

Biokonjugation

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63, e202403044

doi.org/10.1002/anie.202403044

Cyclopropene als Chemische Reporter für die Duale Bioorthogonale und Orthogonale Metabolische Markierung von DNA

Nicola Seul, Dennis Lamade, Petko Stoychev, Michaela Mijic, Rita T. Michenfelder, Lisa Rieger, Philipp Geng, und Hans-Achim Wagenknecht*

Abstract: Die duale bioorthogonale Markierung ermöglicht die Untersuchung und das Verständnis von Wechselwirkungen in der biologischen Umgebung, die mit einer einzigen Markierung nicht zugänglich sind. Eine Herausforderung bleibt jedoch die Anwendung von zwei bioorthogonalen Reaktionen in der gleichen Umgebung aufgrund von Kreuzreaktivität. Um dieses Problem für die duale und orthogonale Markierung von DNA zu lösen, haben wir zwei unterschiedlich modifizierte 2'-Desoxynukleoside entwickelt. Mit Hilfe der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf und Photoklick-Reaktion wurde genomische DNA in Zellen mit zwei verschiedenen fluorogenen Markern verknüpft. Aus einer kleinen synthetischen Bibliothek aus 1- und 3-methylcyclopropenyl-modifizierten 2'-Desoxynukleosiden wurden zwei 2'-Desoxyuridine identifiziert, die am schnellsten in jeweils einer der beiden bioorthogonalen Reaktionen reagieren. Ihre orthogonale Reaktivität konnte in vitro nachgewiesen werden. Ihre Replikationseigenschaften als Ersatz für Thymidin wurden in Primerverlängerungsexperimenten untersucht, um die anschließenden Markierungsreaktionen an DNA abzuschätzen. Schließlich wurde eine duale, orthogonale und metabolische Fluoreszenzmarkierung von genomischer DNA in HeLa-Zellen nachgewiesen. Es wurde ein experimentelles Protokoll entwickelt, das den intrazellulären Transport und den metabolischen DNA-Einbau der beiden 2'-Desoxyuridine mit der anschließenden dualen bioorthogonalen Markierung unter Verwendung eines fluorogenen Cyanin-Styryl-Tetrazins und eines fluorogenen Pyren-Tetrazols kombiniert. Diese Ergebnisse sind von grundlegender Bedeutung für fortgeschrittene metabolische Markierungsstrategien für Nukleinsäuren in der Zukunft, insbesondere in lebenden Zellen.

Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat sich die bioorthogonale Markierung zu einem wertvollen Instrument für die Untersuchung von Biomolekülen in lebenden Systemen entwickelt, das es uns ermöglicht, biologische Prozesse durch Bildgebung auf molekularer Ebene zu untersuchen.^[1] Die Methode beruht auf einer kleinen funktionellen Gruppe, dem chemischen Reporter, die in das anvisierte Biomolekül eingebaut wird, wodurch der störende Einfluss auf das lebende System auf ein Minimum beschränkt bleibt, bis das Biomolekül über eine bioorthogonale Reaktion mit einem Fluorophor markiert wird. Die bioorthogonale Reaktion muss bei physiologischer Temperatur und physiologischem pH-Wert mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit, Ausbeute und Selektivität ablaufen.^[2] Leistungsfähige bioorthogonale

Reaktionen wurden bereits für Proteine, Glykane und Nukleinsäuren entwickelt.^[3] Trotz dieser beträchtlichen Fortschritte erfordert die Untersuchung lebender biologischer Systeme häufig die gleichzeitige Bildgebung mehrerer Zielmoleküle. Die meisten biologischen Prozesse setzen die Interaktion verschiedener Biomoleküle voraus, daher müssen die Markierungsmethoden durch den Einsatz verschiedener bioorthogonaler Reaktionen auf mehrere Zielmoleküle ausgedehnt werden. Viele der bekannten bioorthogonalen Reaktionen führen jedoch, wenn sie in einem Topf kombiniert werden, zu unerwünschten Kreuzreaktionen. So werden beispielsweise sowohl bei der ringspannungsgetriebenen Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) als auch bei der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) gespannte Alkene oder Alkine als Ausgangsmaterial verwendet. Bereits mehrere Ansätze zur Kombination von bioorthogonalen und orthogonalen Reaktionspaaren wurden publiziert.^[4] Einer basiert auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, wie die Gruppe von Jaeschke erfolgreich gezeigt hat.^[5] Sie erreichte zwei verschiedene Markierungen an der DNA mit Hilfe der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) in Kombination mit der IEDDA-Reaktion. Wittmann et al. erreichten eine dreifach orthogonale Markierung von Zelloberflächenglykanen, indem sie CuAAC, SPAAC und die Photoklick-Reaktion verwendeten.^[6] Ein zweiter Ansatz besteht darin, Orthogonalität durch Modulation der Reaktivität funktioneller Gruppen zu erzeugen. Prescher et al. entdeckten, dass die Reaktivität von Methylcyclopropenen durch unterschiedli-

[*] M. Sc. N. Seul, Dr. D. Lamade, B. Sc. P. Stoychev, M. Sc. M. Mijic, M. Sc. R. T. Michenfelder, M. Sc. L. Rieger, Dr. P. Geng, Prof. Dr. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT),
Fritz-Haber-Weg 6, 76131 Karlsruhe, Deutschland
E-mail: Wagenknecht@kit.edu

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

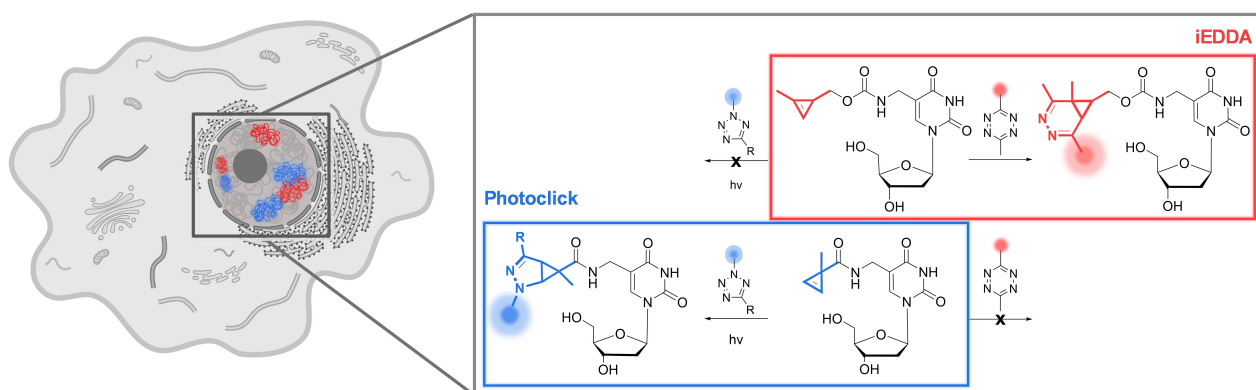


Abbildung 1. Duale bioorthogonale und orthogonale metabolische Markierung von DNA durch eine Kombination von IEDDA- und Photoclick-Reaktion unter Verwendung zweier isomerer Methylcyclopropene als 2'-Desoxyuridin-Modifikationen.

che Substitutionsmuster stark beeinflusst werden kann.^[7] 1-Methylcyclopropene sind gute Kandidaten für IEDDA-Reaktionen mit Tetrazinen.^[8] Eine Methylgruppe in der 3-Position des Cyclopropens führt jedoch zu einer sterischen Hinderung im Übergangszustand der IEDDA-Reaktion. Diese Moleküle lassen sich wiederum gut in Photoclick-Reaktionen mit Nitrilimin einsetzen, die in situ aus Tetrazolen erzeugt werden.^[7,9] Diese Reaktivität wird durch die Carboxylsubstituenten, die die Grenzorbitale absenken, weiter gefördert. Die metabolische Markierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der bioorthogonalen Chemie^[1a] wurde von der Gruppe von Salic^[10] mit der kupferkatalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition begonnen und wurde mit kupferfreien Reaktionen von den Gruppen von Luedtke^[11] und Spitale weiterentwickelt.^[12] Diese Studien zeigen, dass die Größe des chemischen Reporters der kritischste Parameter für eine effiziente metabolische Markierung von genomischer DNA ist; es gilt: je kleiner, desto besser. Kleine Reporter verursachen minimale Störungen im lebenden System und werden von den Stoffwechselenzymen besser toleriert. Im Vergleich zu reaktiveren, aber größeren chemischen Reportern, wie *trans*-Cycloocten, bieten Cyclopropene den besten Kompromiss aus geringer Größe und schneller Reaktivität.^[13] Darüber hinaus sind Cyclopropene aufgrund ihrer mäßigen Ringspannung in der zellulären Umgebung sowohl ausreichend stabil als auch reaktiv.^[8a,14] Unsere Gruppe hat bereits die Verwendung von 1-methylcyclopropenylmodifizierten Nukleosiden für die Markierung von DNA durch die IEDDA-Reaktion mit fluorogenen tetrazinmodifizierten Farbstoffen in vitro etabliert.^[15]

Auf der Basis dieser vielversprechenden Ergebnisse erweitern wir hier die Anwendungsbreite von Methylcyclopropenen als chemische Reporter für die fluoreszente Bildung von Nukleinsäuren (Abbildung 1). In dieser Arbeit beschreiben wir zum ersten Mal die duale bioorthogonale und orthogonale metabolische Markierung von DNA durch eine Kombination von IEDDA- und Photoclick-Reaktion unter Verwendung von zwei isomeren Methylcyclopropenen als kleine chemische Reporter. Im Vergleich zu früher veröffentlichten Beispielen für die duale Markierung von DNA ist diese Methode nicht auf die Verwendung von

zytotoxischen Kupfer- oder anderen Übergangsmetallkatalysatoren angewiesen.^[5,15b]

Resultate und Diskussion

Cyclopropenylmodifizierte 2'-Desoxynucleoside mit Orthogonaler Reaktivität

Die 2'-Desoxynucleoside **1–5** wurden mit 1-Methylcyclopropyl-Substituenten als funktionelle Gruppen für die IEDDA-Reaktionen mit Tetrazinen modifiziert (Abbildung 2, rot). Eine Carbamat- oder Harnstoffgruppe wurde neben dem Cyclopropen platziert, da sich gezeigt hat, dass elektronenschiebende Substituenten die Geschwindigkeit der IEDDA-Reaktion erhöhen.^[8a,14a] Bei den 2'-Desoxynucleosiden **6** und **7** wurde der 3-Methylcyclopropyl-Substituent als reaktive Gruppe über eine Carboxylgruppe verknüpft, um ihn für die Photoclick-Reaktion mit Nitrilimin elektronenärmer zu machen (Abbildung 2, blau). Die Nucleoside unterscheiden

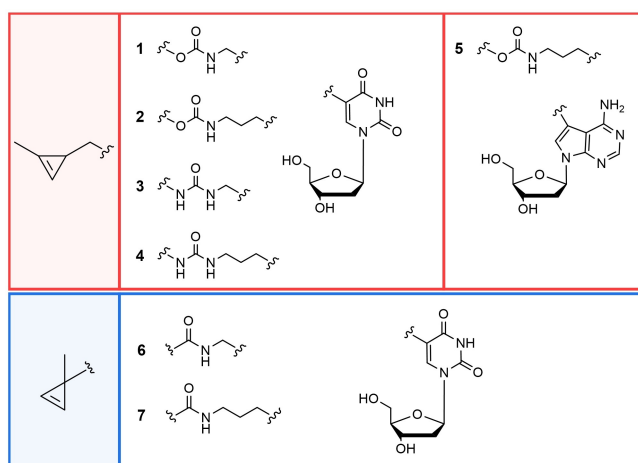


Abbildung 2. 1-Methylcyclopropenylmodifizierte 2'-Desoxynucleoside **1–5** für die IEDDA-Reaktion und 3-methylcyclopropenylmodifizierte 2'-Desoxyuridine **6** und **7** für die Photoclick-Reaktion.

sich durch die Länge des Linkers zwischen der DNA-Base und der reaktiven Gruppe, konkret der Methyl-Linker in **1**, **2** und **6** und der Propyl-Linker in **3–5** und **7**. Das Cyclopropen wurde an die 5-Position der 2'-Desoxyuridine (dU) geknüpft, mit Ausnahme von **5**, das ein 7-Desaza-2'-Desoxyadenosin (dZA) ist, das an der 7-Position modifiziert wurde, um den Einfluss der Nukleobase zu untersuchen. Der modulare Ansatz ermöglicht die schnelle Synthese dieser modifizierten 2'-Desoxynukleoside aus 5-Aminomethyl-, 5-Aminopropyl-2'-desoxyuridin oder 7-Aminopropyl-7-Desaza-2'-desoxyadenosin als Bausteine (siehe SI, Schema S1–S7). Die Cyclopropene waren synthetisch über eine rhodiumkatalysierte [2+1]-Cycloaddition eines TMS-geschützten Alkins mit einer Diazoverbindung zugänglich^[8b,9] und wurden mit dem Nukleosidbaustein in Form eines Cyclopropenylalkohols, -amins oder -carbonsäure gekoppelt, wobei je nach gewünschter Verknüpfung entweder Carbonyldiimidazol, *p*-Nitrophenylchlorameisensäureester oder *N*-Hydroxysuccinimid als Aktivator verwendet wurde.

Die Chemo Selektivität der 2'-Desoxynukleoside **1–5** in der IEDDA-Reaktion wurde unter Verwendung des dipyrityldisubstituierten Tetrazins **8** (Schema S8 und Abbildung S1–S5) untersucht. Bei diesem Tetrazin handelt es sich um ein in der Literatur bekanntes Standardsubstrat, das den Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten ermöglicht.^[8a,16] Die Geschwindigkeitskonstanten k_2 zweiter Ordnung wurden unter Bedingungen pseudoerster Ordnung mittels HPLC-Analyse bestimmt (Tabelle 1 und Abbildung S6–S10). Die Geschwindigkeitskonstanten k_2 für die IEDDA-Reaktion liegen im Bereich von $0.12–0.27 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und zeigen keinen signifikanten systematischen Effekt der strukturellen Variationen, weder durch die Linkerlängen (Methyl in **1–2** vs. Propyl in **3–5**) noch durch die Art der verknüpften Nukleobase (dU in **1–4** vs. dZA in **5**). Wir erwarteten, dass 1-Methylcyclopropene, die über Harnstoff gebunden sind, im Vergleich zu den entsprechenden Urethanderivaten reaktiver sind, was auf die stark elektronenschiebende Wirkung des Stickstoffs im Harnstoff zurückzuführen ist. Darüber hinaus haben Devaraj und Mitarbeiter gezeigt, dass 1-Methylcyclopropene mit einem benachbarten Stickstoffatom

in einem Amid schneller mit Tetrazinen reagieren als solche, die als Urethan mit einem Sauerstoffatom verknüpft sind.^[17] Ein solcher Effekt wurde jedoch bei den IEDDA-Reaktionen mit unseren 2'-Desoxynukleosiden nicht beobachtet. Die 2'-Desoxynukleoside **1** und **3** mit der Urethanverknüpfung zeigen eine ähnliche Reaktivität wie die 2'-Desoxynukleoside **2** und **4** mit der Harnstoffverknüpfung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das 2'-Desoxynukleosid **1** die schnellste IEDDA-Reaktivität zeigt. Daher haben wir uns in den folgenden Experimenten auf diesen Kandidaten konzentriert (siehe unten). Die Photoclick-Reaktion der 3-methylcyclopropenylmodifizierten 2'-Desoxynukleoside **6** und **7** wurde unter Verwendung von Tetrazol **9** durchgeführt, da es sich dabei um ein in der Literatur bekanntes Diaryltetrazol handelt (Schema S9 und Abbildung S11–S12).^[9] In der HPLC-Analyse (Abbildung S13–S14) ergeben die Photoclick-Reaktionen von **6** und **7** deutlich höhere Geschwindigkeitskonstanten k_2 zweiter Ordnung von 64.4 bzw. $31.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Da das 2'-Desoxynukleosid **6** die höchste Photoclick-Reaktivität aufweist, wurde es in den nachfolgenden Experimenten verwendet, um die Orthogonalität beider Reaktionen in vitro auszuarbeiten.

Die Orthogonalität der IEDDA-Reaktion und der Photoclick-Reaktion (Schema S10 und S11) wurde mit zwei identischen Proben einer äquimolaren Mischung der 2'-Desoxynukleoside **1** und **6** in PBS:MeCN (1:1) untersucht. Diese beiden 2'-Desoxyuridine wurden als die am schnellsten reagierenden in unserer kleinen Bibliothek identifiziert. Die HPLC- und LC-MS-Analyse der ersten Charge mit Tetrazin **8** ergab eine klare Selektivität für die Bildung des gewünschten IEDDA-Produkts **DA1–8** mit **1** und keine Kreuzreaktivität von **6** zu einem unerwünschten Produkt (Abbildung 3a). Die Photoclick-Reaktion in der zweiten Probe mit Tetrazol **9** zeigte ebenfalls eine hohe Selektivität für die Bildung des gewünschten Produkts **PC6–9** (Abbildung 3b). Zusammen zeigen die 2'-Desoxynukleoside **1** und **6** eine orthogonale Reaktivität, die die Voraussetzung für die duale bioorthogonale und metabolische Markierung in Zellen darstellt.

Primerverlängerungsexperimente und Fluoreszente Markierung der DNA in Vitro

Mit den beiden 2'-Desoxyuridinen **1** und **6** wurden Primerverlängerungsexperimente durchgeführt, um ihre Replikationseigenschaften als Ersatz für Thymidin zu prüfen und die anschließende IEDDA- und Photoclick-Markierung auf DNA-Ebene vorzubereiten (Schema S12). Die Synthese von Triphosphat **10** erfolgte nach der Ludwig-Eckstein-Methode^[18] und ist in den Hintergrundinformationen beschrieben (Schema S2). Ob sich **10** für den enzymatischen Einbau eignet, wurde zunächst in Running-Start-Experimenten mit dem Cy5-markierten Primer **P1**, Templat **T1** und drei verschiedenen kommerziell erhältlichen DNA-Polymerasen (Vent (exo–), Deep Vent (exo–) und Hemo KlenTaq) getestet. **10** wurde als Analogon für Thymidin von allen getesteten DNA-Polymerasen erkannt und bei 37°C innerhalb von 5 min Elongationszeit eingebaut (Abbildung 4a

Tabelle 1: Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung k_2 der IEDDA-Reaktion der 2'-Desoxynukleoside **1–5** mit Tetrazin **8** und der Photoclick-Reaktion von **6** und **7** mit Tetrazol **9**. Für die IEDDA-Reaktion wurden die 2'-Desoxynukleoside **1–5** (0.50 mM in PBS-Puffer:MeCN 1:1) mit Tetrazin **8** (0.10 mM) behandelt, bei Raumtemperatur inkubiert und stündlich mittels HPLC analysiert. Die Photoclick-Experimente wurden mit den 2'-Desoxynukleosiden **6** und **7** (0.50 mM in PBS:MeCN 1:1) und Tetrazol **9** (0.10 mM) durchgeführt und mit einer 308-nm-LED bei 20°C 600 s lang bestrahlt, wobei alle 60 s eine Probe gesammelt wurde.

	Selektivität	$k_2 [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$
1	IEDDA-Reaktion mit 8	0.27 ± 0.02
2	IEDDA-Reaktion mit 8	0.12 ± 0.01
3	IEDDA-Reaktion mit 8	0.13 ± 0.03
4	IEDDA-Reaktion mit 8	0.14 ± 0.01
5	IEDDA-Reaktion mit 8	0.27 ± 0.01
6	Photoclick-Reaktion mit 9	64.4 ± 5.0
7	Photoclick-Reaktion mit 9	31.8 ± 1.1

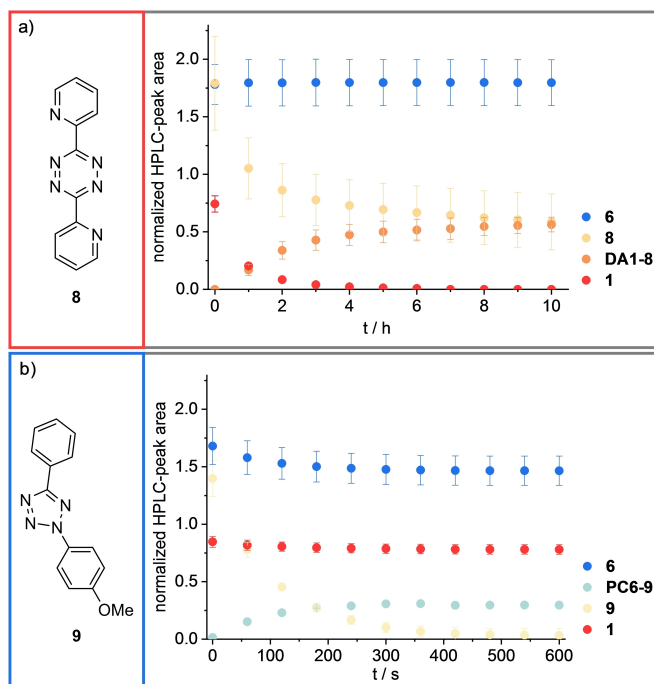


Abbildung 3. Orthogonale Reaktivität von **1** und **6**, analysiert mittels HPLC. Eine Mischung aus **1** und **6** (0.50 mM in PBS:MeCN 1:1) wurde mit 0.50 mM Tetrazin **8** (a) oder 0.50 mM Tetrazol **9** (b) versetzt. Die IEDDA-Reaktionsmischung wurde 10 h bei r. t. inkubiert. Die Photoclick-Reaktionsmischung wurde 10 min bei 20°C mit einer 308 nm-LED bestrahlt. Die normalisierten HPLC-Peakflächen von **1**, **6** und **8**, **9** sowie das IEDDA-Produkt **DA1-8** und das Photoclick-Produkt **PC6-9** wurden gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

und S15). Die Cyclopropenyl-Modifikation wird also gut toleriert und hat keinen Einfluss auf die Aktivität dieser Enzyme. Für die anschließenden postsynthetischen Markierungsexperimente wurde **P1** mit Deep Vent (exo-) Polymerase bei 37°C für 30 min in Gegenwart von **10** verlängert, um das Produkt in voller Länge zu erhalten. Das cyclopropenylmodifizierte Oligonukleotid wurde dann entsalzt, gefriergetrocknet, wieder gelöst und mit einem 1000-fachen Überschuss des Tetrazin-Farbstoff-Konjugats **11** markiert. Diese Farbstoffe wurden speziell für die Markierung von DNA entwickelt und zeigen eine sehr deutliche Beschleunigung der Reaktion im Vergleich von einzelnen Nukleosiden und DNA, wobei Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $284.000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreicht wurden.^[19] Bei der anschließenden PAGE-Analyse wurde eine neue Gelbande mit geringerer Gelmobilität nachgewiesen, was auf eine erfolgreiche IEDDA-Markierung hinweist (Abbildung 4b). Die Produktbildung wird außerdem durch die zusätzliche Fluoreszenz der Bande im spezifischen Emissionsbereich des Cyanin-Styryl-Farbstoffs **11** belegt. Bemerkenswerterweise wurde in der Probe, die unmittelbar nach der Zugabe von **11** entnommen wurde, bereits kein Ausgangsmaterial mehr gefunden, was eine quantitative Markierung des DNA-Strangs innerhalb von Minuten zeigt. Der große Überschuss des Reaktionspartners wurde verwendet, um einen direkten Vergleich mit unseren früher veröffentlichten Primerverlängerungsexperimenten zu ermöglichen.^[15] Zusätzliche Experimente mit **1**, **2**,

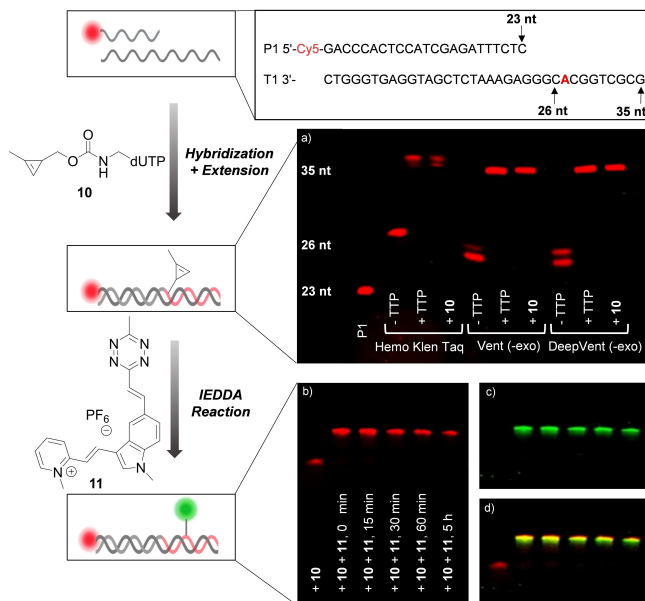


Abbildung 4. Primerverlängerungsexperimente mit 2'-Desoxyuridintriphosphat **10** und anschließender Markierung mit dem Tetrazin-Farbstoff **11** mittels IEDDA-Reaktion, analysiert durch PAGE. a) Nach der Hybridisierung mit **T1** wurde **P1** mit Hemo KlenTaq, Vent (exo-) und Deep Vent (exo-) Polymerase bei 37°C für 30 min verlängert (–TTP: Negativkontrollen mit nur dATP, dCTP und dGTP in der Primerverlängerungsmischung; +TTP: Positivkontrollen mit unmodifizierten dNTPs; +**10**: TTP wurde durch **10** ersetzt. b)–c) Für IEDDA-Experimente wurde das Verlängerungsprodukt entsalzt, gefriergetrocknet, in H₂O wieder aufgelöst und mit **11** (1000 Äquiv.) für die angegebenen Zeiträume inkubiert. a) und b) $\lambda_{\text{exc}} = 630 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \pm 20 \text{ nm}$; c) $\lambda_{\text{exc}} = 470 \pm 20 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 \pm 20 \text{ nm}$; d) Überlagerung von b) und c).

5, **10** und **100** Äquiv. von **11** zeigten, dass auch ein fünffacher Überschuss von **11** für die Markierung des Primerverlängerungsprodukts unmittelbar nach der Zugabe des Reaktionspartners ausreicht (Abbildung S16).

Für die Photoclick-Markierung wurden entsprechende Experimente mit Triphosphat **12**, das aus 2'-Desoxynukleosid **6** hergestellt wurde, durchgeführt (Abbildung 5). In Running-Start-Experimenten wurde das Volllängenprodukt erhalten, wenn **P1** in Gegenwart von **12** mit den drei bereits zuvor verwendeten Polymerasen verlängert wurde, was zeigt, dass **12** als Thymidinersatz akzeptiert wird. Die anschließende Photoclick-Markierung wurde mit dem Pyren-Tetrazol-Konjugat **13** versucht. Dieser Farbstoff kann durch sichtbares Licht (405/450 nm LEDs) photoaktiviert werden und die anschließende Reaktion des Nitrilimins ist fluorogen.^[3c] Die postsynthetischen DNA-Markierungsversuche waren jedoch nicht erfolgreich, weder mit Tetrazol **13** noch mit **9**, wahrscheinlich, weil die Oligonukleotide in MeCN unlöslich sind. Aus unseren Photoclick-Experimenten in vitro und in Zellen wissen wir, dass für diese Chemie wässrige Mischungen mit großen Anteilen organische Lösungsmittel erforderlich sind, wobei MeCN am besten geeignet ist.^[3c] Obwohl es sich hier um ein Experiment mit negativem Resultat handelt, ist es ein wichtiges Ergebnis, weil es uns geholfen hat, das Protokoll für die doppelte

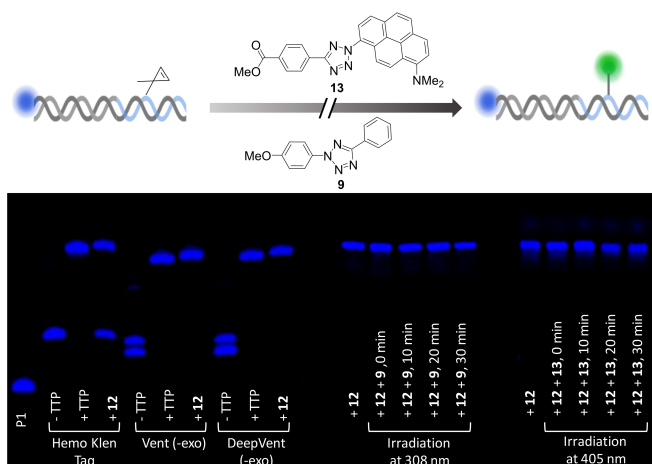


Abbildung 5. Primerverlängerungsexperimente mit dem 2'-Desoxyurid-triphosphat **12** und Photoclick-Markierungen mit den Tetrazolen **9** und **13**, analysiert durch PAGE. **P1** wurde mit **T1** hybridisiert und mit den angegebenen Polymerasen bei 37 °C für 30 min verlängert. Positiv- und Negativkontrollen wurden mit bzw. ohne Zugabe von TTP durchgeführt. Für Markierungsexperimente wurde das Verlängerungsprodukt von **P1** mit Deep Vent (exo-) Polymerase bei 37 °C für 30 min hergestellt. Die Proben wurden entsalzt, gefriergetrocknet und in PBS-Puffer wieder aufgelöst. Tetrazol **9** oder **13** (1000 Äquiv.) wurde hinzugefügt und die Mischungen wurden für die angegebenen Zeiträume bei 308 nm bzw. 405 nm bestrahlt.

metabolische Markierung in der zellulären Umgebung anzupassen, wie unten beschrieben.

Metabolische Markierung von DNA

Zur Vorbereitung des metabolischen Einbaus der Nukleoside **1** und **6** in die zelluläre DNA für die anschließende duale bioorthogonale Markierung untersuchten wir zunächst ihre zelluläre Toxizität mittels MTT-Test (Abbildung S17). Nach 48-stündiger Inkubation mit beiden 2'-Desoxynukleosiden in einer Konzentration von 0.50 mM wurde eine Zellviabilität von über 75 % festgestellt. Bei 0.10 mM wurde keine Toxizität mehr beobachtet, was der Konzentration entspricht, die in den folgenden Zellexperimenten verwendet wurde. Um die metabolische Markierungseffizienz zu erhöhen, wurden die Zellen durch unsere kürzlich veröffentlichten und optimierten Zellkulturbedingungen gezwungen, die modifizierten 2'-Desoxyuridine **1** und **6** einzubauen.^[13] HeLa-Zellen wurden in minimalem essentiellen Medium (MEM- α) ohne Nukleoside und L-Glutamin kultiviert. Letzteres ist bekanntlich eine wesentliche Stickstoffquelle für die zelluläre Nukleosidbiosynthese.^[20] Die metabolische Markierung genomischer DNA über die IEDDA- und die Photoclick-Reaktion unter Verwendung der 2'-Desoxynukleoside **1** und **6** wurde zunächst für jede Reaktion separat untersucht. Bei den ersten Experimenten zur metabolischen Markierung mit IEDDA wurden die Zellen 48 h mit 0.10 mM **1** inkubiert, um mindestens eine Zellteilung zu gewährleisten. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit dem Tetrazin-Cyanin-Styryl-Farbstoff **11** (Abbildung S18) inkubiert, der

den Vorteil hat, dass er eine fluorogene Eigenschaft aufweist und somit zusätzliche Waschschritte überflüssig macht.^[19] Es wurde jedoch keine Färbung des Zellkerns beobachtet, was durch die ineffiziente Metabolisierung des modifizierten Nukleosids oder die schlechten Zugänglichkeit der Cyclopropenylgruppe in der Chromatinstruktur erklärt werden könnte. Um die letztgenannte Frage zu klären, führten wir vor der Markierungsreaktion einen Denaturierungsschritt in den Zellen durch (Abbildung S19), aber auch hier wurde keine Färbung beobachtet. In diesem Zusammenhang könnte auch die Instabilität der Cyclopropenyl-Gruppe unter den stark sauren Bedingungen, die für die DNA-Denaturierung verwendet werden, problematisch sein. Wir haben kürzlich gezeigt, dass die Größe der reaktiven Gruppe für IEDDA-Reaktionen die Effizienz der metabolischen Markierung von DNA erheblich beeinflusst.^[13] Es ist auch bekannt, dass die kritischsten Enzyme im zellulären Nukleosidstoffwechsel die Kinasen sind, die die 2'-Desoxynukleoside in die entsprechenden Triphosphate umwandeln.^[5b] Um die kritische Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen zu umgehen und dadurch möglicherweise die Inkorporationseffizienz zu erhöhen, beschlossen wir, **1** synthetisch in das Triphosphat **10** umzuwandeln und es mithilfe eines von Kraus und Mitarbeitern entwickelten synthetischen Nukleosidtriphosphat-Transporters (SNTT) in HeLa-Zellen einzuschleusen.^[21] Kürzlich wurde dieser Transporter von Hocek et al. erfolgreich für die Einführung von 2'-Desoxynukleotiden, die mit großen funktionellen Gruppen modifiziert wurden, in die zelluläre DNA eingesetzt, um die naszierende DNA während der Zellteilung abzubilden.^[22] HeLa-Zellen wurden dafür 10 min mit dem modifizierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphat **10** (10 μ M) und SNTT (10 μ M) in Tricin-Puffer inkubiert. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit in MEM- α -Medium ohne Glutamin und Nukleoside wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit dem Tetrazin-Cyanin-Styryl-Farbstoff **11** behandelt. Die Zellen zeigten eine deutliche Fluoreszenzfärbung im Zellkern (Abbildung S20). Kontrollversuche mit ausschließlich **10** oder **11** und **10** ohne SNTT zeigten keine Fluoreszenz, was auf eine erfolgreiche Markierungsreaktion der mit 1-Methylcyclopropenen modifizierten zellulären DNA hinweist. Die Lokalisierung der beobachteten Fluoreszenz in der zellulären DNA wurde durch Kofärbung mit Hoechst als DNA-spezifischer Farbstoff bestätigt (Abbildung S21), was ein weiterer Beleg für den metabolischen Einbau des modifizierten Substrats in die genomische DNA ist. Zusätzliche Waschschritte waren aufgrund der starken Fluorogenität von **11** nicht erforderlich. Im Vergleich zu unserer kürzlich veröffentlichten metabolischen Markierung unter Verwendung eines 1-methylcyclopropenylmodifizierten 2'-Desoxyuridins mit einem längeren Alkyl-Linker^[13] führt der Einbau und die Markierung von **10** mit dem SNTT zu einem intensiveren Fluoreszenzsignal (Abbildung S22). Um die metabolische Markierung mittels Photoclick-Reaktion unter Verwendung des modifizierten 2'-Desoxynukleotids **6** zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen 48 h mit 0.10 mM **6** inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, einer HCl-Denaturierung unterzogen, 1 h mit Pyren-Tetrazol **13** (30 μ M) inkubiert und 20 min mit einer 405-nm-LED bestrahlt. Da die Photolyse des Tetrazols die

Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln erfordert, wurde **13** als Lösung in MeCN bereitgestellt. Im Gegensatz zu **1** wurde **6** vom zellulären Stoffwechsel aufgenommen und Zellbilder zeigten eine starke Fluoreszenz im Zellkern im Bereich von 420 nm bis 470 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm) (Abbildung S23). Der metabolische Einbau von **6** wurde durch Anfärben der zellulären DNA mit DRAQ5 weiter bestätigt, wobei eine starke Kolorisierung beider fluoreszierender Sonden beobachtet wurde (Abbildung S24). Mit beiden Markierungsverfahren in der Hand gingen wir zu den dualen metabolischen Markierungsexperimenten über, bei denen wir die 3-Methylcyclopropenyl-Gruppe über das Nukleosid **6** und das 1-Methylcyclopropen über das Triphosphat **10** mit SNTT in DNA einbauen ließen (Abbildung 6a). Die Kontrollexperimente zur Untersuchung der Chemo-selektivität der isomeren Cyclopropene in einer zellulären Umgebung wurden zunächst in zwei getrennten Versuchen durchgeführt. Um eine eindeutige Detektion der beiden unterschiedlich markierten Produkte in getrennten Fluoreszenz-auslesekanälen zu gewährleisten, verwendeten wir den mit tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl-Farbstoff **14** (Schema S13), eine modifizierte Version von **11**, die ein Chinolin anstelle von Pyridin trägt und eine charakteristische Fluoreszenz von 600 bis 650 nm aufweist.^[23] Nach dem Transport von Triphosphat **10** in die Zelle unter Verwendung des SNTT im ersten Kontrollexperiment zeigte die anschließende Markierung mit Tetrazol **13** keine signifikante Fluoreszenz in den Zellkernen (Abbildung 6b). Bei **6** wurde jedoch eine Fluoreszenzfärbung beobachtet (Abbildung 6c), was beweist, dass die Photoclick-Reaktion spezifisch mit der DNA, die durch mit den 3-Methylcyclopropenen von **6** metabolisch modifiziert wurde, funktioniert. Im zweiten Kontrollexperiment wurden HeLa-Zellen mit dem 2'-Desoxynukleosid **6** versetzt und mit dem Tetrazin-Farbstoff **14** inkubiert. Auch hier konnte mikroskopisch keine signifikante Fluoreszenz in den Zellen festgestellt werden (Abbildung 6d), während die Markierung mit **10** und **14** zu einer signifikanten Kernfärbung führte (Abbildung 6e). Beide Kontrollexperimente zusammengekommen belegen die Orthogonalität von Photoclick- und IEDDA-Markierung in der Zelle. Um schließlich die duale und orthogonale Markierung genomischer DNA nachzuweisen, wurde der folgende Arbeitsablauf etabliert, der alle notwendigen intrazellulären Transport- und Markierungsschritte kombiniert. HeLa-Zellen wurden 48 h mit dem 2'-Desoxynukleosid **6** (100 μM) inkubiert und anschließend mit einer Lösung von **10** (10 μM) und SNTT (10 μM) in Tricin-Puffer behandelt. Nach nur 2-stündiger Inkubation im Medium wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit dem Tetrazin-Farbstoff **14** (1 μM in MEM) behandelt, um die IEDDA-Markierung zu ermöglichen. Anschließend wurde die genomische DNA einer HCl-Denaturierung unterzogen, und schließlich wurden die Zellen in Gegenwart des Tetrazol-Farbstoffs **13** (30 μM in MeCN) bei 405 nm bestrahlt, um die Photoclick-Markierung zu induzieren. Die Bilder dieser Zellen zeigten eine starke Fluoreszenz im Zellkern in beiden Emissionskanälen (Abbildung 6f; 600–650 nm für die IEDDA-markierte DNA und 420–470 nm für die Photoclick-Produkte). Besonders bemerkenswert ist, dass sich die Fluoreszenzsignale

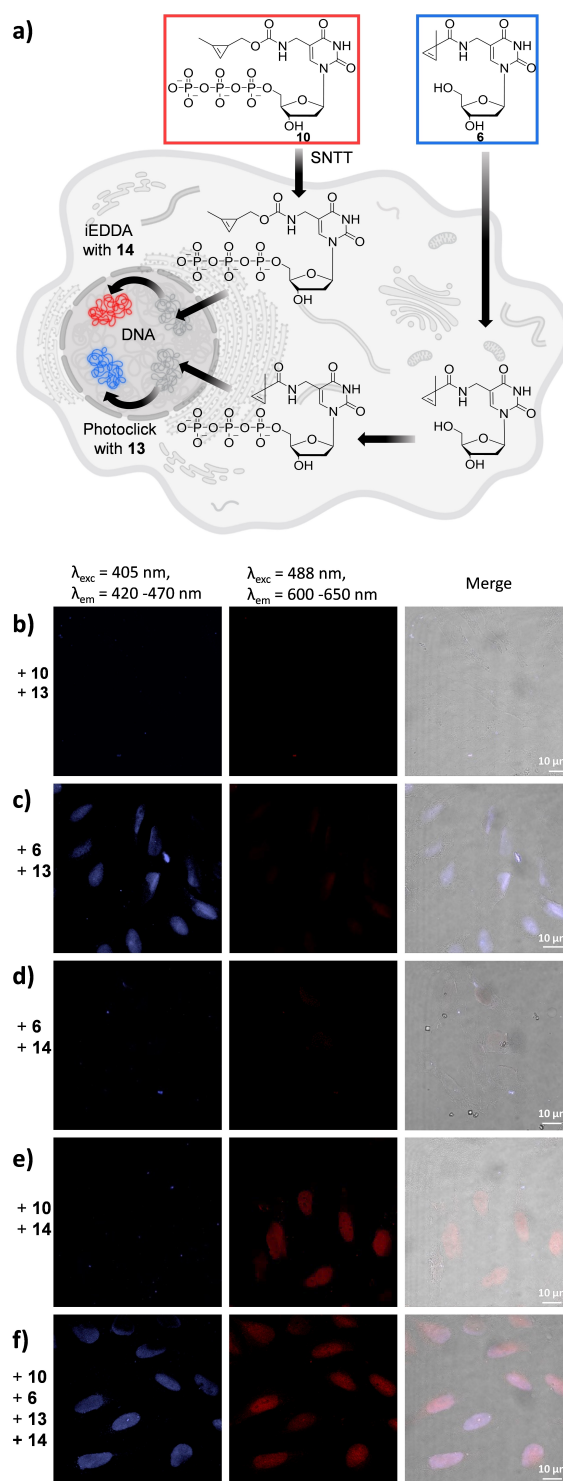


Abbildung 6. a) Duale und orthogonale metabolische Markierung von DNA unter Verwendung von 2'-Desoxynukleosidtriphosphat **10** für die IEDDA-Reaktion und 2'-Desoxynukleosid **6** für die Photoclick-Reaktion; b)–e) Chemo-selektive Reaktivität isomerer Cyclopropene in HeLa-Zellen. f) Duale Markierung mit orthogonaler IEDDA- und Photoclick-Reaktion in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit **6** (100 μM) inkubiert und anschließend 10 min mit **10** (10 μM) und SNTT in Tricinpuffer behandelt. Nach einer Inkubation in MEM für 2 h wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit **14** (1 μM in MEM) behandelt. Die Zellen wurden einer Permeabilisierung und DNA-Denaturierung unterzogen und nach 1-stündiger Inkubation in Gegenwart von **13** für 20 min bestrahlt.

nicht vollständig überlagern, was das Ergebnis einer erfolgreichen doppelten Markierung der genomischen DNA mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern bestätigt. Obwohl es sich bei beiden Substraten um modifizierte Thymidine handelt und sie denselben zellulären Weg durchlaufen, gehen wir davon aus, dass die chemischen Reporter aufgrund der unterschiedlichen metabolischen Markierungsansätze nicht während derselben Zellteilung eingebaut werden. Die sequentielle Inkubation der Zellen, zunächst 48 h mit dem 2'-Desoxynukleosid **6**, das zur Phosphorylierung den Kinaseweg durchlaufen muss, und dann 2 h mit dem 2'-Desoxynukleosidtriphosphat **10**, führt zum Einbau beider Substrate zu unterschiedlichen Zeitpunkten für jede Zelle. Alle Kontrollversuche ohne **10**, **6**, **13** und/oder **14** führen zu keiner signifikanten Fluoreszenz innerhalb der Zellen (Abbildung S25).

Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die duale bioorthogonale und orthogonale metabolische Markierung genomischer DNA in Zellen als grundlegende Plattformtechnologie. Die IEDDA- und die Photoclick-Reaktion wurden mit Hilfe von zwei isomeren Methylcyclopropenen als bioorthogonal reaktive funktionelle Gruppen kombiniert, die an zwei 2'-Desoxynukleoside gebunden sind. Cyclopropene sind klein und weisen aufgrund ihrer Ringspannung im Vergleich zu einfachen Vinylgruppen eine erhöhte Reaktivität auf und stellen somit den besten Kompromiss aus Größe und Reaktivität in der zellulären Umgebung dar. Eine kleine Bibliothek dieser Verbindungen wurde synthetisiert, wobei sich **1** und **6** als die Kandidaten mit der höchsten IEDDA- und Photoclick-Reaktivität herausstellten. Die Orthogonalität wurde mit diesen beiden 2'-Desoxynukleosiden in vitro nachgewiesen. Die Primerverlängerung mit verschiedenen DNA-Polymerasen zeigte, dass die 2-Desoxyuridintriphosphate von **1** und **6** als Thymidinersatz erkannt und in vitro in die DNA eingebaut werden. Um die duale und orthogonale Markierung genomischer DNA in HeLa-Zellen zu demonstrieren, wurde ein exaktes experimentelles Protokoll ausgearbeitet, das alle notwendigen Anforderungen an den intrazellulären Transport der beiden 2'-Desoxyuridine und die Markierungsschritte mit einem fluorogenen Cyanin-Styryl-Tetrazin und einem fluorogenen Pyren-Tetrazol in der richtigen Reihenfolge kombiniert. Diese Markierungen waren erfolgreich; die Bilder dieser Zellen zeigten eine starke, aber nicht vollständig überlagernde Fluoreszenz in beiden Emissionsbereichen (600–650 nm für das IEDDA-Produkt und 420–470 nm für die Photoclick-Produkte), die sich im Zellkern befanden. Obwohl beide chemischen Reporter als modifizierte Thymidine eingeführt wurden, wurde der Unterschied durch unterschiedliche Wege der metabolischen Markierung erzielt: **10** war bereits durch organische Synthese phosphoryliert, während **6** den gesamten Weg der metabolischen Markierung einschließlich der Phosphorylierung durch die zellulären Kinasen durchlaufen musste. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere metabolische Markierungsstrategien für Nukleinsäuren in der Zukunft,

auch für Experimente in lebenden Zellen. Viele Anwendungen sind nun denkbar. So kann die Methode beispielsweise für die metabolische Markierung von zellulärer RNA oder eines therapeutischen Oligonukleotids eingesetzt werden, das in die Zelle eingebracht wird, zusätzlich zur Markierung der genomischen DNA durch zwei verschiedene bioorthogonale und orthogonale Reaktionen.

Hintergrundinformationen

Die Autoren haben zusätzliche Referenzen in den unterstützenden Informationen angegeben.^[24]

Danksagung

Die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 2039/2, Projekte Wa 1386/17-2 und Wa 1386/22-1) und durch das KIT wird dankend anerkannt. Die Abbildungen wurden mit BioRender erstellt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

Stichwörter: 2'-Desoxyuridin · Biokonjugation · DNA-Polymerase · Farbstoffe · Oligonukleotide

- [1] a) D. Ganz, D. Harijan, H. A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1*, 86–97; b) S. L. Scinto, D. A. Bilodeau, R. Hincapie, W. Lee, S. S. Nguyen, M. Xu, C. W. Am Ende, M. G. Finn, K. Lang, Q. Lin, J. P. Pezacki, J. A. Prescher, M. S. Robillard, J. M. Fox, *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, *1*; c) R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 2457–2479.
- [2] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [3] a) D. S. Liu, A. Tangpeerachaikul, R. Selvaraj, M. T. Taylor, J. M. Fox, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 792–795; b) C. M. Cole, J. Yang, J. Seckute, N. K. Devaraj, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 205–208; c) L. Rieger, B. Pfeuffer, H. A. Wagenknecht, *RSC Chem. Biol.* **2023**, *4*, 1037–1042.
- [4] a) Y. Hu, J. M. Schomaker, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 3254–3262; b) M. Smeenk, J. Agramunt, K. M. Bongers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *60*, 79–88; c) D. M. Patterson, J. A. Prescher, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *28*, 141–149.
- [5] a) J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jaeschke, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1382–1386; b) U. Rieder, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9168–9172.

- [6] V. F. Schart, J. Hassenrück, A.-K. Späte, J. E. G. A. Dold, R. Fahrner, V. Wittmann, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 166–171.
- [7] 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.
- [8] a) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638–18643; b) J. Yang, J. Seckute, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479; c) A. K. Spate, H. Busskamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147–154.
- [9] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10600–10604.
- [10] C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15779–15784.
- [11] a) A. Messikommer, K. Seipel, S. Byrne, P. J. M. Valk, T. Pabst, N. W. Luedtke, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3*, 1225–1232; b) M. Tera, N. W. Luedtke, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2991–2997.
- [12] a) M. Gupta, J. Wang, C. M. Garfio, A. Vandewalle, R. C. Spitale, *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 3257–3260; b) M. Gupta, S. R. Levine, R. C. Spitale, *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 2647–2659; c) M. Gupta, M. Singha, D. B. Rasale, Z. Zhou, S. Bhandari, S. Beasley, J. Sakr, S. M. Parker, R. C. Spitale, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 7183–7187; d) M. Kubota, S. Nainar, S. M. Parker, W. England, F. Furche, R. C. Spitale, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 1698–1707.
- [13] D. Ganz, P. Geng, H.-A. Wagenknecht, *ACS Chem. Biol.* **2023**, *18*, 1054–1059.
- [14] a) J. Yang, Y. Liang, J. Seckute, K. N. Houk, N. K. Devaraj, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3365–3375; b) J. M. J. M. Ravasco, C. M. Monteiro, A. F. Trindade, *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 1167–1198.
- [15] a) D. Ploschik, F. Ronicke, H. Beike, R. Strasser, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1949–1953; b) U. Reissacher, D. Ploschik, F. Ronicke, G. B. Cserep, P. Kele, H. A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4032–4037.
- [16] R. D. Row, J. A. Prescher, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1073–1081.
- [17] H. Wu, N. K. Devaraj, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1249–1259.
- [18] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631–635.
- [19] P. Geng, E. List, F. Ronicke, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202203156.
- [20] J. W. Pelley, in *Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition)* (Ed.: J. W. Pelley), W. B. Saunders, Philadelphia, **2012**, pp. 119–124.
- [21] Z. Zawada, A. Tatar, P. Mocilac, M. Budesinsky, T. Kraus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9891–9895.
- [22] a) A. Spampinato, E. Kuzmová, R. Pohl, V. Sýkorová, M. Vrábel, T. Kraus, M. Hocek, *Bioconjugate Chem.* **2023**, *34*, 772–780; b) M. Kuba, P. Khoroshyy, M. Lepsík, E. Kuzmová, D. Kodr, T. Kraus, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202307548.
- [23] B. Pfeuffer, P. Geng, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2024**, *25*, e202300739.
- [24] a) M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserep, U. Wenge, P. Kele, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527–7538; b) A. Gubu, L. Li, Y. Ning, X. Zhang, S. Lee, M. Feng, Q. Li, X. Lei, K. Jo, X. Tang, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 5895–5900; c) J. Steinmeyer, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 431–436.

Manuskript erhalten: 12. Februar 2024

Akzeptierte Fassung online: 22. März 2024

Endgültige Fassung online: 19. April 2024