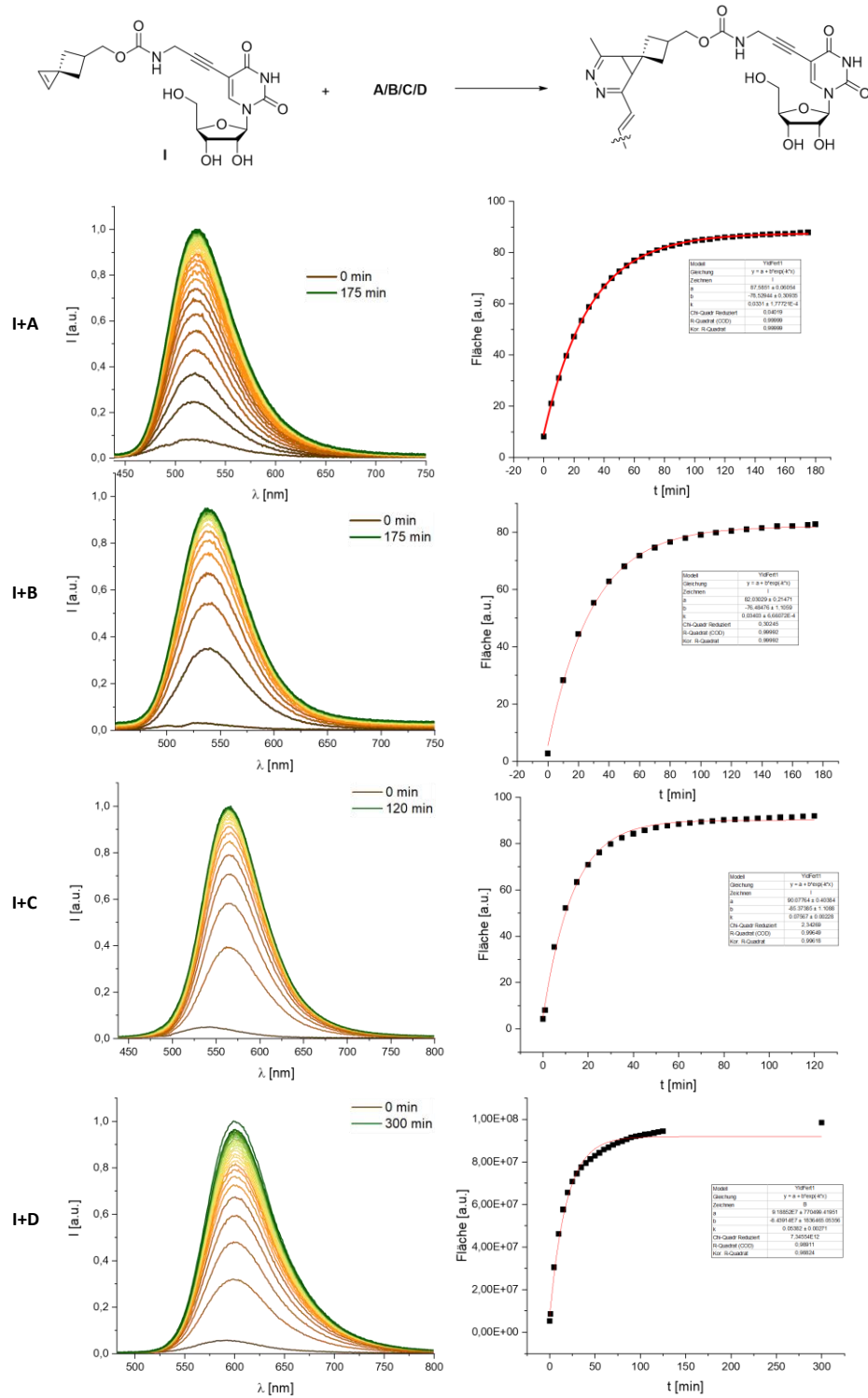


Abbildung 69 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **I** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 20 μM Fluorophor, 100 μM **I** (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$.

Anhang

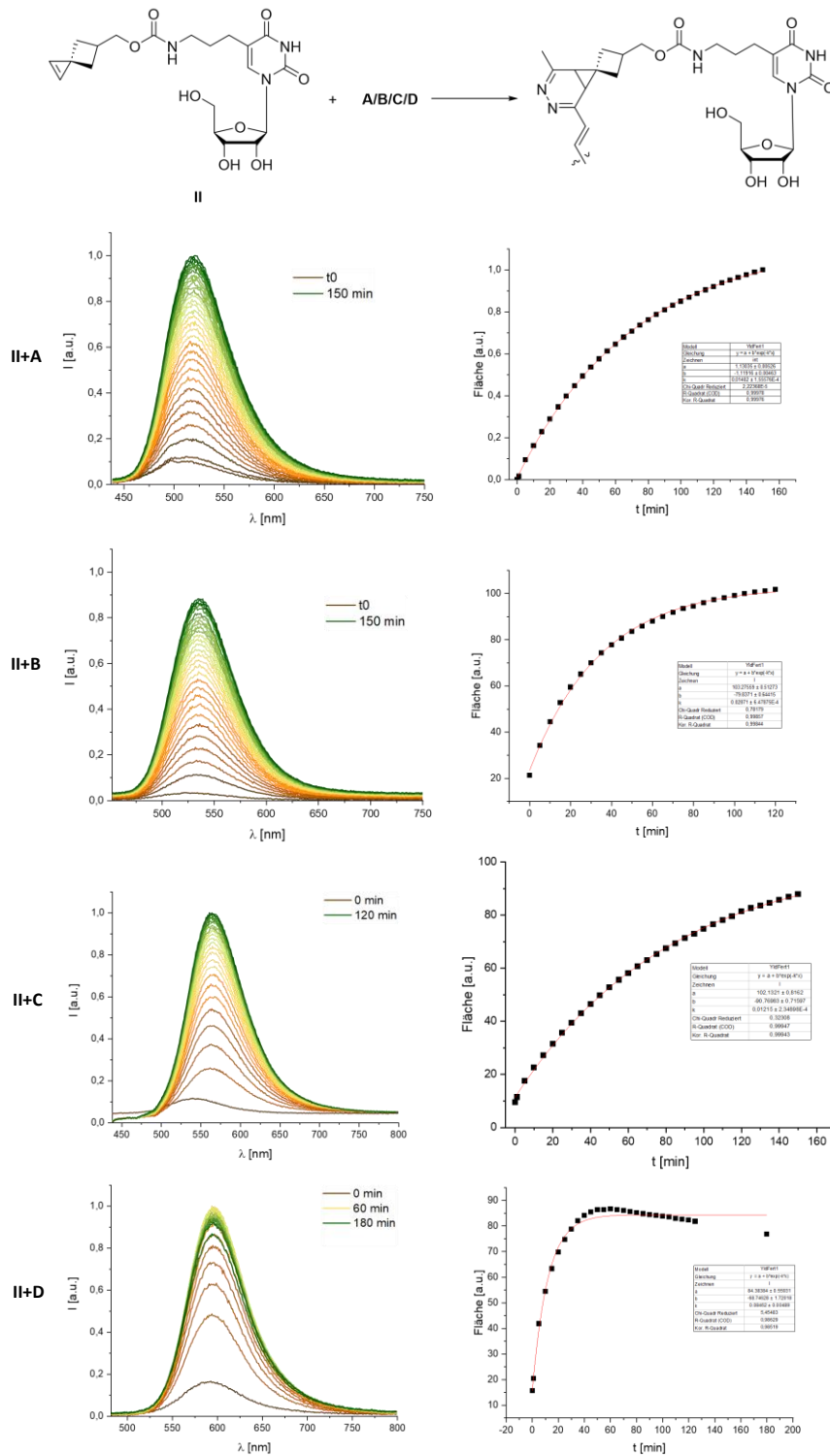


Abbildung 70 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **II** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 20 μM Fluorophor, 100 μM **II** (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$.

Anhang

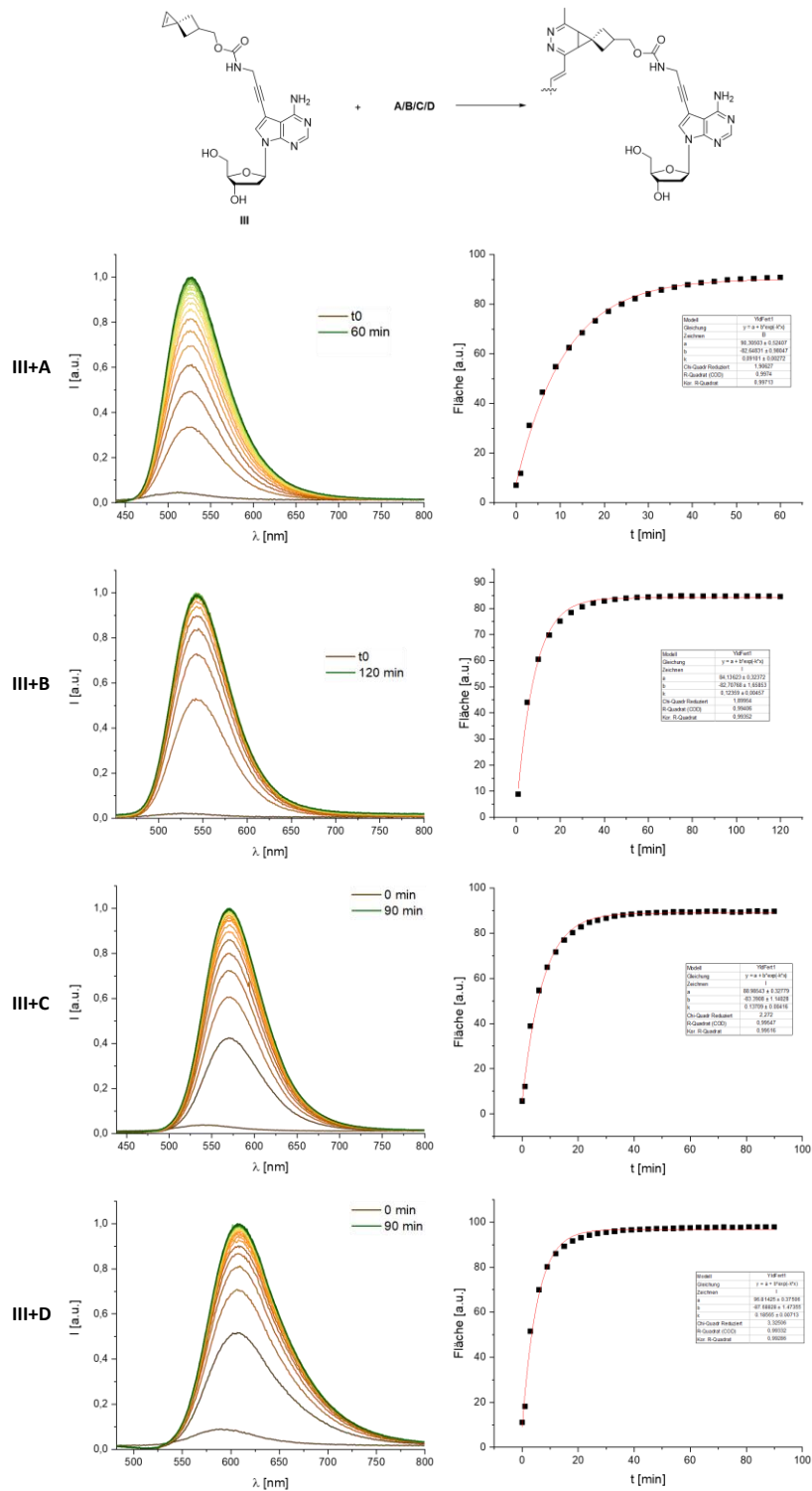


Abbildung 71 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **III** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 20 μM Fluorophor, 100 μM **III** (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$.

Anhang

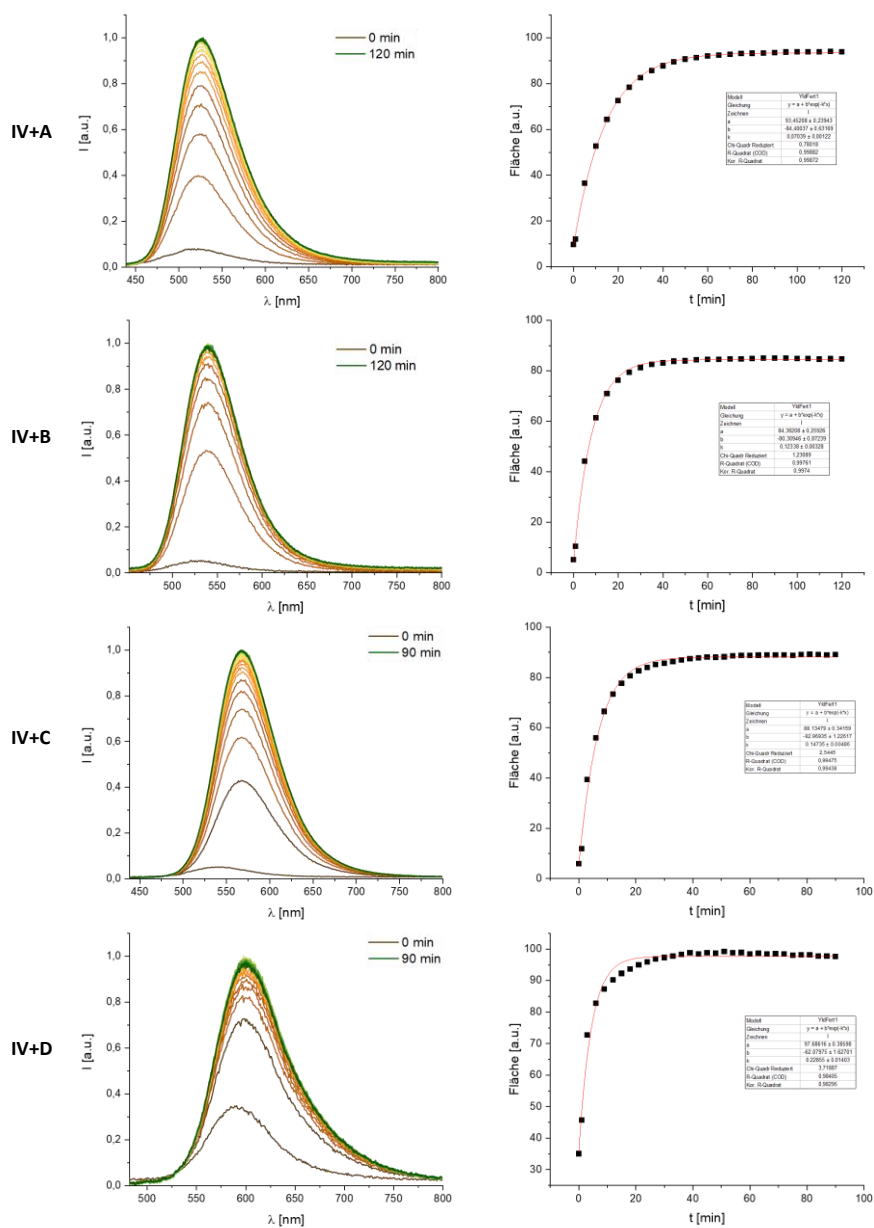
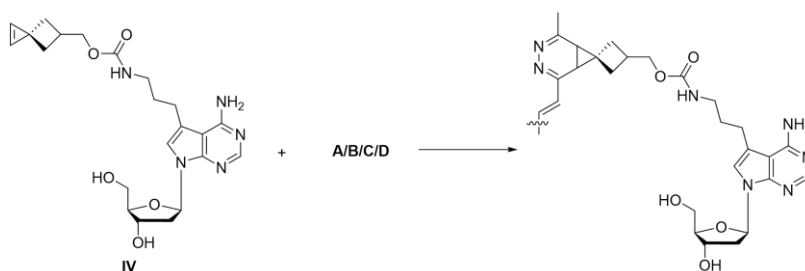


Abbildung 72 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **IV** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 20 μM Fluorophor, 100 μM **IV** (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$.

Anhang

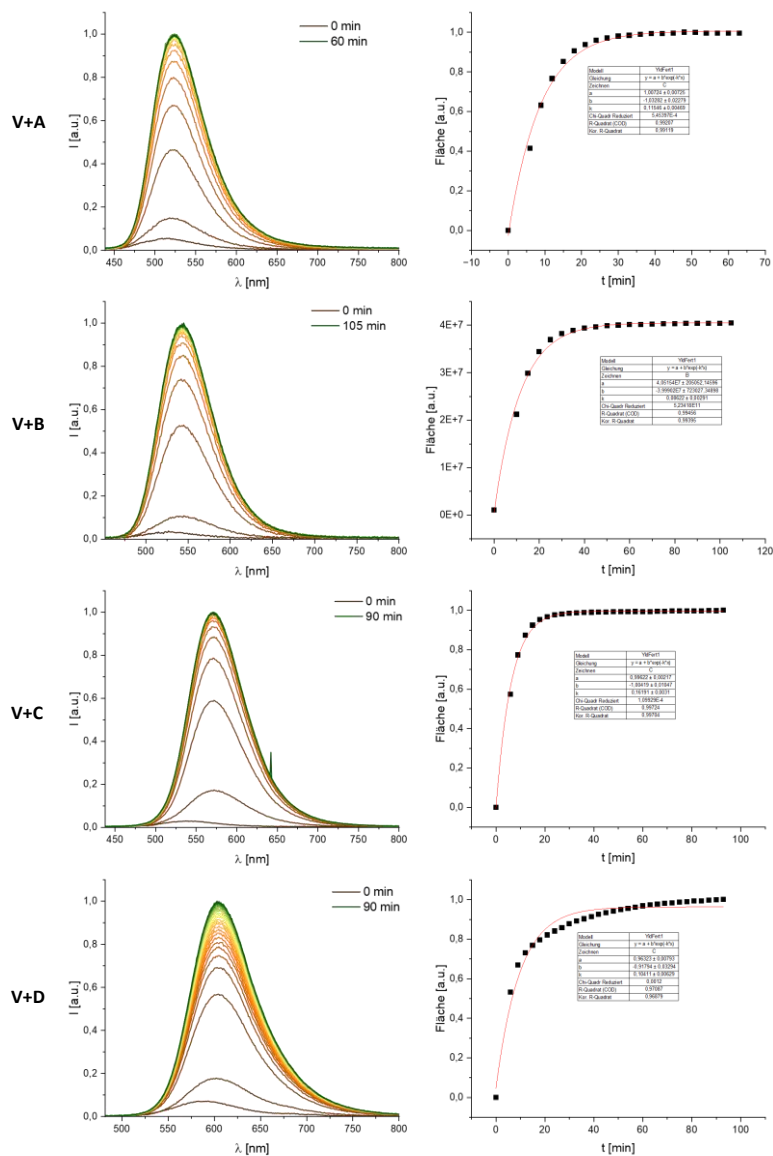
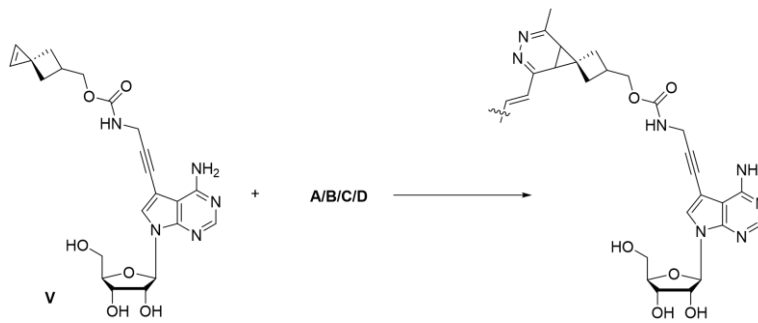


Abbildung 73 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **V** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 20 μM Fluorophor, 100 μM **V** (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$.

Anhang

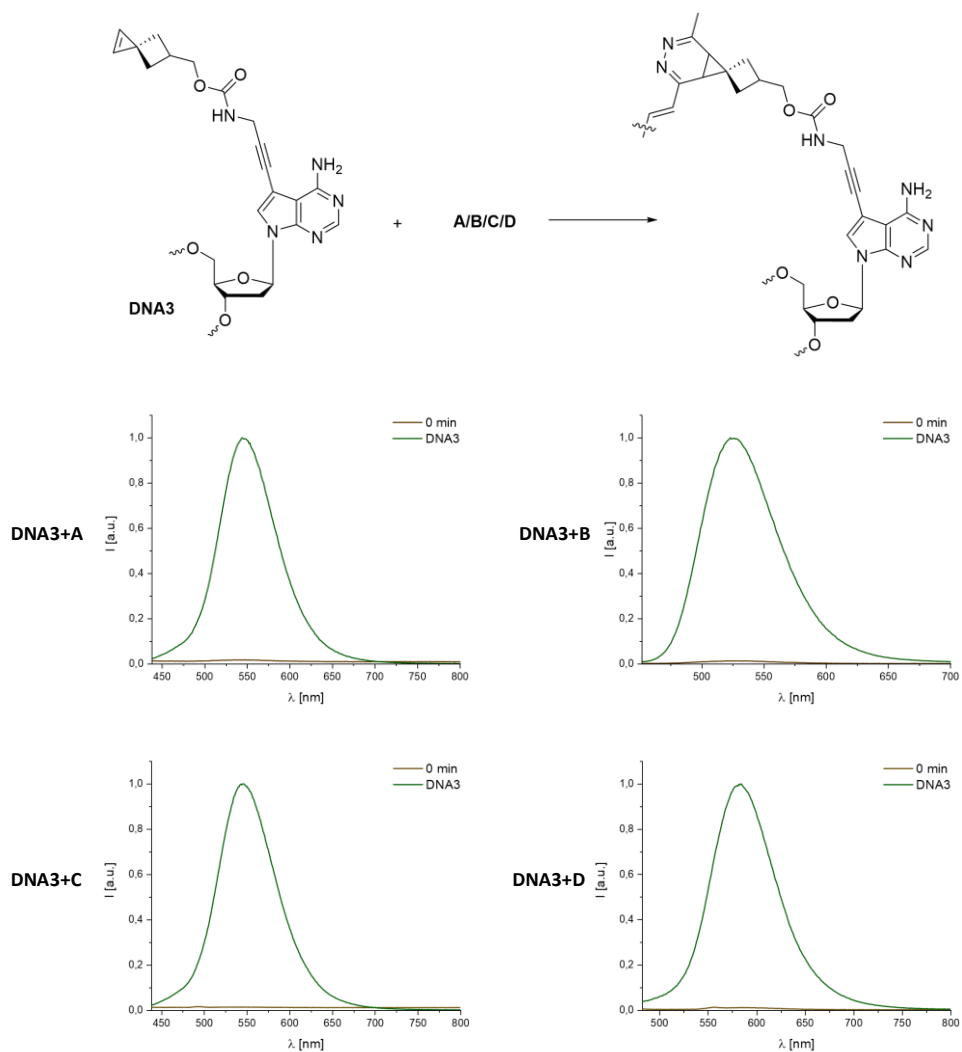


Abbildung 74 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **DNA3** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit. Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 2 μM Fluorophor, 10 μM **DNA3** (5,00 \AA q.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C.

Anhang

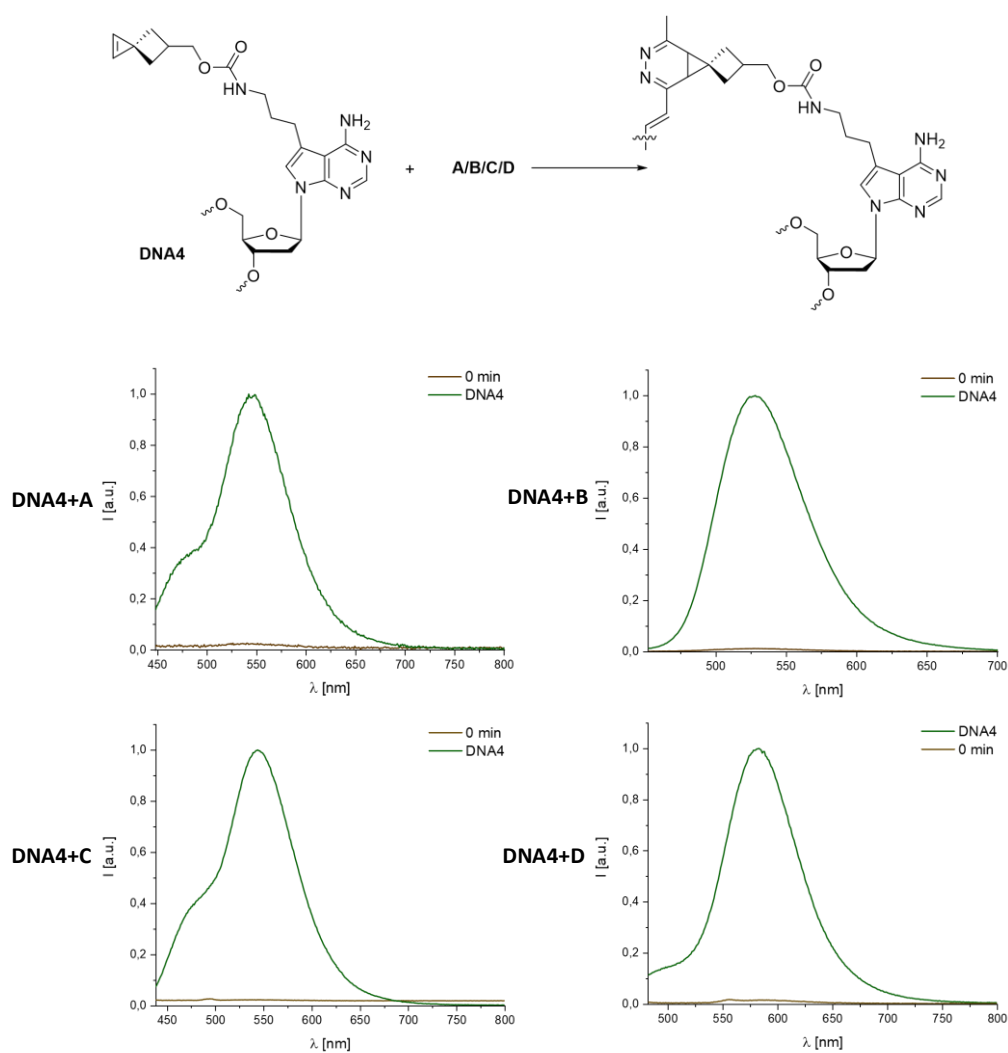


Abbildung 75 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **DNA4** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit. Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 2 μM Fluorophor, 10 μM **DNA4** (5,00 \AA q.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C.

Anhang

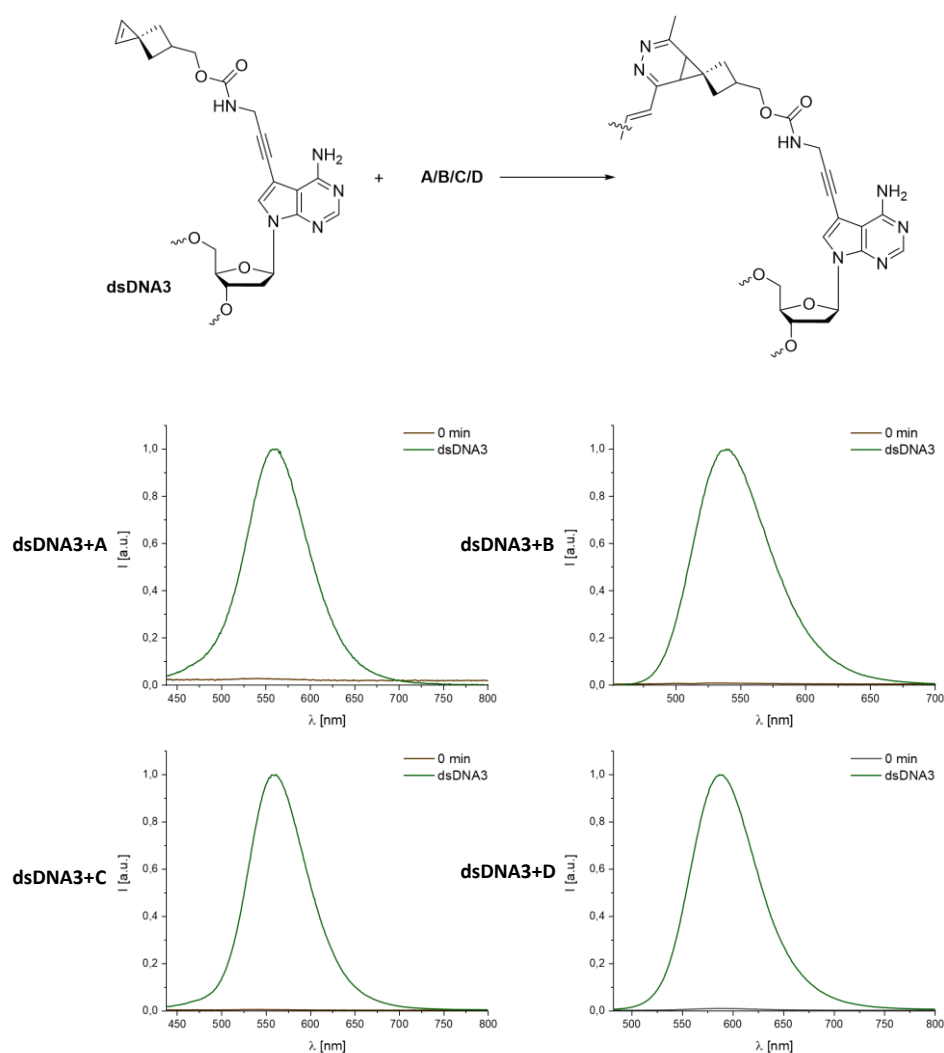


Abbildung 76 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von **dsDNA3** mit **A-D** bei zunehmender Reaktionszeit. Die Messungen wurden in H₂O/DMSO (99:1 Vol%, 250 mM NaCl, 10mM NaP_i-Puffer) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (**A**), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (**B**), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (**C**) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (**D**), 2 μM Fluorophor, 10 μM **dsDNA3** (5,00 \AA q.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C.

Anhang

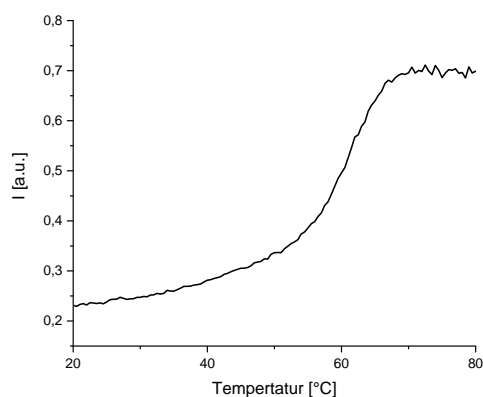


Abbildung 77 – Schmelztemperaturkurve der hybridisierten doppelsträngigen **dsDNA3**.

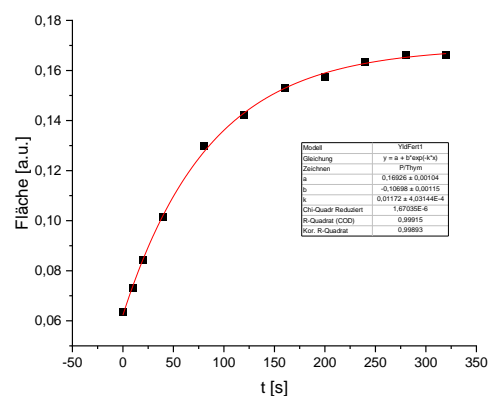


Abbildung 78 - Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von Photoclick-Produkt **39+E** durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten in MeCN/PBS 1:1, **39**: 500 μ M, **E**: 100 μ M.

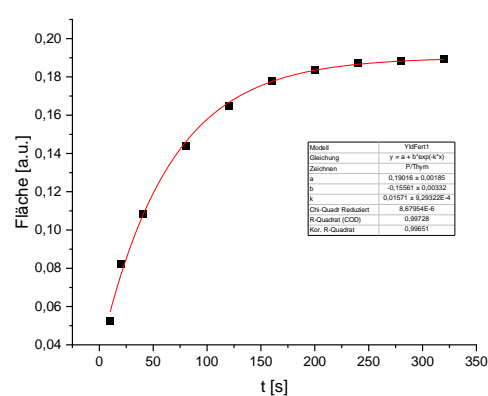


Abbildung 79 - Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von Photoclick-Produkt **I+E** durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten in MeCN/PBS 1:1, **I**: 500 μ M, **E**: 100 μ M.

Anhang

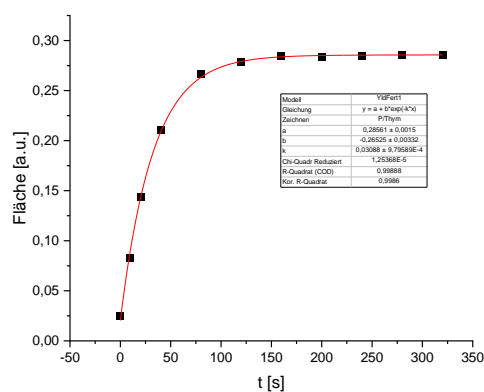


Abbildung 80 - Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von Photoclick-Produkt **40+E** durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten in MeCN/PBS 1:1, **40**: 500 μ M, **E**: 100 μ M.

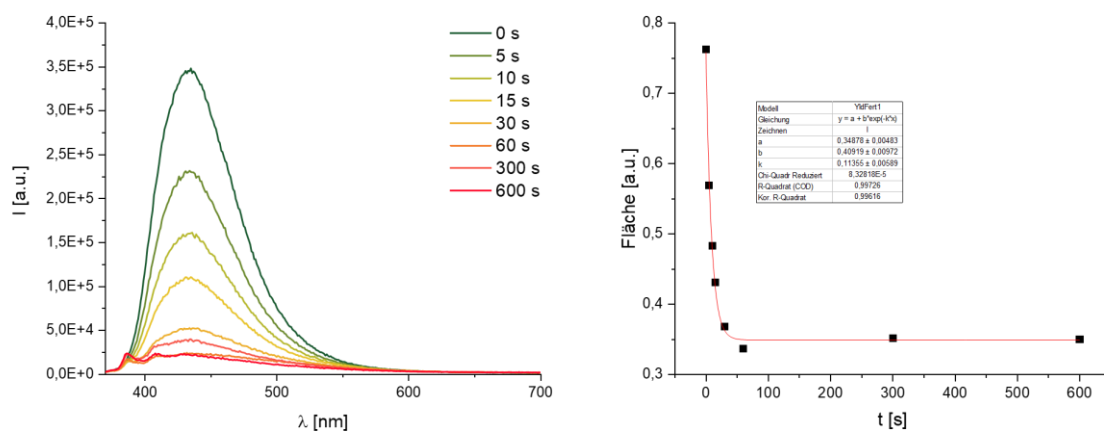


Abbildung 81 – Fluoreszenzspektrum **39+F** nach definierten Belichtungszeiten. **39** (250 μ M), **F** (25 μ M) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm, Slit: 0,8. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).

Anhang

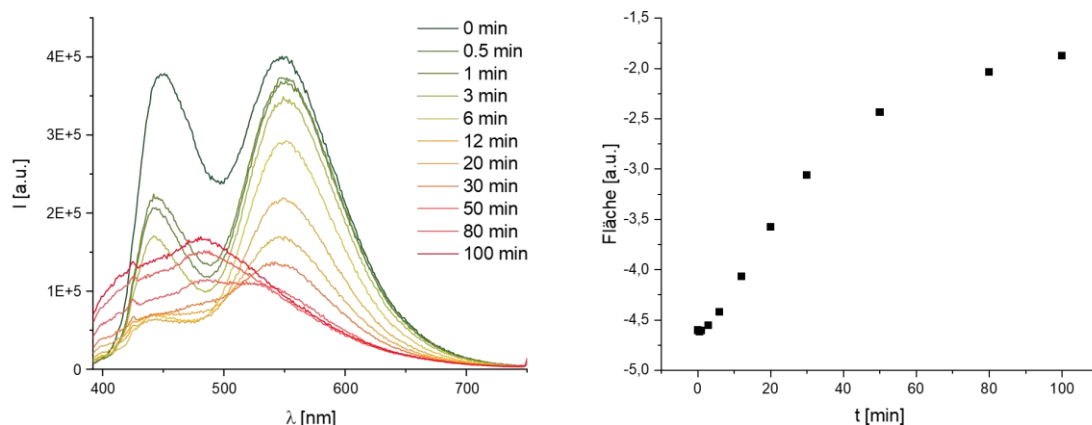


Abbildung 82 - Fluoreszenzspektrum **39+G** nach definierten Belichtungszeiten. **39** (250 μM), **G** (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 377$ nm, Slit: 2,0. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).

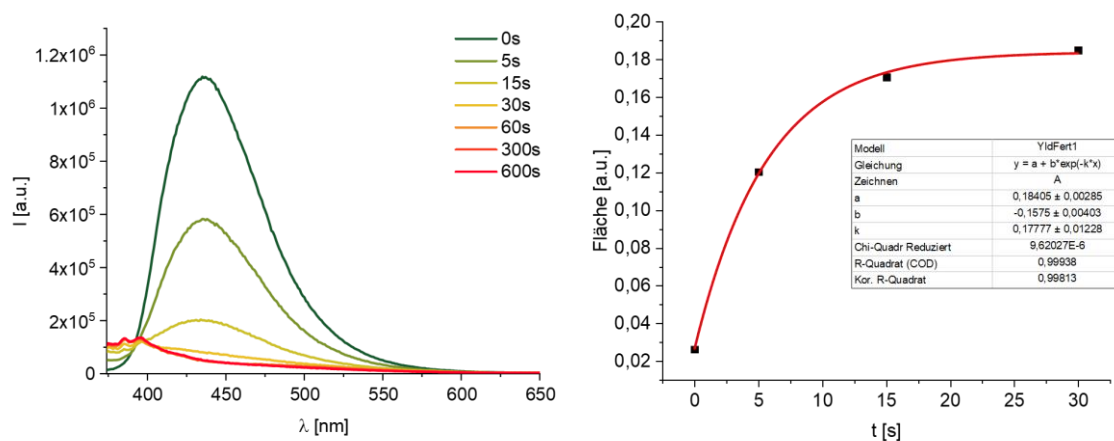


Abbildung 83– Fluoreszenzspektrum **I+F** nach definierten Belichtungszeiten (links). **I** (250 μM), **F** (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm, Slit: 0,8. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).

Anhang

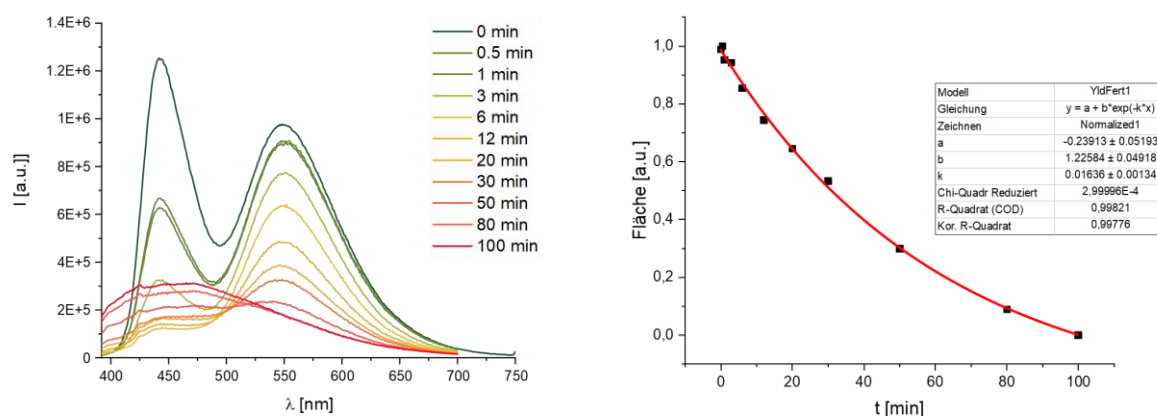


Abbildung 84- Fluoreszenzspektrum **I+G** nach definierten Belichtungszeiten. **I** (250 μM), **G** (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 377 \text{ nm}$, Slit: 2,0. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).

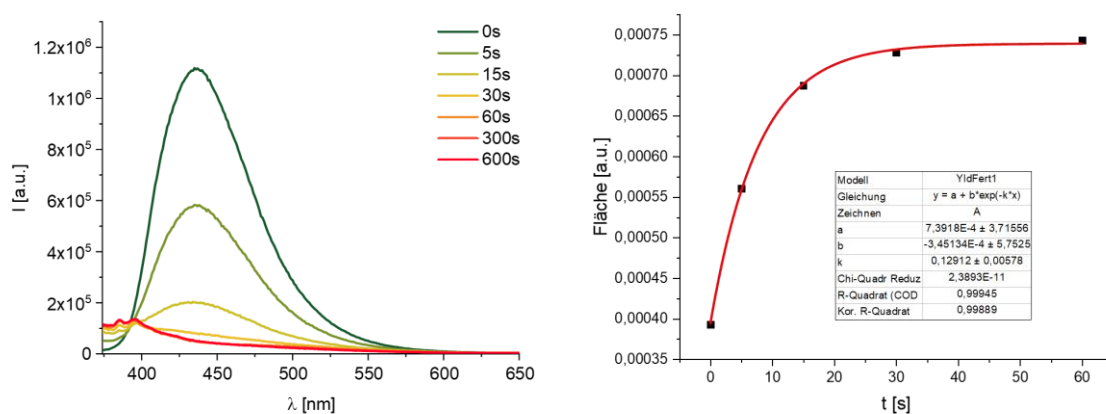


Abbildung 85- Fluoreszenzspektrum **40+F** nach definierten Belichtungszeiten. **40** (250 μM), **F** (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$, Slit: 0,8. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).

Anhang

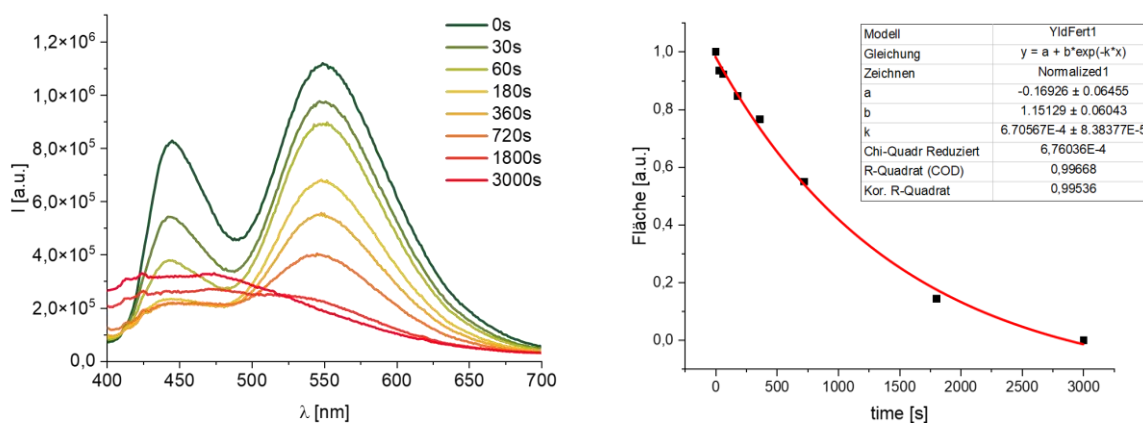


Abbildung 86 Fluoreszenzspektrum **40+G** nach definierten Belichtungszeiten. **40** ($250 \mu\text{M}$), **G** ($25 \mu\text{M}$) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 377 \text{ nm}$, Slit: 2,0. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).

7.2 Ergänzende Zellbilder

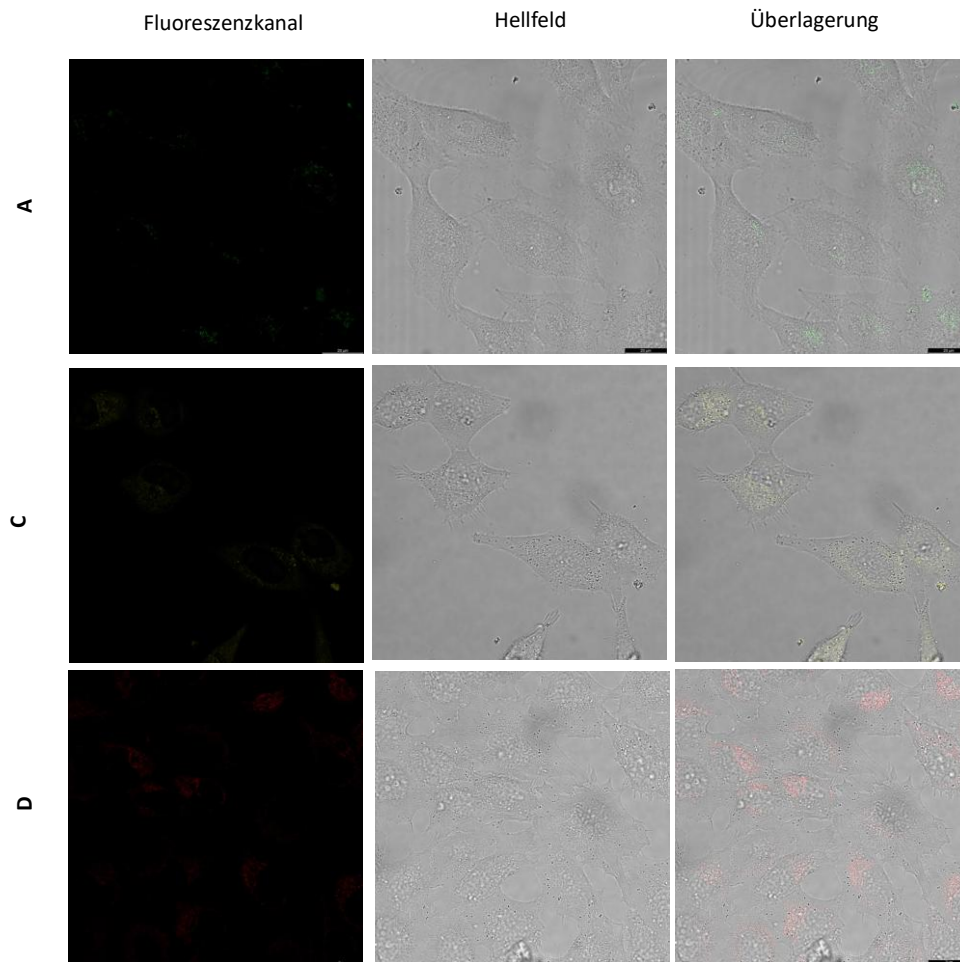


Abbildung 87 - HeLa-Zellen mit Fluorophor **A**, **C** und **D** (jeweils 150 nM) als Negativkontrollen. Visualisierung mittels konfokalem Fluoreszenzmikroskop bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ (**A**), $\lambda_{\text{em.}} = 550\text{-}600 \text{ nm}$ (**C**), $\lambda_{\text{em.}} = 600\text{-}650 \text{ nm}$ (**D**), Maßstab: 20 μm .

Anhang

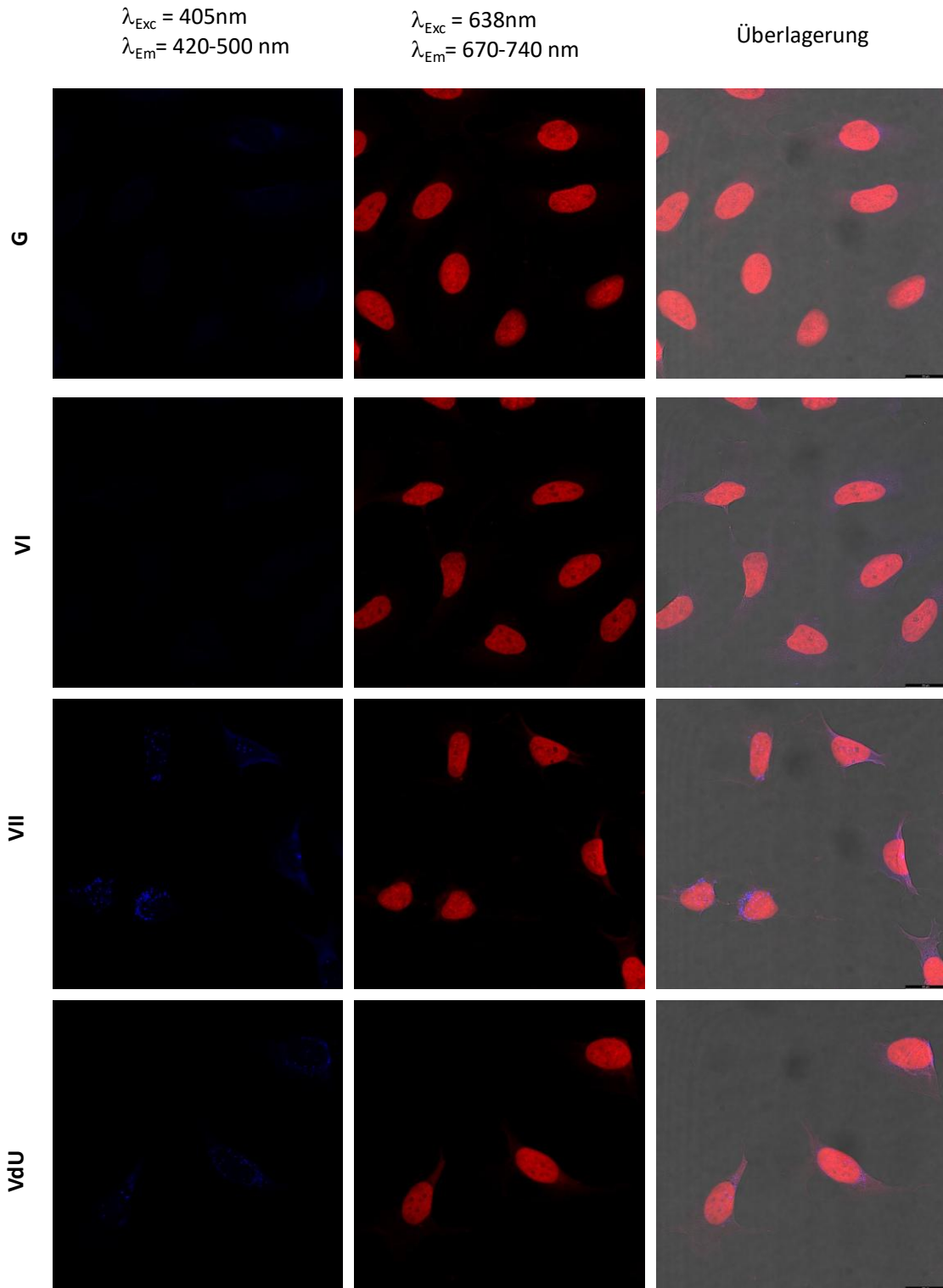


Abbildung 88 – Metabolische Markierung von **VI** und **VII** über Photoclick-Reaktion mit Gegenfärbung von DRAQ5 in PBS. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 48 h Inkubation mit **VI**, **VII** und **VdU** (250 μM), Fixierung, Permeabilisierung und Denaturierung der DNA. Photoclick-Reaktion *in cellulo* mit Fluorophor **G**, 1h Inkubation bei Raumtemperatur und Belichtung für 20 min bei 405 nm. Negativkontrolle (oben) ohne 2'Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 405\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 420\text{-}500\text{ nm}$. Laser-Intensität 10 %.

7.3 Ergänzende Absorptionsspektren der acpcPNA Experimente

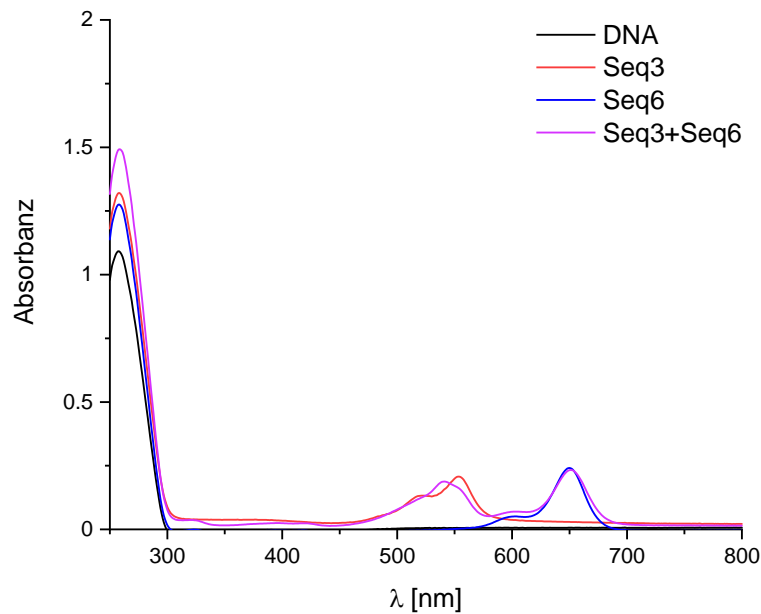


Abbildung 89 - Absorptionsspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit **Seq3**, **Seq6** und **Seq3+Seq6** in 250 mM NaCl, 2,5 μ M in 10 mM NaP_i, pH = 7, 20 °C.

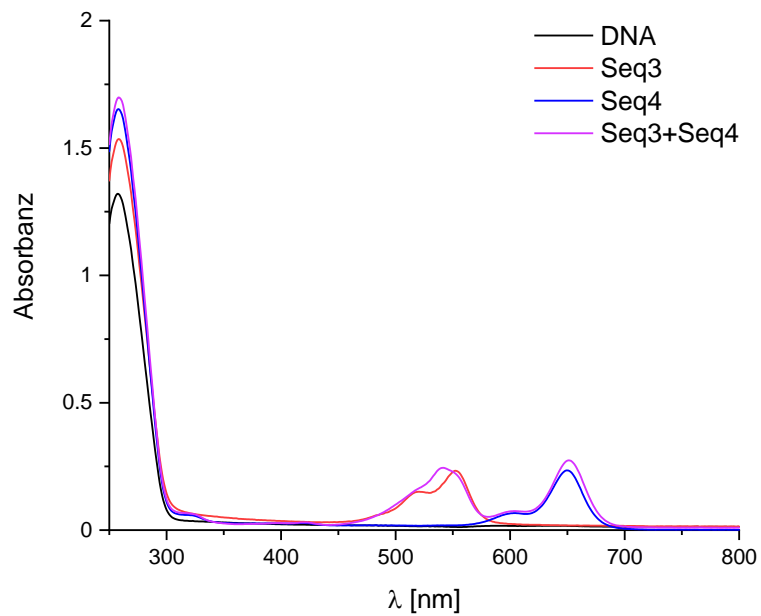


Abbildung 90- Absorptionsspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit **Seq3**, **Seq4** und **Seq3+Seq4** 2,5 μ M in 10 mM NaP_i, pH = 7, 20 °C.

Anhang

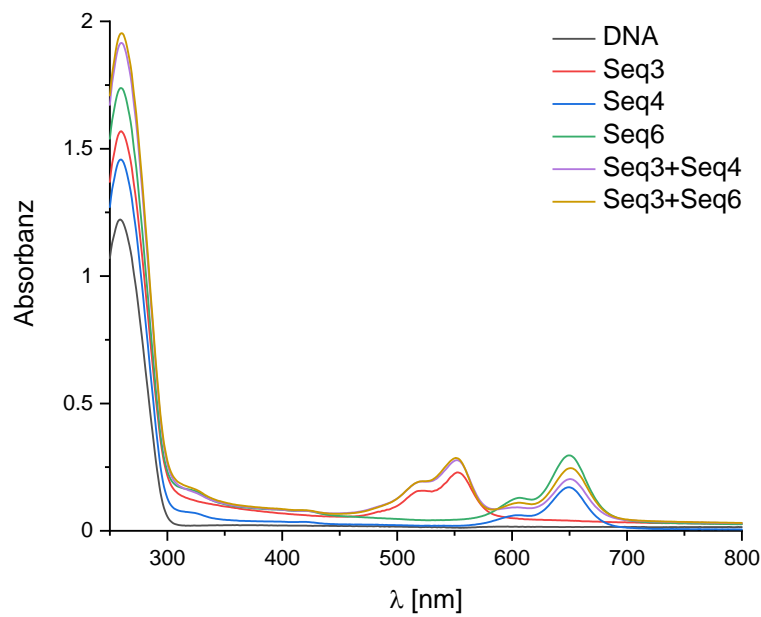


Abbildung 91 - Absorptionsspektrum der hybridisierten, nicht-komplementären DNA mit **Seq3**, **Seq4/Seq6** und **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6**, 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.

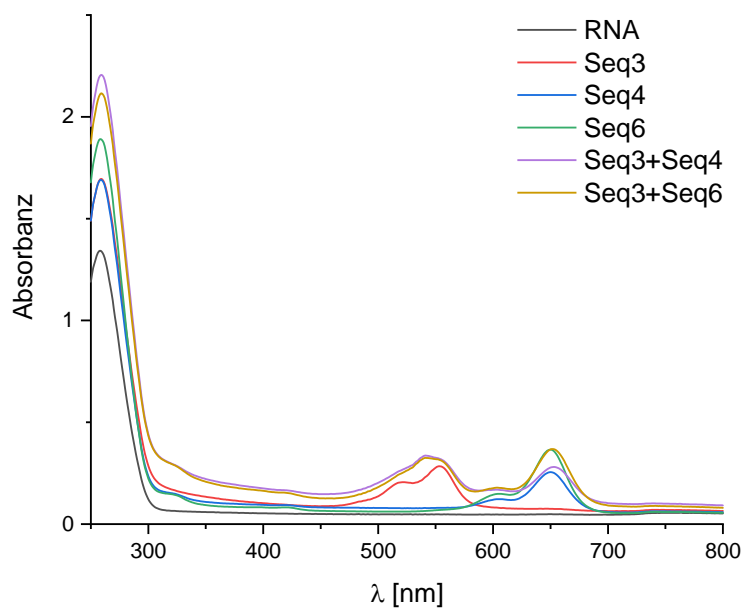


Abbildung 92- Absorptionsspektrum der hybridisierten, komplementären RNA mit **Seq3**, **Seq4/Seq6** und **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6**, 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.

Anhang

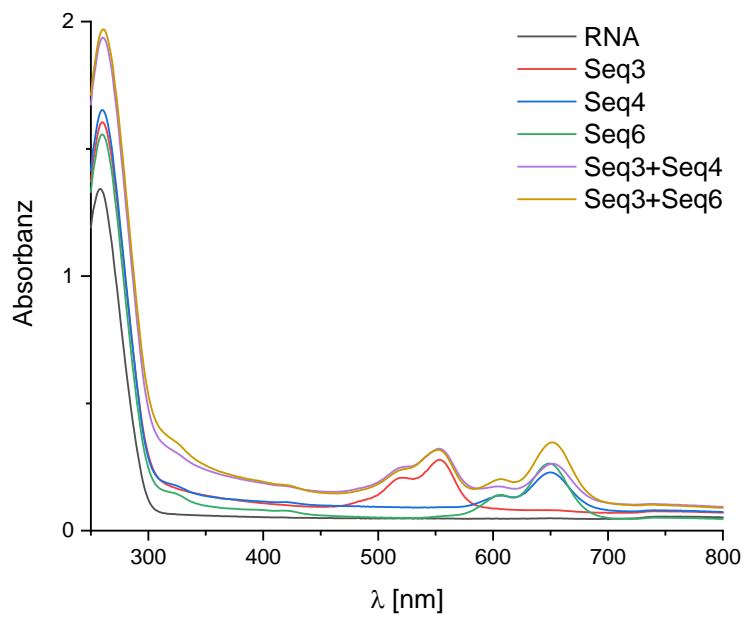
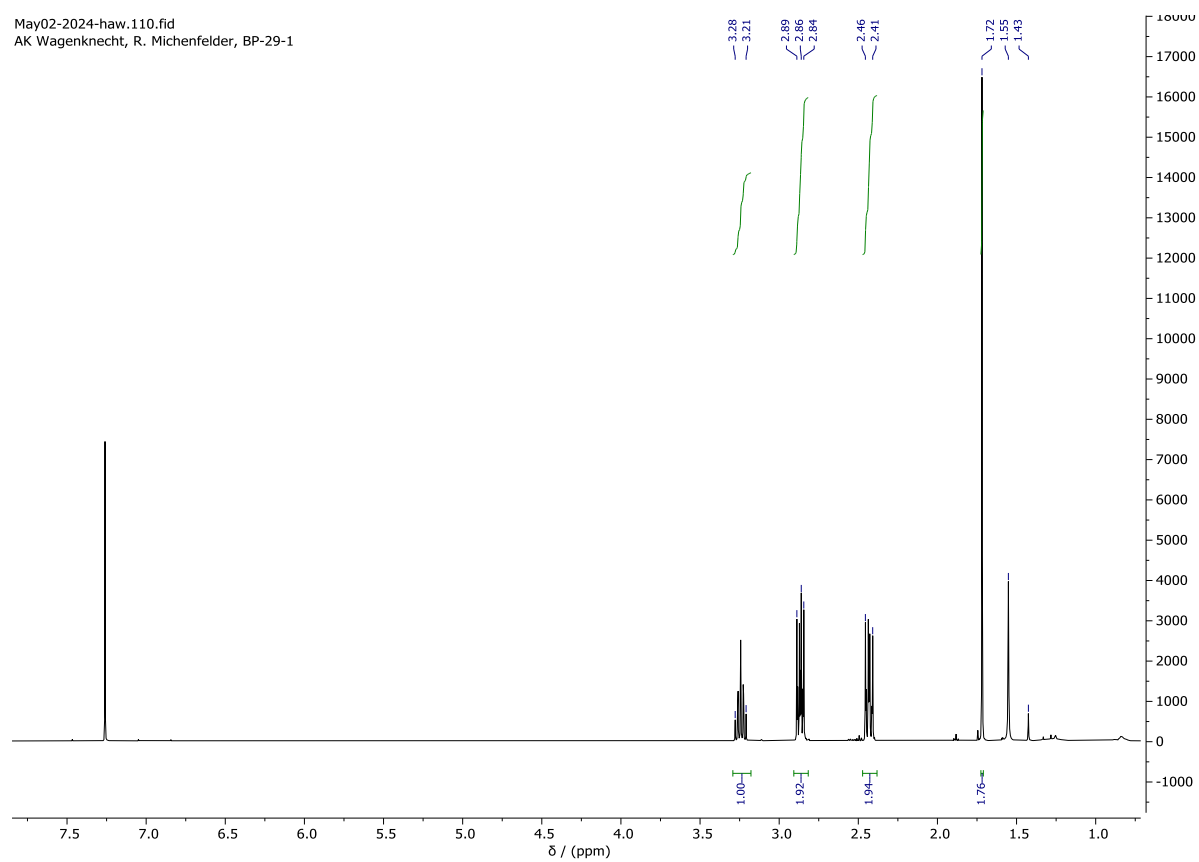


Abbildung 93 - Absorptionsspektrum der hybridisierten, nicht-komplementären RNA mit **Seq3**, **Seq4/Seq6** und **Seq3+Seq4** bzw. **Seq3+Seq6**, 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.

7.4 Ergänzende NMR-Spektren und MS-Spektren der hergestellten Moleküle

Abbildung 94 - ^1H -NMR Spektrum von **2** (400 MHz, CDCl_3).

Anhang

Oct14-2021.160.fid
AK Wagenknecht, B.Pfeuffer, BP-30, CDCl₃

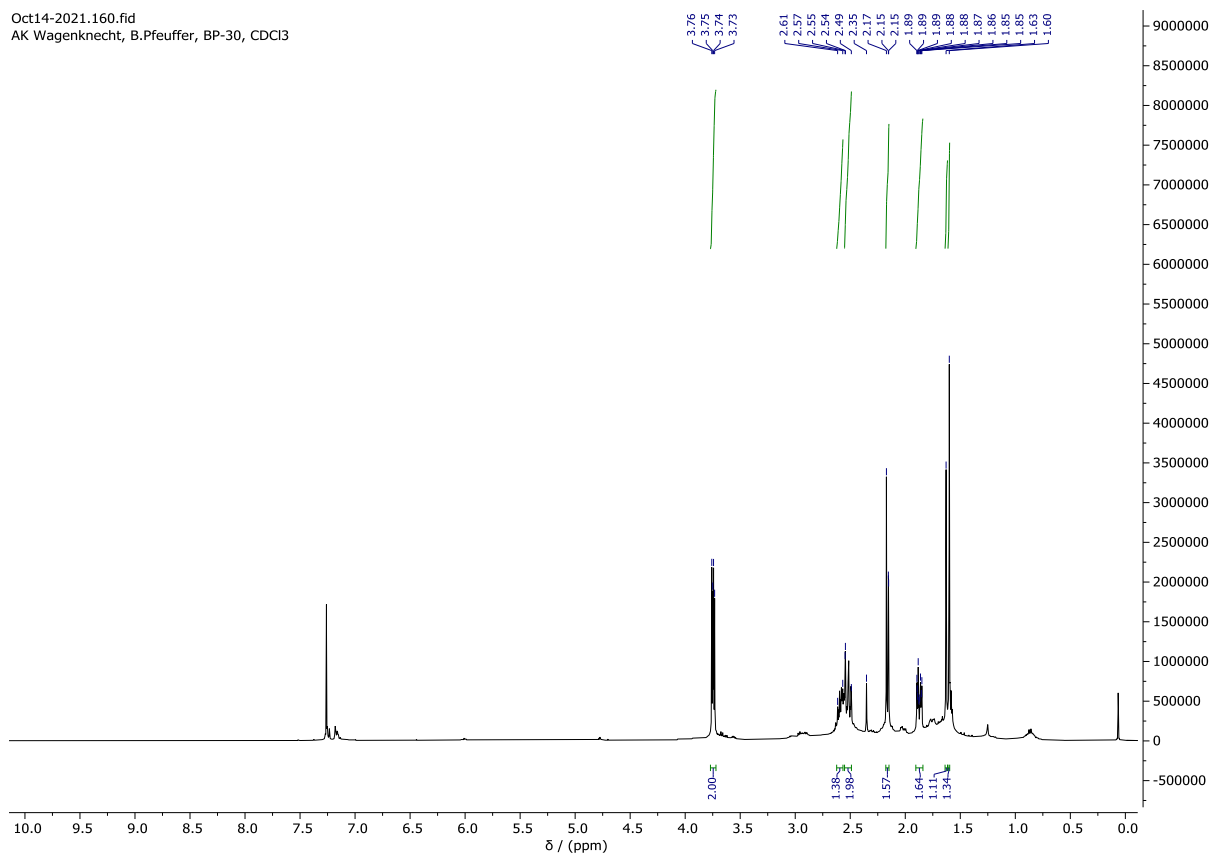


Abbildung 95 - ¹H-NMR Spektrum von **3** (400 MHz, CDCl₃).

May10-2022.670.fid
AK Wagenknecht, B.Pfeuffer, BP-31e B5+6, CDCl₃

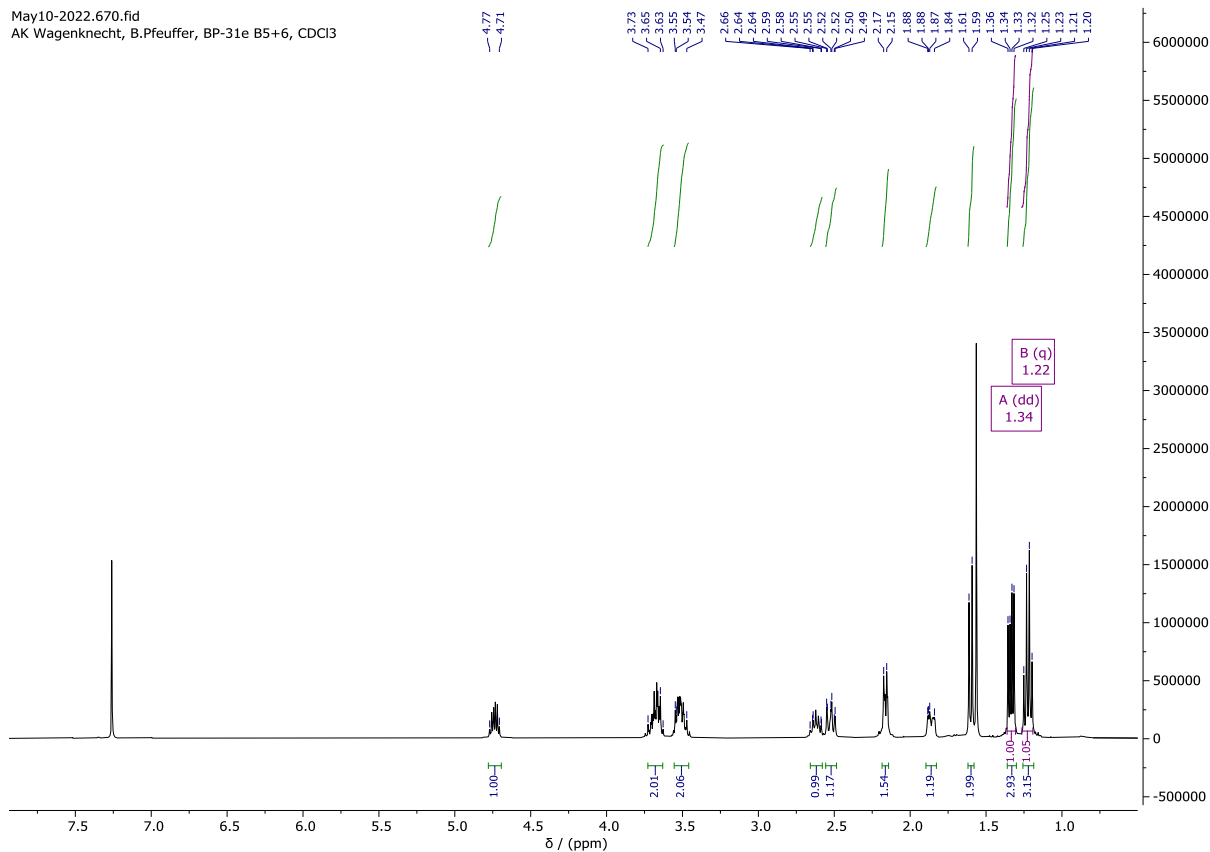


Abbildung 96 - ¹H-NMR Spektrum von **4** (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

Aug03-2022.160.fid
AK Wagenknecht, B.Pfeuffer, BP-32g-F2, CDCl₃

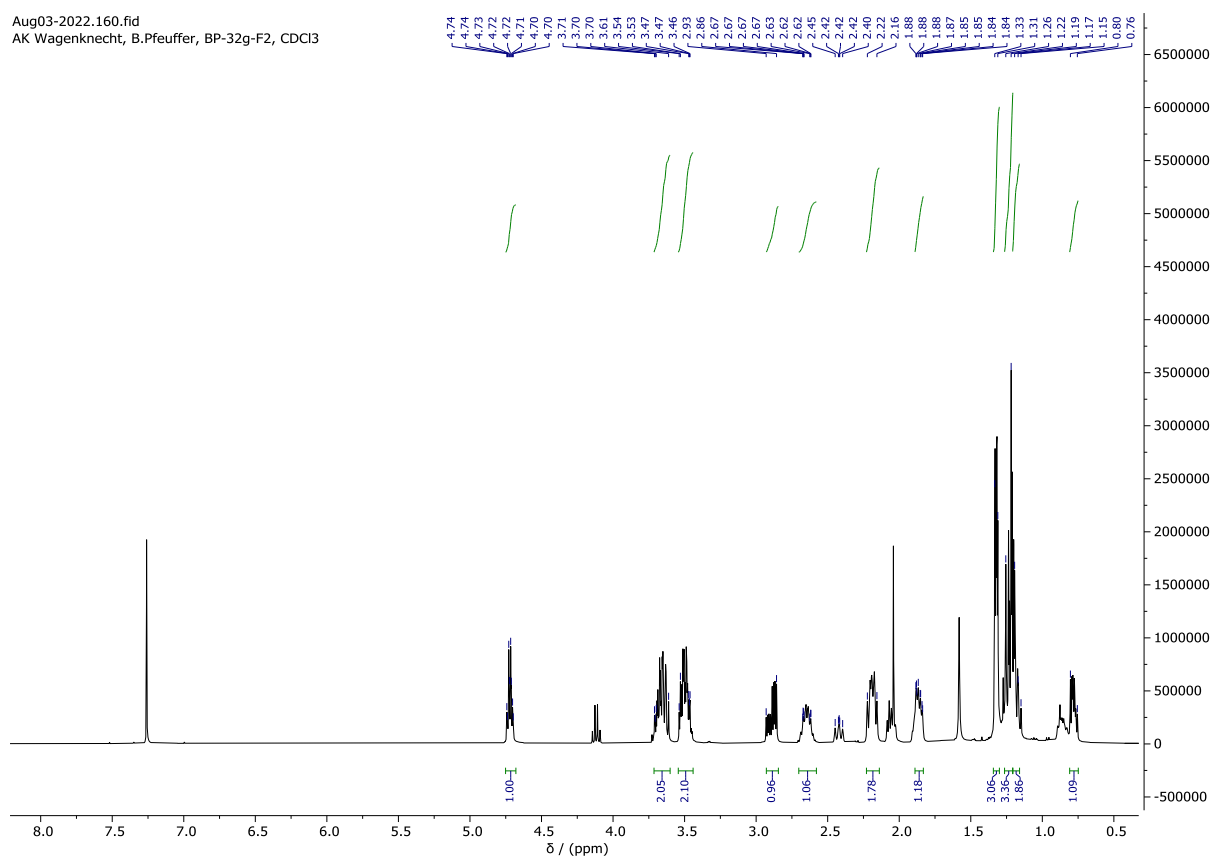


Abbildung 97 - ¹H-NMR Spektrum von **5** (400 MHz, CDCl₃).

Nov11-2021.540.fid
AK Wagenknecht, B.Pfeuffer, BP-33a-cis-P, CDCl₃

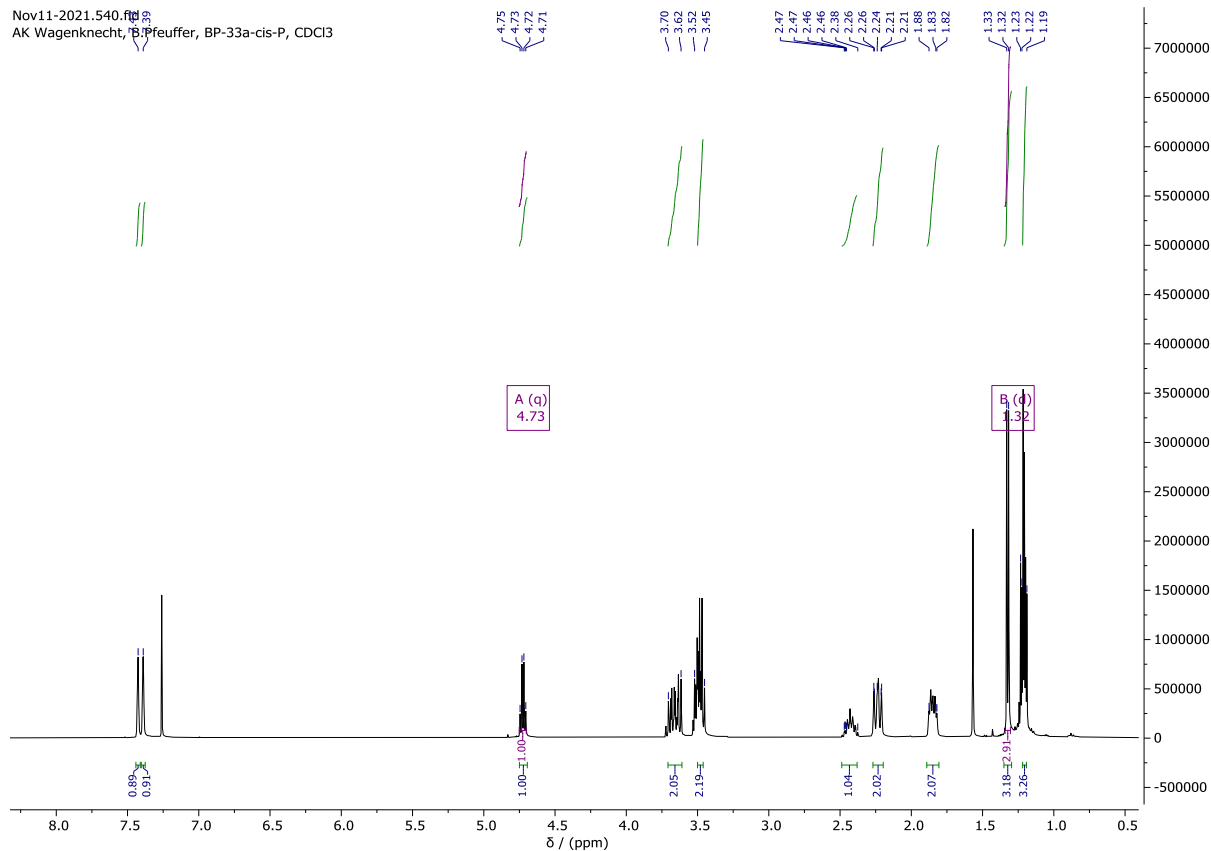


Abbildung 98 - ¹H-NMR Spektrum von **6** (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

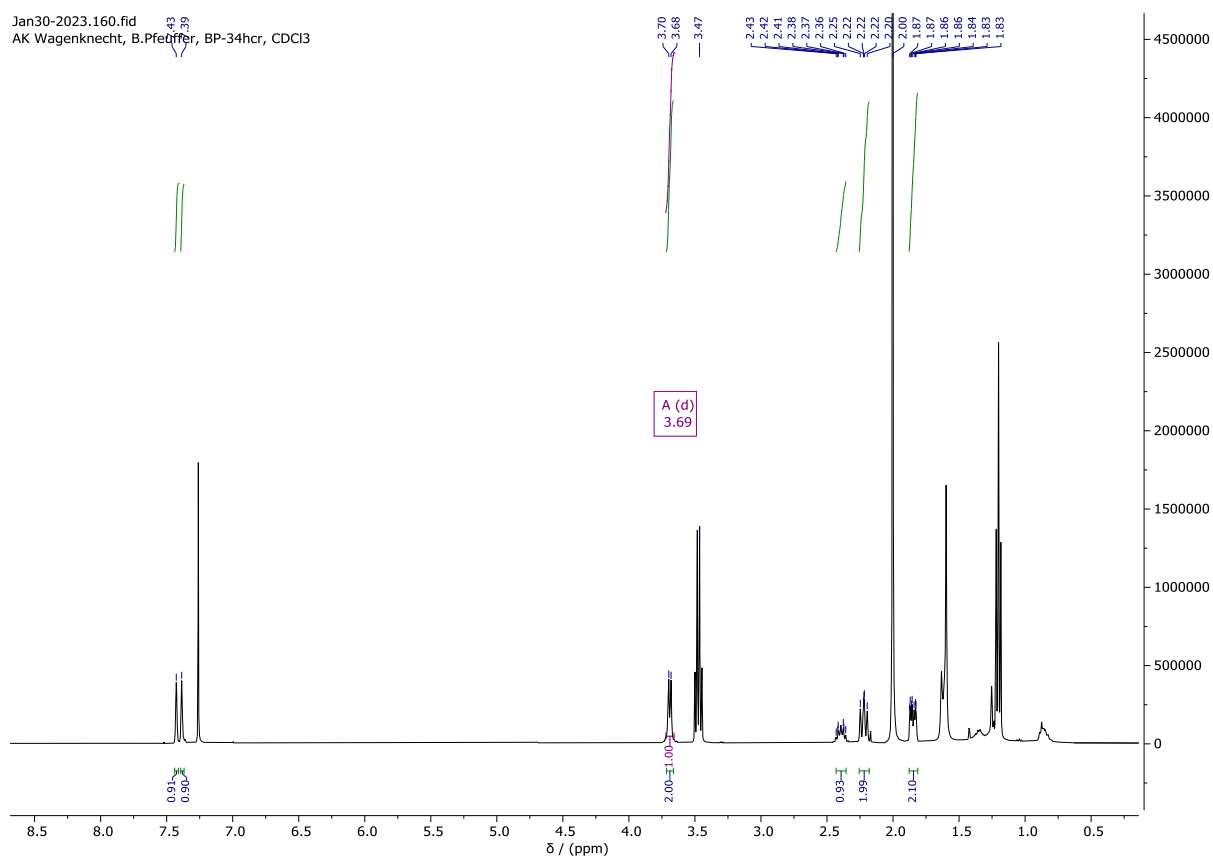


Abbildung 99 - ¹H-NMR Spektrum von **7** (400 MHz, CDCl₃).

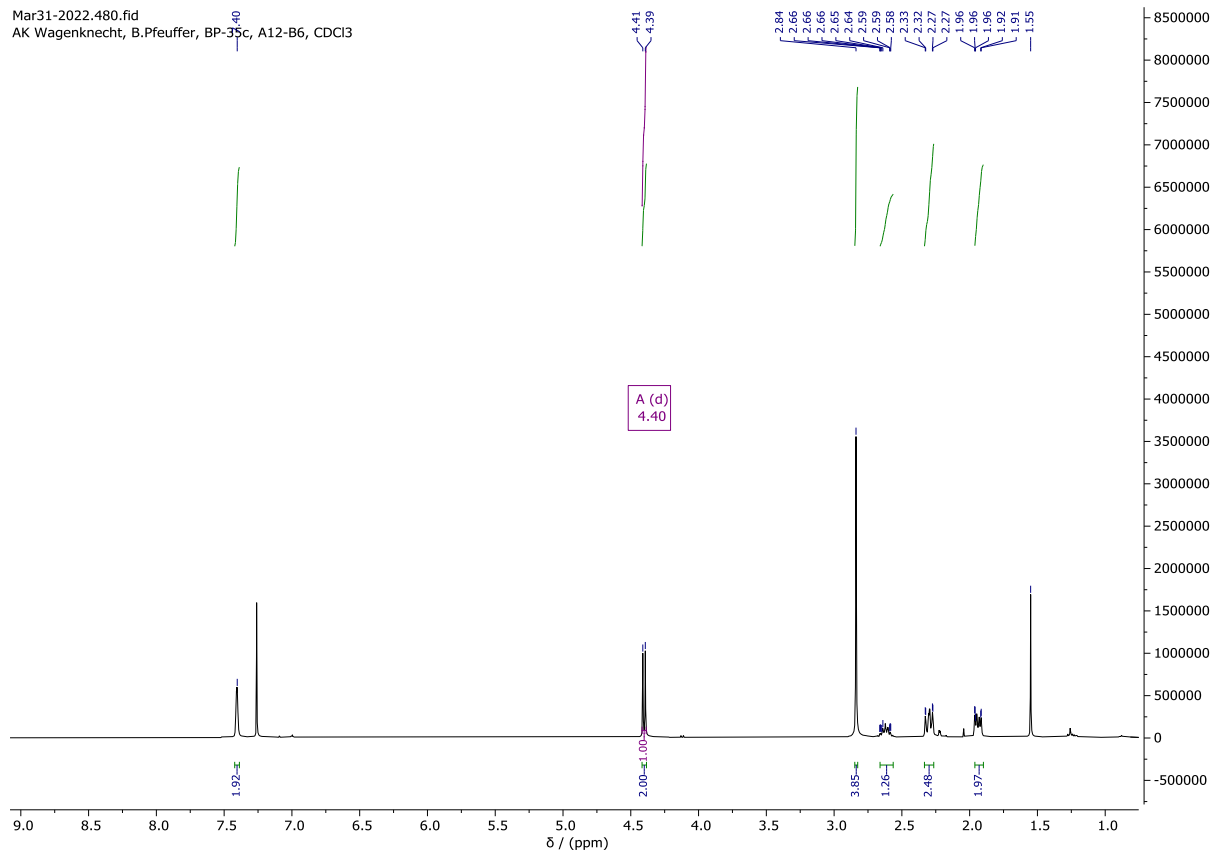


Abbildung 100 - ¹H-NMR Spektrum von **8** (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

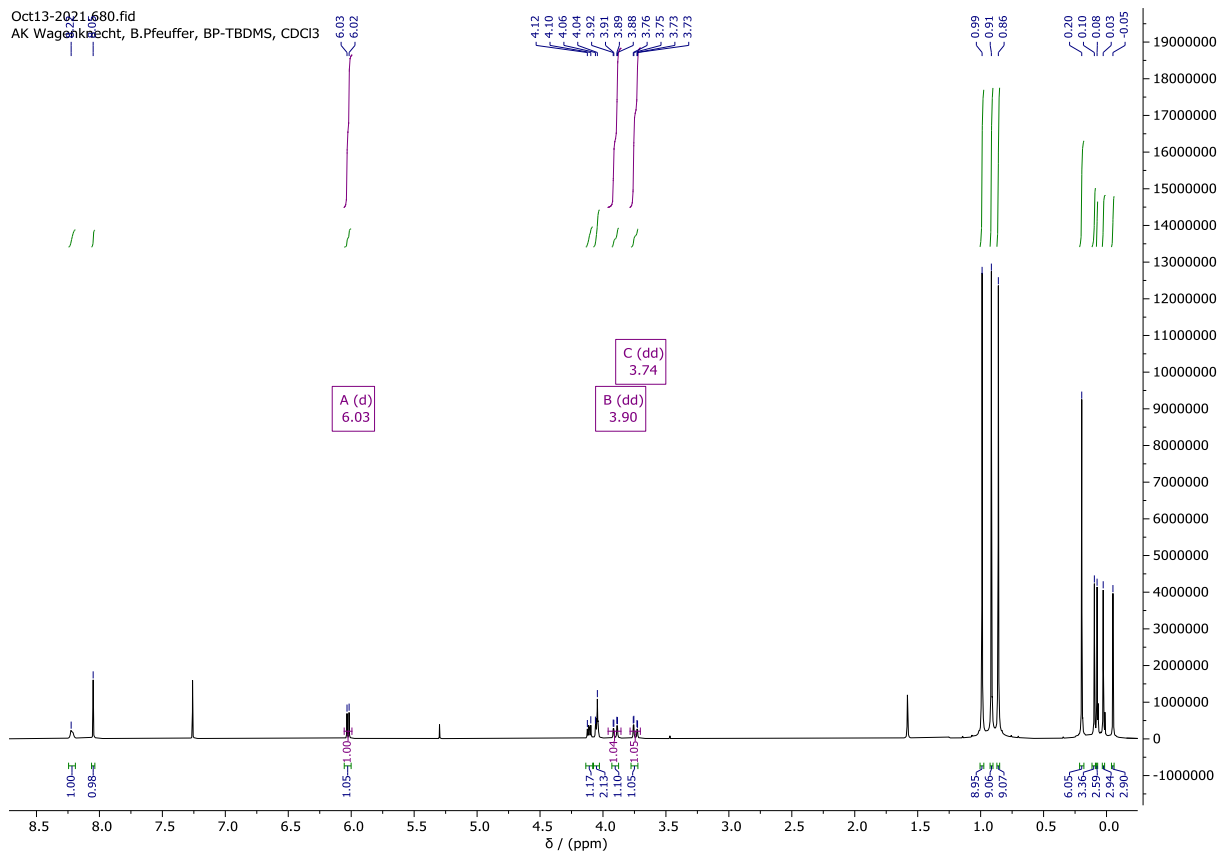


Abbildung 101 - ¹H-NMR Spektrum von **10** (400 MHz, CDCl₃).

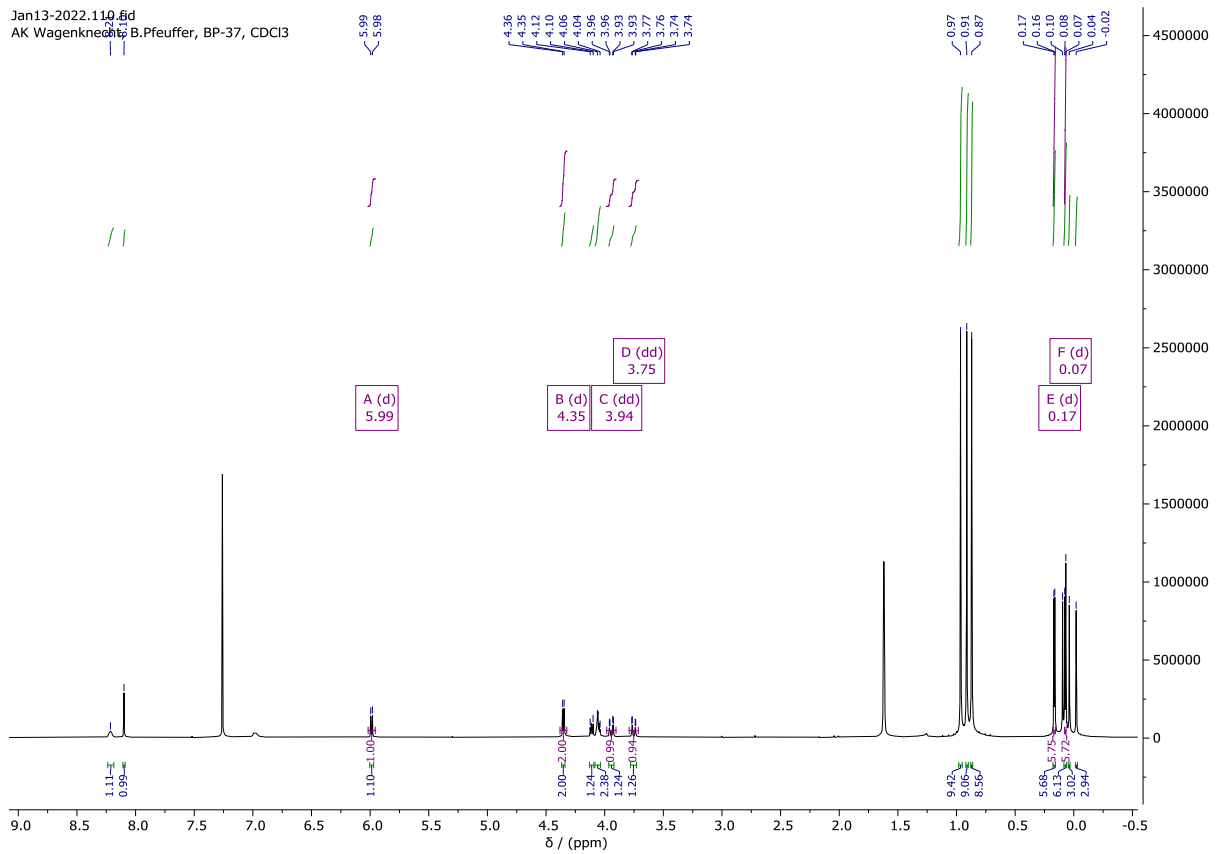


Abbildung 102 - ¹H-NMR Spektrum von **14** (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

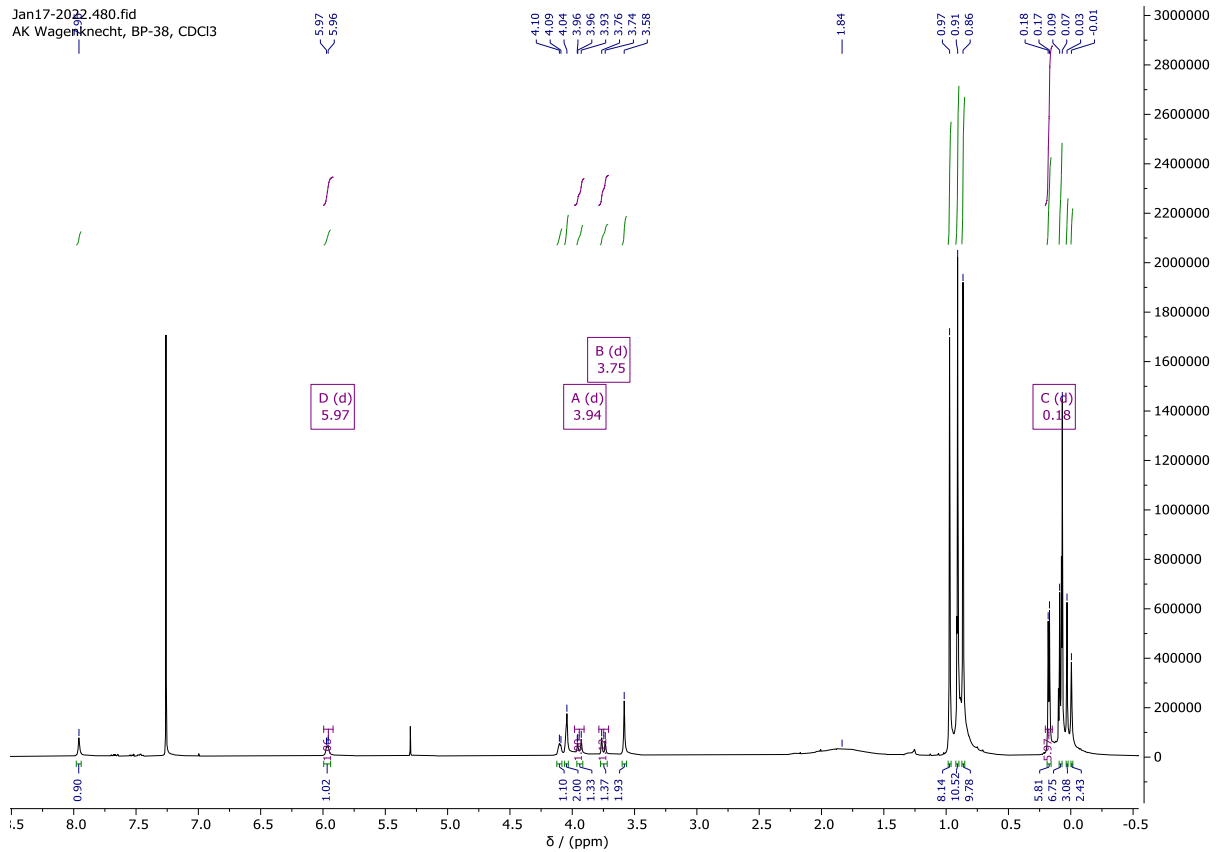


Abbildung 103 - ¹H-NMR Spektrum von **16** (400 MHz, CDCl₃).

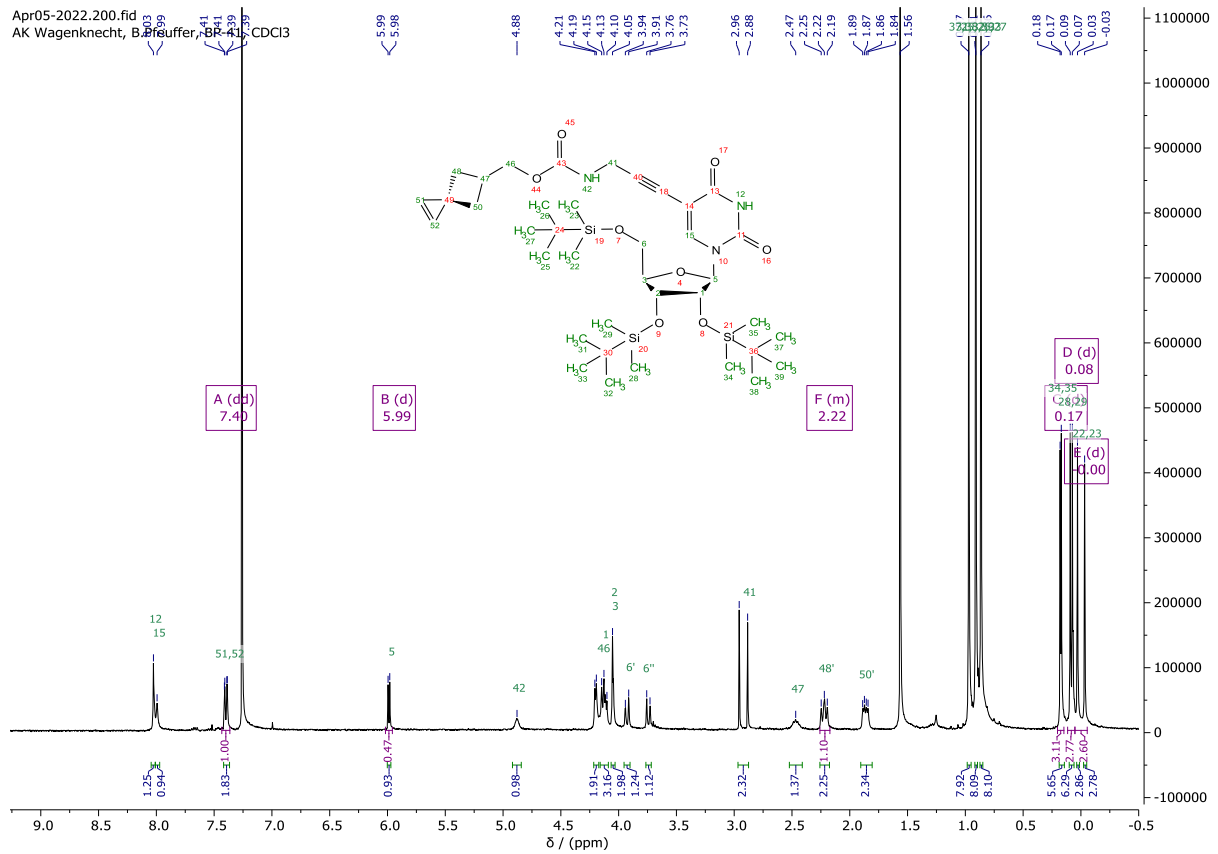


Abbildung 104 - ¹H-NMR Spektrum von **18** (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

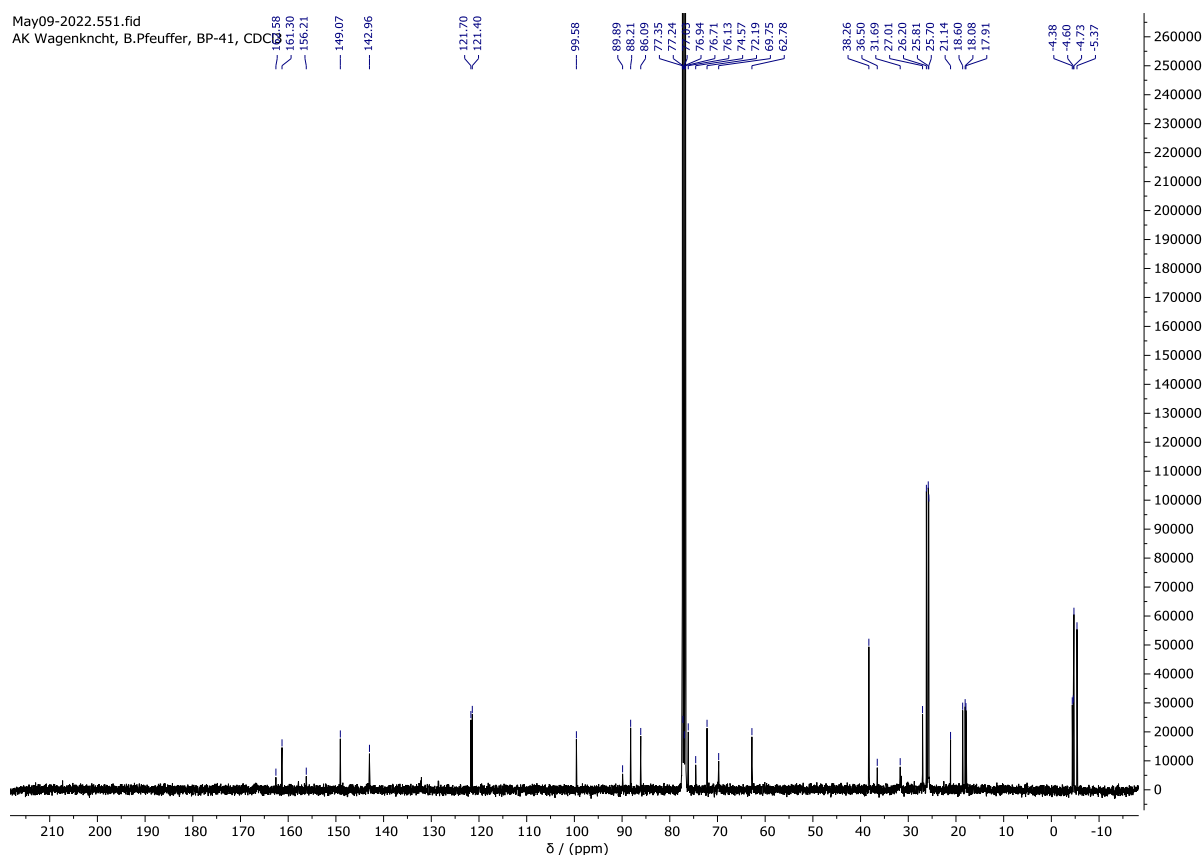


Abbildung 106 – ¹³C-NMR Spektrum von **18** (400 MHz, CDCl₃).

BP-41.1 #1-20 RT: 0.02-0.36 AV: 20 NL: 2.17E7
T: FTMS + p ESI Full ms [650.0000-950.0000]

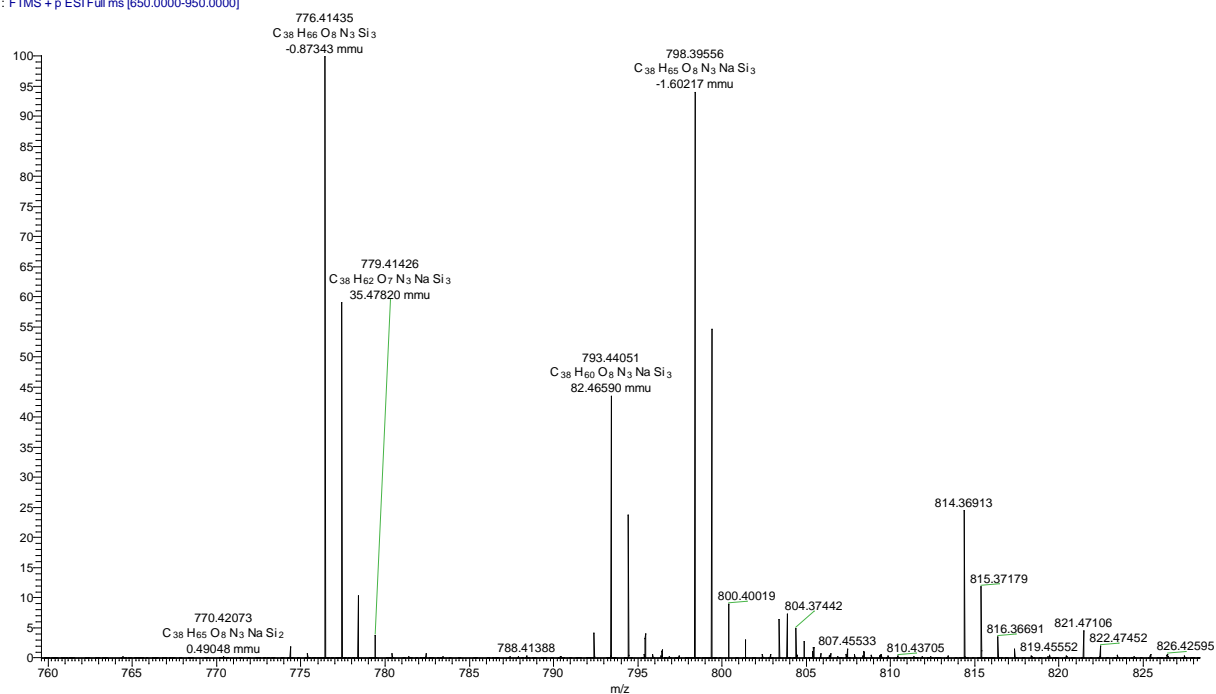


Abbildung 105 – ESI HRMS Spektrum von **18**.

Anhang

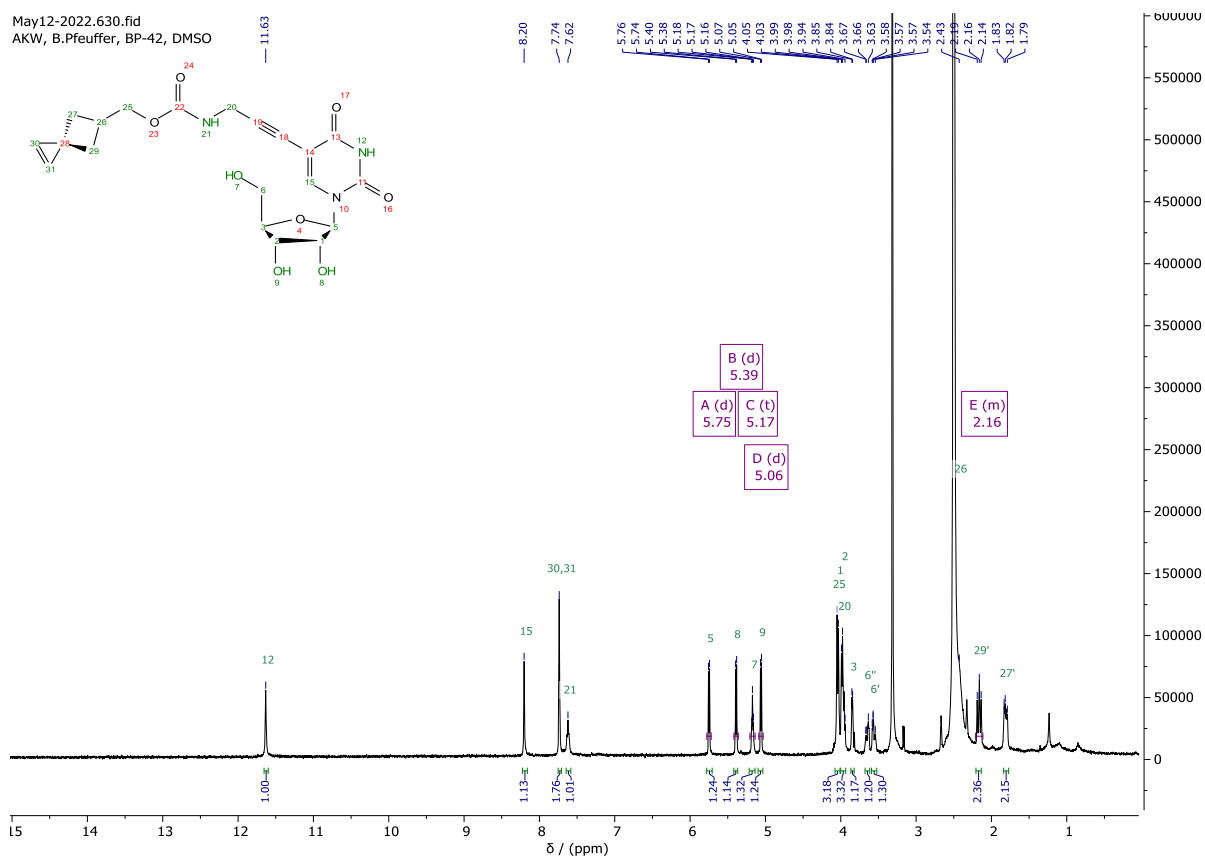


Abbildung 107 - ^1H -NMR Spektrum von I (400 MHz, DMSO-d_6).

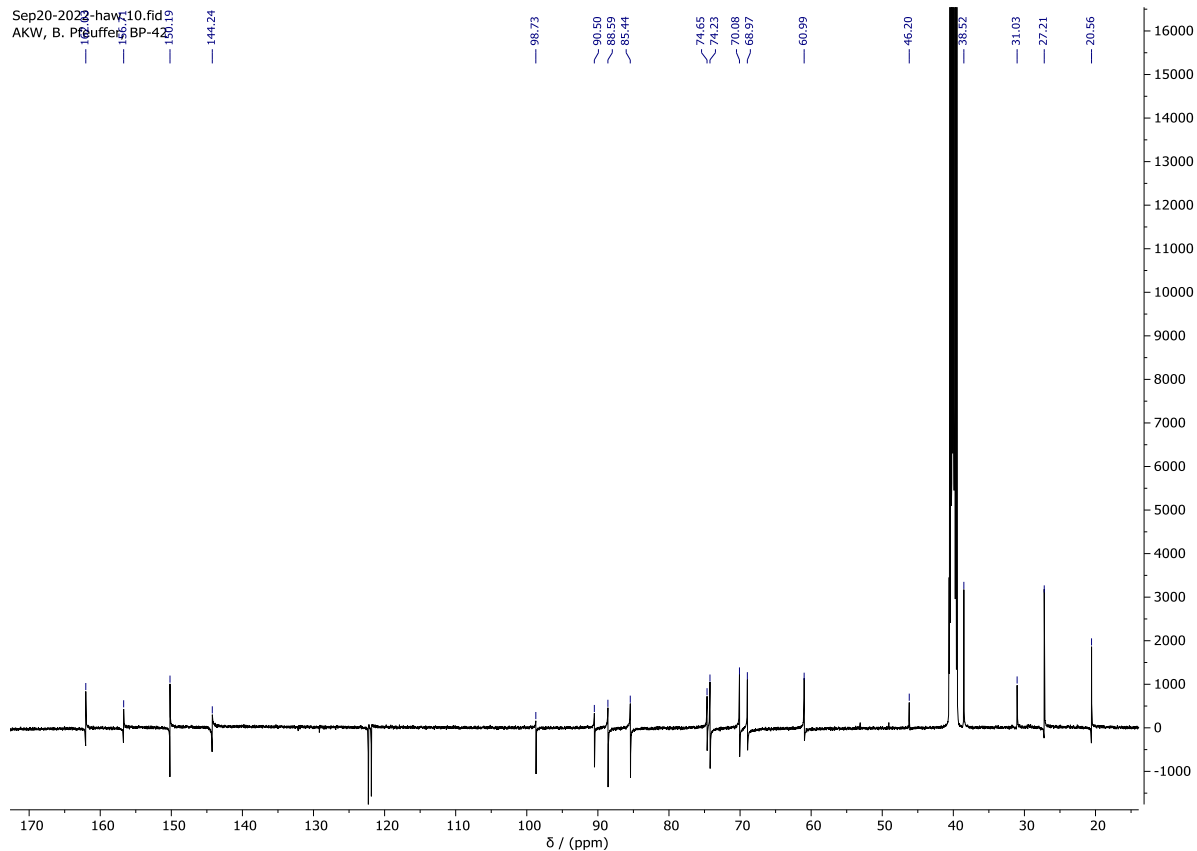


Abbildung 108 - ^{13}C -NMR Spektrum von I (400 MHz, DMSO-d_6).

Anhang

BP-42 #1-20 RT: 0.02-0.36 AV: 20 NL: 3.48E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]

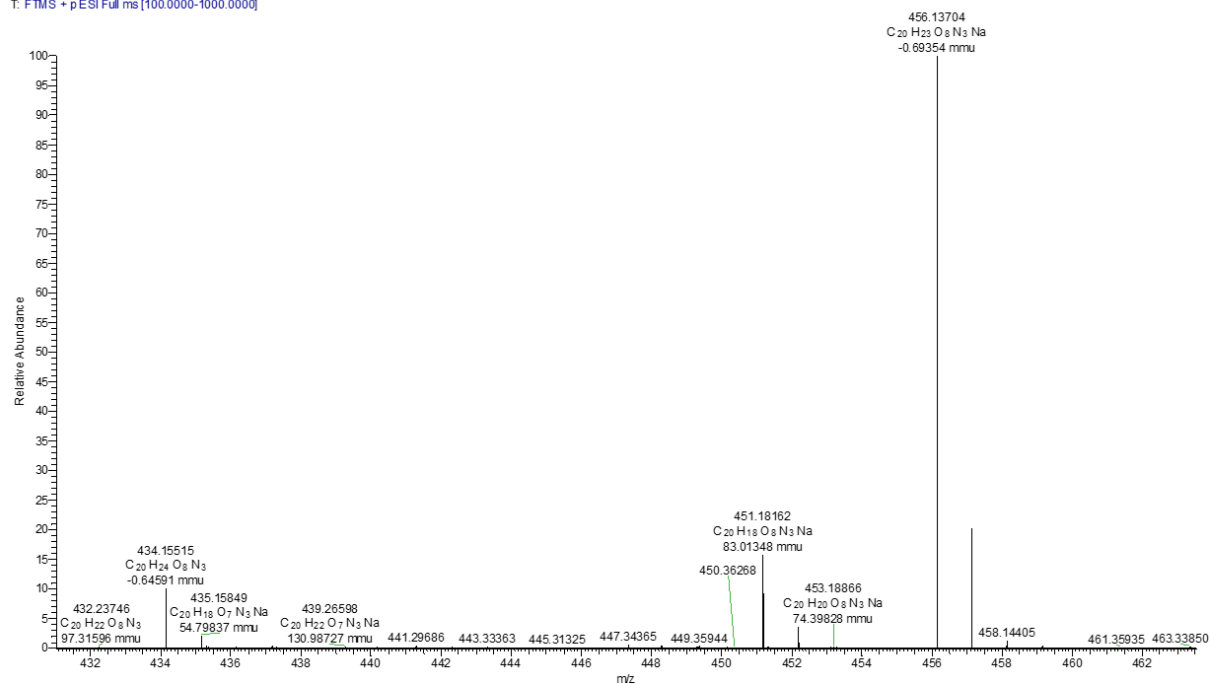


Abbildung 109 – ESI HRMS Spektrum von 15.

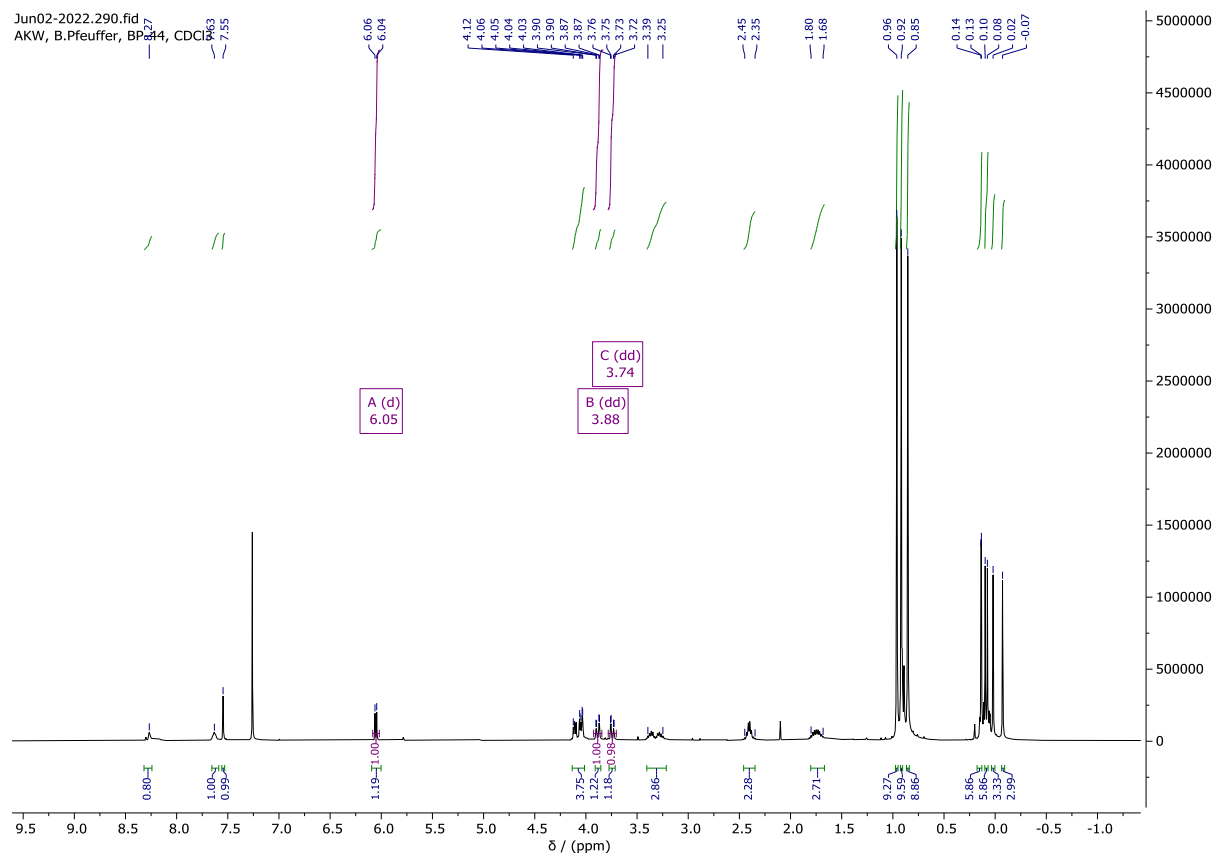


Abbildung 110 - ¹H-NMR Spektrum von 15 (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

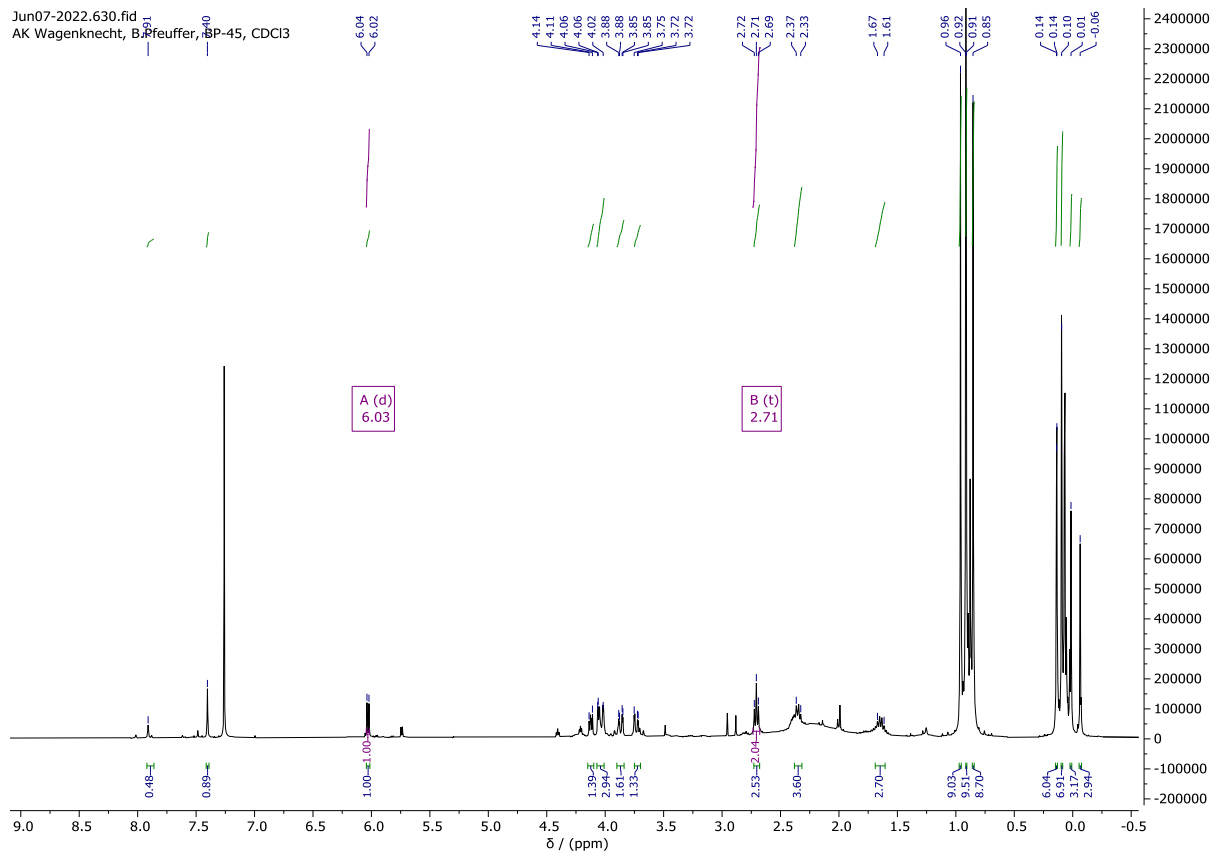


Abbildung 111 - ¹H-NMR Spektrum von **17** (400 MHz, CDCl₃).

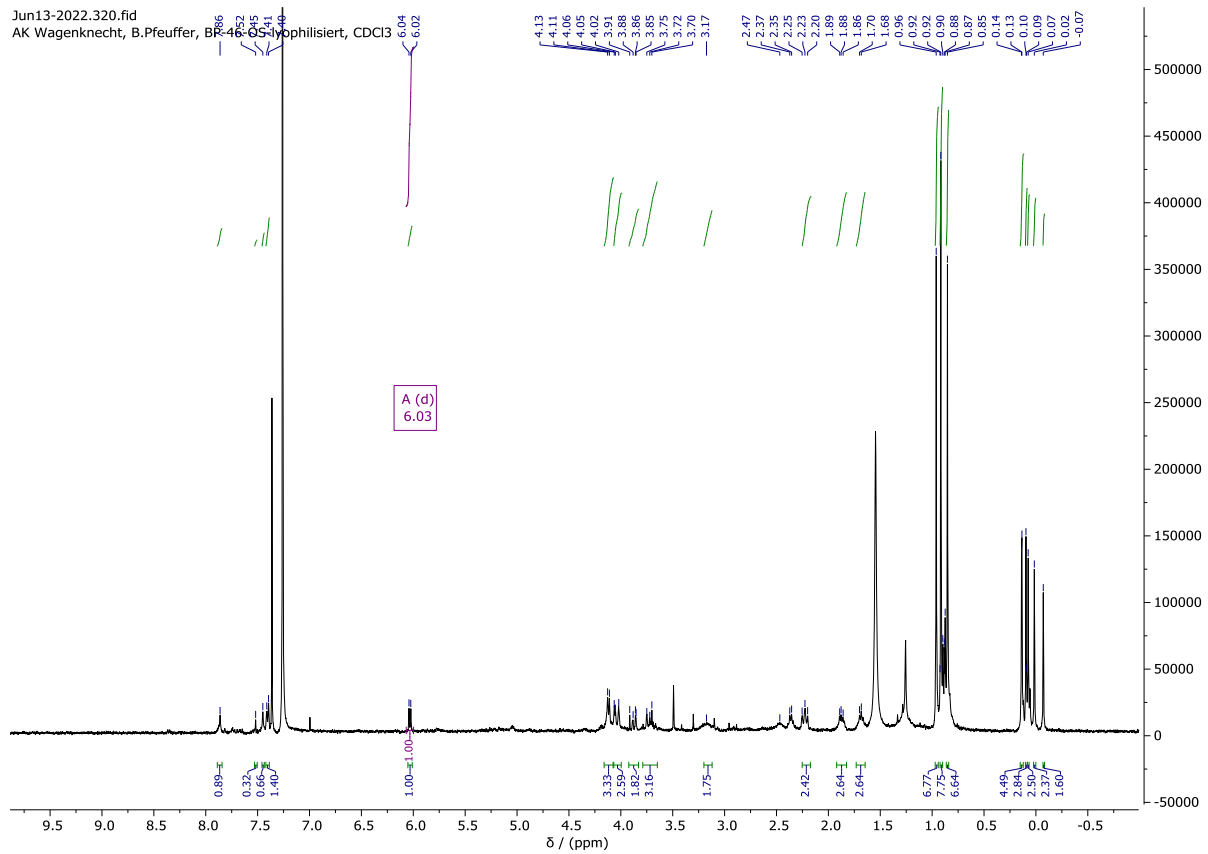


Abbildung 112 - ¹H-NMR Spektrum von **19** (400 MHz, CDCl₃).

Anhang

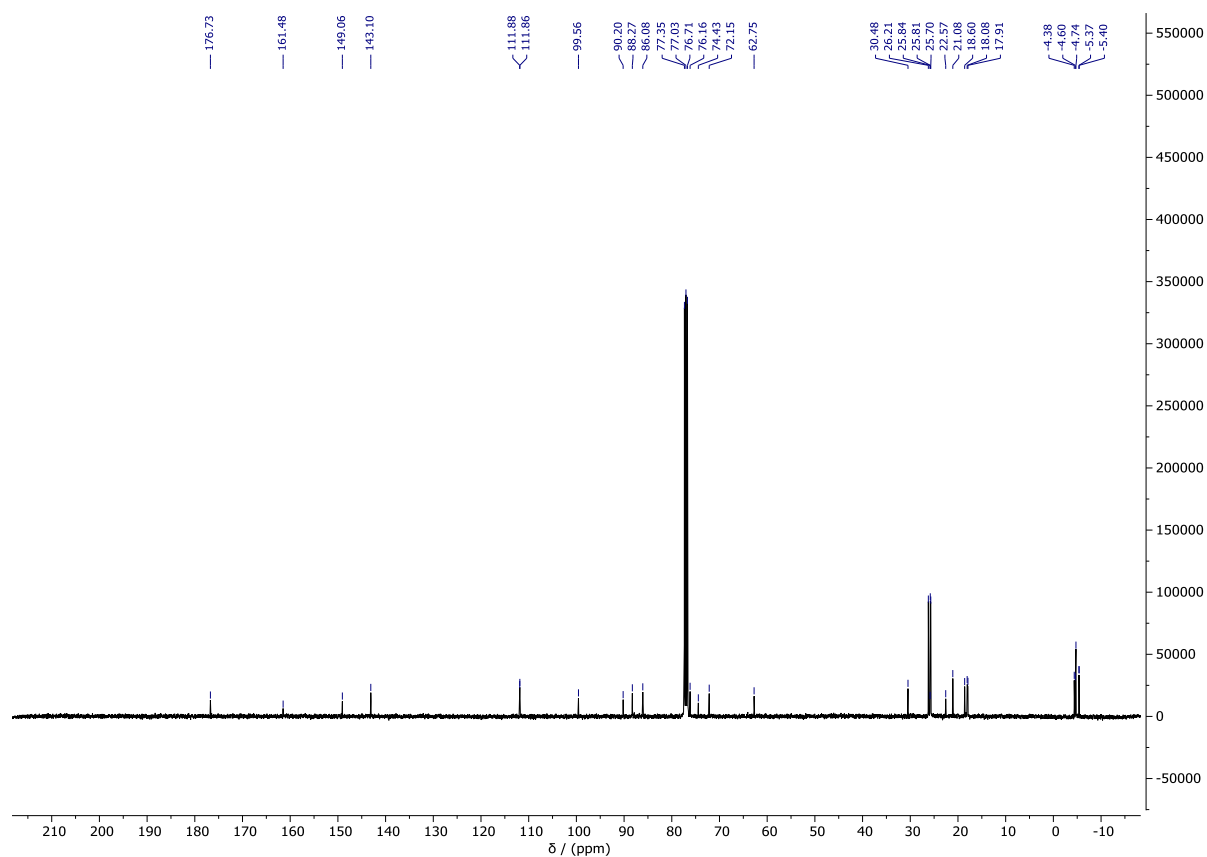


Abbildung 113 - ^{13}C -NMR Spektrum von **19** (400 MHz, CDCl_3).

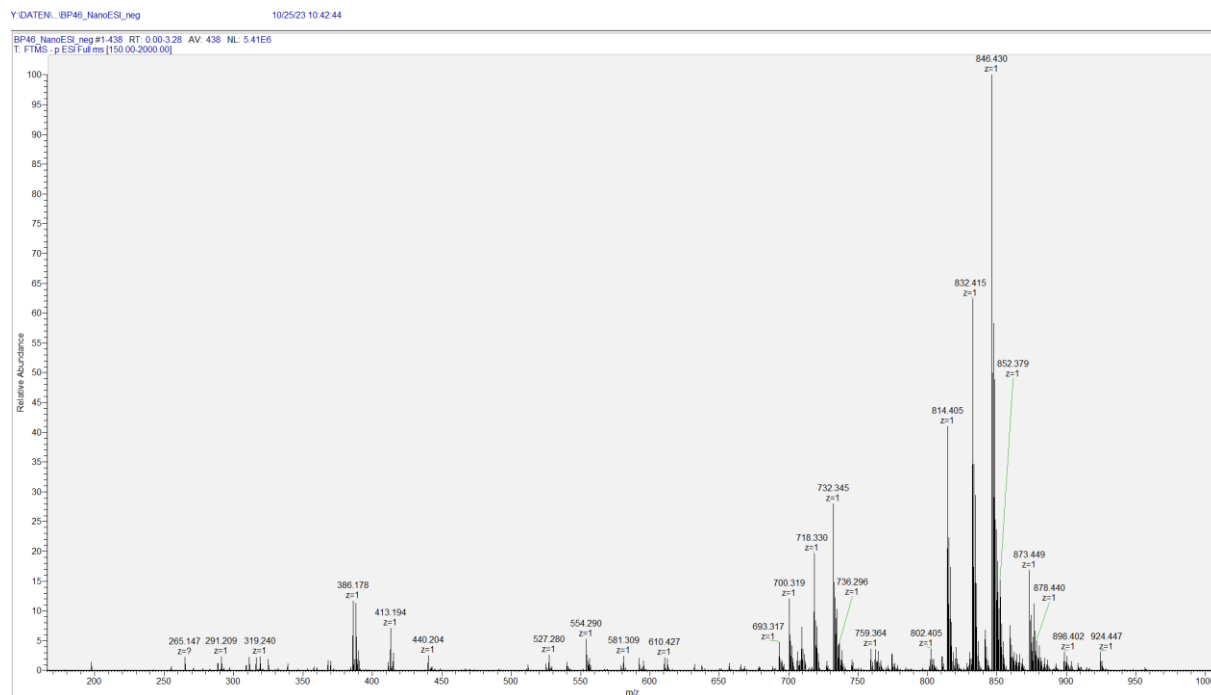
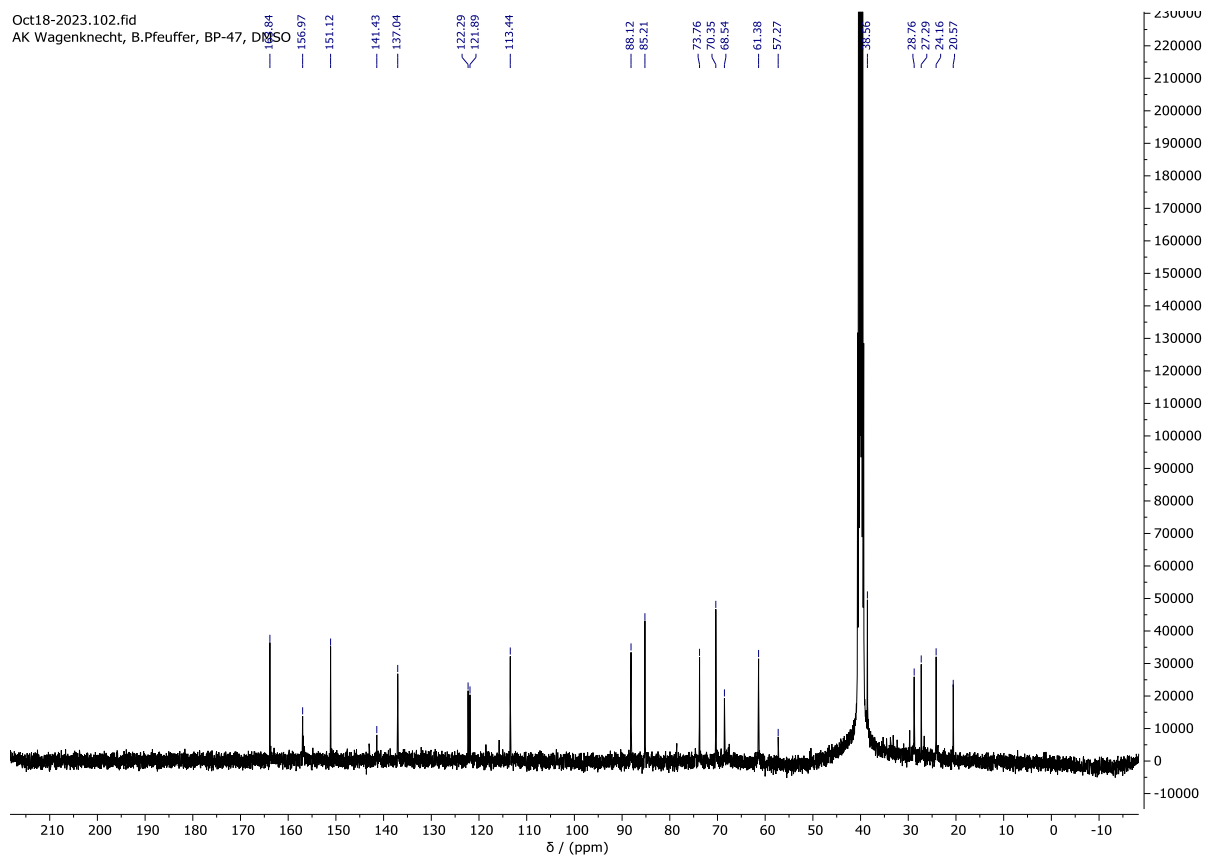
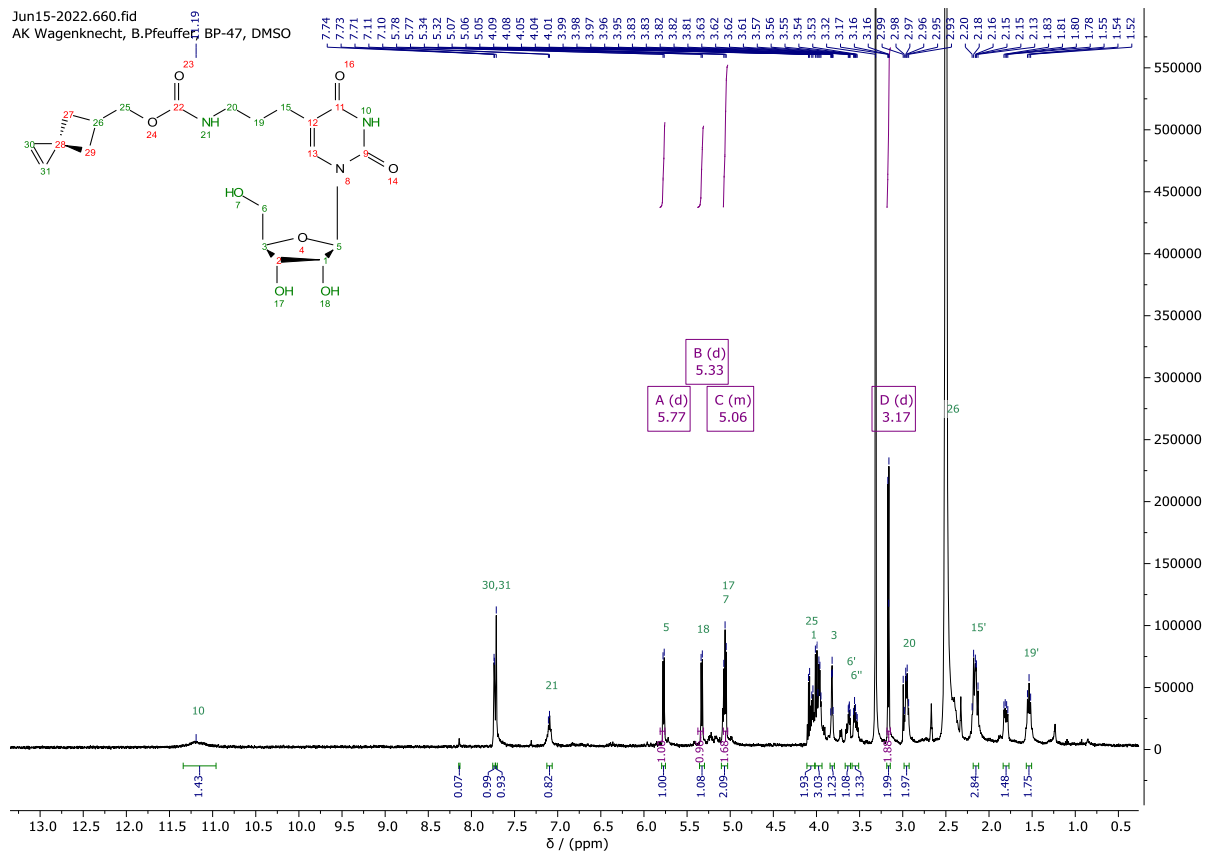


Abbildung 114 – ESI HRMS Spektrum von **19**.

Anhang



Anhang

BP-47 #1-20 RT: 0.02-0.36 AV: 20 NL: 5.20E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-600.0000]

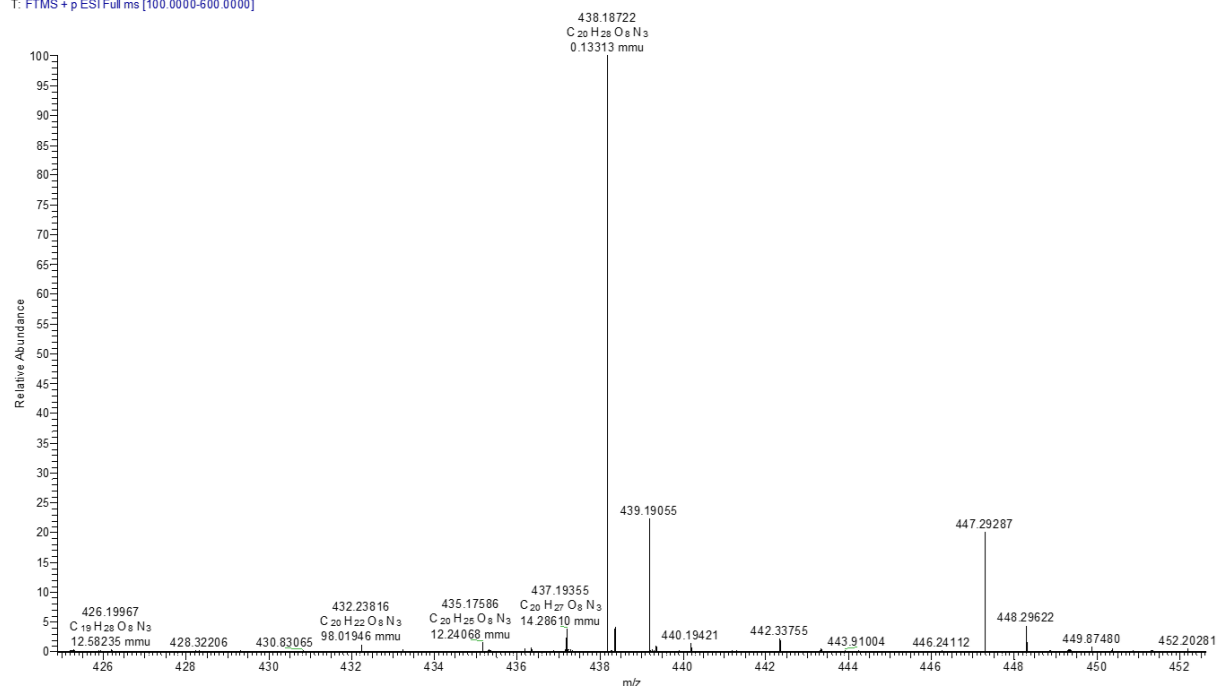


Abbildung 117 – ESI HRMS Spektrum von II.

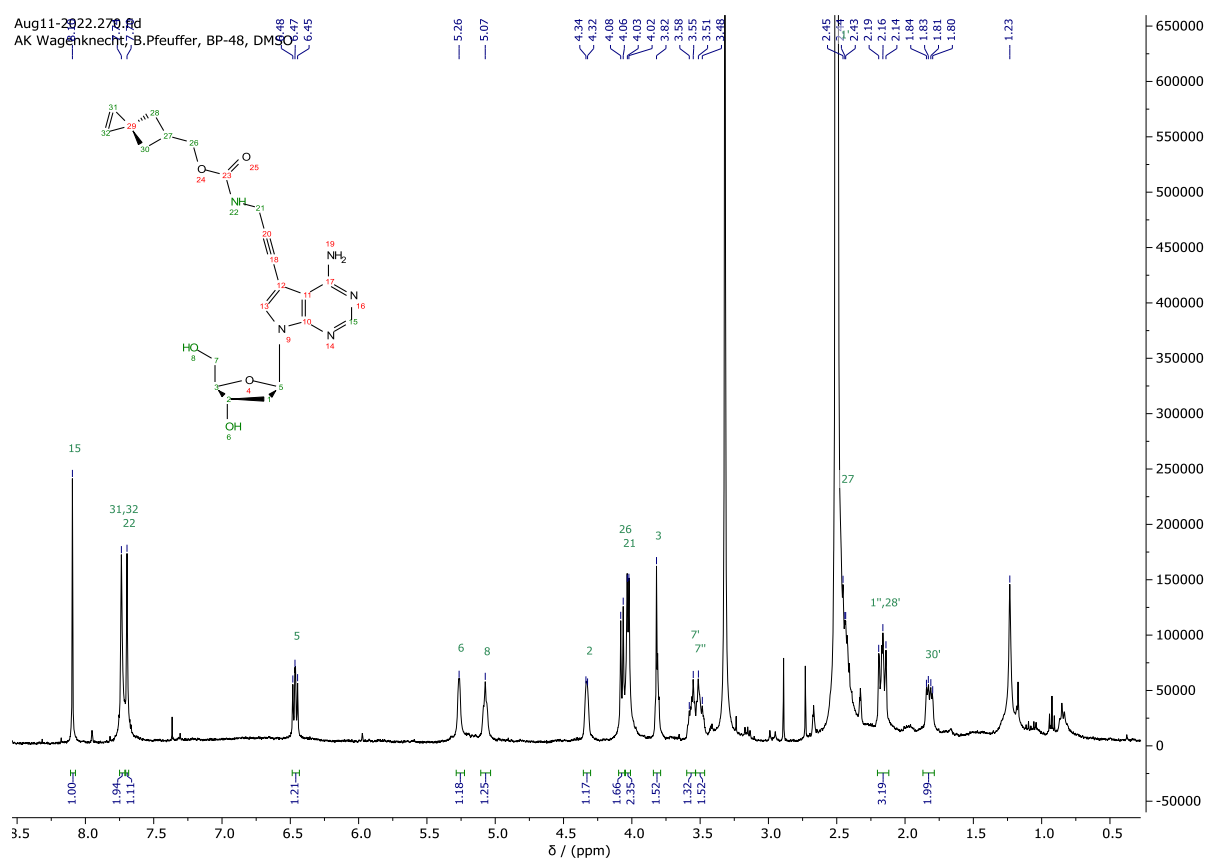


Abbildung 118 - ¹H-NMR Spektrum von III (400 MHz, DMSO-d₆).

Anhang

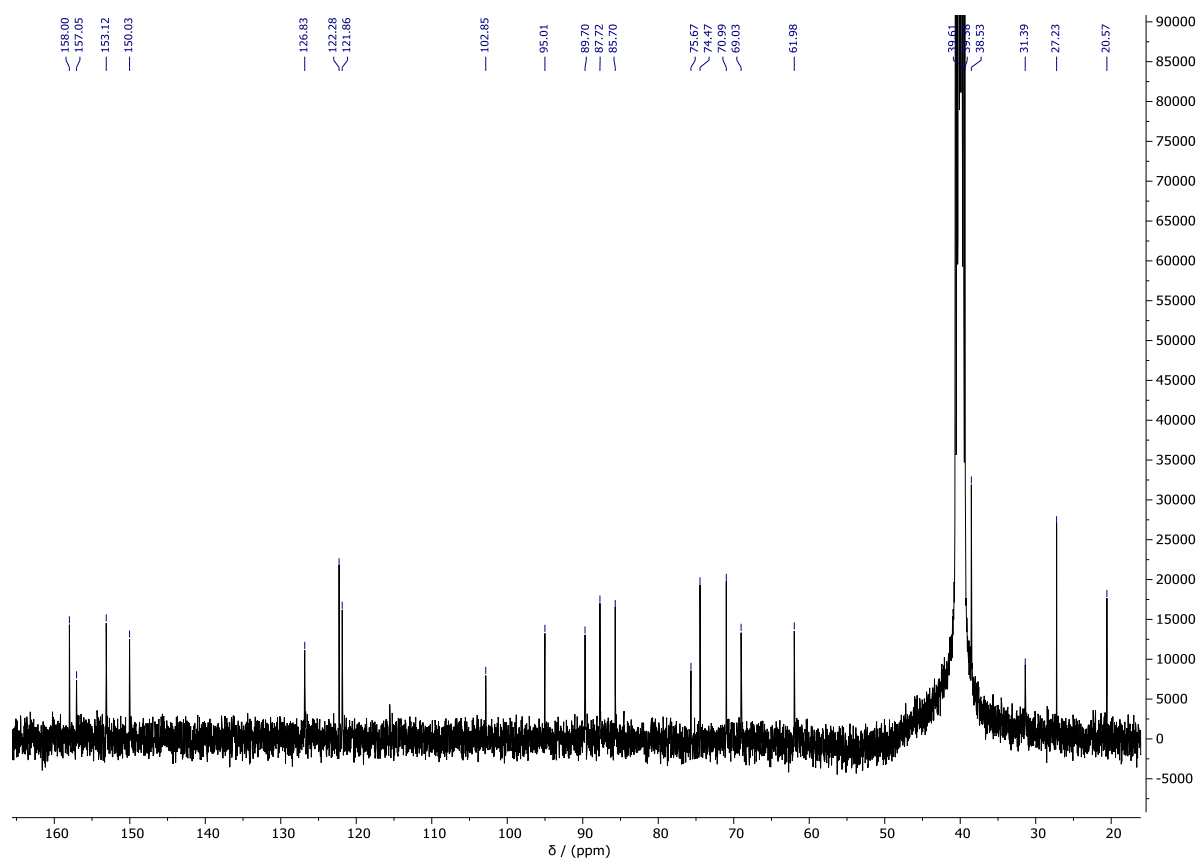


Abbildung 119 - ^{13}C -NMR Spektrum von III (400 MHz, DMSO-d_6).

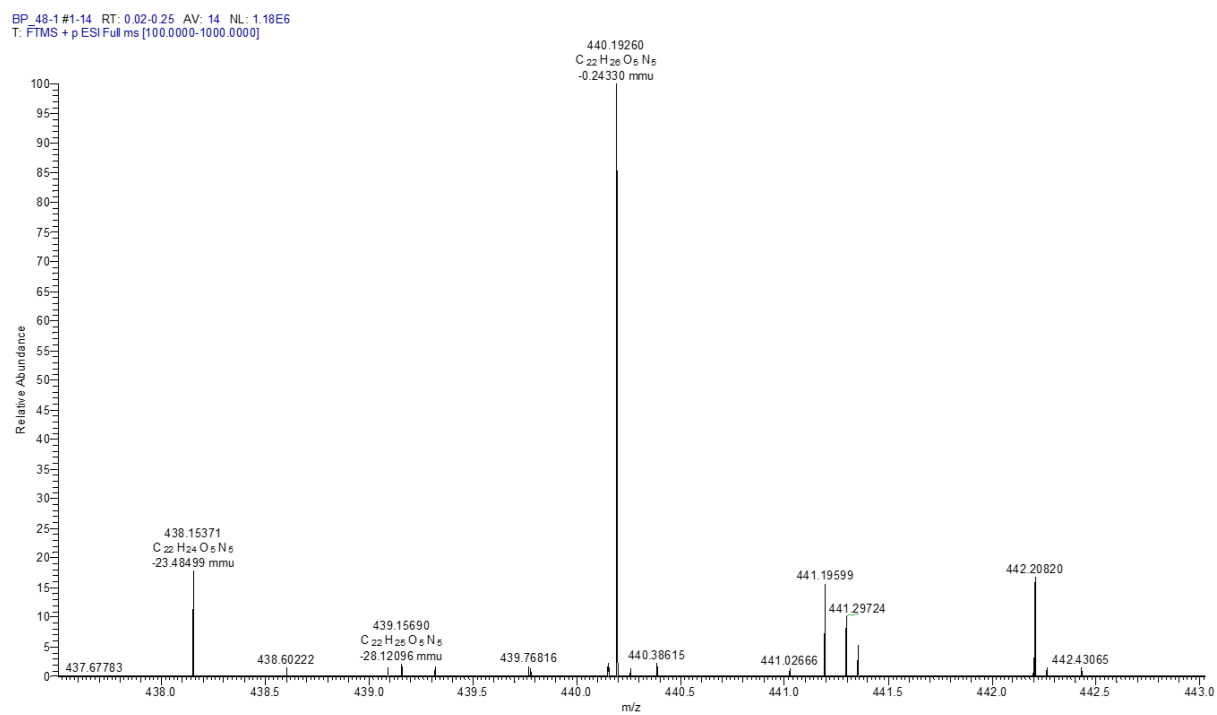


Abbildung 120 – ESI HRMS Spektrum von III.

Anhang

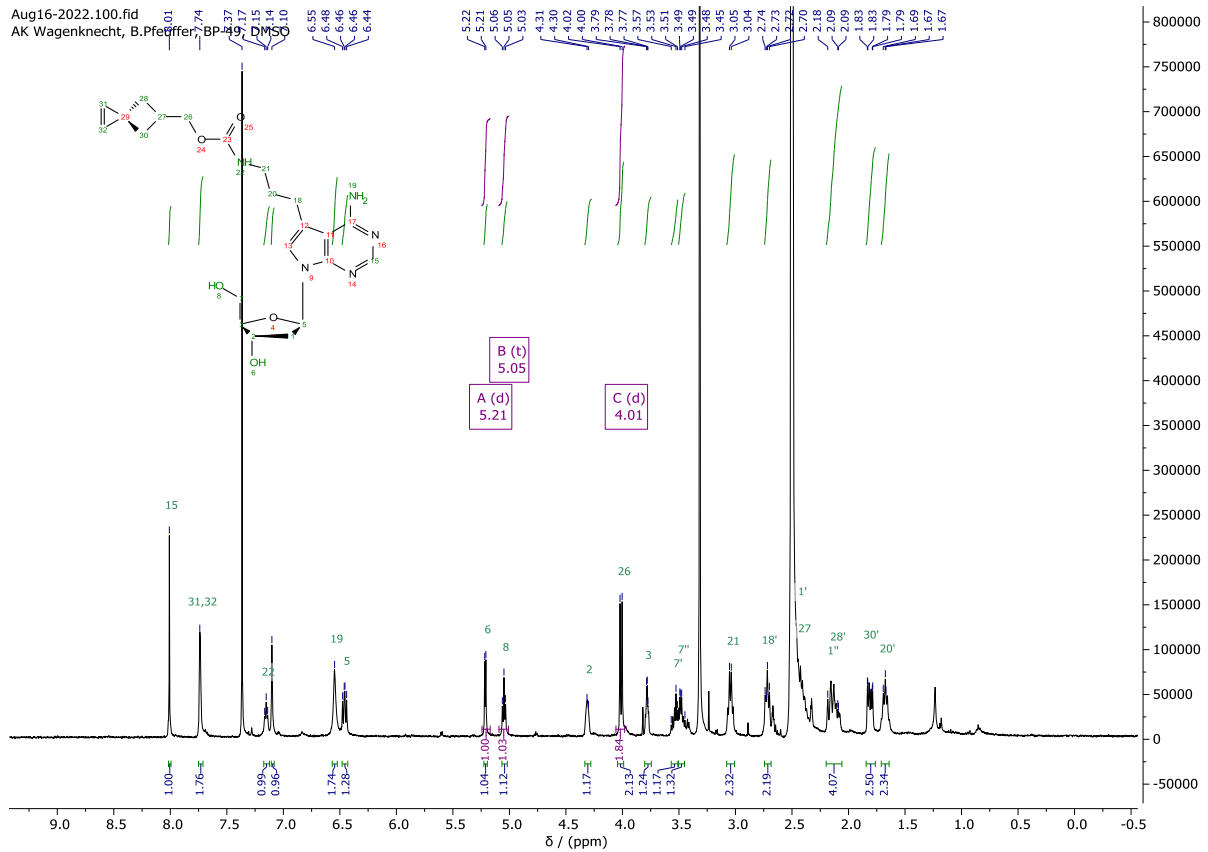


Abbildung 121 - ^1H -NMR Spektrum von IV (400 MHz, DMSO-d_6).

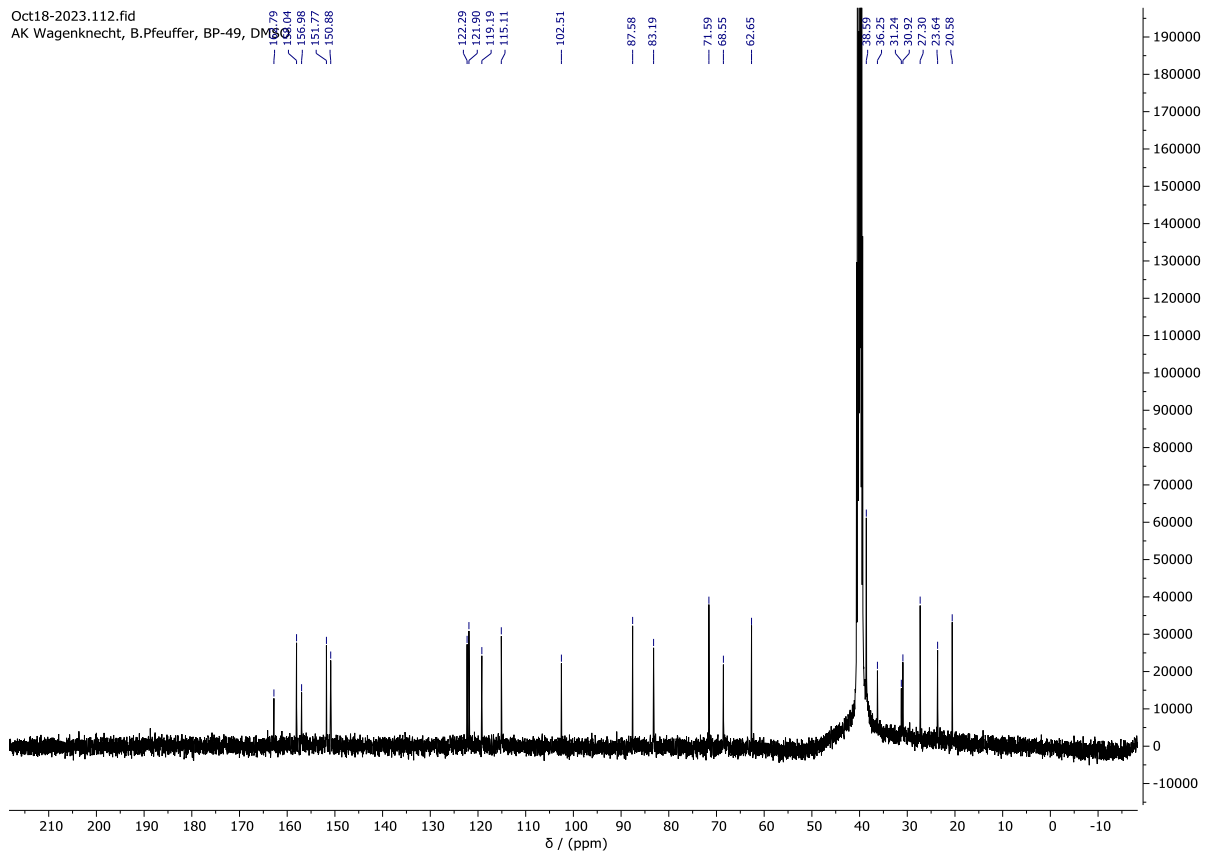


Abbildung 122 - ^{13}C -NMR Spektrum von IV (400 MHz, DMSO-d_6).

Anhang

BP 49-1 #1-46 RT: 0.02-0.89 AV: 46 NL: 9.44E4
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0000]

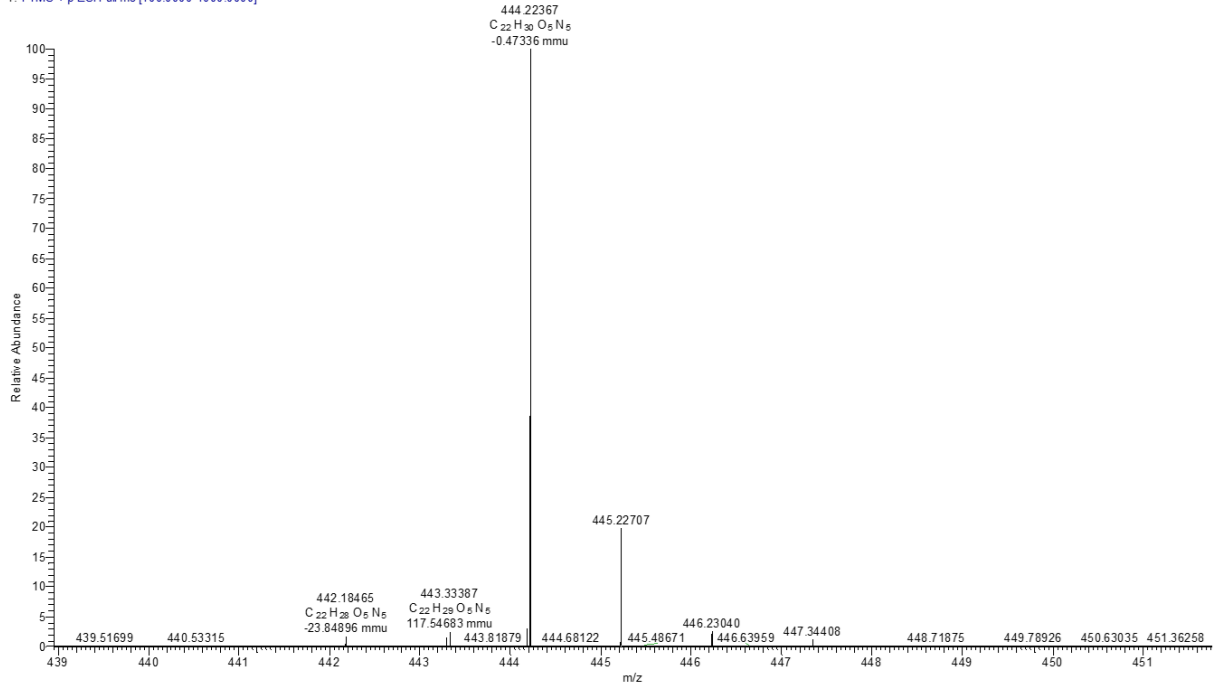


Abbildung 123 – ESI HRMS Spektrum von IV.

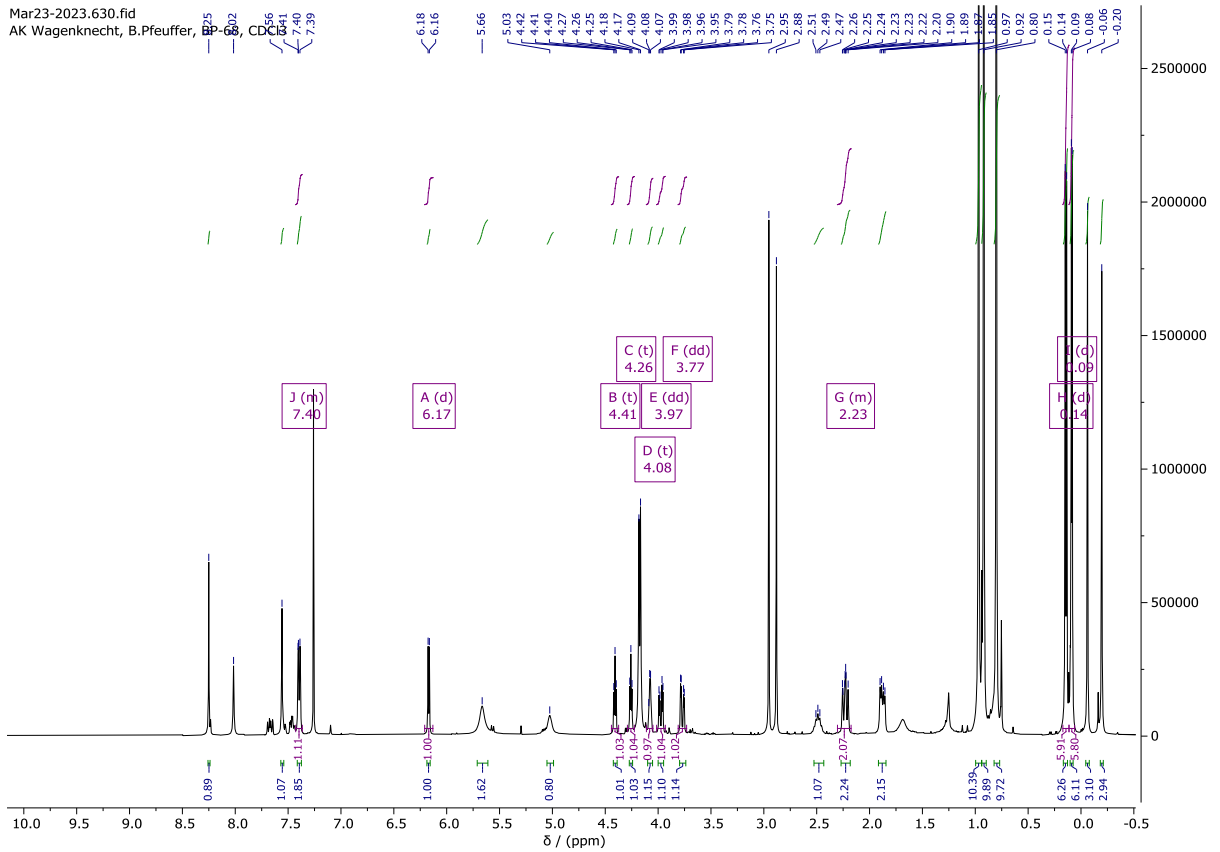


Abbildung 124 - 1H -NMR Spektrum von 30 (400 MHz, $CDCl_3$).

Anhang

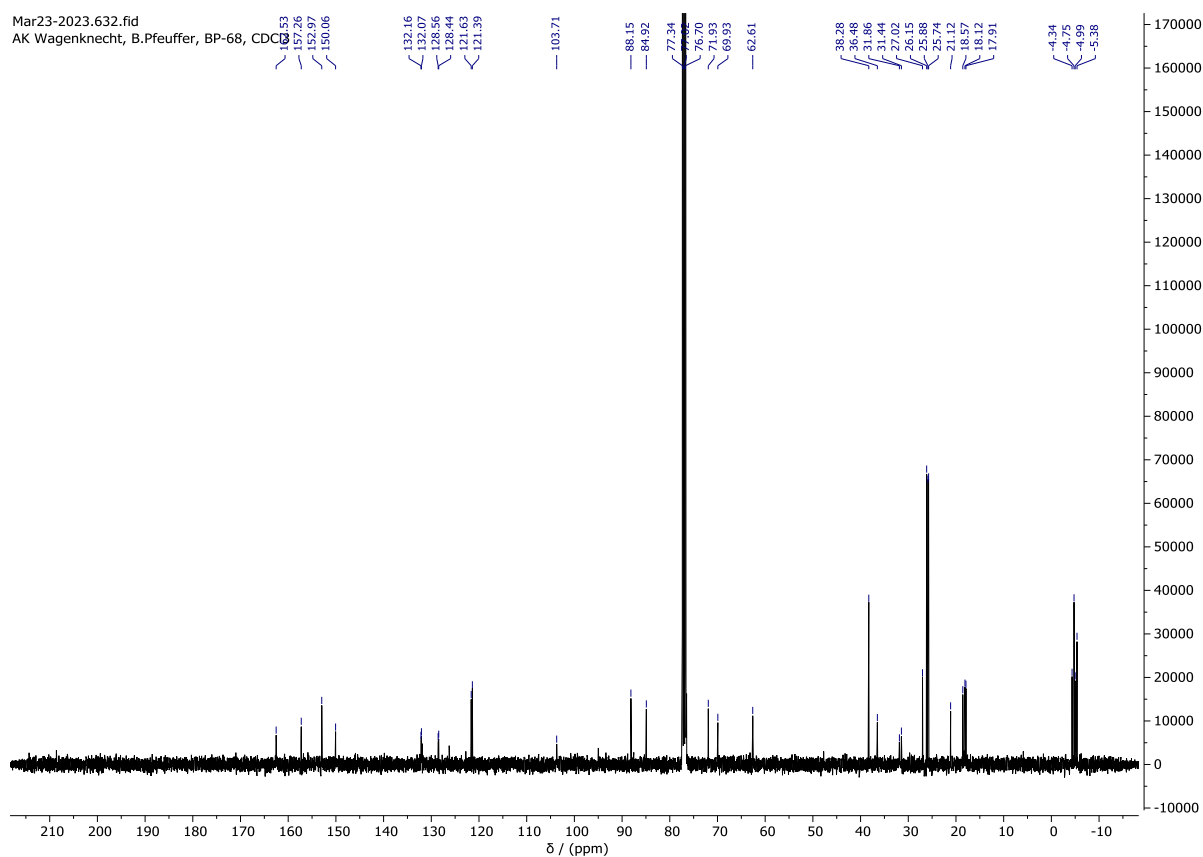


Abbildung 125 - ^{13}C -NMR Spektrum von **30** (400 MHz, CDCl_3).

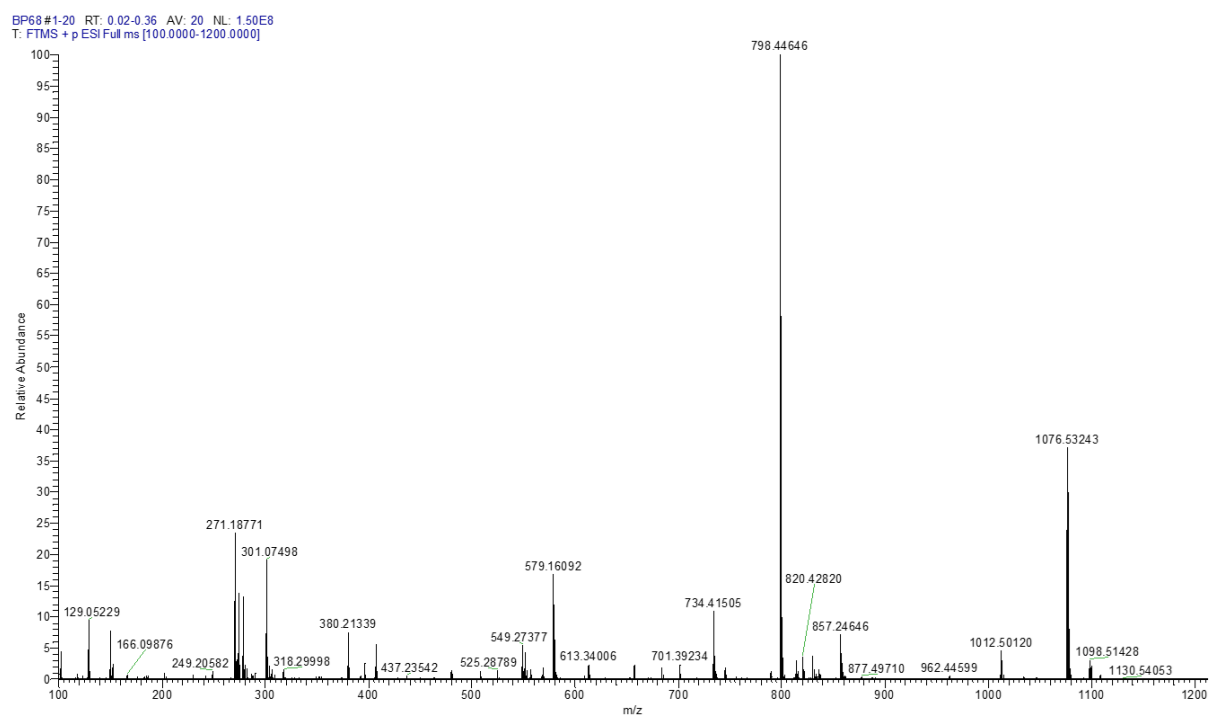


Abbildung 126 – ESI HRMS Spektrum von **30**.

Anhang

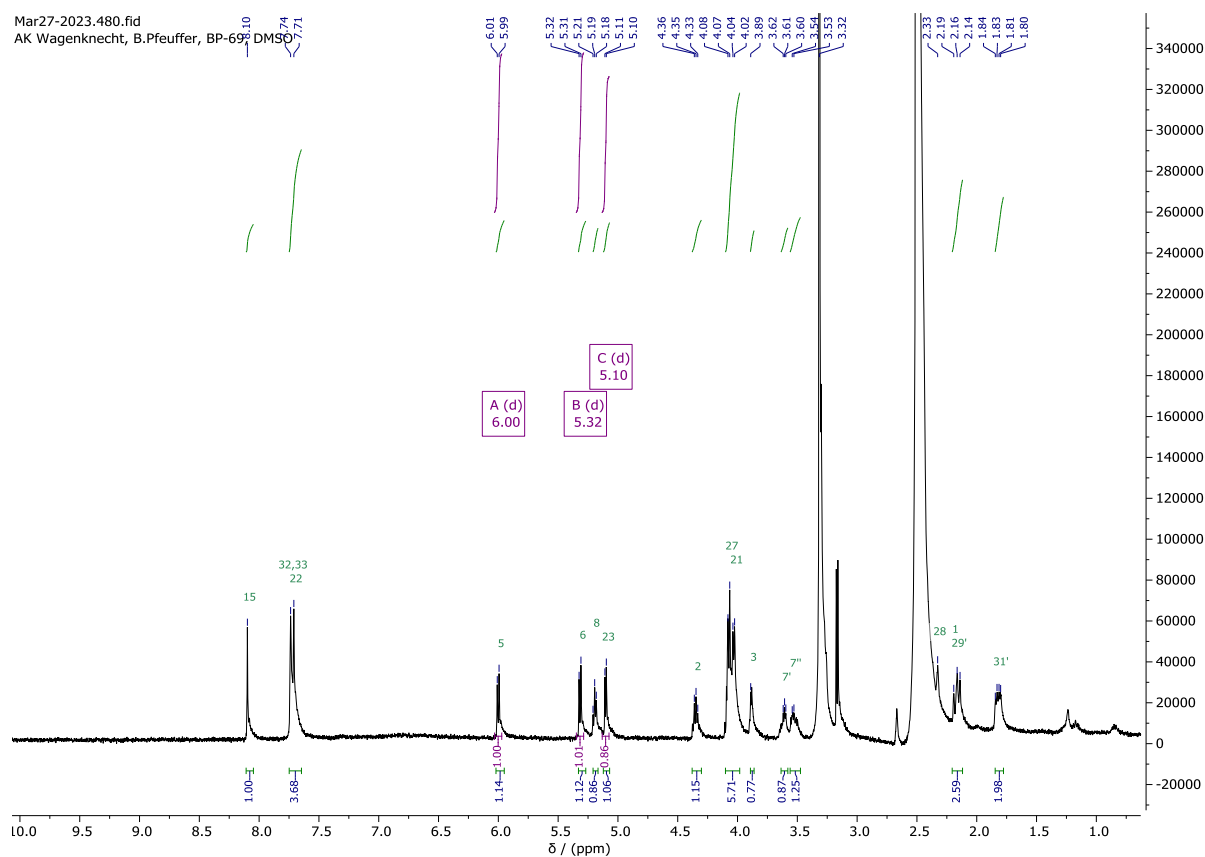


Abbildung 127 - ^1H -NMR Spektrum von **V** (400 MHz, DMSO-d_6).

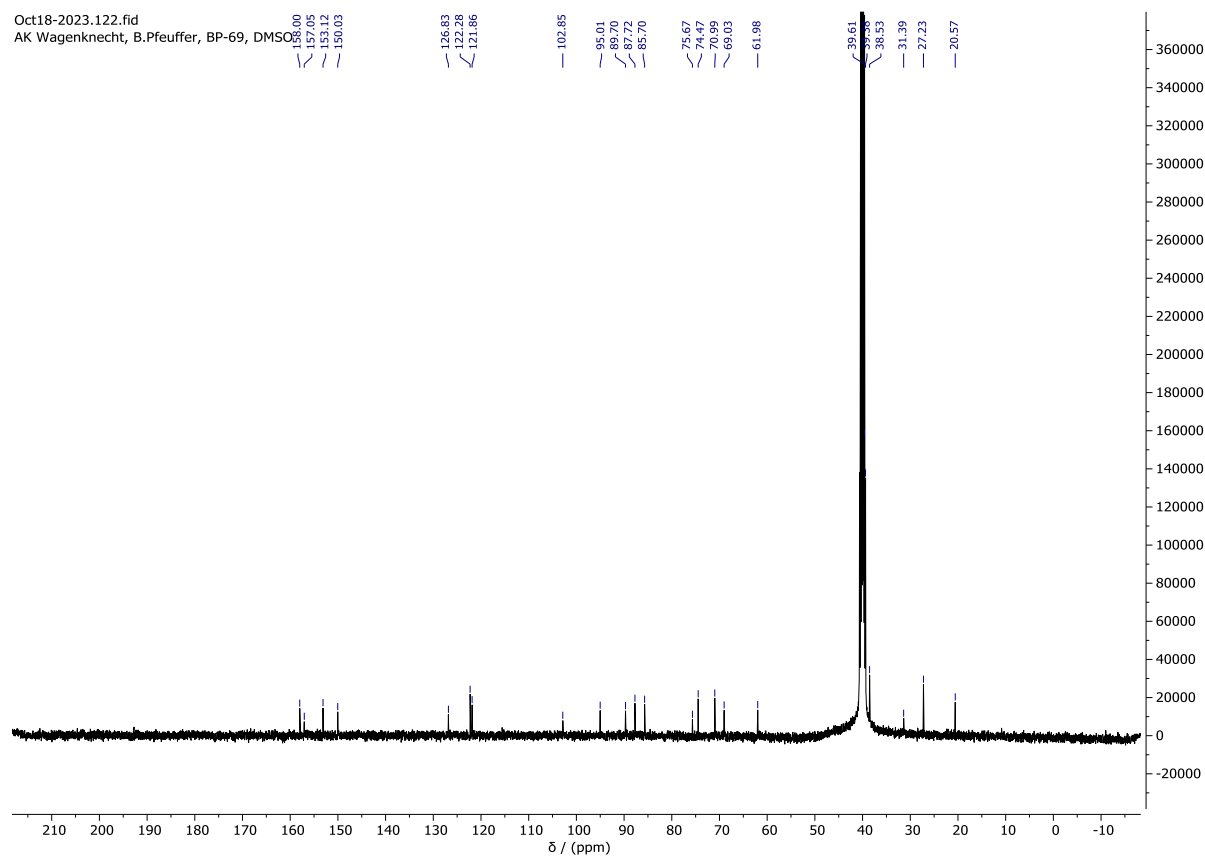


Abbildung 128 - ^{13}C -NMR Spektrum von **V** (400 MHz, DMSO-d_6).

Anhang

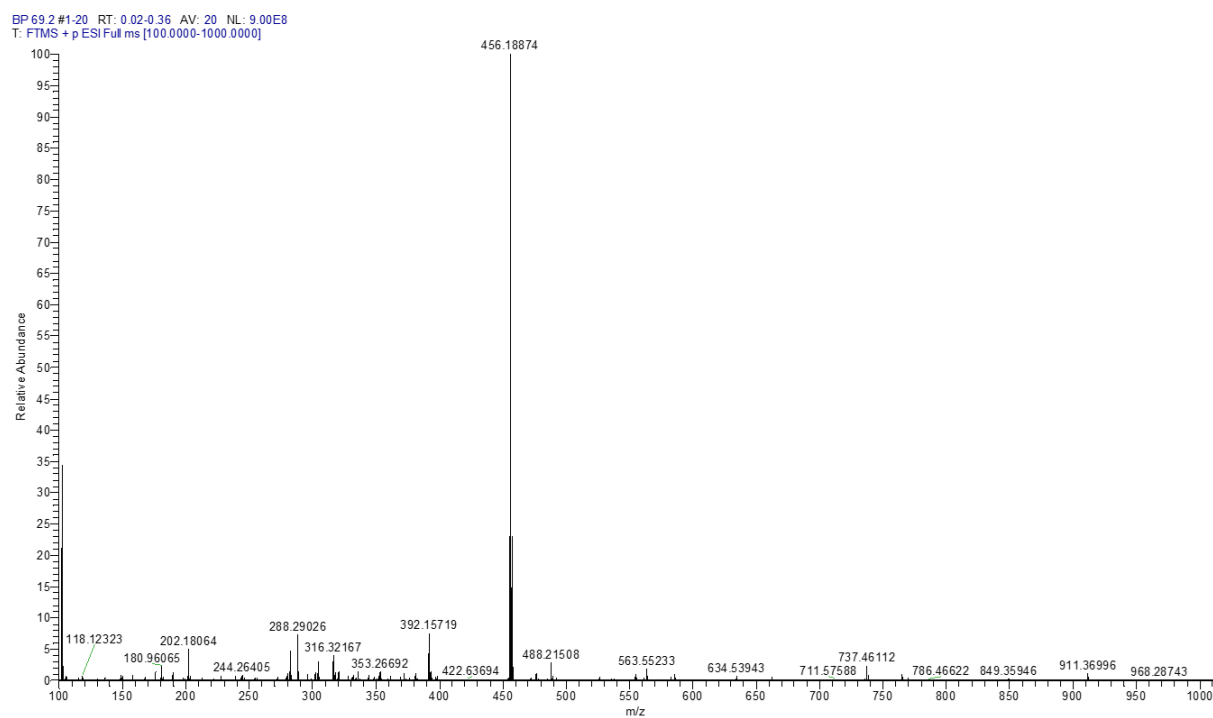


Abbildung 129 – ESI HRMS Spektrum von **V**.

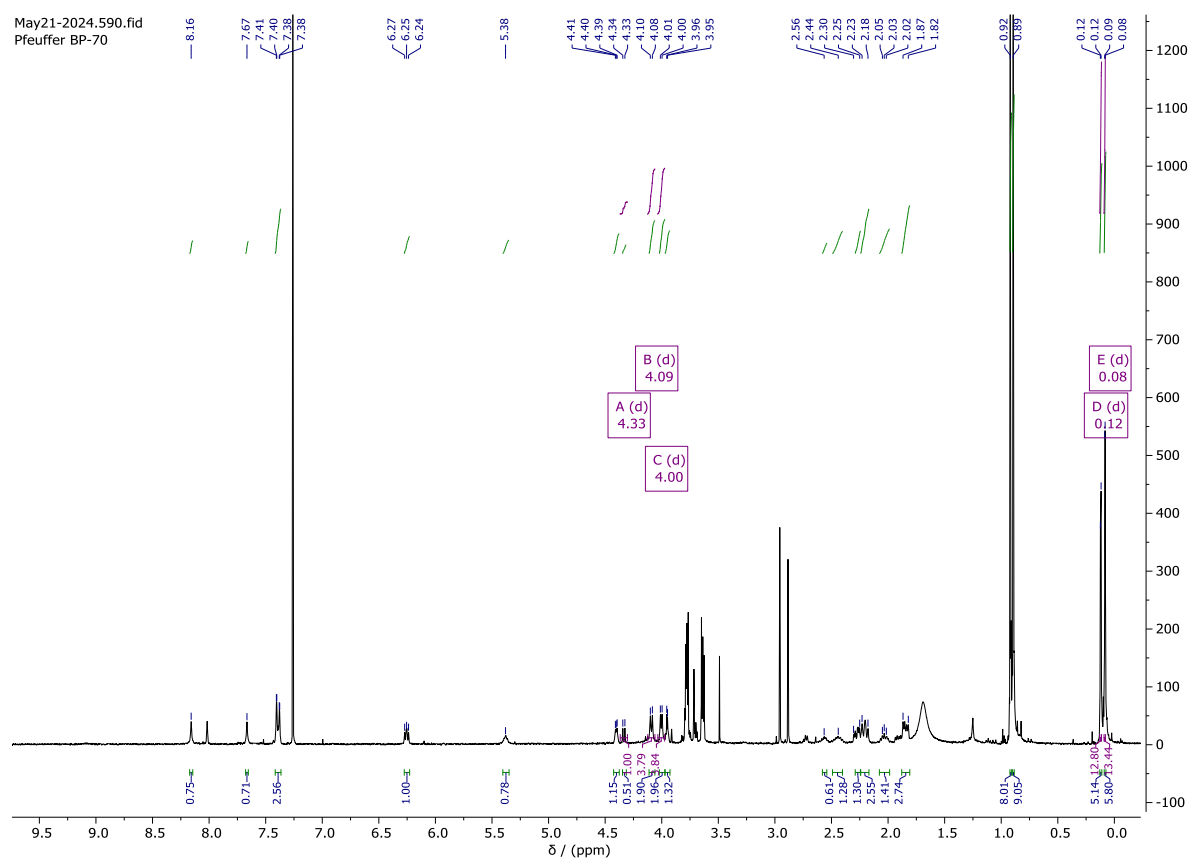


Abbildung 130 - ^1H -NMR Spektrum von **33** (400 MHz, CDCl_3).

Anhang

BP 70 #1-20 RT: 0.02-0.37 AV: 20 NL: 2.39E5
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-800.0000]

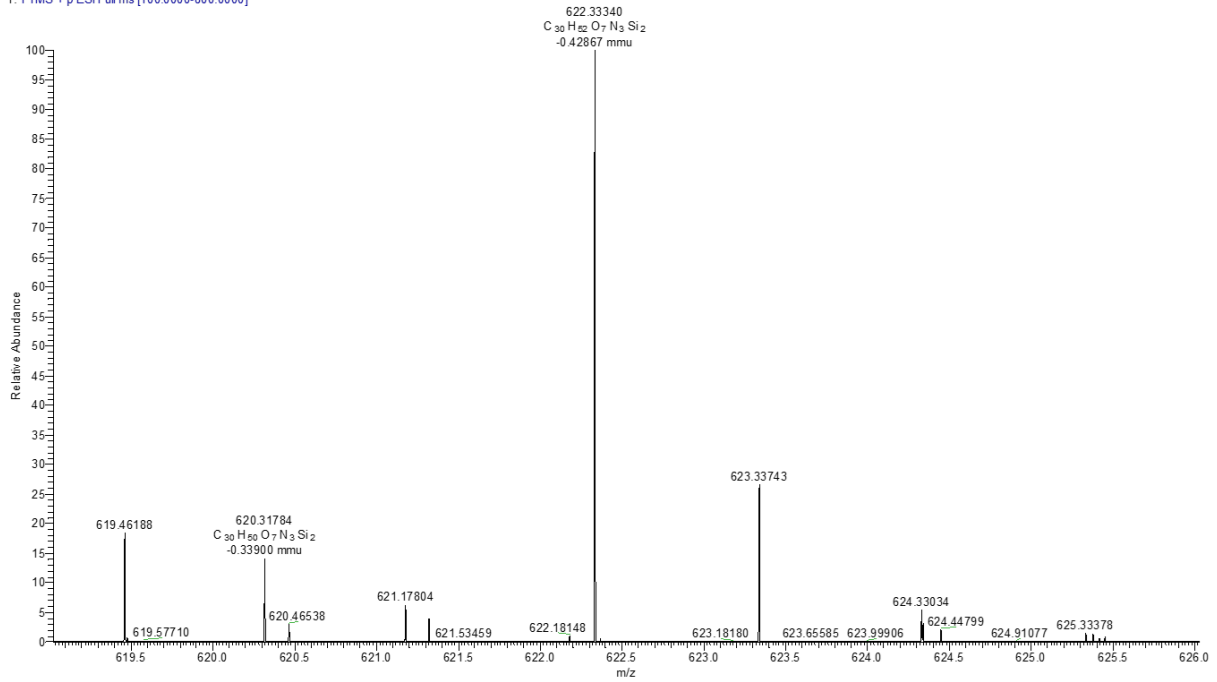


Abbildung 131 – ESI HRMS Spektrum von **33**.

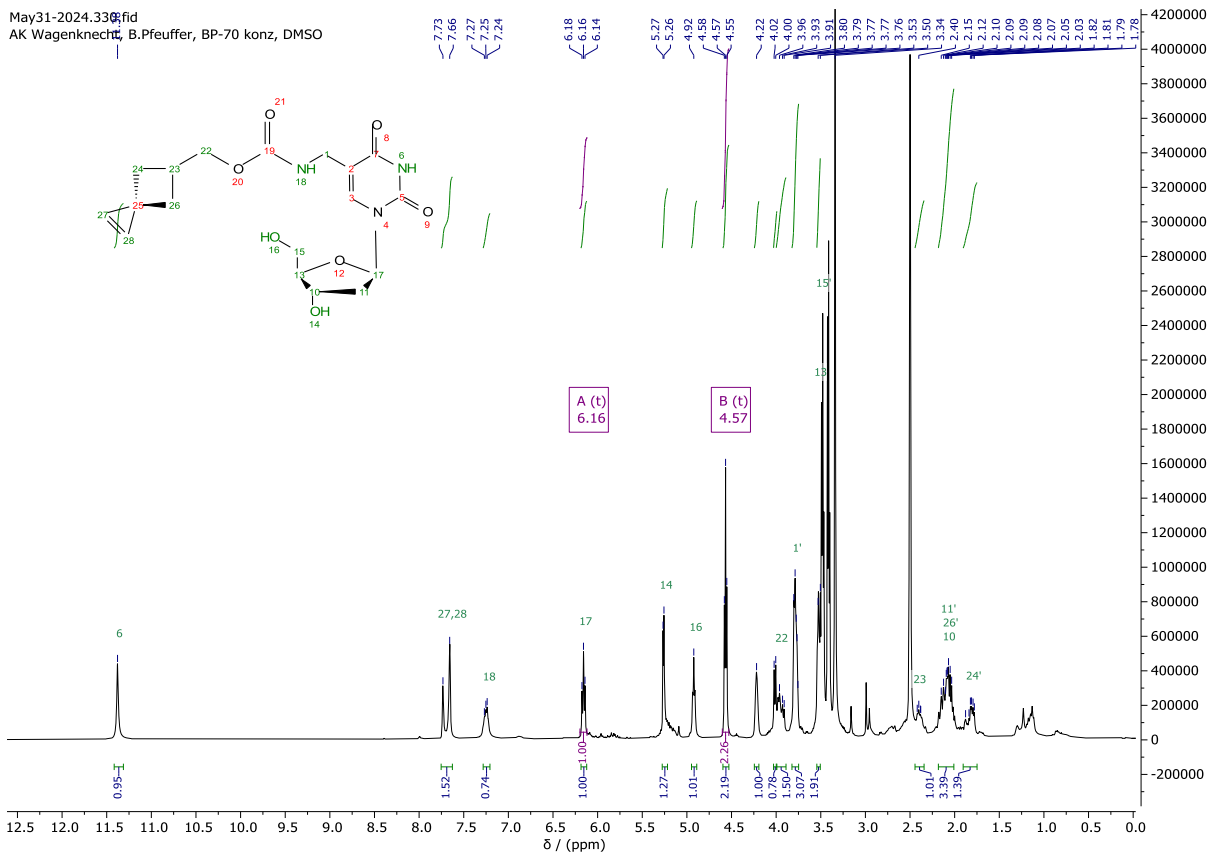


Abbildung 132 - ¹H-NMR Spektrum von **VI** (400 MHz, DMSO-d₆).

Anhang

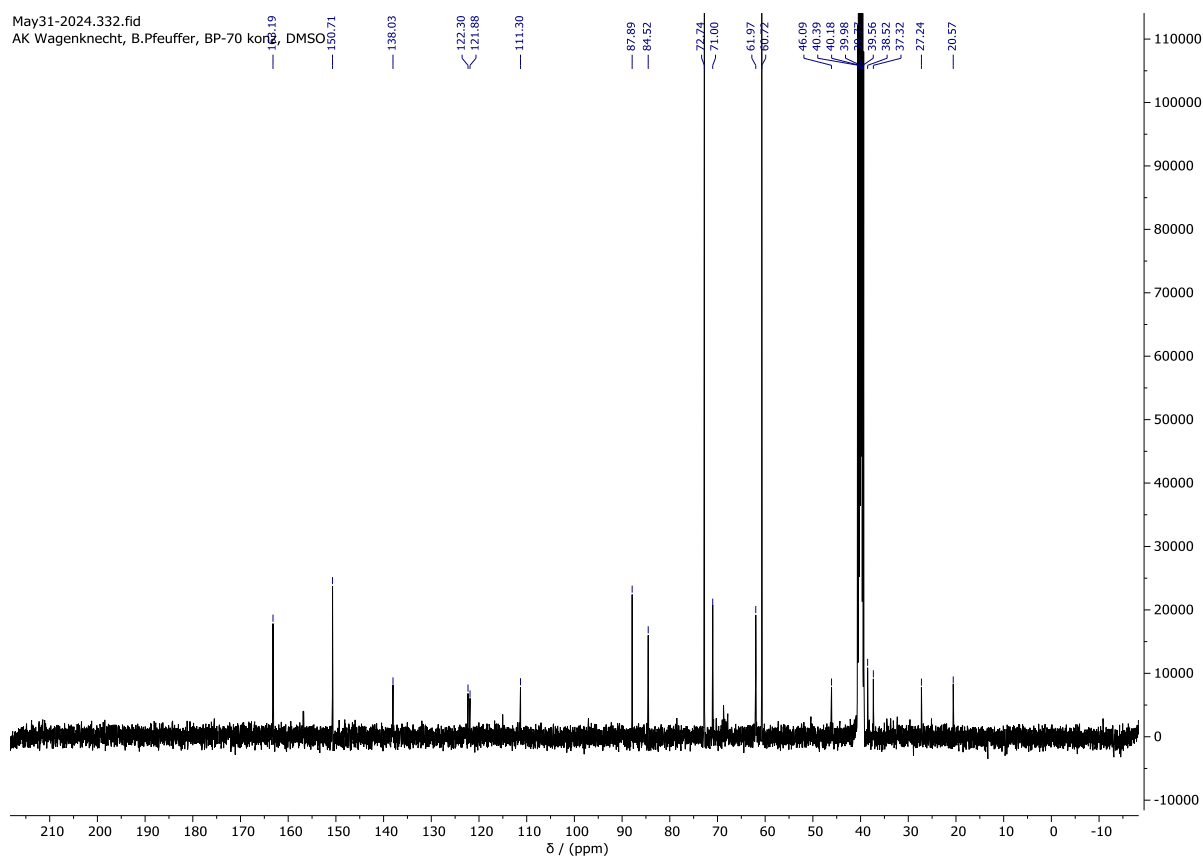


Abbildung 133 - ^{13}C -NMR Spektrum von VI (400 MHz, DMSO-d_6).

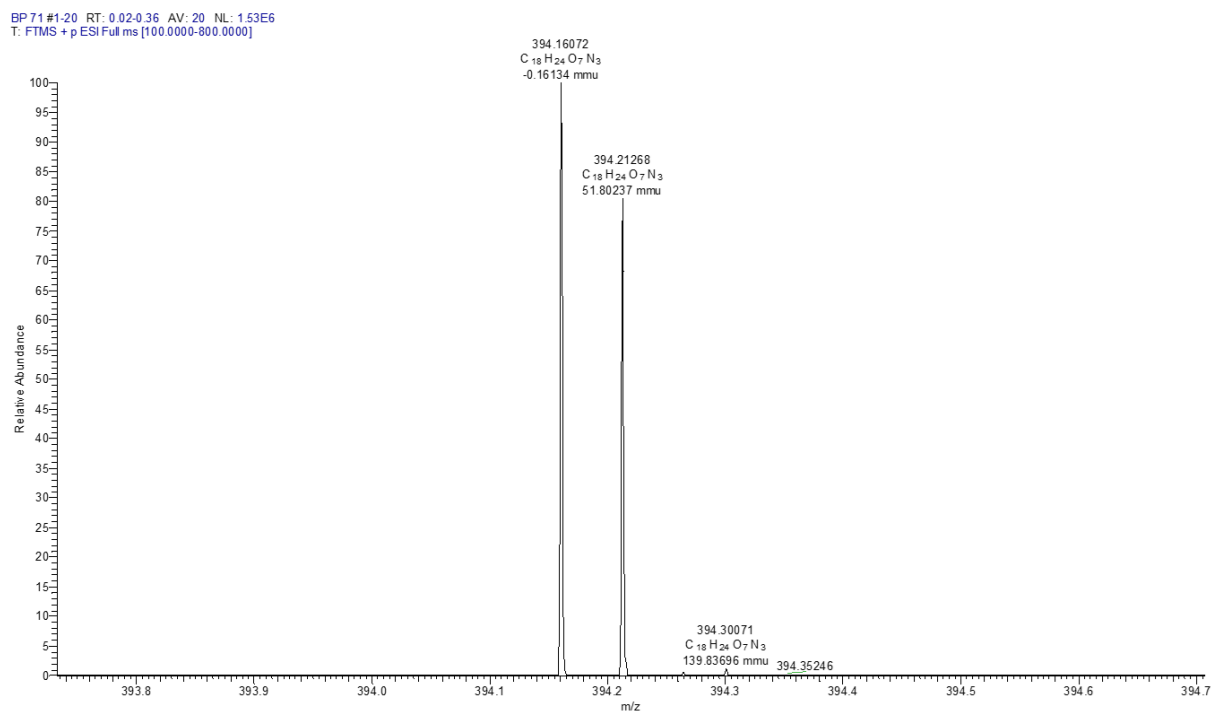


Abbildung 134 – ESI HRMS Spektrum von VI.

Anhang

May30-2024.100.fid
AK Wagenknecht, B.Pfeuffer, BP-73 DMSO

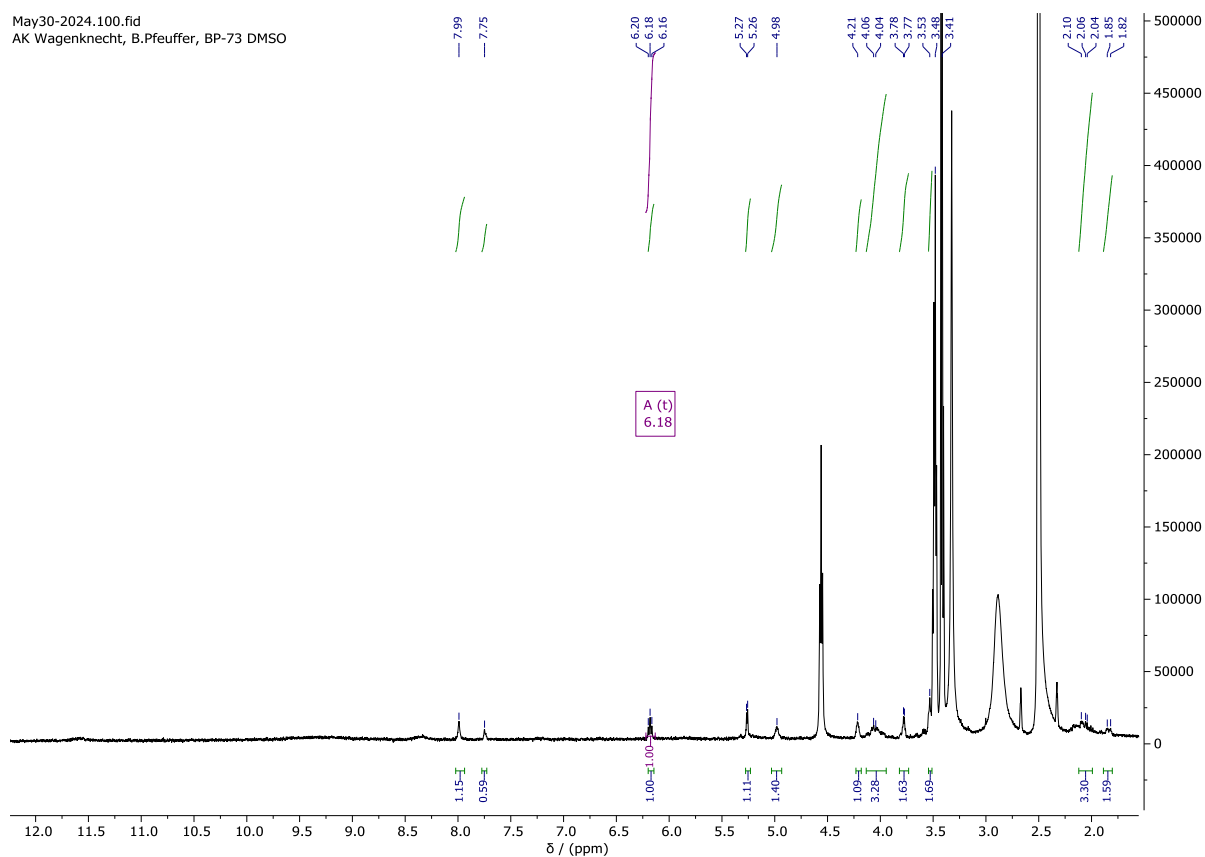


Abbildung 135 - ^1H -NMR Spektrum von VII (400 MHz, DMSO-d_6).

BP 73 #1-20 RT: 0.02-0.36 AV: 20 NL: 1.34E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-800.0000]

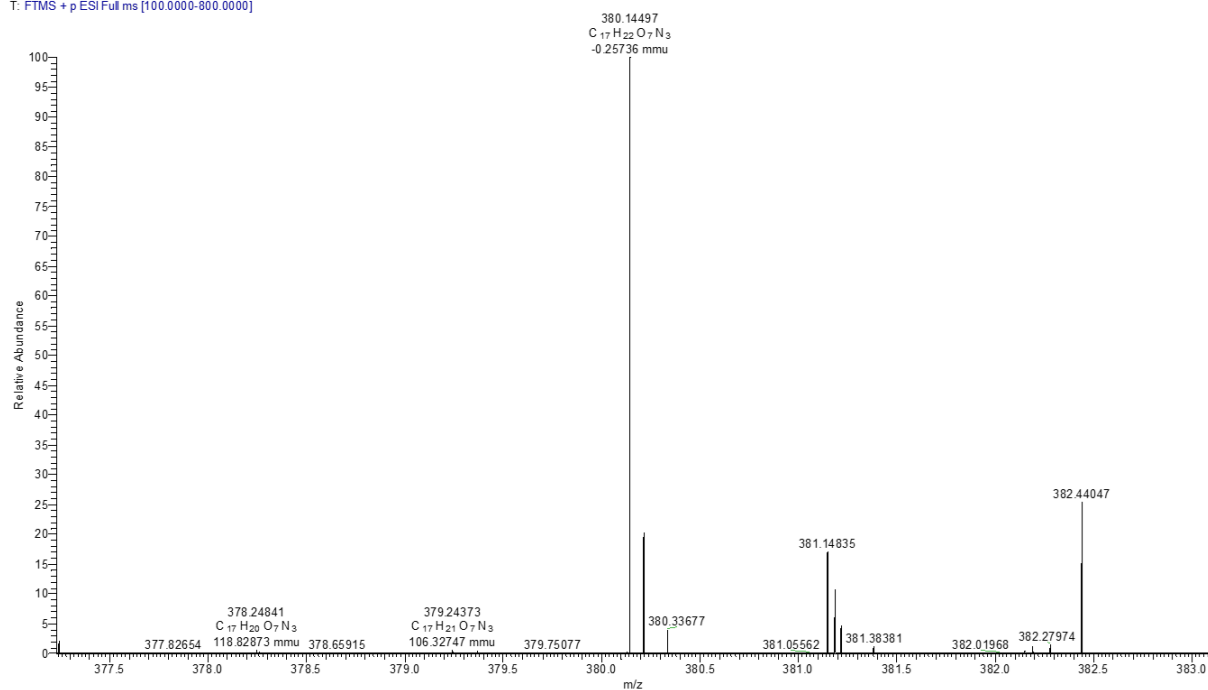


Abbildung 136 – ESI HRMS Spektrum von VII.

Anhang

Confidence
Data: BP_DNA_6_3J_HPA_dowex_0001.M20[c] 13 Oct 2022 7:59 Cal: 4-6kDa_HPA_15032022 7 Jul 2022 10:43
Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624: Mode 2019_Linear_neg_new, Power: 132, Blanked, P.Ext. @ 5340 (bir

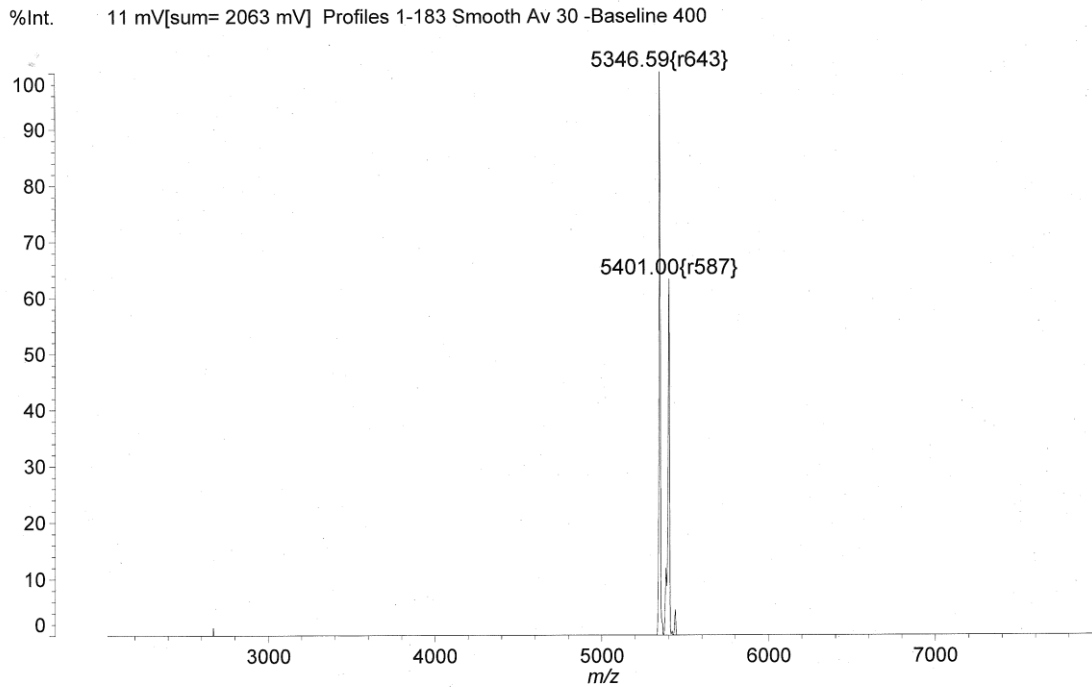


Abbildung 137 - MALDI-TOF-MS Analyse von **DNA3**.

Confidence
Data: BP_DNA4_J_HPA_0001.l16[c] 18 Aug 2022 9:48 Cal: 3-5KDa_HPA_14032022 7 Jul 2022 10:26
Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624: Mode 2019_Linear_neg_new, Power: 136, Blanked, P.Ext. @ 5300 (bir

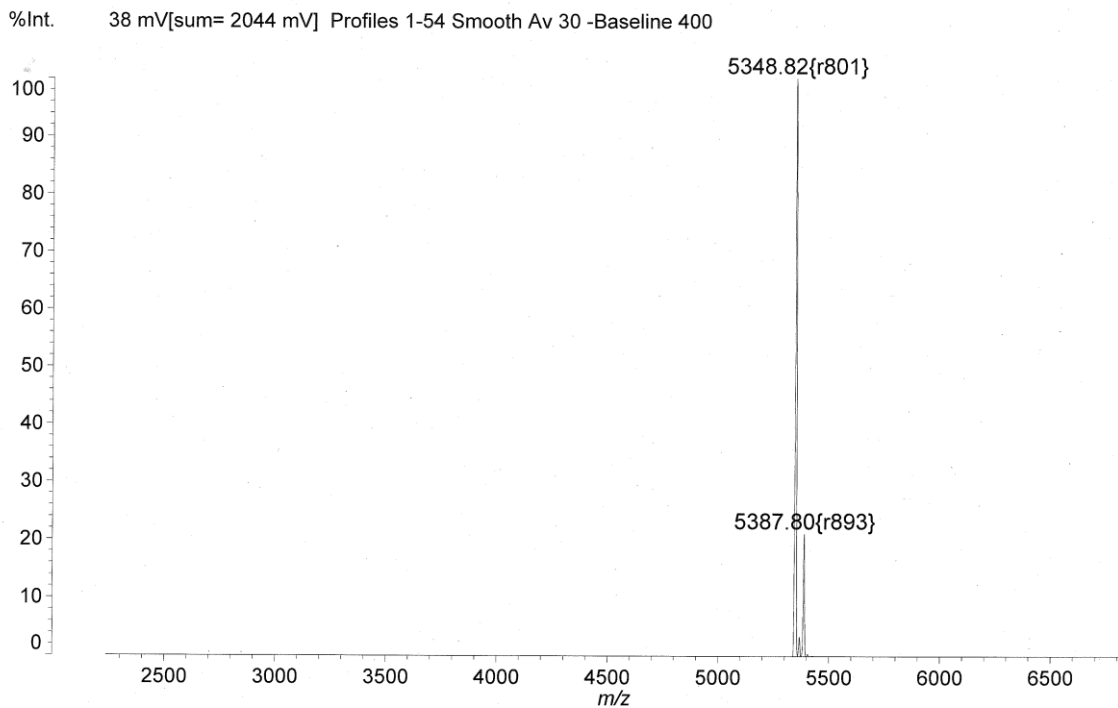


Abbildung 138 - MALDI-TOF-MS Analyse von **DNA4**.

Anhang

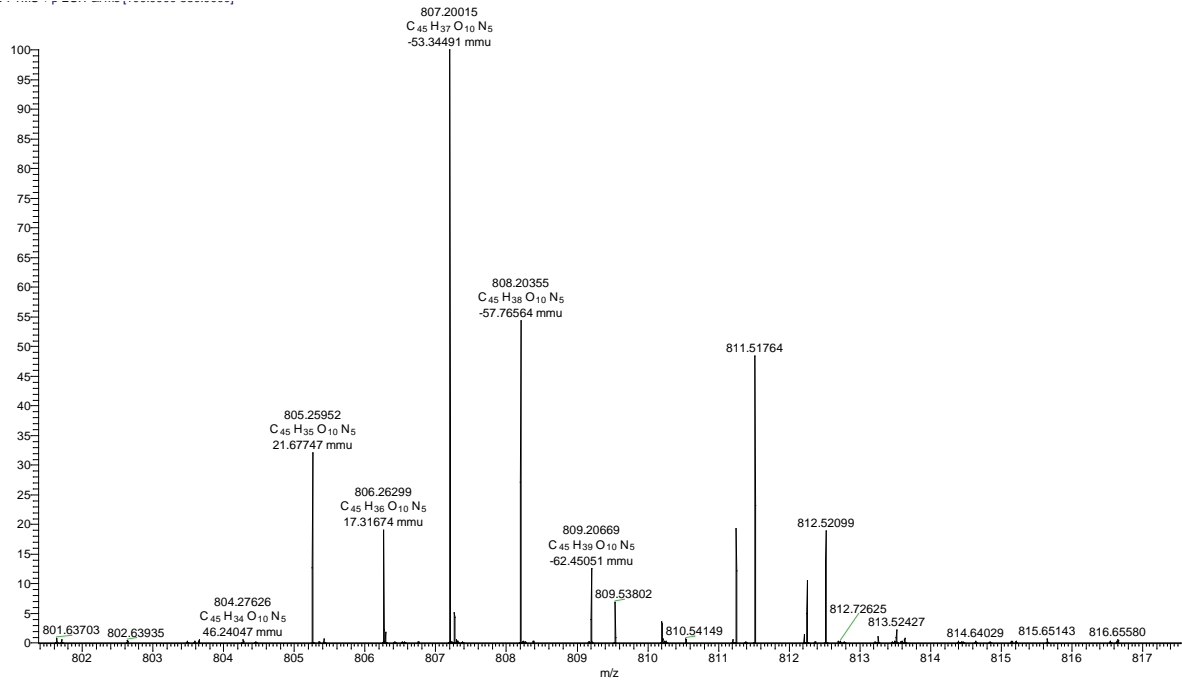


Abbildung 139 - HR-MS (ESI) von I+F; berechnet: $C_{45}H_{41}N_5O_{10}$ $[M]^+$: 811.28534, gemessen $[M]^+$: 811.51764.

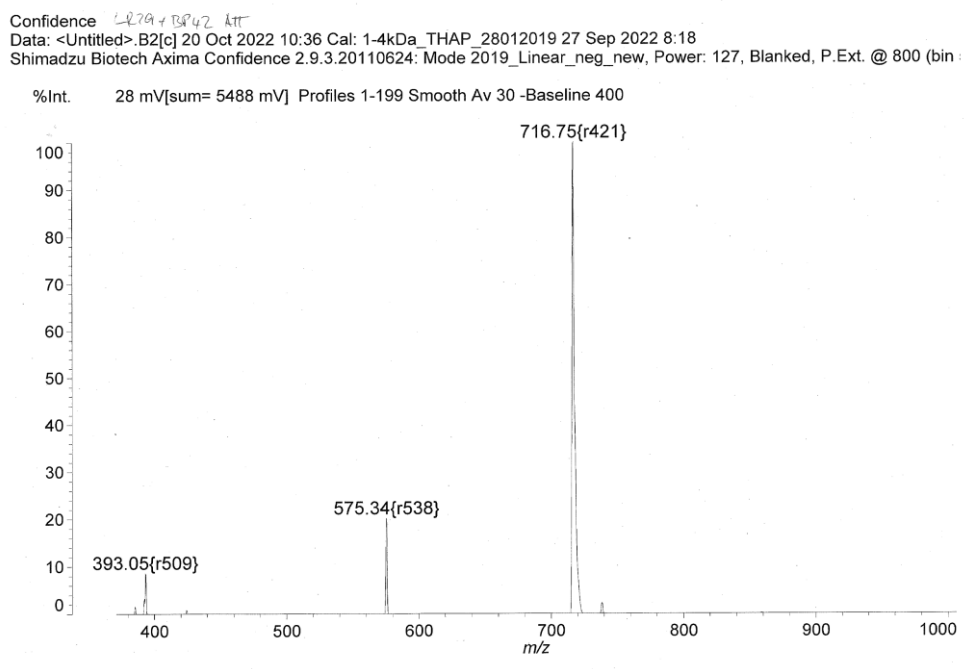


Abbildung 140 - MALDI-TOF-MS von I+G; berechnet: $C_{47}H_{46}N_6O_{10}$ $[M]^+$: 854.23, berechnet: $C_{39}H_{39}N_6O_8$ $[M]^+$: 719.28, gemessen: $[M]^+$: 716.75

Anhang

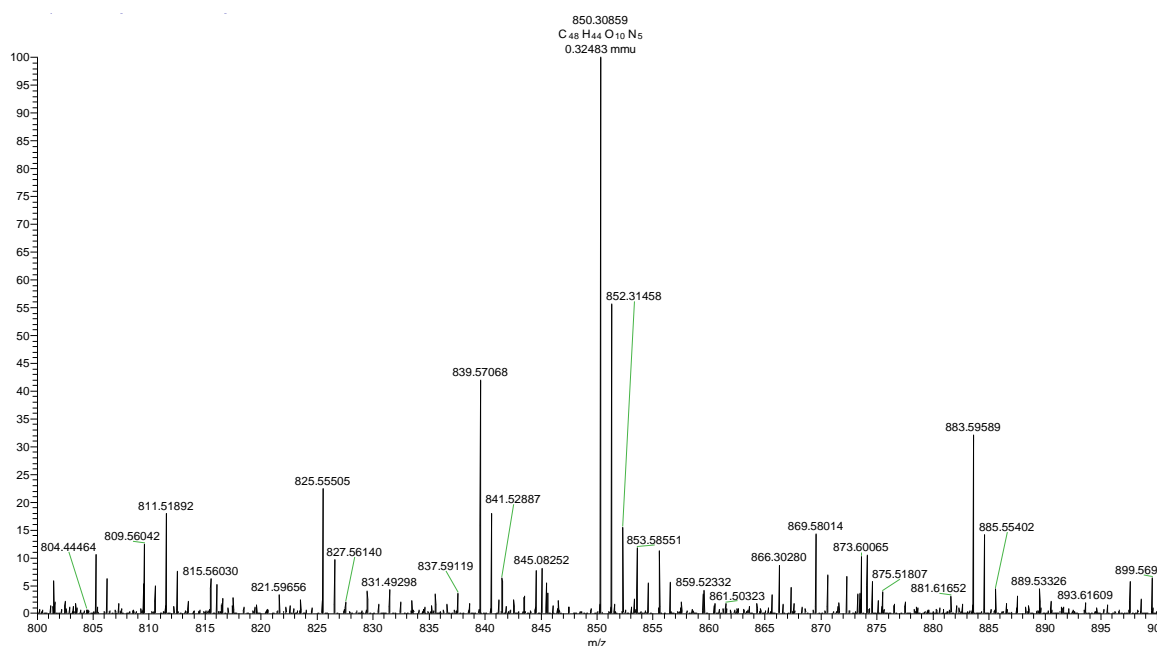


Abbildung 141 - HR-MS (ESI) von **40+F**; berechnet: C₄₈H₄₅N₅O₁₀ [M]⁺: 851.31664; gemessen [M-H]⁺: 850.30859.

LR29 + EL10.1 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 7.41E5
T: FTMS + p ESI Full ms [850.0000-950.0000]

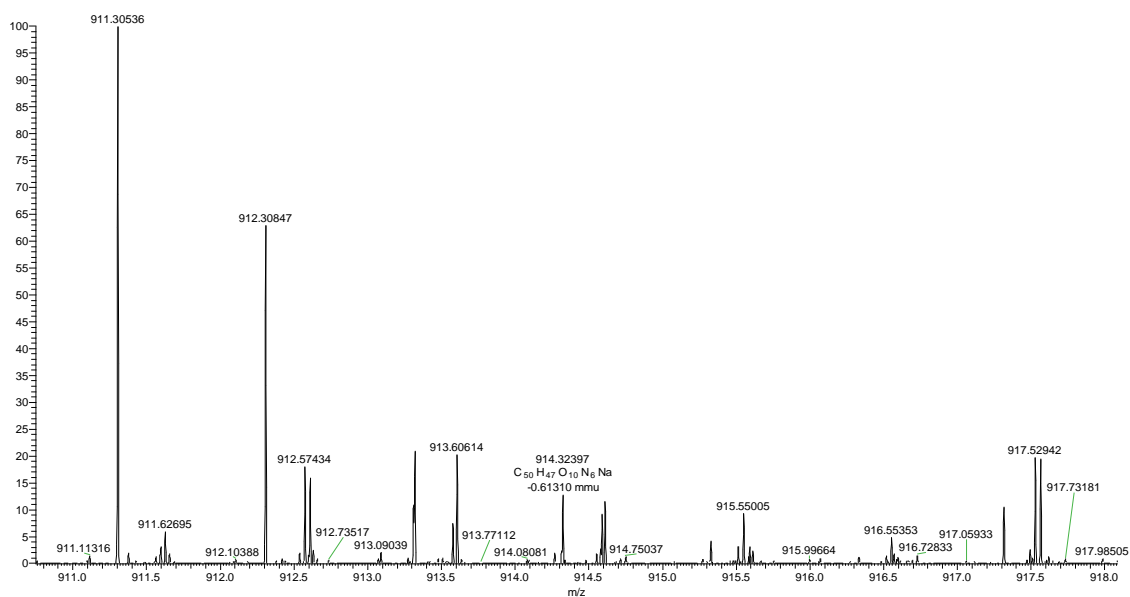


Abbildung 142 - HR-MS (ESI) von **40+G**. berechnet: C₃₄H₃₂N₃O₃ [M]⁺: 892.34319; gemessen [M-H+Na]⁺: 914.32397.

Anhang

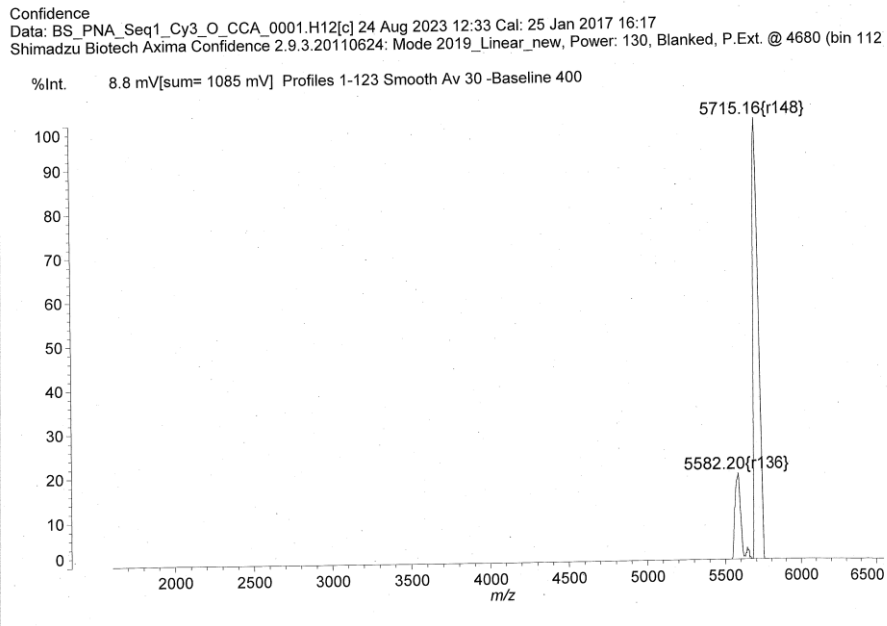


Abbildung 143 - MALDI-TOF-MS von **Seq1**; berechnet [M]⁺: 5715, gemessen [M]⁺: 5715.

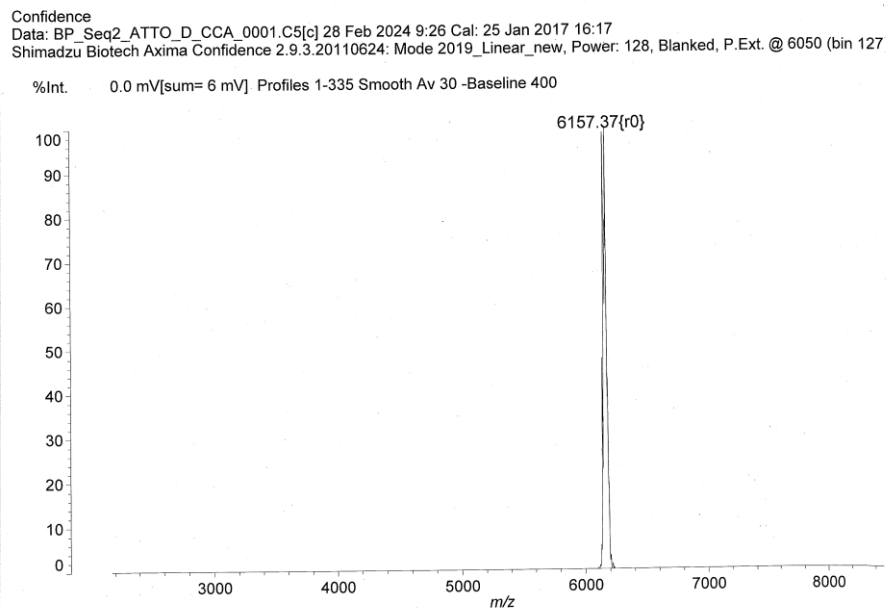


Abbildung 144 - MALDI-TOF-MS von **Seq2**; berechnet [M]⁺: 6159, gemessen [M-2H]⁺: 6157.

Anhang

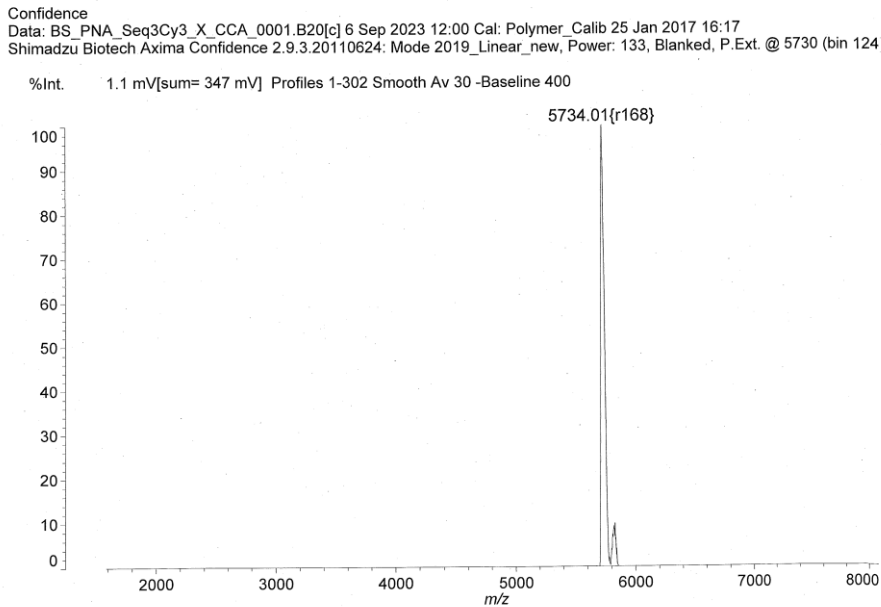


Abbildung 145 - MALDI-TOF-MS von **Seq3**; berechnet $[M]^+$: 5731, gemessen $[M+3H]^+$: 5734.

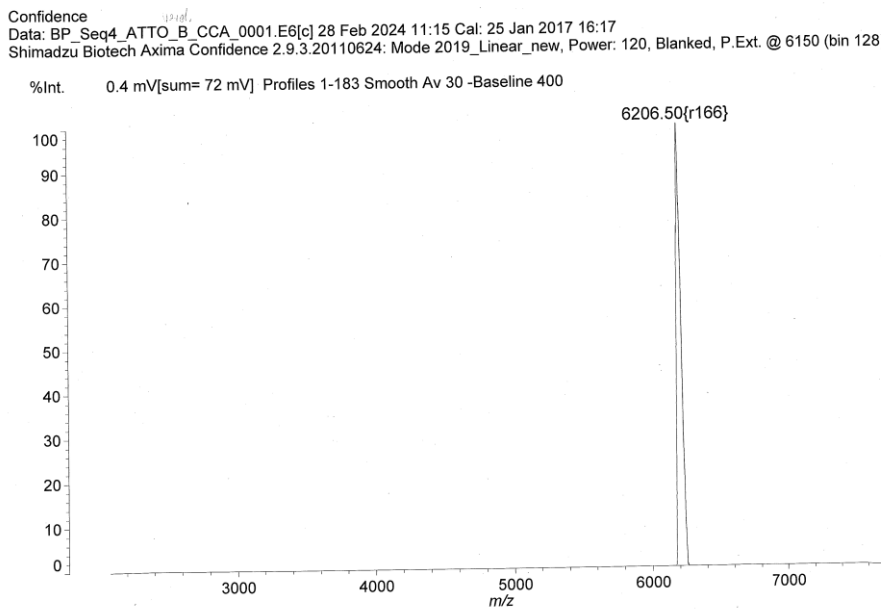


Abbildung 146 - MALDI-TOF-MS von **Seq4**; berechnet $[M]^+$: 6207, gemessen $[M-H]^+$: 6206.

Anhang

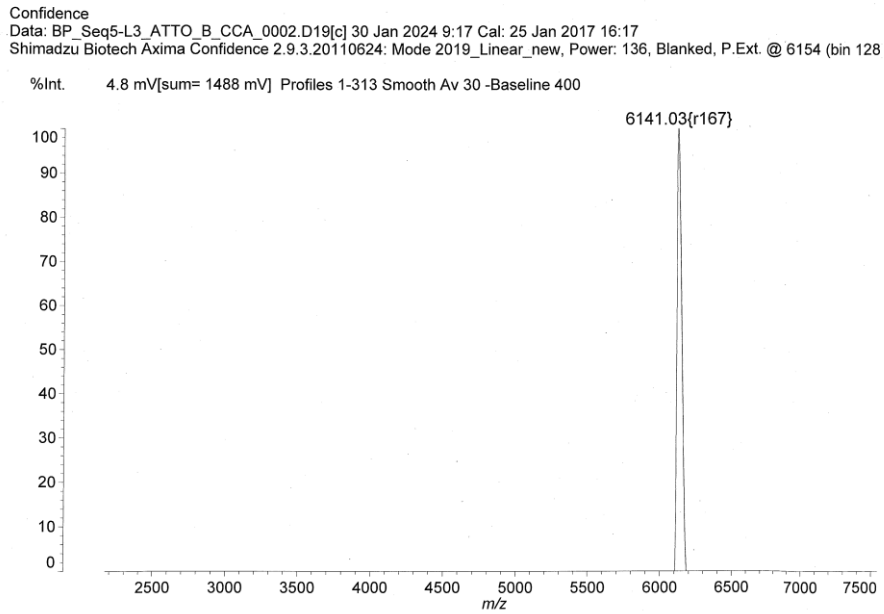


Abbildung 147 - MALDI-TOF-MS von **Seq5**; berechnet [M]⁺: 6154, gemessen [M]⁺: 6141.

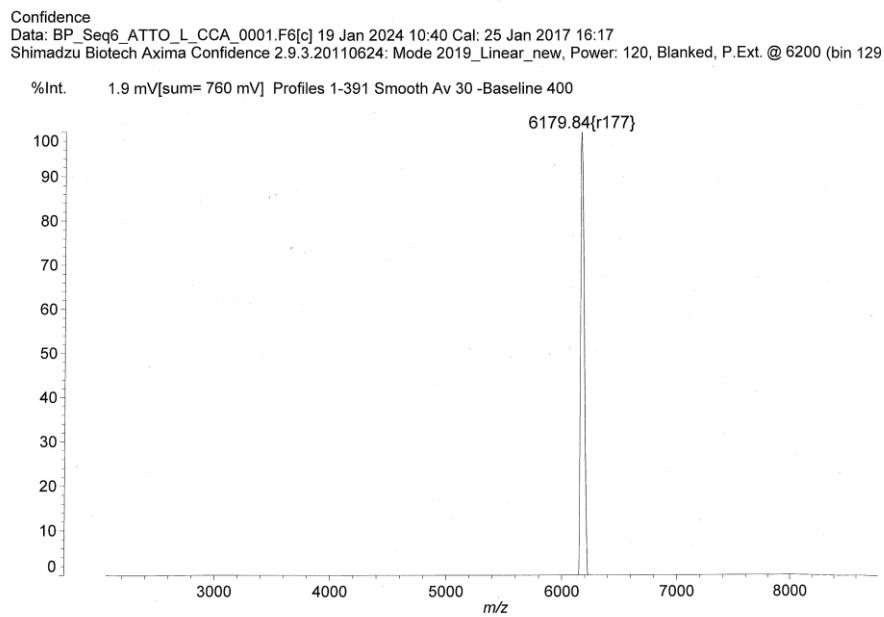


Abbildung 148 - MALDI-TOF-MS von **Seq6**; berechnet [M]⁺: 6176, gemessen [M+3H]⁺: 6179.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Zahl der Publikationen pro Jahr zu bioorthogonalen Reaktionen in den Jahren 2010 bis 2023. ^[10]	2
Abbildung 2 - Schematische Darstellung einer bioorthogonalen Reaktion. Zuerst erfolgt der metabolische Einbau des Bausteins in das Biomolekül, welcher mit einem chemischen Reporter versehen ist. Anschließend erfolgt die Reaktion mit einem selektiven Kupplungspartner, welcher einen Fluoreszenzfarbstoff oder einen anderen Marker trägt.	4
Abbildung 3 – Übersichtsreaktion eines Azids mit einem terminalen Alkin in einer Cu(I)-katalysierten [3+2]-Azid-Alkin-Cycloaddition.....	6
Abbildung 4 - Schematische Darstellung des Mechanismus einer Reaktion von einem 1,2,4,5-Tetrazin mit einem Dienophil in einer iEDDA-Reaktion. ^[39]	8
Abbildung 5 -Molekülorbitalschema der wechselwirkenden Grenzorbitale bei einer klassischen Diels-Alder (rot) vs. einer iEDDA-Reaktion (grün).	9
Abbildung 6 – Darstellung diverser Click-Reaktionen und deren Geschwindigkeitskonstanten. Spannungsgetriebene Azid-Alkin-Cycloaddition (rot), Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (blau), Photoclick-Reaktion (gelb) und die Diels-Alder Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (grün). ^[50]	10
Abbildung 7 – Zwei-Faktor-Fluorogenität eines Tetrazin-modifizierten Cyanin-Stryryl-Farbstoffes. Das Tetrazin (blau) dient als reaktive Gruppe für die iEDDA-Reaktion und als Fluoreszenzlöcher. Die strukturelle Fluorogenität erhöht sich, wenn die Rotation um die Methylenbrücke eingeschränkt wird (grün) z.B. durch sterisch anspruchsvolle Reaktionspartner, wie DNA.....	11
Abbildung 8 – Reaktionsschema einer Photoclick-Reaktion. Durch die Bestrahlung des Tetrazols (links) spaltet sich Stickstoff ab und es entsteht <i>in situ</i> ein hochreaktives Nitrilimin (Mitte), welches mit einem Alken zu einem Pyrazolin (rechts) weiterreagiert. In orange ist der mögliche Fluorophor am Tetrazol dargestellt.	12
Abbildung 9 - Mögliche Nebenreaktionen von Nitrilimininen mit Wasser, Thiolen und Aminen.	14
Abbildung 10 – Übersicht verschiedener Tetrazole für die Photoclick-Chemie und deren Anregungswellenlängen.....	15

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 11 – Schematische Darstellung einer Polymerisation unsubstituierter Cyclopropene.	16
Abbildung 12 – Schematische Darstellung der dualen bioorthogonalen Markierung von DNA durch metabolischen Einbau von 1-und 3-Methylcyclopropen mit Hilfe von 2'-Desoxynukleosiden und Triphosphaten in einer iEDDA- und Photoclick-Reaktion.....	17
Abbildung 13 – Strukturen der von LIN <i>et al.</i> publizierten 3,3-disubstituierten Cyclopropene (oben links, Mitte), und SPH (oben, rechts); Reaktionsschema von SPH in einer iEDDA- und einer Photoclick-Reaktion (unten).	18
Abbildung 14 – Überblick verschiedener Dienophile für eine bioorthogonale Reaktion und deren Einordnung gegenüber Reaktivität und Stabilität.	19
Abbildung 15 - Schematische Darstellung einer metabolischen Markierung von 2'-Desoxynukleosiden. 1) Das mit dem chemischen Reporter (rot) ausgestattete 2'-Desoxynukleosid wird über einen Ionenkanal durch die Zellmembran transportiert. 2) Phosphorylierung des modifizierten 2'-Desoxynukleosids. 3) Inkorporation des Triphosphats durch Polymerase in die DNA. 4) Einbringen des Fluorophors (grün) mit dem Kupplungspartner (blau). 5) Detektion der markierten DNA durch Click-Reaktion.	20
Abbildung 16 – Strukturen von 2'-Desoxyuridin und -Adenosin (oben) mit geeigneten Positionen für Modifikationen und erprobte Nukleoside für die metabolische Markierung (unten).	21
Abbildung 17 – Schematische Darstellung einer Lipofektion (A) und der Transport von modifizierten Nukleotiden über die Zellmembran mit Hilfe eines SNT-Transporters (B).	23
Abbildung 18 – Strukturvergleich zwischen DNA, aegPNA, γ PNA und acpcPNA.....	25
Abbildung 19 – Strukturvergleich zwischen APC-modifizierter acpcPNA und Lysin-modifizierter acpcPNA zur postsynthetischen Modifikation für Fluoreszenzmarkierungen.	26
Abbildung 20 - Arten der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). A) indirekte Markierung der Zielsequenz über ein Hapten und einen Antikörper; B) direkte Markierung der Zielsequenz durch kovalent geknüpfte Fluorophore.	27
Abbildung 21 – Schematische Darstellung eines Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET). 1) Anregung des Donors (D) durch Absorption eines Photons, 2) Energietransfer vom	

Abbildungsverzeichnis

Donor auf den Akzeptor (A), 3) Rückkehr des Donors in den Grundzustand und Anregung des Akzeptors mit anschließender Emission des Akzeptors.	28
Abbildung 22 – Übersicht der SPH-modifizierten Nukleoside I-V und SPH-OH 7 , welche im Rahmen dieser Arbeit für die bioorthogonale Markierung mit Tetrazin- und Tetrazol- Derivaten in einer iEDDA- und Photoclick-Reaktion untersucht werden sollen. Nukleoside VI und VII sollen mittels metabolischer Markierung in HeLa-Zellen visualisiert werden.	32
Abbildung 23 - Synthese des SPH-NHS-Esters 8 . a) CHBr ₃ , 3-Methylencyclobutancarbonitril, NaOH, CTAB, RT, 24 h, 74 %; b) -78 °C, DIBAL-H, 3 h, HCl, EtOH, 0 °C, NaBH ₄ , 16 h, 67 %; c) p-TsOH, Et ₂ O, 0 °C, Ethylvinylether, 16 h, 51 %, d) THF, Ti(O ⁱ Pr) ₄ , 0 °C, EtMgBr, 16h, 62 %; e) DMSO, KO ^t Bu, 0 °C, 16 h, 63 %, f) MeCN, 1 M HCl, 1 h, 0 °C, 72 %; g) MeCN, Et ₃ N, 0 °C, Disuccinimidylcarbonat, 16 h, 74 %.	33
Abbildung 24 – Schützung von 5'-Ioduridin mit TBDMS und Kupplung des Trifluoracetat (TFAC)-geschützten Propargyllinkers. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, 3h, RT, 66 %; b) MeOH, 24 h, RT, 72 %; c) CuI, Et ₃ N, DMF, Pd(PPh ₃) ₄ , 16 h, RT, 74 %; d) Pd/C, MeOH, H ₂ , quant.	35
Abbildung 25 – Synthese von SPH-modifizierten Uridinen I und II . a) MeOH, 1 M NaOH, 3 h, RT, 16 : quant, 17 : quant.; b) Et ₃ N, DMF, 8 , 16 h, RT, 18 : 72 %, 19 : 38 %; c) THF, Et ₃ N·3HF, 16 h, RT, I : 70 %, II : quant.	36
Abbildung 26 – Synthese der aminmodifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine 23 und 24 . a) MeCN, KOH, TMEEA, 3 h, RT, Aceton, 7 M NH ₃ , 24 h, 120 °C, 68 %.	37
Abbildung 27 – Synthese der SPH-modifizierten 7-Deaza-2'-desoxyadenosine III und IV . a) DMF, Et ₃ N, 16 h, RT, III : 20 %, IV : 33 %.	38
Abbildung 28 - Synthese des SPH-modifizierten 7-Deazaadenosins V , SG = TBDMS. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, 3 h, RT, 80 % b) MeOH, DMF-DMA, 16 h, 40 °C, 86 %; c) CuI, Et ₃ N, DMF, Pd(PPh ₃) ₄ , 13 , 76 %; d) MeOH, NaOH, 16 h, RT, quant., e) DMF, Et ₃ N, 8 , 16 h, RT, 68 %; f) THF, Et ₃ N·3HF, 16 h, RT, 70 %.	39
Abbildung 29 – Synthese SPH-modifizierter Nukleoside VI und VII . a) Et ₃ N, 8 , DMF, 16 h, RT, 33 : 83 %; b) THF, Et ₃ N·3HF, 16 h, RT, VI : 67 %, VII : 27% über zwei Stufen.	40
Abbildung 30 – Übersicht der Tetrazin-modifizierten Fluorophore A-D mit ihrer jeweiligen Emission. ^[55]	41

Abbildung 31 – Übersicht der iEDDA-Reaktionen der Tetrazin-Fluorophore A-D mit 7 zu den Click-Produkten 7+A-7+D	42
Abbildung 32 – Beispiel einer iEDDA-Reaktion zwischen 7 und B . 1) Anstieg der normierten Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$) während der Reaktion zwischen Dienophil 7 (100 μM , 5,00 Äq) und Fluorophor B (20 μM , 1,00 Äq) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%); 2) sichtbarer <i>Turn-On</i> Effekt, B vor Reaktion mit 7 (links) und nach Reaktion mit 7 (rechts); 3) kinetische Darstellung der Fluoreszenzsteigerung gegen die Zeit, exponentieller Fit, $y = a + b \exp(-k \cdot x)$	43
Abbildung 33 - Beispiel einer iEDDA-Reaktion zwischen I und B . 1) Anstieg der normierten Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$) während der Reaktion zwischen Dienophil I (100 μM , 5,00 Äq) und Fluorophor B (20 μM , 1,00 Äq) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%); 2) sichtbarer <i>Turn-On</i> -Effekt, B vor Reaktion mit I (links) und nach Reaktion mit I (rechts); 3) kinetische Darstellung der Fluoreszenzsteigerung gegen die Zeit, exponentieller Fit, $y = a + b \exp(-k \cdot x)$	45
Abbildung 34 – <i>Turn-On</i> -Werte der Nukleoside I-V (100 μM) nach vollständigem Umsatz mit A-D (20 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%).	48
Abbildung 35 – Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 der Nukleoside I-V (100 μM) nach vollständigem Umsatz mit A-D (20 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%).	49
Abbildung 36 – Optisch sichtbare Fluoreszenzsteigerung der Fluorophore A-D nach vollständigem Umsatz mit III durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 395 nm (von links nach rechts). Die linken Küvetten repräsentieren jeweils das Fluorophor ohne Dienophil, die rechte Küvette nach Umsetzung mit Dienophil III	50
Abbildung 37 – Synthese der aktivierten Phosphoramidite 37 und 38	51
Abbildung 38 – Synthese der SPH-modifizierten DNA-Stränge DNA3 und DNA4 mittels postsynthetischer Modifikation von DNA1 und DNA2 mit 8	52
Abbildung 39 – Vergleich der <i>Turn-On</i> -Werte zwischen 7 , den Nukleosiden III und IV (jeweils 100 μM in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1 Vol%), den DNA-Strängen DNA3 , DNA4 (jeweils 10 μM in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1 Vol%) und dsDNA3 (10 μM in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1 Vol%, 250 mM NaCl, 10 mM NaPi -Puffer) nach vollständiger Umsetzung mit den Fluorophoren A-D (20/2 μM).	56
Abbildung 40 – Reaktion der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside 39 , I und 40 (jeweils 500 μM) mit Tetrazol E (100 μM) zu den Produkten 39+E , I+E und	

40+E unter Belichtung mit einer 308 nm LED in PBS/MeCN 1:1. Aus übersichtlichen Gründen ist bei Photoclick-Produkt I+E nur eines der beiden entstehenden Diastereomere gezeigt.	59
Abbildung 41 – Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion von Nukleosid 39 (500 μ M) und Tetrazol E (100 μ M) zu Photoclick-Produkt 39+E in PBS/MeCN 1:1 nach Belichtung mit einer 308 nm LED für insgesamt 320 Sekunden. Analyse <i>via</i> RP-HPLC.	60
Abbildung 42 – Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion von Nukleosid I (500 μ M) und Tetrazol E (100 μ M) zu Photoclick-Produkt I+E in PBS/MeCN 1:1 nach Belichtung mit einer 308 nm LED für insgesamt 320 Sekunden. Analyse <i>via</i> RP-HPLC.	61
Abbildung 43 - Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion von Nukleosid 40 (500 μ M) und Tetrazol E (100 μ M) zu Photoclick-Produkt 40+E in PBS/MeCN 1:1 nach Belichtung mit einer 308 nm LED für insgesamt 320 Sekunden. Analyse <i>via</i> RP-HPLC.	62
Abbildung 44 - UV/Vis-Extinktion der Tetrazole F und G (25 μ M) in MeCN.	65
Abbildung 45 – Photoclick-Reaktion der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside 39 , I und 40 (jeweils 250 μ M) mit Tetrazol F bzw. G (jeweils 25 μ M) zu den Produkten 39+F/G , I+F/G und 40+F/G durch Belichtung mit einer $\lambda = 405$ nm LED in MeCN. Aus übersichtlichen Gründen ist bei Photoclick-Produkt I+F/G nur eines der beiden entstehenden Diastereomere gezeigt.	66
Abbildung 46 – UV/Vis Absorptionsspektren der Photoclick-Reaktionen der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside 39 , I und 40 (jeweils 250 μ M) mit Tetrazol F (25 μ M) zu den Produkten 39+F (oben, links), I+F (oben, rechts) und 40+F (unten, Mitte) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN.	67
Abbildung 47 - UV/Vis-Absorptionsspektren der Photoclick-Reaktionen der 3-Methylcyclopropen-, SPH- und BCN-modifizierten Nukleoside 39 , I und 40 (jeweils 250 μ M) mit Tetrazol G (25 μ M) zu den Produkten 39+G (oben, links), I+G (oben, rechts) und 40+G (unten, Mitte) mit Belichtung einer $\lambda = 405$ nm LED in MeCN.	68
Abbildung 48 - HeLa-Zellen nach 24 h Transfektion mit DNA3 (75 nM) und Click-Reaktion <i>in cellulo</i> mit Fluorophor B (150 nM). Negativkontrolle mit B , ohne DNA3 (oben), DNA3+B Click <i>in cellulo</i> (Mitte) und Positivkontrolle DNA3+B Click <i>in vitro</i> (unten). Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 500$ -550 nm, Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μ m.	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 49 - HeLa-Zellen nach 24 h Transfektion mit DNA3 (75 nM) und Click-Reaktion <i>in cellulo</i> mit Fluorophor A , C und D (jeweils 150 nM). Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ (A), $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}600 \text{ nm}$ (C), $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}650 \text{ nm}$ (D), Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm	73
Abbildung 50 - HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 24 h Inkubation mit III , IV und VdU (100 μM) und Click-Reaktion <i>in cellulo</i> mit Fluorophor B , Negativkontrolle (oben) ohne modifizierte 2'-Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$. Laser-Intensität 10 %. Maßstab: 20 μm	76
Abbildung 51 - 2'-Desoxynukleoside VI und VII für die metabolische Markierung mittels iEDDA- und Photoclick-Reaktion.	77
Abbildung 52 – Metabolische Inkorporation von VI und VII in zelluläre DNA mit anschließender Visualisierung <i>via</i> Photoclick-Reaktion mit Tetrazol G . HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 48 h Inkubation mit VI , VII und VdU (250 μM), Fixierung, Permeabilisierung und Denaturierung der DNA. Photoclick-Reaktion <i>in cellulo</i> mit Fluorophor G , 1h Inkubation bei Raumtemperatur und Belichtung für 20 min bei 405 nm. Negativkontrolle (oben) ohne modifizierte 2'-Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420\text{-}500 \text{ nm}$. Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm	79
Abbildung 53 - Metabolische Inkorporation von VI und VII <i>via</i> iEDDA-Reaktion mit Fluorophor B . HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 48 h Inkubation mit VI , VII und VdU (500 μM), Fixierung, Permeabilisierung und Denaturierung der DNA. iEDDA-Reaktion <i>in cellulo</i> mit Fluorophor B , 24 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO ₂ . Gegenfärbung mit Hoechst 33342 (zweite Spalte). Negativkontrolle (oben) ohne 2'-Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ für B , $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420\text{-}470 \text{ nm}$ für Hoechst 33342. Laser-Intensität 10 %, Maßstab: 20 μm	80
Abbildung 54 – Übersicht des FRETs mittels acpcPNA-Sonden (grün), welche mit Cy3 (rot) bzw. Atto647N (blau) modifiziert sind sowie einen Ausschnitt der shha-Sequenz (grau). Die gelb markierten Sequenzabschnitte stellen die Hybridisierungspunkte der acpcPNA-Sonden dar.	82

Abbildung 55 – Anregungs- und Emissionssignal der Farbstoffe Cy3 und Atto647N (jeweils 5 μM in H_2O bei 20 °C). Die überlappende Fläche zwischen der Emission des Cy3-Farbstoffs und der Anregung des Atto647N-Farbstoffs zeigt die FRET-Kompatibilität der beiden Farbstoffe.	83
Abbildung 56 – Cy3-Modifikation der der Sequenzen Seq1 und Seq3 mittels CuAAC und Abspaltung von der Festphase. a) HATU, DIPEA, 5-Hexinsäure, DMF; b) Ammoniak/1,4-Dioxan 1:1 (Vol%), 60 °C, 16 h; c) CuAAC: Natriumascorbat, Trisbenzylmethylamin, Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, Cy3-Azid, t-BuOH, DMSO; d) TFA. ..	84
Abbildung 57 – Atto647N-Modifikation der Sequenzen Seq2 , Seq4 , Seq5 und Seq6 mittels CuAAC und Abspaltung von der Festphase. a) TES, HFIP, TFE, DCM; b) HATU, DIPEA, 5-Hexinsäure, DMF; c) Ammoniak/1,4-Dioxan 1:1 (Vol%), 60 °C, 16 h; d) CuAAC: Natriumascorbat, Trisbenzylmethylamin, Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, Atto647N-Azid, t-BuOH, DMSO; e) TFA.	85
Abbildung 58 – Fluoreszenzspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit Seq3 und Seq6 . $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq6}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+Seq6}) = 500 \text{ nm}$; 250 mM NaCl, 2,5 μM in 10 mM NaPi , pH = 7, 20 °C.	86
Abbildung 59 – Vergleich der Fluoreszenzspektren von hybridisierter, komplementärer DNA mit Seq3+Seq6 mit NaCl (rot) und ohne NaCl (schwarz), $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+Seq6}) = 500 \text{ nm}$, 2,5 μM in 10 mM NaPi , pH = 7, 20 °C.	87
Abbildung 60 – links: Fluoreszenzspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit Seq3 , Seq4 und Seq3+Seq4 . $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq4}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+4}) = 500 \text{ nm}$ (2,5 μM in 10 mM NaPi), rechts: Vergleich der Fluoreszenzspektren von hybridisierter komplementärer DNA mit Seq3+Seq4 (schwarz) und mit Seq3+Seq6 (rot), $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ (2,5 μM in 10 mM NaPi), pH = 7, 20 °C.	88
Abbildung 61 - Fluoreszenzspektren der hybridisierten, nicht-komplementären DNA mit Seq3 , Seq4/Seq6 und Seq3+Seq4 bzw. Seq3+Seq6 . $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq4/Seq6}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+Seq4/Seq6}) = 500 \text{ nm}$; 2,5 μM in 10 mM NaPi , pH = 7, 20 °C.	89
Abbildung 62 – Vergleich der Fluoreszenzspektren von komplementärer RNA (links) mit nicht-komplementärer RNA (rechts) mit Seq3 , Seq6 und Seq3+Seq6 , $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3}) = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq6}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}}(\text{Seq3+6}) = 500 \text{ nm}$ (2,5 μM in 10 mM NaPi), pH = 7, 20 °C.	90

Abbildung 63 – links: Vergleich der Fluoreszenzspektren von komplementärer (k., lila) und nicht-komplementärer (n.k., braun) RNA mit Seq3+Seq4 bzw. Seq3+Seq6 bei $\lambda_{exc} = 500$ nm (2,5 μ M in 10 mM NaPi); rechts: Vergleich Fluoreszenzspektren von komplementärer RNA (grau) und DNA (lila) mit Seq3+Seq4 bzw. Seq3+Seq6 bei $\lambda_{exc} = 500$ nm (2,5 μ M in 10 mM NaPi), pH = 7, 20 °C.	91
Abbildung 64 – FISH der Proben eins bis sechs zur Detektion der shha-Sequenz in Zebrafisch-Embryos. Spalte eins zeigt den Cy3-Emissionskanal ($\lambda_{exc} = 496$ nm, $\lambda_{em} = 567$ -599 nm), Spalte zwei den Atto647N-Emissionskanal ($\lambda_{exc} = 633$ nm, $\lambda_{em} = 680$ -715 nm) und Spalte drei den Emissionskanal des Atto647N-Farbstoffs unter Anregung bei $\lambda_{exc} = 496$ nm. Alle Proben wurden mit einer Konzentration von 40 ng in 400 μ L verwendet, 48 h inkubiert und anschließend mit PTW gewaschen.	92
Abbildung 65 – Schematische Darstellung der iEDDA-Reaktionen zwischen SPH-OH 7 , SPH-modifizierten Nukleosiden und SPH-modifizierten Oligonukleotiden mit den Fluorophoren A-D , wobei eine klare Korrelation zwischen sterischer Hinderung des Dienophils und den <i>Turn-On</i> -Werten mit den Fluorophoren zu erkennen ist. Die höchsten Fluoreszenzsteigerungen wurden mit dsDNA3 mit Fluorophor C erzielt, gefolgt von B , A und D	95
Abbildung 66 Modifizierte DNA-Einzelstränge DNA1 und DNA2	130
Abbildung 67 Postsynthetische Modifikation von DNA1 und DNA2 mit SPH-NHS-Ester 8 zu DNA3 bzw. DNA4	132
Abbildung 68 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von 7 mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{exc} = 424$ (A), $\lambda_{exc} = 437$ (B), $\lambda_{exc} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{exc} = 467$ (D), 20 μ M Fluorophor, 100 μ M 7 (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$	141
Abbildung 69 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von I mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{exc} = 424$ (A), $\lambda_{exc} = 437$ (B), $\lambda_{exc} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{exc} = 467$ (D), 20 μ M Fluorophor, 100 μ M I (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C.	

Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$	142
Abbildung 70 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von II mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 20 μM Fluorophor, 100 μM II (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$	143
Abbildung 71 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von III mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 20 μM Fluorophor, 100 μM III (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$	144
Abbildung 72 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von IV mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 20 μM Fluorophor, 100 μM IV (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$	145
Abbildung 73 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von V mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit (links) und kinetische Messungen durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten (rechts). Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeführt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 20 μM Fluorophor, 100 μM V (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C. Für die kinetische Auswertung wurde folgende exponentielle Anpassungsfunktion verwendet: $y = a + b \cdot \exp(-k \cdot x)$	146
Abbildung 74 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von DNA3 mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit. Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%)	

Abbildungsverzeichnis

durchgeföhrt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 2 μM Fluorophor, 10 μM DNA3 (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C...	147
Abbildung 75 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von DNA4 mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit. Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%) durchgeföhrt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 2 μM Fluorophor, 10 μM DNA4 (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C...	148
Abbildung 76 - Normalisierte Fluoreszenzspektren der iEDDA-Reaktionen von dsDNA3 mit A-D bei zunehmender Reaktionszeit. Die Messungen wurden in H ₂ O/DMSO (99:1 Vol%, 250 mM NaCl, 10mM NaP _i -Puffer) durchgeföhrt, $\lambda_{\text{exc}} = 424$ (A), $\lambda_{\text{exc}} = 437$ (B), $\lambda_{\text{exc}} = 423$ (C) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 467$ (D), 2 μM Fluorophor, 10 μM dsDNA3 (5,00 Äq.), Slit: 3 nm Anregung, 3 nm Emission, T = 20 °C.....	149
Abbildung 77 – Schmelztemperaturkurve der hybridisierten doppelsträngigen dsDNA3	150
Abbildung 78 - Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von Photoclick-Produkt 39+E durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten in MeCN/PBS 1:1, 39 : 500 μM , E : 100 μM	150
Abbildung 79 - Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von Photoclick-Produkt I+E durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten in MeCN/PBS 1:1, I : 500 μM , E : 100 μM	150
Abbildung 80 - Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von Photoclick-Produkt 40+E durch Auftragen der Fläche bei entsprechenden Messzeiten in MeCN/PBS 1:1, 40 : 500 μM , E : 100 μM	151
Abbildung 81 – Fluoreszenzspektrum 39+F nach definierten Belichtungszeiten. 39 (250 μM), F (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm, Slit: 0,8. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).....	151
Abbildung 82 - Fluoreszenzspektrum 39+G nach definierten Belichtungszeiten. 39 (250 μM), G (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 377$ nm, Slit: 2,0. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).....	152
Abbildung 83– Fluoreszenzspektrum I+F nach definierten Belichtungszeiten (links). I (250 μM), F (25 μM) mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm LED in MeCN, $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm, Slit: 0,8. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).....	152

Abbildung 84- Fluoreszenzspektrum I+G nach definierten Belichtungszeiten. I (250 μ M), G (25 μ M) mit Belichtung einer λ_{exc} = 405 nm LED in MeCN, λ_{exc} = 377 nm, Slit: 2,0. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).....	153
Abbildung 85– Fluoreszenzspektrum 40+F nach definierten Belichtungszeiten. 40 (250 μ M), F (25 μ M) mit Belichtung einer λ_{exc} = 405 nm LED in MeCN, λ_{exc} = 350 nm, Slit: 0,8. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).....	153
Abbildung 86 Fluoreszenzspektrum 40+G nach definierten Belichtungszeiten. 40 (250 μ M), G (25 μ M) mit Belichtung einer λ_{exc} = 405 nm LED in MeCN, λ_{exc} = 377 nm, Slit: 2,0. Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung (rechts).....	154
Abbildung 87 - HeLa-Zellen mit Fluorophor A , C und D (jeweils 150 nM) als Negativkontrollen. Visualisierung mittels konfokalem Fluoreszenzmikroskop bei λ_{exc} = 488 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ = 500-550 nm (A), $\lambda_{\text{em.}}$ = 550-600 nm (C), $\lambda_{\text{em.}}$ = 600-650 nm (D), Maßstab: 20 μ m.	155
Abbildung 88 – Metabolische Markierung von VI und VII über Photoclick-Reaktion mit Gegenfärbung von DRAQ5 in PBS. HeLa-Zellen, kultiviert in No/No-Medium nach 48 h Inkubation mit VI , VII und VdU (250 μ M), Fixierung, Permeabilisierung und Denaturierung der DNA. Photoclick-Reaktion <i>in cellulo</i> mit Fluorophor G , 1h Inkubation bei Raumtemperatur und Belichtung für 20 min bei 405 nm. Negativkontrolle (oben) ohne 2'Desoxynukleoside. Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ = 420-500 nm. Laser-Intensität 10 %.	156
Abbildung 89 - Absorptionsspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit Seq3 , Seq6 und Seq3+Seq6 in 250 mM NaCl, 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.	157
Abbildung 90- Absorptionsspektrum der hybridisierten, komplementären DNA mit Seq3 , Seq4 und Seq3+Seq4 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.	157
Abbildung 91 - Absorptionsspektrum der hybridisierten, nicht-komplementären DNA mit Seq3 , Seq4/Seq6 und Seq3+Seq4 bzw. Seq3+Seq6 , 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.	158
Abbildung 92- Absorptionsspektrum der hybridisierten, komplementären RNA mit Seq3 , Seq4/Seq6 und Seq3+Seq4 bzw. Seq3+Seq6 , 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C....	158
Abbildung 93 - Absorptionsspektrum der hybridisierten, nicht-komplementären RNA mit Seq3 , Seq4/Seq6 und Seq3+Seq4 bzw. Seq3+Seq6 , 2,5 μ M in 10 mM NaPi, pH = 7, 20 °C.	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 94 - ^1H -NMR Spektrum von 2 (400 MHz, CDCl_3).....	160
Abbildung 95 - ^1H -NMR Spektrum von 3 (400 MHz, CDCl_3).....	161
Abbildung 96 - ^1H -NMR Spektrum von 4 (400 MHz, CDCl_3).....	161
Abbildung 97 - ^1H -NMR Spektrum von 5 (400 MHz, CDCl_3).....	162
Abbildung 98 - ^1H -NMR Spektrum von 6 (400 MHz, CDCl_3).....	162
Abbildung 99 - ^1H -NMR Spektrum von 7 (400 MHz, CDCl_3).....	163
Abbildung 100 - ^1H -NMR Spektrum von 8 (400 MHz, CDCl_3).....	163
Abbildung 101 - ^1H -NMR Spektrum von 10 (400 MHz, CDCl_3).....	164
Abbildung 102 - ^1H -NMR Spektrum von 14 (400 MHz, CDCl_3).....	164
Abbildung 103 - ^1H -NMR Spektrum von 16 (400 MHz, CDCl_3).....	165
Abbildung 104 - ^1H -NMR Spektrum von 18 (400 MHz, CDCl_3).....	165
Abbildung 106 – ^{13}C -NMR Spektrum von 18 (400 MHz, CDCl_3).	166
Abbildung 105 – ESI HRMS Spektrum von 18	166
Abbildung 107 - ^1H -NMR Spektrum von I (400 MHz, DMSO-d_6).....	167
Abbildung 108 - ^{13}C -NMR Spektrum von I (400 MHz, DMSO-d_6).....	167
Abbildung 109 – ESI HRMS Spektrum von I	168
Abbildung 110 - ^1H -NMR Spektrum von 15 (400 MHz, CDCl_3).....	168
Abbildung 111 - ^1H -NMR Spektrum von 17 (400 MHz, CDCl_3).....	169
Abbildung 112 - ^1H -NMR Spektrum von 19 (400 MHz, CDCl_3).....	169
Abbildung 113 - ^{13}C -NMR Spektrum von 19 (400 MHz, CDCl_3).....	170
Abbildung 114 – ESI HRMS Spektrum von 19	170
Abbildung 115 - ^1H -NMR Spektrum von II (400 MHz, DMSO-d_6).....	171
Abbildung 116 - ^{13}C -NMR Spektrum von II (400 MHz, DMSO-d_6).....	171
Abbildung 117 – ESI HRMS Spektrum von II	172
Abbildung 118 - ^1H -NMR Spektrum von III (400 MHz, DMSO-d_6).....	172
Abbildung 119 - ^{13}C -NMR Spektrum von III (400 MHz, DMSO-d_6).....	173
Abbildung 120 – ESI HRMS Spektrum von III	173
Abbildung 121 - ^1H -NMR Spektrum von IV (400 MHz, DMSO-d_6).	174
Abbildung 122 - ^{13}C -NMR Spektrum von IV (400 MHz, DMSO-d_6).	174
Abbildung 123 – ESI HRMS Spektrum von IV	175
Abbildung 124 - ^1H -NMR Spektrum von 30 (400 MHz, CDCl_3).....	175
Abbildung 125 - ^{13}C -NMR Spektrum von 30 (400 MHz, CDCl_3).....	176

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 126 – ESI HRMS Spektrum von 30	176
Abbildung 127 - ^1H -NMR Spektrum von V (400 MHz, DMSO- d_6).	177
Abbildung 128 - ^{13}C -NMR Spektrum von V (400 MHz, DMSO- d_6).	177
Abbildung 129 – ESI HRMS Spektrum von V	178
Abbildung 130 - ^1H -NMR Spektrum von 33 (400 MHz, CDCl_3).	178
Abbildung 131 – ESI HRMS Spektrum von 33	179
Abbildung 132 - ^1H -NMR Spektrum von VI (400 MHz, DMSO- d_6).	179
Abbildung 133 - ^{13}C -NMR Spektrum von VI (400 MHz, DMSO- d_6).	180
Abbildung 134 – ESI HRMS Spektrum von VI	180
Abbildung 135 - ^1H -NMR Spektrum von VII (400 MHz, DMSO- d_6).	181
Abbildung 136 – ESI HRMS Spektrum von VII	181
Abbildung 137 - MALDI-TOF-MS Analyse von DNA3	182
Abbildung 138 - MALDI-TOF-MS Analyse von DNA4	182
Abbildung 139 - HR-MS (ESI) von I+F ; berechnet: $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{10}$ $[\text{M}]^+$: 811.28534, gemessen $[\text{M}]^+$: 811.51764.....	183
Abbildung 140 - MALDI-TOF-MS von I+G ; berechnet: $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{10}$ $[\text{M}]^+$: 854.23, berechnet: $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_8$ $[\text{M}]^+$: 719.28, gemessen: $[\text{M}]^+$: 716.75	183
Abbildung 141 - HR-MS (ESI) von 40+F ; berechnet: $\text{C}_{48}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{10}$ $[\text{M}]^+$: 851.31664; gemessen $[\text{M-H}]^+$: 850.30859.....	184
Abbildung 142 - HR-MS (ESI) von 40+G . berechnet: $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$: 892.34319; gemessen $[\text{M-H+Na}]^+$: 914.32397.	184
Abbildung 143 - MALDI-TOF-MS von Seq1 ; berechnet $[\text{M}]^+$: 5715, gemessen $[\text{M}]^+$: 5715. ...	185
Abbildung 144 - MALDI-TOF-MS von Seq2 ; berechnet $[\text{M}]^+$: 6159, gemessen $[\text{M-2H}]^+$: 6157.	185
Abbildung 145 - MALDI-TOF-MS von Seq3 ; berechnet $[\text{M}]^+$: 5731, gemessen $[\text{M+3H}]^+$: 5734.	186
Abbildung 146 - MALDI-TOF-MS von Seq4 ; berechnet $[\text{M}]^+$: 6207, gemessen $[\text{M-H}]^+$: 6206.	186
Abbildung 147 - MALDI-TOF-MS von Seq5 ; berechnet $[\text{M}]^+$: 6154, gemessen $[\text{M}]^+$: 6141. ...	187
Abbildung 148 - MALDI-TOF-MS von Seq6 ; berechnet $[\text{M}]^+$: 6176, gemessen $[\text{M+3H}]^+$: 6179.	187

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F , Fluoreszenzsteigerungen und der Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Tetrazin-modifizierten Fluorophore A-D (20 μM) nach vollständigem Umsatz mit 7 (100 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%).	43
Tabelle 2 Übersicht der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F , Fluoreszenzsteigerungen und der Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Tetrazin-modifizierten Fluorophore A-D (20 μM) nach vollständigem Umsatz mit I-V (100 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%).	47
Tabelle 3: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F und <i>Turn-On</i> -Werte der SPH-modifizierten Oligonukleotide DNA3 und DNA4 (10 μM) nach vollständigem Umsatz mit A-D (2 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%) sowie dsDNA3 (10 μM) nach vollständigem Umsatz mit A-D (2 μM) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (99:1 Vol%, 250 mM NaCl, 10 mM NaP_i -Puffer).	54
Tabelle 4 – Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Photoclick-Reaktionen 39+E , I+E und 40+E in MeCN/PBS 1:1 (Dienophil: 500 μM , E : 100 μM).	63
Tabelle 5 – Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten k_2 der Photoclick-Reaktionen 39+F/G , I+F/G und 40+F/G mit Belichtung einer $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ LED in MeCN (Dienophil: 250 μM , F bzw. G : 25 μM).	69
Tabelle 6: Berechnete und gefundene Masse von DNA1-DNA4 .	133
Tabelle 7: Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide DNA3 und DNA4 .	133
Tabelle 8: Schmelztemperatur der hybridisierten doppelsträngigen dsDNA3 .	134
Tabelle 9 – Berechnete sowie gefundene Massen der Photoclick-Produkte der Dienophile 39 , I und 40 mit den Pyren-Tetrazolen F und G .	136
Tabelle 10 – Sequenzabfolge sowie berechnete und gefundene Masse der acpcPNA-Sequenzen Seq1-Seq6 .	138

10 Literaturverzeichnis

- [1] T. Brown, B. Nordén, *Q. Rev. Biophys.* **2022**, 55, 1-1.
- [2] C. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 9, 3057–3064.
- [3] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708-2711.
- [4] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047.
- [5] D. Choquet, M. Sainlos, J.-B. Sibarita, *Nat. Rev. Neurosci.* **2021**, 22, 237-255.
- [6] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, 111, 229-233.
- [7] P. V. Chang, C. R. Bertozzi, *ChemComm* **2012**, 48, 8864-8879.
- [8] D. Wu, K. Yang, Z. Zhang, Y. Feng, L. Rao, X. Chen, G. Yu, *Chem Soc Rev* **2022**, 51, 1336-1376.
- [9] Q. Yao, F. Lin, C. Lu, R. Zhang, H. Xu, X. Hu, Z. Wu, Y. Gao, P. R. Chen, *Bioconjug Chem* **2023**, 34, 2255-2262.
- [10] Scifinder, **aufgerufen am 06.09.2024**, <https://scifinder-n.cas.org>.
- [11] R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioconjugate Chem.* **2021**, 32, 2457-2479.
- [12] R. D. Row, J. A. Prescher, *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 1073–1081.
- [13] C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 651–653.
- [14] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2005**, 1, 13–21.
- [15] N. K. Devaraj, *ACS Cent Sci* **2018**, 4, 952-959.
- [16] V. Ntziachristos, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, 8, 1-33.
- [17] S. Hanson, T. Hsu, E. Weerapana, K. Kishikawa, G. Simon, B. Cravatt, C. Wong, *J. Am. Chem. Soc* **2007**, 129, 7266–7267.
- [18] L. Allott, C. Chen, M. Braga, S. F. J. Leung, N. Wang, C. Barnes, D. Brickute, L. Carroll, E. O. Aboagye, *RSC Adv.* **2021**, 11, 20335-20341.
- [19] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J Am Chem Soc* **2012**, 134, 18638-18643.
- [20] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem Biol* **2014**, 9, 16-20.
- [21] R. K. V. Lim, Q. Lin, *ChemComm* **2010**, 46, 1589.
- [22] C. P. Ramil, Q. Lin, *ChemComm* **2013**, 49, 11007.
- [23] C. Denk, D. Svatunek, S. Mairinger, J. Stanek, T. Filip, D. Matscheko, C. Kuntner, T. Wanek, H. Mikula, *Bioconjug Chem* **2016**, 27, 1707-1712.
- [24] F. Nensa, A. Demircioglu, C. Rischpler, *J. Nucl. Med.* **2019**, 60, 29S-37S.
- [25] M. Czuban, S. Srinivasan, N. A. Yee, E. Agustin, A. Koliszak, E. Miller, I. Khan, I. Quinones, H. Noory, C. Motola, R. Volkmer, M. Di Luca, A. Trampuz, M. Royzen, J. M. Mejia Oneto, *ACS Cent Sci* **2018**, 4, 1624-1632.
- [26] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem Biol* **2014**, 9, 592-605.
- [27] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 633-645.
- [28] Y. Özkılıç, N. Ş. Tüzün, *Organometallics* **2016**, 35, 2589-2599.
- [29] K. Lang, J. W. Chin, *Chem Rev* **2014**, 114, 4764-4806.
- [30] Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1674.
- [31] D. C. Kennedy, R. K. Lyn, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2444–2445.
- [32] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 9879-9883.
- [33] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolorow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J Am Chem Soc* **2011**, 133, 17993-18001.

Literaturverzeichnis

- [34] J. A. Marchand, M. E. Neugebauer, M. C. Ing, C. I. Lin, J. G. Pelton, M. C. Y. Chang, *Nature* **2019**, *567*, 420-424.
- [35] C. C. Nawrat, C. J. Moody, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53*, 2056-2077.
- [36] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, T. Montagnon, G. Vassilikogiannakis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1668-1698.
- [37] V. Borsenberger, S. Howorka, *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, 1477-1485.
- [38] J.-P. Meyer, P. Adumeau, J. S. Lewis, B. M. Zeglis, *Bioconjug Chem* **2016**, *27*, 2791-2807.
- [39] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895-4950.
- [40] Z. M. Png, H. Zeng, Q. Ye, J. Xu, *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 2142-2159.
- [41] D. L. Boger, R. P. Schaum, R. M. Garbaccio, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6329-6337.
- [42] M. Handula, K.-T. Chen, Y. Seimbille, *Molecules* **2021**, *26*, 4640.
- [43] J. Balcar, G. Chrisam, F. X. Huber, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1481-1484.
- [44] A. Hamasaki, R. Ducray, D. L. Boger, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 185-193.
- [45] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug Chem* **2011**, *22*, 2263-2270.
- [46] R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.
- [47] K. Wang, A. Sachdeva, D. J. Cox, N. M. Wilf, K. Lang, S. Wallace, R. A. Mehl, J. W. Chin, *Nat Chem* **2014**, *6*, 393-403.
- [48] H.-A. Wagenknecht, P. Kele, G. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, *Synthesis* **2015**, *47*, 2738-2744.
- [49] F. Liu, Y. Liang, K. N. Houk, *Acc Chem Res* **2017**, *50*, 2297-2308.
- [50] K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 990-1011.
- [51] D. Ganz, D. Harijan, H.-A. Wagenknecht, *RSC chem. biol.* **2020**, *1*, 86-97.
- [52] C. Schwechheimer, F. Röncke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 6557-6563.
- [53] H. Wu, J. Yang, J. Šečutè, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5915-5919.
- [54] P. Geng, E. List, F. Röncke, H. A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*.
- [55] B. Pfeuffer, P. Geng, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2024**, *25*.
- [56] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869-2872.
- [57] A. Wieczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506-1510.
- [58] R. Huisgen, M. Seidel, G. Wallbillich, H. Knupfer, *Tetrahedron* **1962**, *17*, 3-29.
- [59] B. D. Fairbanks, L. J. Macdougall, S. Mavila, J. Sinha, B. E. Kirkpatrick, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6915-6990.
- [60] P. Samers, *Chem. Soc. Rev.* **1970**, *24*, 37-68.
- [61] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
- [62] M. A. Tasdelen, Y. Yagci, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 5930-5938.
- [63] R. Huisgen, M. Seidel, J. Sauer, J. McFarland, G. Wallbich, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 892-893.
- [64] L. Garanti, A. Sala, G. Zecchi, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1389-1392.
- [65] Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J. S. Lee, S. Q. Yao, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 2002-2006.
- [66] J. Gao, Q. Xiong, X. Wu, J. Deng, X. Zhang, X. Zhao, P. Deng, Z. Yu, *Commun. Chem.* **2020**, *3*.
- [67] H. Zhang, M. Fang, Q. Lin, *Top. Curr. Chem.* **2023**, *382*.
- [68] Z. Yu, L. Y. Ho, Q. Lin, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 11912-11915.

Literaturverzeichnis

- [69] J. Wang, W. Zhang, W. Song, Y. Wang, Z. Yu, J. Li, M. Wu, L. Wang, J. Zang, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14812-14818.
- [70] W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654-9655.
- [71] Y. Wu, G. Guo, J. Zheng, D. Xing, T. Zhang, *ACS Sens* **2019**, *4*, 44-51.
- [72] Z. Yu, R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 13325-13329.
- [73] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600-10604.
- [74] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527-7538.
- [75] B. Lehmann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7579-7582.
- [76] Z. Yu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4153-4156.
- [77] G. S. Kumar, Q. Lin, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200175.
- [78] X. S. Wang, Y.-J. Lee, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3176-3179.
- [79] J. A. Zahra, B. A. Abu Thaher, M. M. El-Abadelah, R. Boese, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 822-825.
- [80] A. Herner, J. Marjanovic, T. M. Lewandowski, V. Marin, M. Patterson, L. Miesbauer, D. Ready, J. Williams, A. Vasudevan, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14609-14615.
- [81] Y. Zhang, W. Liu, Z. Zhao, *Molecules* **2014**, *19*, 306-315.
- [82] P. An, Q. Lin, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 5241-5244.
- [83] P. An, T. M. Lewandowski, T. G. Erbay, P. Liu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4860-4868.
- [84] C. P. Ramil, Q. Lin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 89-95.
- [85] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9920-9922.
- [86] P. Lederhose, K. N. R. Wüst, C. Barner-Kowollik, J. P. Blinco, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5928-5931.
- [87] L. Rieger, B. Pfeuffer, H.-A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.* **2023**, *4*, 1037-1042.
- [88] Y. Li, H. Fu, *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 835-853.
- [89] E. H. P. Leunissen, M. H. L. Meuleners, J. M. M. Verkade, J. Dommerholt, J. G. J. Hoenderop, F. L. Van Delft, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1446-1451.
- [90] F. Thalhammer, U. Wallfahner, J. Sauer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851-6854.
- [91] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [92] P. R. Khoury, J. D. Goddard, W. Tam, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8103-8112.
- [93] K. B. Wiberg, W. J. Bartley, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 6375-6380.
- [94] G. L. Closs, L. E. Closs, W. A. Boll, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3796-3800.
- [95] J. Yang, J. Šečkutè, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476-7479.
- [96] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10752-10756.
- [97] D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H. W. Shih, K. N. Houk, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13680-13683.
- [98] N. Seul, D. Lamade, P. Stoychev, M. Mijic, R. T. Michenfelder, L. Rieger, P. Geng, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2024**, *136*.
- [99] P.-W. Xu, J.-S. Yu, C. Chen, Z.-Y. Cao, F. Zhou, J. Zhou, *ACS Catalysis* **2019**, *9*, 1820-1882.
- [100] C. P. Ramil, M. Dong, P. An, T. M. Lewandowski, Z. Yu, L. J. Miller, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13376-13386.
- [101] P. An, H.-Y. Wu, T. M. Lewandowski, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 14005-14008.
- [102] R. Xie, S. Hong, X. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 747-752.
- [103] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14846-14851.

Literaturverzeichnis

- [104] H. G. Gratzner, R. C. Leif, D. J. Ingram, A. Castro, *Exp Cell Res* **1975**, *95*, 88-94.
- [105] X. Tang, D. L. Falls, X. Li, T. Lane, M. B. Luskin, *J Neurosci* **2007**, *27*, 5837-5844.
- [106] Z. Darzynkiewicz, G. Juan, *Curr. Protoc. Cytom.* **1997**, *2*.
- [107] M. Kubota, S. Nainar, S. M. Parker, W. England, F. Furche, R. C. Spitale, *ACS Chem Biol* **2019**, *14*, 1698-1707.
- [108] H. Zhao, H. D. Halicka, J. Li, E. Biela, K. Berniak, J. Dobrucki, Z. Darzynkiewicz, *Cytometry Part A* **2013**, *83*, 979-988.
- [109] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789-793.
- [110] U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9168-9172.
- [111] D. Ganz, P. Geng, H. A. Wagenknecht, *ACS Chem Biol* **2023**, *18*, 1054-1059.
- [112] T. K. Kim, J. H. Eberwine, *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 3173-3178.
- [113] P. Washbourne, A. K. McAllister, *Curr Opin Neurobiol* **2002**, *12*, 566-573.
- [114] S. L. Holmen, M. W. Vanbrocklin, R. R. Eversole, S. R. Stapleton, L. C. Ginsberg, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1995**, *31*, 347-351.
- [115] Z. Zawada, A. Tatar, P. Mocilac, M. Buděšínský, T. Kraus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9891-9895.
- [116] J. B. Rothbard, E. Kreider, C. L. VanDeusen, L. Wright, B. L. Wylie, P. A. Wender, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3612-3618.
- [117] A. Spampinato, E. Kužmová, R. Pohl, V. Sýkorová, M. Vrábel, T. Kraus, M. Hocek, *Bioconjugate Chem.* **2023**, *34*, 772-780.
- [118] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [119] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [120] L. Good, R. Sandberg, O. Larsson, P. E. Nielsen, C. Wahlestedt, *Microbiology* **2000**, *146*, 2665-2670.
- [121] P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624-630.
- [122] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1997**, *240*, 778-782.
- [123] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 3-7.
- [124] V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 404-412.
- [125] S. N. Oyaghire, E. Quijano, J. D. R. Perera, H. K. Mandl, W. M. Saltzman, R. Bahal, P. M. Glazer, *Cell Rep. Phys. Sci* **2023**, *4*, 101635.
- [126] P. Bhingardeva, B. R. Madhanagopal, H. Naick, P. Jain, M. Manoharan, K. Ganesh, *J Org Chem* **2020**, *85*, 8812-8824.
- [127] T. Vilaivan, C. Suparpprom, P. Harnyuttanakorn, G. Lowec, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533-5536.
- [128] C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, *Artif DNA PNA XNA* **2011**, *2*, 50-59.
- [129] P. E. Nielsen, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 786-804.
- [130] C. Ananthanawat, T. Vilaivan, V. P. Hoven, X. Su, *Biosens Bioelectron* **2010**, *25*, 1064-1069.
- [131] K. Siri Wong, P. Chuichay, S. Saen-oon, C. Suparpprom, T. Vilaivan, S. Hannongbua, *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *372*, 765-771.
- [132] T. Vilaivan, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1645-1656.
- [133] H. Pansuwan, B. Ditmangklo, C. Vilaivan, B. Jiangchareon, P. Pan-In, S. Wanichwecharungruang, T. Palaga, T. Nuanyai, C. Suparpprom, T. Vilaivan, *Bioconjug Chem* **2017**, *28*, 2284-2292.

Literaturverzeichnis

- [134] P. R. Bohländer, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, *OBC* **2015**, *13*, 9223–9230.
- [135] L. Jin, R. V. Lloyd, *J. Clin. Lab. Anal.* **1997**, *11*, 2-9.
- [136] J. G. Gall, M. L. Pardue, *Proc Natl Acad Sci* **1969**, *63*, 378-383.
- [137] M. L. Pardue, J. Gall, *Proc Natl Acad Sci* **1969**, *64*, 600-604.
- [138] P. R. Langer-Safer, M. Levine, D. C. Ward, *Proc Natl Acad Sci* **1982**, *79*, 4381-4385.
- [139] S. D. Kenneth R. Luehrsen, Yun Ji Lee, Riaz Rouhani, 1 Ali Soleimani, Teresa Raich, Carol A. Cain, Ellen J. Collarini, Douglas T. Yamanishi, Jennifer Pearson, Kerry Magee, Mary Rose Madlansacay, Veeraiah Bodepudi, David Davoudzadeh, Paula A. Schueler, and Walt Mahoney, *J Histochem Cytochem* **2000**, *48*, 133–145.
- [140] J. M. Levsky, R. H. Singer, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2833-2838.
- [141] J. W. J. G. J. Bauman, P. Borst, P. van Duijn, *Exp. Cell Res.* **1980**, *128*, 485-490.
- [142] F. S. F. A. M. Femino, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
- [143] A. Raj, P. Van Den Bogaard, S. A. Rifkin, A. Van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 877-879.
- [144] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [145] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684.
- [146] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 187-191.
- [147] V. Borsenberger, M. Kukwikila, S. Howorka, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3826–3835.
- [148] J. Bijapur, S. Bergqvist, T. Brown, M. D. Keppler, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res* **1999**, *27*, 1802-1809.
- [149] J. Steinmeyer, H. A. Wagenknecht, *Bioconjug Chem* **2018**, *29*, 431-436.
- [150] D. P. Geng, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss., **2023**.
- [151] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458.
- [152] J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917-6920.
- [153] A. Meijer, S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8989-8994.
- [154] A. Fürstenberg, *CHIMIA* **2017**, *71*, 26.
- [155] F. Hovelmann, O. Seitz, *Acc Chem Res* **2016**, *49*, 714-723.
- [156] J. Maillard, K. Klehs, C. Rumble, E. Vauthey, M. Heilemann, A. Fürstenberg, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 1352-1362.
- [157] H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederwieser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827-10829.
- [158] D. Krois, Springer Berlin Heidelberg, **2017**, pp. 85-105.
- [159] K. Krell, B. Pfeuffer, F. Rönicke, Z. S. Chinoy, C. Favre, F. Friscourt, H.-A. Wagenknecht, *Chemistry* **2021**, *27*, 16093–16097.
- [160] Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5330-5333.
- [161] G. S. Kumar, S. Racioppi, E. Zurek, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 57–62.
- [162] D. H. Ess, K. N. Houk, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 10187–10198.
- [163] C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216-2230.
- [164] Y. Matsumura, H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *195*, 298-308.
- [165] G. Molteni, A. Ponti, *Molecules* **2017**, *22*.
- [166] K. Dr. Nicola Seul, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Diss. , **2024**.
- [167] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Organic letters* **2006**, *8*, 1897-1900.
- [168] aAtto-Tec, 2021 ed., <https://www.atto-tec.com/ATTO-647N.html?language=de>, **19.08.2024 13:00**; bantibodies.com, 2015 ed., <https://www.antibodies.com/de/cyanine-3-azide-a270141>, **19.08.2024 13:00**.

Literaturverzeichnis

- [169] R. C. Miller, C. P. Aplin, T. M. Kay, R. Leighton, C. Libal, R. Simonet, A. Cembran, A. A. Heikal, A. J. Boersma, E. D. Sheets, *J Phys Chem B* **2020**, *124*, 3447-3458.
- [170] J.-L. Mergny, A. S. Boutorine, T. Garestier, F. Belloc, M. Rougée, N. V. Bulychiev, A. A. Koshkin, J. Bourson, A. V. Lebedev, B. Valeur, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res* **1994**, *22*, 920-928.
- [171] Vanessa Laura Gerber; Universität Heidelberg; Diss., **2019**.
- [172] D. H. Hilko, L. F. Bornaghi, S. A. Poulsen, *J Org Chem* **2018**, *83*, 11944-11955.

11 Appendix

Publikationen

“Two-Factor Fluorogenic Cyanine-Styryl Dyes with Yellow and Red Fluorescence for Bioorthogonal Labelling of DNA”, **B. Pfeuffer**, P. Geng, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem*, **2024**, 25, e202300739.

„Metabolic labelling of DNA in cells by means of the “photoclick” reaction triggered by visible light”, L. Rieger, **B. Pfeuffer**, H.-A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.*, **2023**, 4, 1037-1042.

“Fast and Efficient Postsynthetic DNA Labeling in Cells by Means of Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloadditions”, K. Krell, **B. Pfeuffer**, F. Rönicke, Z. S. Chinoy, C. Favre, F. Friscourt, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, **2021**, 27, 16093-16097.

Konferenzen

09/21	Nukleinsäuretreffen, DNG, Bad Herrenalb
11/21	GRK 2039 Retreat, Freudenstadt, Lauterbad
07/22	GRK 2039 Retreat, Freudenstadt, Lauterbad
09/23	Nukleinsäuretreffen, DNG, Würzburg
03/24	GRK 2039 Retreat, Freudenstadt, Lauterbad

Auslandsaufenthalt

04-06/23	Auslandsaufenthalt an der Chulalongkorn Universität, Bangkok, Thailand
----------	--

Appendix

Lehre

SS 2021	Organisch-chemisches Grundpraktikum
WS 2021/22	Organisch-chemisches Grundpraktikum
	Organisch-chemisches Fortgeschrittenenpraktikum
SS 2022	Organisch-chemisches Fortgeschrittenenpraktikum
WS 2022/23	Organisch-chemisches Grundpraktikum
	Organisch-chemisches Fortgeschrittenenpraktikum
WS 2023/24	Organisch-chemisches Grundpraktikum
	Organisch-chemisches Fortgeschrittenenpraktikum
SS 2024	Organisch-chemisches Fortgeschrittenenpraktikum
	Organisch-chemisches Fortgeschrittenenpraktikum