

Strategien zur metabolischen Markierung von RNA lebender Zellen mittels IEDDA-Reaktion

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte

Dissertation

von

M. Sc. Eileen List

aus Ketsch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2025

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Erster Gutachter: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ute Schepers



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -
Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0 DE):
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

Meiner Familie

“It always seems impossible until it’s done.”

-Nelson Mandela -

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herr Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Institut für organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) im Zeitraum von Juni 2022 bis Oktober 2025 angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

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

Karlsruhe, den 17.09.2025

Eileen List

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Theoretischer Hintergrund	3
1 „Click“-Chemie als Werkzeug der bioorthogonalen Markierung	5
1.1 CuAAC für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren	7
1.2 SPAAC für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren.....	12
1.3 IEDDA für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren	15
2 Metabolische Markierung mit Nukleotiden.....	20
III. Themenstellung	27
IV. Modifizierte Nukleoside für die metabolische Markierung von RNA	29
1 Design des 1-methylcyclopropenmodifizierten Nukleosids 1	29
2 Synthese des 1-Methylcyclopropenmodifizierten Nukleosids 1.....	31
3 Experimente <i>in vitro</i>	34
3.1 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels HPLC	34
3.2 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie	37
3.3 Untersuchung der Reaktivität in einer Photoclick-Reaktion	39
4 <i>In cellulo</i> Experimente.....	43
5 Zusammenfassung	47
V. Modifizierte Nukleotide für die metabolische Markierung von RNA.....	49
1 Synthese des bicyclononinmodifizierten Nukleosidtriphosphats 20	50
2 <i>In vitro</i> Experimente	55
2.1 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie	55
3 <i>In cellulo</i> Experimente.....	57
4 Zusammenfassung	63
VI. TriPPPPro für die metabolische Markierung von RNA	65
1 Design der TriPPPPro Reporter	65
2 Synthese eines BCN-modifizierten TriPPPPro	67
3 <i>In vitro</i> Experimente	73
3.1 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie	73

4	<i>In cellulo</i> Experimente	78
4.1	Untersuchung der Metabolischen Markierung mittels RNA-Isolation ...	78
4.2	TriPPPPro für die RNA-Markierung Lebender Zellen	80
4.3	NTP für die Bioorthogonale Markierung von RNA in Zellen	83
5	Zusammenfassung.....	91
VII.	Anorganisch organische Hybridnanopartikel für die metabolische Markierung von RNA	93
1	Synthese und Charakterisierung der IOH-NP	94
2	<i>In cellulo</i> Experimente	99
2.1	MTT-Test.....	99
2.2	Untersuchung der Zellulären Aufnahme.....	101
3	Zusammenfassung.....	103
VIII.	Experimenteller Teil	105
1	Material und Methoden.....	105
2	Zelllabor.....	113
3	Organisch-chemische Synthesen.....	114
4	Allgemeine Durchführung der „Click“-Experimente <i>in vitro</i>	147
5	Zellexperimente	150
IX.	Abkürzungsverzeichnis	157
X.	Danksagung	163
XI.	Anhang	165
1	Anhang zu Kapitel V	165
2	Anhang zu Kapitel VI	168
3	Anhang zu Kapitel VII	179
4	Anhang zu Kapitel VIII.....	180
XII.	Literaturverzeichnis.....	231

I. Einleitung

Seit Jahrzehnten bildet das von Francis Crick beschriebene zentrale Dogma der Molekularbiologie das Fundament, um biologische Systeme zu verstehen.¹ Es beschreibt den gerichteten Fluss genetischer Informationen von der Desoxyribonukleinsäure (DNA) über die Ribonukleinsäure (RNA) bis hin zu den Proteinen.¹ Die Prozesse der Transkription und Translation gewährleisten dabei die präzise Übertragung und Umsetzung der genetischen Information¹ und sind für nahezu alle physiologischen und pathologischen Prozesse auf zellulärer Ebene von zentraler Bedeutung.²

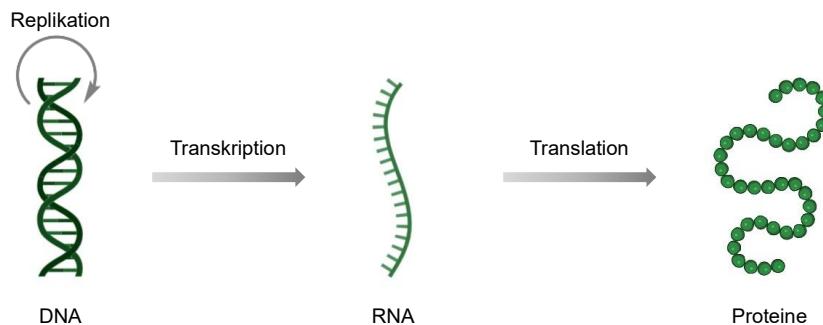


Abbildung 1: Zentrales Dogma der Molekularbiologie. Erstellt mit bioRender.com.

Innerhalb dieses grundlegenden Informationsflusses in der Zelle nimmt die RNA eine zentrale Schlüsselrolle ein.³ Neben der Übertragung genetischer Informationen im Rahmen der Transkription und Translation erfüllen diverse nicht-codierende RNA-Moleküle, wie beispielsweise microRNA, siRNA sowie tRNA, vielfältige regulatorische, katalytische und strukturelle Funktionen.^{4, 5} Für ein umfassendes Verständnis biologischer Systeme ist daher die Untersuchung der Funktion, Dynamik und Interaktion von Nukleinsäuren und anderen Biomolekülen von essenzieller Bedeutung. Dies stellt besondere Anforderungen an die Entwicklung von Methoden, die es ermöglichen, Biomoleküle in ihrer nativen zellulären Umgebung sichtbar zu machen. Carolyn Bertozzi formulierte es in ihrer Chemie-Nobelpreis-Vorlesung im Jahr 2022 wie folgt:

“The fundamental goal was to invent a new type of chemistry that could be performed in the most complex reaction vessel you can think of which is the living organism.”⁶

Seit der Einführung durch *Bertozzi* hat sich die bioorthogonale Chemie in den vergangenen zwei Jahrzehnten als vielseitiges und leistungsfähiges Werkzeug der molekularbiologischen Forschung etabliert.⁷⁻⁹ Darüber hinaus bildet sie eine entscheidende Grundlage für innovative Anwendungen in der Diagnostik und Therapie.¹⁰⁻¹² Die zunehmende Bedeutung dieses Forschungsfeldes spiegelt sich unter anderem auch in der stetig steigenden Zahl wissenschaftlicher Publikationen in diesem Bereich wider.⁸ Dabei liegt der Fokus überwiegend auf der Untersuchung von Proteinen, während die Anzahl an Publikationen im Bereich der Nukleinsäuren, insbesondere RNA, vergleichsweise deutlich geringer ist.⁸ Veröffentlichungen zur bioorthogonalen Markierung von Nukleinsäuren machen nur etwa ein Fünftel der Gesamtpublikationen aus, wobei RNA gegenüber DNA einen noch geringeren Anteil einnimmt.⁸ Die Möglichkeit, RNA in ihrer nativen zellulären Umgebung spezifisch und störungsfrei zu markieren, eröffnet die Möglichkeit dynamische Prozesse auf subzellulärer Ebene zu verfolgen. Dies ermöglicht nicht nur tiefere Einblicke in grundlegende biologische Mechanismen, sondern trägt auch zur Entwicklung innovativer diagnostischer und therapeutischer Strategien bei, die zur Bekämpfung unterschiedlicher Krankheiten eingesetzt werden können.

Die Etablierung zuverlässiger und schonender Methoden für die bioorthogonale Markierung von RNA ist daher von großem Interesse, um das komplexe Zusammenspiel der RNA-Biologie in lebenden Systemen besser verstehen und gezielt nutzen zu können.

II. Theoretischer Hintergrund

Die Verwendung radioisotopenmarkierter Nukleoside wie ^3H -2'-Desoxyuridine und ^3H -Uridine stellte eine der ersten Techniken zur Untersuchung von Nukleinsäuren im zellulären Kontext dar (Abbildung 2).¹³ Nach dem Einbau in die DNA bzw. RNA können diese mittels Autoradiographie detektiert werden.^{13, 14} Insbesondere die aufwändige sowie zeit- und kostenintensive Detektion führten jedoch zur Entwicklung alternativer, nicht-radioaktiver Markierungsmethoden.^{5, 15} Seit 1975 galt die metabolische Markierung mit brommodifizierten Nukleosid-Analoga, wie 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) und 5-Bromuridin (BrU), als Standardmethode zur Analyse von Nukleinsäuren in Zellen (Abbildung 2).¹⁶⁻¹⁸

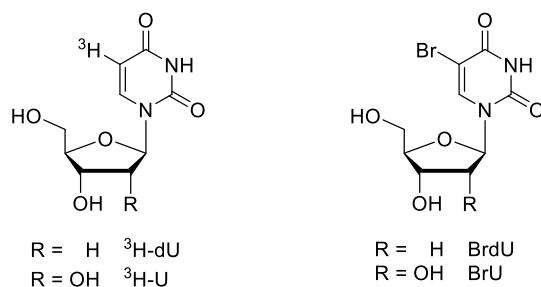
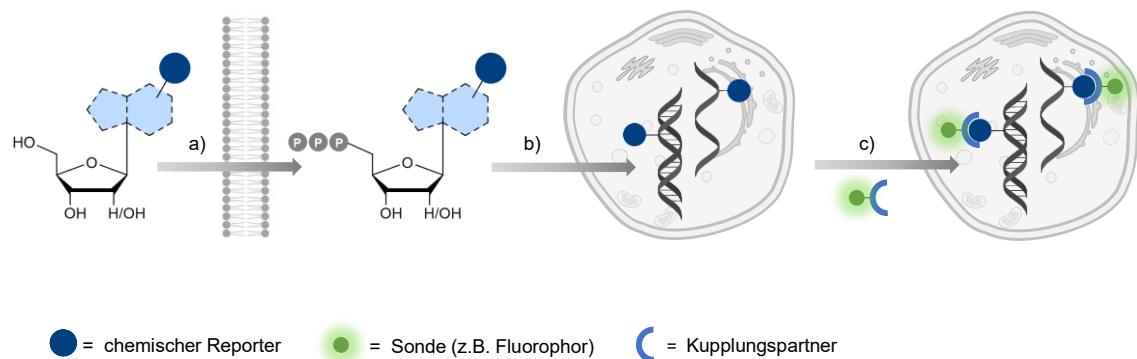


Abbildung 2: Struktur der Nukleosid-Analoga ^3H -2'-Desoxyuridine (^3H -dU) und ^3H -Uridine (^3H -U) sowie 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) und 5-Bromuridin (BrU) für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren.

Hierbei dienen die C5-modifizierten Nukleoside BrdU sowie BrU als metabolische Vorläufermoleküle, die von den Zellen aufgenommen und durch enzymatische Prozesse zu bioaktiven Triphosphaten umgewandelt werden. Diese Nukleosidtriphosphate (NTP) werden anschließend durch Polymerasen in die DNA bzw. RNA inkorporiert. Die Detektion der markierten Nukleinsäuren erfolgt im Fall der brommodifizierten Nukleoside durch den Einsatz monoklonaler Antikörper.^{16, 18} Der Nachweis durch Immunmarkierung ist jedoch zeitintensiv und darüber hinaus aufgrund der begrenzten Zellpenetrationsfähigkeit von Antikörpern auf fixierte und permeabilisierte Zellen beschränkt.^{5, 15}

Ein Durchbruch gelang in den frühen 2000er Jahren durch *Bertozzi et al.* mit der Einführung der bioorthogonalen Markierung.^{9, 19} Die Strategie basiert auf der idealerweise metabolischen Inkorporation eines chemischen Reportermoleküls in das zu untersuchende Biomolekül, wie

beispielsweise DNA bzw. RNA (Abbildung 3). Der chemische Reporter ist hierbei eine funktionelle Gruppe, deren Reaktivität orthogonal zu den in Zellen vorkommenden Funktionalitäten ist und anschließend einen Nachweis durch bioorthogonale Reaktion mit einer exogenen Sonde ermöglicht. Diese trägt eine komplementäre funktionelle Gruppe, welche eine hochselektive Reaktion mit dem modifizierten Biomolekül gewährleistet.⁹



Ursprünglich wurde die bioorthogonale Markierung von *Bertozzi et al.* zur selektiven Detektion von Zuckermolekülen (Glykane) auf Zelloberflächen entwickelt.¹⁹ Hierbei werden synthetisch hergestellte Azidzucker metabolisch in Glykokonjugate auf der Oberfläche von Zellen eingebaut und anschließend mit biotinylierten Triarylphosphinen in einer bioorthogonalen Staudinger-Ligation zu stabilen kovalenten Addukten umgesetzt.^{19, 21} Hierdurch wird eine selektive Detektion zellulärer Glykokonjugate unter physiologischen Bedingungen möglich, ohne native zelluläre Prozesse zu stören.¹⁹

Neben der Anwendung in der Glykan²²- und Proteinmodifikation^{23, 24} konnte die Staudinger-Ligation bereits erfolgreich zur Konjugation funktionalisierter Phosphine an DNA eingesetzt werden.²⁵⁻²⁷ Trotz ihrer vielseitigen Einsatzmöglichkeiten weist die Markierungsmethode entscheidende Limitierungen auf, welche eine Anwendung *in vivo* einschränken.²⁸ Aufgrund der langsamen Reaktionskinetik sind für eine effiziente Markierung lange Reaktionszeiten oder hohe Konzentrationen notwendig. Letzteres ist unter anderem aufgrund der begrenzten Wasserlöslichkeit der Phosphin-Sonden herausfordernd. Darüber hinaus

ist die eingeschränkte Stabilität der Triarylphosphine gegenüber Oxidation ein wesentlicher Nachteil.^{28, 29}

1 „Click“-Chemie als Werkzeug der bioorthogonalen Markierung

Reaktionen, die für eine Anwendung in der bioorthogonalen Markierung geeignet sind, müssen unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur und Druck) im wässrigen Milieu selektiv ablaufen, hohe Ausbeuten erzielen sowie biokompatibel sein. Für eine effiziente Markierung in biologischen Systemen ist es zudem entscheidend, dass hohe Reaktionsgeschwindigkeiten bereits bei niedrigen Konzentrationen erreicht werden und die Reaktanden sowie Produkte im zellulären Kontext ausreichend stabil und nicht toxisch sind. Die im Jahr 2001 durch *Sharpless et al.* eingeführten „Click“-Reaktionen³⁰ erfüllen diese Anforderungen und haben sich daher als besonders attraktiv für biologische Anwendungen erwiesen. Zu den am häufigsten verwendeten „Click“-Reaktionen für die bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren gehört unter anderem die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (engl. *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) (Abbildung 4). Obwohl die Azid-Alkin-Cycloaddition³¹ bereits 1990 durch *Huisgen* beschrieben wurde, ermöglicht erst der Einsatz von Cu(I) als Katalysator einen effizienten Ablauf der Reaktion bei physiologischen Temperaturen und damit die Anwendung der Reaktion für die Markierung von Biomolekülen.^{32, 33} Im Vergleich zur Staudinger-Ligation ($k_2 = 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^{34, 35} zeigt die CuAAC deutlich höhere Geschwindigkeitskonstanten ($k_2 = 10 - 200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{34, 36}

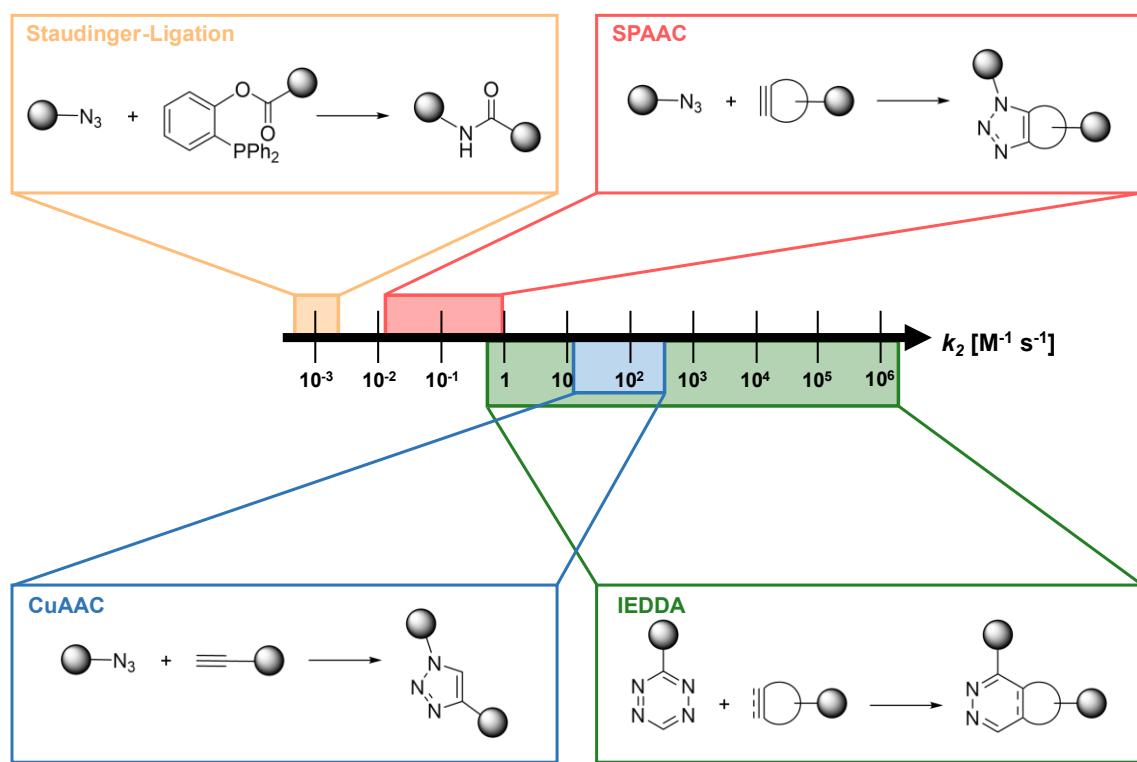


Abbildung 4: Übersicht ausgewählter bioorthogonaler „Click“-Reaktionen mit Darstellung der charakteristischen Bereiche der Geschwindigkeitskonstanten k_2 . Ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (engl. strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) Cu(I) katalysierte Azid Alkin Cycloaddition (engl. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (engl. inverse electron-demand Diels-Alder reaction, IEDDA).^{34, 36-39}

Aufgrund der Zytotoxizität der eingesetzten Cu(I)-Salze ist die Anwendung der CuAAC überwiegend auf Experimente *in vitro* sowie auf fixierte Zellen beschränkt.⁴⁰ Kupferfreie „Click“-Reaktionen wie die ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (engl. strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) und die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (engl. inverse electron-demand Diels-Alder reaction, IEDDA) kommen ohne Cu(I) als Katalysator aus und bieten daher eine Alternative für die bioorthogonale Markierung von Biomolekülen wie Nukleinsäuren (Abbildung 4). Im Gegensatz zur CuAAC beruht die Aktivierung der SPAAC auf der Verwendung ringgespannter cyclischer Alkine, typischerweise Cyclooctin-Derivate (COT-Derivate).³⁷ Die Änderung der Aktivierungsstrategie führt jedoch zu deutlich geringeren Reaktionsgeschwindigkeiten ($k_2 = 0.0012 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für Cyclooctin).^{36-38, 41} Durch die Entwicklung neuer COT-basierter Derivate wie Aza-dibenzocyclooctin (DIBAC)⁴² und Biarylazacyclooctin (BARAC)⁴³ konnte die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht werden.⁴⁴ Dennoch lassen sich auch mit den

reaktivsten COT-Derivaten nur Geschwindigkeitskonstanten von maximal $k_2 = 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreichen, was für einige biologische Anwendungen nicht ausreichend ist.^{28, 34}

Die IEDDA-Reaktion zwischen elektronenarmen Dienen, wie Tetrazinen, und Alkenen sowie Alkinen als elektronenreiche Dienophile zählt derzeit zu den schnellsten bioorthogonalen „Click“-Reaktionen. Besonders mit gespannten Dienophilen, wie *trans*-Cycloocten (TCO), können Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden.^{34, 36, 39, 45} Ein weiterer Vorteil der IEDDA-Reaktion gegenüber anderen bioorthogonalen Reaktionen besteht in ihrer Irreversibilität. Das nach der initialen [4+2]-Cycloaddition entstandene bicyclische Zwischenprodukt wird in einer nachfolgenden Retro-Diels-Alder-Reaktion durch die Freisetzung von Stickstoff zu stabilen Dihydropyridazin-Derivaten (bei Reaktionen mit Alkenen) bzw. Pyridazin-Derivaten (bei Reaktionen mit Alkinen) umgewandelt.³⁴ Aufgrund der fluoreszenzlöschen Eigenschaft von Tetrazinen gegenüber Fluorophoren kann durch die Verwendung geeigneter Tetrazin-Fluorophor-Konjugate zudem die Fluoreszenz des Produkts im Vergleich zu den Edukten deutlich verstärkt werden.^{34, 46} Diese fluorogenen Tetrazin-Sonden ermöglichen waschfreie Bedingungen in Zellexperimenten und führen zu einem deutlich verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis.⁴⁷⁻⁴⁹

Bereits vor der Anwendung für die metabolische Markierung wurden bioorthogonale Reaktionen zur postsynthetischen Markierung reaktiver Oligonukleotide eingesetzt. Modifizierte Oligonukleotide können chemisch durch Festphasensynthese oder enzymatisch durch den Einbau modifizierter NTP mittels Primer-Verlängerung (engl. *primer extension*, PEX) und weiterer enzymbasierter Verfahren synthetisiert werden.³⁸ Die postsynthetische Markierung mittels bioorthogonaler Reaktionen erlaubt anschließend neben der fluoreszenten Markierung von Nukleinsäuren⁵⁰⁻⁵² unter anderem auch die gezielte Einführung von Affinitätsmarkern wie Biotin.⁵³ Durch Einbringen der modifizierten Oligonukleotide in Zellen mittels Transfektion kann darüber hinaus die bioorthogonale Reaktivität in zellulärer Umgebung untersucht werden.^{50, 54-57}

1.1 CuAAC für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren

Bevor Markierungsstrategien für RNA etabliert wurden, bildete im Jahr 2008 die erstmals von *Salic* und *Mitchison* demonstrierte metabolische Markierung von DNA unter Verwendung von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) den Grundstein für die Entwicklung chemo-enzymatischer Markierungsmethoden für Nukleinsäuren (Abbildung 5).⁵⁸ Die Inkorporation des chemischen Reporters in neu synthetisierte DNA wurde mittels CuAAC mit einem azidfunktionalisierten Rhodamin-Derivat nachgewiesen, wodurch eine fluoreszente Markierung ermöglicht wurde.⁵⁸

Durch die Verwendung eines zellgängigen Tetramethylrhodamin-Azids gelang ihnen zudem die Markierung EdU-markierter DNA in lebenden Zellen. Aufgrund der Zytotoxizität von Cu(I) führte der Markierungsprozess jedoch zur Apoptose der Zellen. Neben der Reaktivität alkinmodifizierter DNA in der CuAAC bietet die Alkin-Modifikation aufgrund ihres charakteristischen Raman-Signals die Möglichkeit, den Einbau mittels Raman-Mikroskopie gezielt nachzuweisen.^{59, 60} Trotz der zahlreichen Beispiele ist die DNA-Markierung mit EdU aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften eingeschränkt. Insbesondere bei längerer Exposition sowie Konzentrationen im mikromolaren Bereich kann EdU Auswirkungen auf die Funktion sowie Stabilität der DNA haben, die zur Beeinträchtigung des Zellzyklus sowie zum Zelltod führen können.^{38, 61-63} Dies führte zur Entwicklung weiterer alkinmodifizierter Nukleoside mit reduzierter Zytotoxizität. Mit dem von *Luedtke et al.* entwickelten Arabinosyl-Derivat (2'S)-Desoxy-2'-fluor-5-ethinyluridin (F-ara-EdU) konnte eine effiziente Markierung zellulärer DNA erreicht werden, ohne dabei die Zellproliferation zu beeinträchtigen. Die Verwendung von F-ara-EdU ermöglichte darüber hinaus die erfolgreiche Markierung zellulärer DNA in Zebrafischen.⁶³ Seitdem wurden weitere ethinyl- und darüber hinaus auch azidmodifizierte 2'-Desoxynukleoside synthetisiert und für die bioorthogonale Markierung von DNA mittels CuAAC eingesetzt (Abbildung 5).⁶⁴⁻⁶⁶

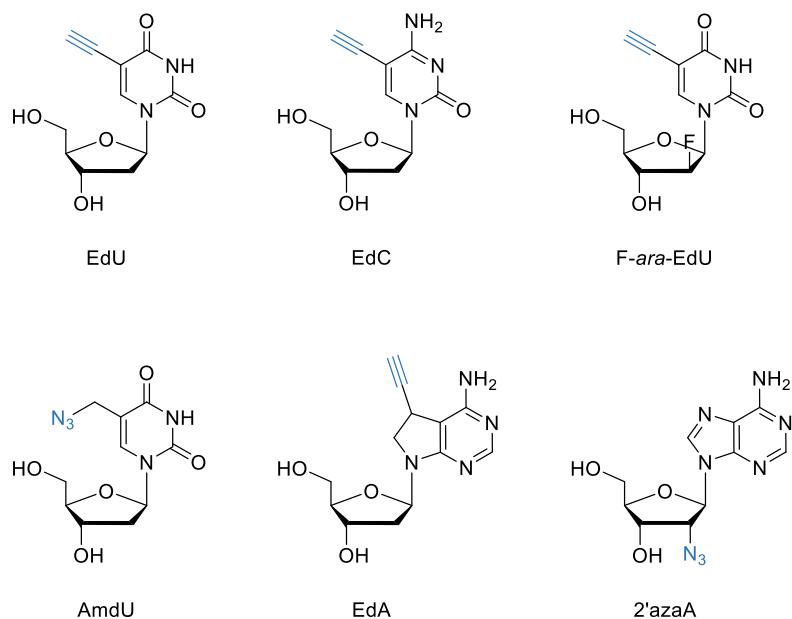


Abbildung 5: Übersicht alkin- und azidmodifizierter Nukleosid-Analoga für die bioorthogonale Markierung von DNA mittels CuAAC.²⁰,⁵⁵,⁶⁷ EdC = 5-Ethynyl-2'-desoxyctyldin, AmdU = 5-Azidomethyl-2'-desoxyuridin, EdA = 7-Deaza-7-ethynyl-2'-desoxyguanosin, 2'azaA = 2'-Azidadenosin.

Die erfolgreiche bioorthogonale Markierung von DNA führte zur Entwicklung von RNA-Markierungsmethoden, die aufgrund der Instabilität der RNA besonders anspruchsvoll sind.⁵⁵ Analog zu EdU synthetisierten *Salic* und *Jao* 5-Ethynyluridin (EU), welches nach intrazellulärer Aufnahme metabolisiert und anschließend von den RNA Polymerasen I, II und III in neu gebildete RNA inkorporiert wird (Abbildung 6).⁶⁸ Die anschließende fluoreszente Markierung mittels CuAAC ermöglichte die Visualisierung ethinylmodifizierter RNA in fixierten Zellen sowie Gewebeschnitten.⁶⁸

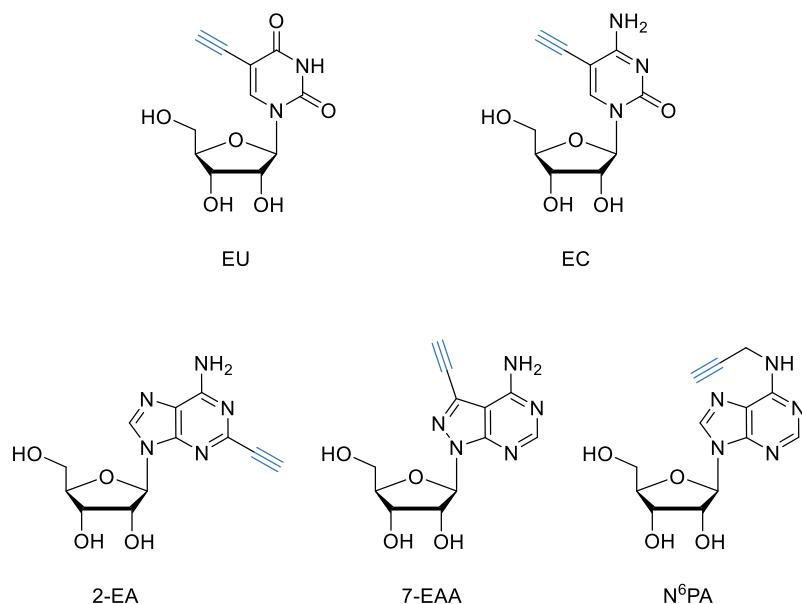


Abbildung 6: Übersicht alkinmodifizierter Nukleosid-Analoga für die bioorthogonale Markierung mittels CuAAC.^{55, 69, 70} 2-EA = 2-Ethynyladenosin, 7-EAA = 7-Ethynyl-8-aza-7-deazaadenosin, N⁶PA = N⁶-Propargyladenosin.

Im Gegensatz zu DNA ist bei RNA entscheidend, dass die modifizierten RNA-Nukleoside nicht als Substrat für die Ribonukleotidreduktase dienen. Dieses Enzym katalysiert die Desoxygenierung von RNA-Nukleosiddi- und -triphosphaten zu den entsprechenden Desoxyribonukleotiden und verhindert somit die spezifische Markierung von RNA.³⁸ *Salic* und *Jao* konnten in Markierungsexperimenten mit den Enzym-Inhibitoren Hydroxyurea sowie Thymidin zeigen, dass EU kein Substrat für die Ribonukleotidreduktase ist und daher spezifisch für die RNA-Markierung verwendet werden kann.^{15, 68} Aufgrund der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten hat sich EU zu einem beliebten chemischen Reporter für die bioorthogonale Markierung von RNA entwickelt und konnte bereits in zahlreichen Systemen erfolgreich zum Nachweis neu synthetisierter RNA eingesetzt werden.^{38, 71-73}

Eine wichtige Anwendung der EU-Markierung konnten *De Haan et al.* demonstrieren, indem sie gezielt die Synthese viraler RNA in virusinfizierten Zellen (Coronavirus MHV-A59) untersuchten, was die Lokalisierung und Analyse viraler Replikationsprozesse ermöglicht.⁷⁴ Eine Ausweitung dieser Methode auf andere Viren, wie das neuartige SARS-CoV-2, konnte bislang noch nicht gezeigt werden, ist aber aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Viren-Stämme denkbar.^{55, 74} Darüber hinaus konnten *Esteban et al.* zeigen, dass neben der fluoreszenten Markierung von RNA die Untersuchung sowie Charakterisierung RNA-interagierender Proteine (Interaktom) mit EU möglich ist (Abbildung 7).⁷⁵ Bei der sogenannten RICK-Methode (engl. *capture of the newly transcribed RNA interactome using click chemistry*) werden neu synthetisierte EU-modifizierte RNA-Transkripte mittels CuAAC biotinyliert, um anschließend eine Anreicherung von RNA und deren wechselwirkenden Proteinen über Streptavidin-Beads zu ermöglichen. Zur Stabilisierung der RNA-Protein-Komplexe werden diese zuvor mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) quervernetzt.⁷⁵

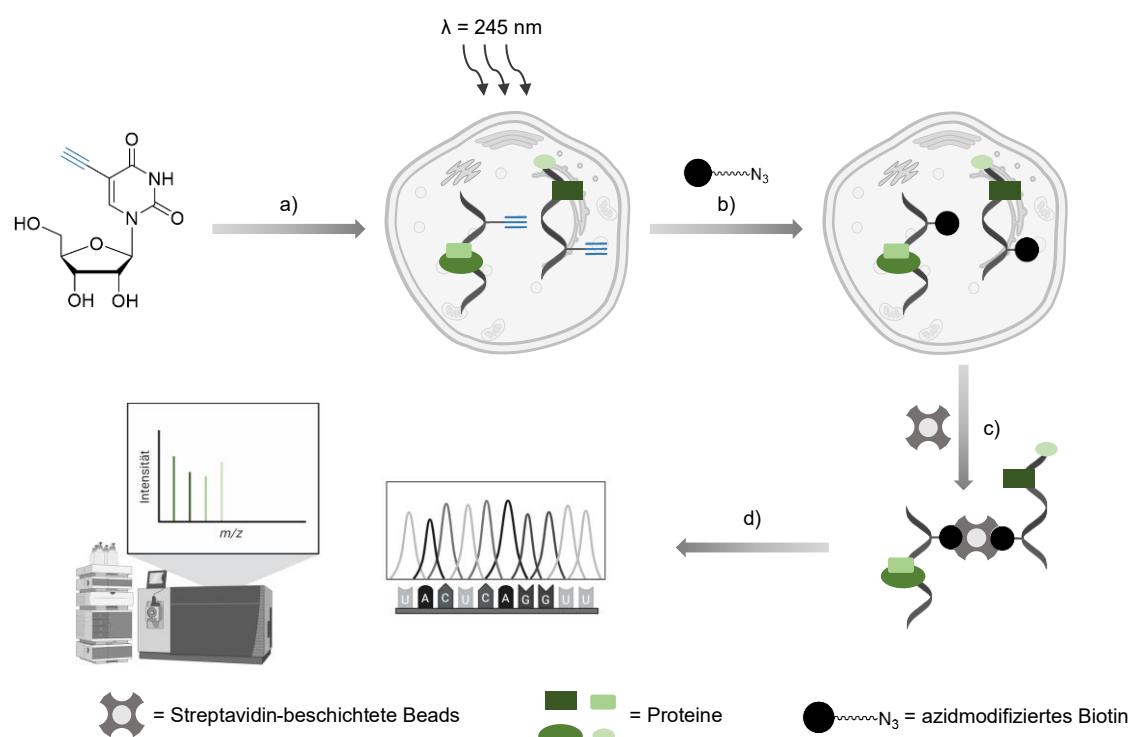


Abbildung 7: Schematische Darstellung der RICK-Methode zur Erfassung des RNA-Interaktoms.⁷⁵ a) metabolische Markierung neu synthetisierter RNA in HeLa-Zellen mit EU. b) Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$), um die markierte RNA mit interagierenden Proteinen kovalent zu vernetzen. b) Biotinylierung EU-modifizierter RNA durch CuAAC mit azidmodifiziertem Biotin in fixierten und permeabilisierten Zellen. c) Isolation der markierten RNA-Protein-Komplexe mittels Streptavidin-Beads. d) Proteinanalyse mittels LC-MS sowie Charakterisierung der isolierten RNA mittels RNA-Sequenzierung. Erstellt mit bioRender.com.

Alternativ bietet die Markierung mit azidmodifiziertem Biotin über CuAAC die Möglichkeit, EU-markierte RNA für die nachfolgende Analyse mittels RNA-Sequenzierung zu isolieren.^{76, 77} Hierdurch können Veränderungen in der Transkriptionsaktivität nach spezifischen Stimuli detailliert untersucht werden, sowie Einblicke in die Dynamik und Regulation der Genexpression erzielt werden.^{38, 76, 77} Trotz der breiten Anwendung in der bioorthogonalen Markierung von RNA beeinträchtigt EU, insbesondere bei langen Inkubationszeiten (48 h), die Zellproliferation ähnlich wie EdU, was dessen Anwendung limitiert.⁷⁸

Neben EU konnten 5-Ethynylcytidin (EC)⁷⁹ sowie die in Abbildung 6 dargestellten ethynylmodifizierten Purin-Nukleoside synthetisiert und erfolgreich für die RNA-Markierung eingesetzt werden.^{69, 70, 80} Die CuAAC ist jedoch aufgrund der Zytotoxizität der Cu(I)-Ionen nicht vollständig bioorthogonal, was ihre Anwendung in lebenden Zellen einschränkt.⁴⁰ Um die Entstehung von DNA-Schäden durch die Cu(I)-vermittelte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) zu reduzieren, wurden wasserlösliche Cu(I)-stabilisierende Liganden (z.B. TBTA, THPTA und BTTE) entwickelt, die als ROS-*Scavenger* wirken und die Reaktion beschleunigen.⁸¹⁻⁸⁴ Trotz dieser Verbesserung ist die Anwendung der CuAAC in lebenden Zellen stark begrenzt.

1.2 SPAAC für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren

Die Einführung von Aziden als bioorthogonale Reporter in Nukleinsäuren ermöglicht deren Detektion über kupferfreie „Click“-Reaktionen wie der SPAAC, was insbesondere für eine bioorthogonale Markierung von RNA in lebenden Zellen von Bedeutung ist. Bioorthogonale Reportergruppen werden typischerweise an der 5-Position von Pyrimidinen sowie an der C2- oder N⁶- bzw. N7-Position der Nukleobase von Purinen eingeführt (Abbildung 8).

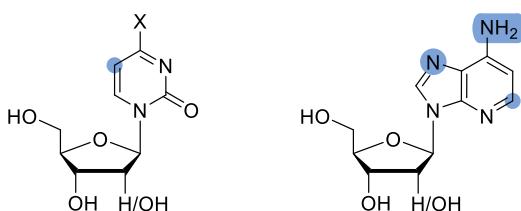


Abbildung 8: Darstellung geeigneter Positionen zur Einführung von Modifikationen an Purin- sowie Pyrimidin-Nukleosiden für die bioorthogonale Markierung.

Der gezielte Einbau an diesen Positionen beruht einerseits auf Experimenten mit verschiedenen Polymerasen, die gezeigt haben, dass Modifikationen hier am besten toleriert werden. Dies bildet die Grundlage für den Einbau modifizierter Nukleoside in die RNA.^{70, 85-88} Andererseits konnten *Spitale et al.* durch Kristallstrukturanalysen substratgebundener Kinasen Bereiche im aktiven Zentrum identifizieren, die Raum für Modifikationen an diesen Positionen bieten.^{78, 89, 90} Aufgrund der Instabilität von Aziden ist die Inkorporation azidmodifizierter Nukleoside überwiegend auf enzymatische Methoden beschränkt. *Srivatsan et al.* konnten den erfolgreichen Einbau der azidmodifizierten Nukleotide AMUTP, APUTP und ATUTP in RNA-Oligonukleotide *in vitro* unter Verwendung der T7 RNA-Polymerase demonstrieren.^{55, 88} Darauf basierend wurden die entsprechenden Nukleoside AMU, APU und ATU (Abbildung 9 A) auf deren Eignung in der metabolischen Markierung von RNA in Zellen untersucht. Die gezielte Inkorporation in die RNA konnte allerdings ausschließlich durch Transfektion der Zellen mit den entsprechenden Triphosphaten erreicht werden (Abbildung 9 B am Beispiel AMU), was darauf hindeutet, dass die Nukleoside AMU, APU und ATU von den endogenen Kinasen nicht als Substrate akzeptiert werden.^{55, 88, 91}

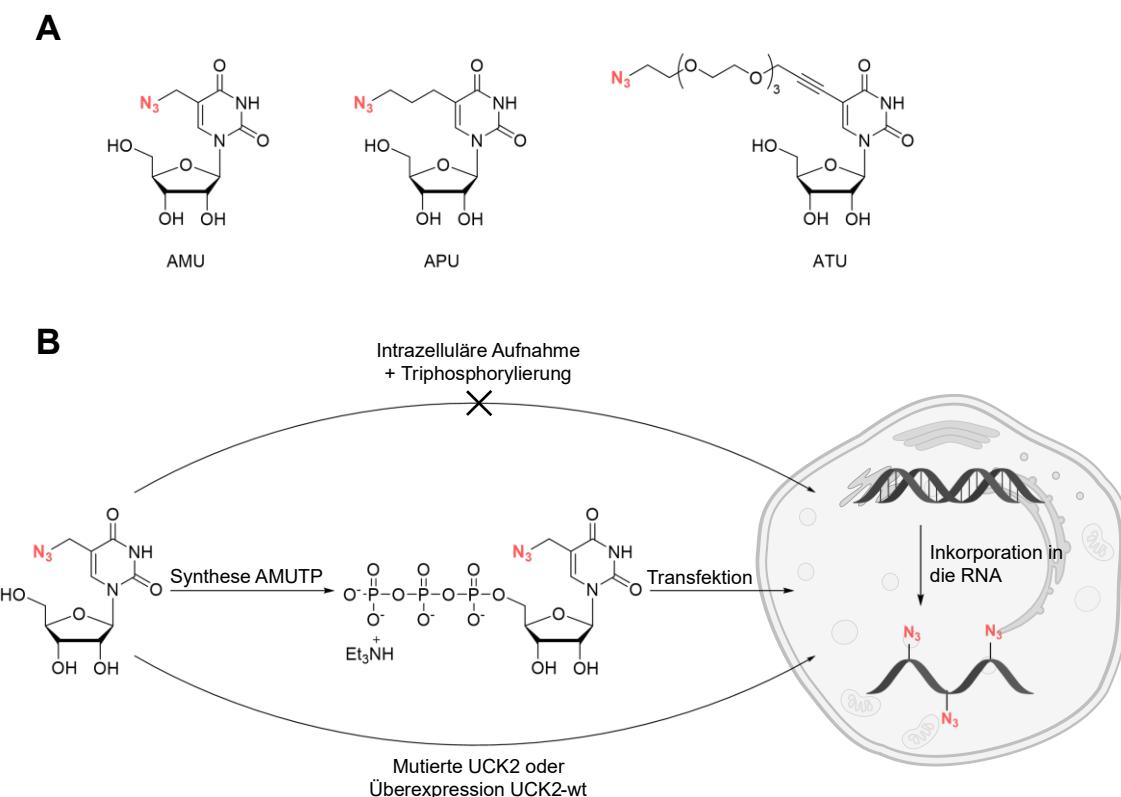


Abbildung 9: A) Strukturen azidmodifizierter Nukleosid-Analoga, die aufgrund der Substratspezifität endogener Kinasen nicht für die metabolische Markierung von RNA geeignet sind. B) Schematische Darstellung der metabolischen Markierung neu synthetisierter RNA mit AMU. Da AMU von endogenen Kinasen nicht als Substrat akzeptiert wird, erfolgt die metabolische Markierung ausschließlich durch Transfektion des chemisch synthetisierten AMUTP oder durch den Einsatz mutierter Kinasen bzw. Überexpression des Wildtyp-Enzyms UCK2.⁵⁵ AMU = 5-Azidmethyluridin, APU = 5-Azidpropyluridin, ATU = Azid-propargyloxy-tetraethylen-glycoluridine.⁸⁸

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnten *Kleiner* und *Zhang* zeigen, dass die Uridin-Cytidin Kinase (UCK2), welche die Phosphorylierung von AMU zum entsprechenden Monophosphat katalysiert, eine hohe Substratspezifität aufweist, was die Phosphorylierung und somit den metabolischen Einbau von AMU in die RNA verhindert.⁹² Neben der Position der Modifikation am Nukleosid beeinflusst auch die Größe maßgeblich die Akzeptanz der Nukleosid-Analoga durch endogene Kinasen.^{92, 93} Eine Strategie die Substratspezifität zu überwinden, um die metabolische Markierung zellulärer RNA mit AMU zu ermöglichen, wurde von *Kleiner et al.* etabliert. Durch gezielte Mutation eines Tyrosin-Restes (Tyr65) im aktiven Zentrum der UCK2 gelang es, die Substratspezifität des Enzyms zu erweitern.⁹² Durch Expressieren der gentechnisch modifizierten Kinase in HeLa-Zellen sind diese in der Lage, AMU effizient zu phosphorylieren, sodass der Einbau in RNA auch ohne Transfektion des entsprechenden Triphosphats möglich ist (Abbildung 9B).⁹² Analog hierzu ermöglicht auch die Überexpression des Wildtyp Enzyms eine

effiziente Phosphorylierung von AMU und somit die metabolische Markierung von RNA.⁹⁴ Darüber hinaus kann der metabolische Einbau modifizierter Nukleoside durch den Einsatz viraler Kinasen verbessert oder erst ermöglicht werden.^{66, 95} Virale Kinasen, wie beispielsweise die Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK) zeichnen sich häufig durch eine breitere Substratspezifität im Vergleich zu endogenen zellulären Kinasen aus. Luedtke *et al.* konnten zeigen, dass durch die Expression exogener Kinasen durch viralen Gentransfer die Phosphorylierung des azidmodifizierten Nukleosids 5-(Azidmethyl)-2'-desoxyuridin (AmdU) effizienter erfolgt.^{66, 96} Dies führte dazu, dass im Vergleich zu nicht infizierten Zellen bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen ein Einbau von AmdU in die DNA beobachtet werden konnte.⁶⁶

Im Gegensatz zur UCK weist die Adenosin-Kinase eine breitere Substratspezifität auf.^{69, 70, 78, 80} Neben den zuvor beschriebenen ethinylmodifizierten Purin-Analoga 2-EA, 7-EAA und N⁶PA konnten auch die in Abbildung 10 gezeigten azidmodifizierten Analoga als Substrate der endogenen Adenosin-Kinase identifiziert werden.^{93, 97} Dies ermöglicht einen erfolgreichen Einbau dieser Purin-Analoga in RNA, unabhängig von den zuvor beschriebenen Strategien. Interessanterweise erfolgt ein Einbau der N⁶-modifizierten Nukleoside überwiegend in neu synthetisierte RNA im Rahmen der Transkription, wohingegen das 2'-modifizierte Nukleosid zusätzlich posttranskriptional während der Polyadenylierung eingebaut wird.⁹³

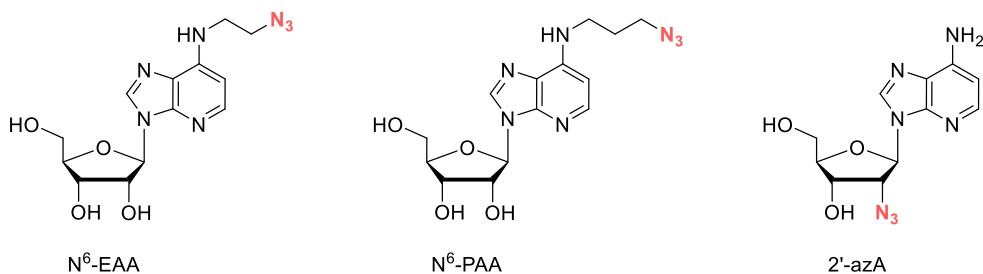


Abbildung 10: Übersicht azidmodifizierter Nukleosid-Analoga für die bioorthogonale Markierung mittels SPAAC.⁹³ N⁶-EAA = N⁶-Ethylazidoadenosin, N⁶-PAA = N⁶-Propylazidoadenosin, 2'-azA = 2'-Azid-2'-desoxyadenosin

Die SPAAC hat sich als katalysatorfreie Alternative zur CuAAC als wertvolles Werkzeug für die bioorthogonale Markierung von RNA, sowohl *in vitro* als auch in Zellen etabliert. Dennoch ist die geringere Reaktionsgeschwindigkeit der SPAAC im Vergleich zur CuAAC ein wesentlicher Nachteil und limitiert deren Anwendung für die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen.^{9, 98} Zwar konnte durch die Entwicklung neuartiger Cyclooctin-Derivate mit erhöhter

Ringspannung die Reaktivität gesteigert werden, jedoch führt die damit verbundene größere und hydrophobere Struktur dieser Derivate zu einer reduzierten Löslichkeit im wässrigen Milieu sowie zu einer eingeschränkten Zellpermeabilität.^{55, 98-100} Diese Limitierungen führten zur Entwicklung alternativer bioorthogonaler Reaktionen, wie der IEDDA-Reaktion.

1.3 IEDDA für die metabolische Markierung von Nukleinsäuren

Die erstmals im Jahr 2008 durch *Fox* und *Hildebrand* unabhängig voneinander beschriebene IEDDA-Reaktion zwischen 1,2,4,5-Tetrazinen (*s*-Tetrazine, Tz) und elektronenreichen Dienophilen stellt eine attraktive Alternative zu den bislang bekannten bioorthogonalen „Click“-Reaktionen dar.^{39, 45} Aufgrund ihrer hohen Reaktionsgeschwindigkeiten sowie hohen Selektivität und Biokompatibilität hat sich die katalysatorfreie IEDDA-Reaktion als Standardmethode für die bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren etabliert. Sie eröffnet neue Perspektiven für die Visualisierung Nukleinsäure-basierter dynamischer Prozesse in lebenden Zellen.^{34, 78}

Im Jahr 2014 beschrieben *Luedtke et al.* erstmals den metabolischen Einbau des IEDDA-kompatiblen Reporter-Nukleosids 5-Vinyl-2'-desoxyuridin (VdU) in neu synthetisierte DNA von HeLa-Zellen sowie die anschließende Visualisierung der markierten DNA mit einem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat (Abbildung 11).¹⁰¹ Darauf aufbauend wurden weitere vinylmodifizierte DNA-Nukleoside wie beispielsweise 5-Vinyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin (VdA)¹⁰² sowie vinylmodifizierte Ribonukleoside für die gezielte Markierung von RNA entwickelt. *Spitale et al.* konnten zeigen, dass die Nukleoside 5-Vinyluridin (VU), 2-Vinyladenosin (2-VA) and 7-Deazavinyladenosin (7-dVA) als Substrate im Nukleosid „salvage pathway“ akzeptiert und erfolgreich in zelluläre RNA inkorporiert werden (Abbildung 11).⁷⁸ Die Vinyl-Gruppe ermöglicht anschließend die Visualisierung oder Isolation der markierten RNA durch IEDDA-Reaktion mit funktionalisierten Tetrazinen.^{78, 103}

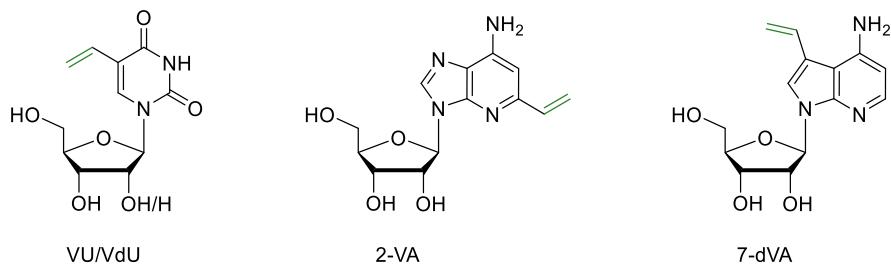


Abbildung 11: Übersicht vinylmodifizierter Nukleosid-Analoga für die bioorthogonale Markierung von DNA bzw. RNA mittels IEDDA.^{78, 101}

Im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen ethinylmodifizierten Nukleosid EU weist VU eine deutlich geringere Toxizität auf und zeigt keine negativen Auswirkungen auf die Zellproliferation.⁷⁸ Neben der Visualisierung neu synthetisierter RNA in Zellen wurde VU erfolgreich zur Fluoreszenzmarkierung von Tumoren in lebenden Mäusen eingesetzt (Abbildung 12). Nach Injektion reichert sich VU im Tumorgewebe an und ermöglicht nach metabolischer Inkorporation in die RNA die gezielte Visualisierung des Tumors durch IEDDA-Reaktion mit einem fluorogenen BODIPY-Tetrazin-Derivat.¹⁰³

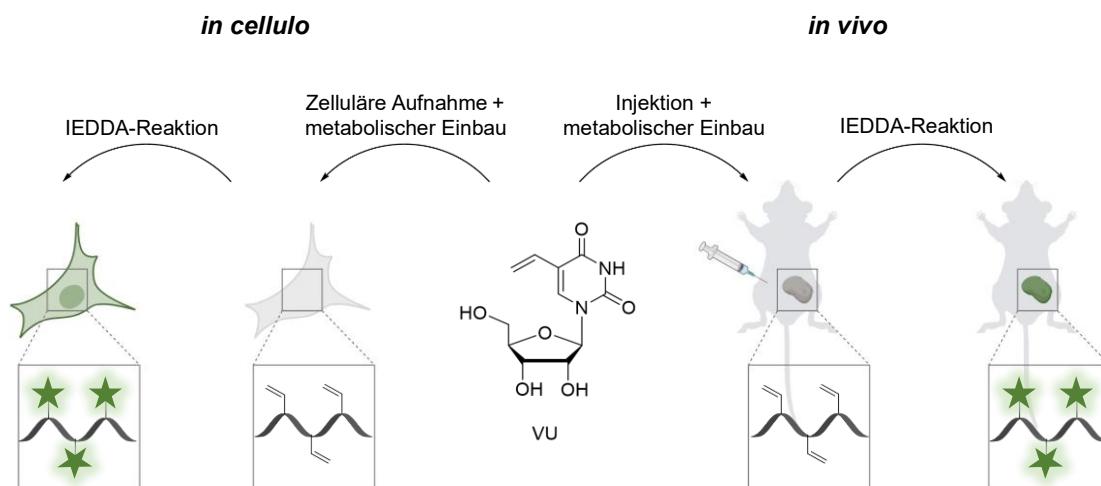


Abbildung 12: Schematische Darstellung der metabolischen Inkorporation von VU in neu synthetisierte RNA *in cellulo* sowie *in vivo* und anschließender Visualisierung markierter RNA durch IEDDA-Reaktion mit einem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat. Die Fluoreszenzmarkierung *in vivo* ermöglicht die selektive Visualisierung von Tumoren in lebenden Mäusen.^{55, 78, 103} Erstellt mit bioRender.com.

Vinylmodifizierte Nukleosid-Reporter zeichnen sich insbesondere durch die geringe Größe der bioorthogonalen Modifikation aus, wodurch sie problemlos von endogenen Kinasen akzeptiert

und in das entsprechende Triphosphat umgesetzt werden können.^{78, 103} Nach deren Einbau in die DNA bzw. RNA führen sie zudem nur zu minimalen strukturellen Veränderungen, sodass die native biologische Funktion weitgehend erhalten bleibt.^{67, 78, 104} Nachteilig sind die in IEDDA-Reaktionen mit Tetrazinen erzielten Reaktionsgeschwindigkeiten, die vergleichbar mit den Geschwindigkeitskonstanten der SPAAC sind.^{34, 78} Aufgrund der geringen Reaktionskinetik ist eine effiziente Verfolgung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen limitiert. Für ein zuverlässiges Monitoring sollten die Reaktionsgeschwindigkeiten bioorthogonaler Reaktionen idealerweise im Bereich zellulärer Prozesse liegen.²⁰

Eine Möglichkeit vinylmodifizierte Nukleoside für die Visualisierung neu synthetisierter DNA bzw. RNA in lebenden Zellen zugänglich zu machen, konnte von *Luedtke et al.* durch die Verwendung einer fluorogenen PINK-Sonde (engl. *probe for imaging nucleosidic alkene groups*) demonstriert werden.¹⁰⁵ Dabei handelt es sich um ein Konjugat aus einem interkalierenden Fluorophor (Acridinorange) und einem Tetrazin. Letzteres dient sowohl als bioorthogonal reaktive Gruppe als auch als Fluoreszenzlöscher des gekoppelten Fluorophors.^{34, 106} Nach Interkalation von PINK in vinylmodifizierte Nukleinsäuren erfolgt eine templatgestützte IEDDA-Reaktion, die im Vergleich zur nicht-templatgestützten Reaktion eine bis zu 60.000-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit zeigt.¹⁰⁵ Zusätzlich führt der Verlust des Tetrazins zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, wodurch eine Detektion in lebenden Zellen unter waschfreien Bedingungen ermöglicht wird.¹⁰⁵ Allerdings ist die Anwendung von PINK limitiert, da die Sonde potenziell DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen induzieren kann, was die Integrität und Funktionalität der DNA beeinträchtigt und somit die Dauer der Verwendung signifikant einschränkt.^{20, 105} Eine ähnliche duale Verstärkungsstrategie konnten *Wagenknecht et al.* durch den Einsatz tetrazinmodifizierter Cyanin-Styryl-Farbstoffe zeigen.^{49, 107} Durch Vorkoordination der positiv geladenen Tetrazin-Farbstoff-Konjugate an die DNA kann die Reaktionsgeschwindigkeit der IEDDA-Reaktion mit BCN-modifizierter DNA im Vergleich zur Reaktion mit BCN-modifiziertem Nukleosid, signifikant erhöht werden. Darüber hinaus wurde für modifizierte DNA aufgrund einer Zwei-Faktor-Fluorogenität ein deutlich stärkerer Fluoreszenzanstieg beobachtet (Abbildung 13). Dieser beruht nicht nur auf dem Verlust der tetrazinbedingten Quenchereigenschaft infolge der IEDDA-Reaktion, sondern auch auf einer strukturellen Fluorogenität, die durch die nicht-kovalente Bindung an DNA verursacht wird.⁴⁹ Es wird angenommen, dass letztere die Rotation um die zentrale Doppelbindung einschränkt, wodurch strahlungsfreie Relaxationsprozesse verhindert werden, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt.

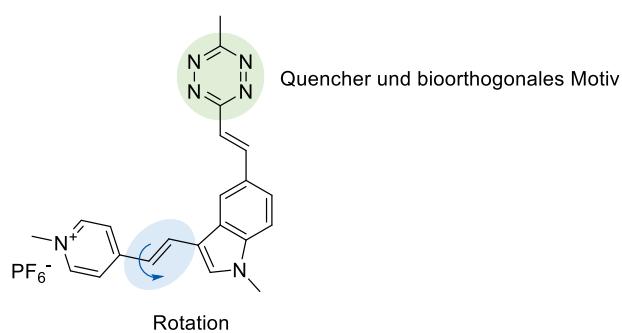


Abbildung 13: Zwei-Faktor-Fluorogenität des tetrazinmodifizierten Cyanin-Styryl Fluorophors. Das Tetrazin dient als bioorthogonal reaktive Gruppe sowie als effizienter Fluoreszenzlöscher (Quencher) des gekoppelten Fluorophors (grün). Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität erfolgt durch Verlust der Tetrazin-Funktion durch die IEDDA-Reaktion mit geeigneten Dienophilen. Die nicht-kovalente Bindung an Nukleinsäuren führt zudem zu einer strukturellen Fluorogenität durch eingeschränkte Rotation um die zentrale Doppelbindung (blau).⁴⁹

Darüber hinaus wird die Reaktionskinetik der IEDDA-Reaktion primär durch die Energiedifferenz zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital des Dienophils (engl. *highest occupied molecular orbital*, $\text{HOMO}_{\text{Dienophil}}$) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital des Diens (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, $\text{LUMO}_{\text{Dien}}$) bestimmt.³⁴ Dementsprechend lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit durch Minimierung der Energiedifferenz signifikant erhöhen. Neben elektronischen Effekten der Substituenten, hat insbesondere die Ringspannung des Dienophils einen entscheidenden Einfluss auf die Kinetik der IEDDA-Reaktion.^{34, 108} Sauer *et al.* konnten zeigen, dass die Reaktivität ringgespannter Cycloalkene in der Reihenfolge Cyclopropen > Cyclobuten > Cyclopenten > Cyclohexen > Cycloocten abnimmt, was unmittelbar mit der Ringspannung korreliert.^{108, 109} Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *trans*-Cycloocten (TCO) trotz geringerer Ringspannung eine gesteigerte Reaktivität in IEDDA-Reaktionen im Vergleich zu Cyclopropenen aufweist.^{108, 109} Dies lässt sich im Rahmen des „Distortion/Interaction-Model“ von Bickelhaupt und Houk dadurch erklären, dass die durch den achtgliedrigen Ring bereits vorverzerrte Doppelbindung nur eine geringe zusätzliche Verzerrungsenergie erfordert.¹¹⁰ Gleichzeitig erlaubt die vorverzerrte Geometrie der Doppelbindung eine günstige Orbitalwechselwirkungen mit dem Tetrazin.¹¹¹⁻¹¹³ TCO stellt das kleinste stabile Cycloalken mit einer Doppelbindung in *trans*-Konfiguration dar.¹⁰⁸ Im Vergleich zu *cis*-Cycloocten (CCO) zeigt TCO eine deutlich erhöhte Reaktivität in IEDDA-Reaktionen.^{34, 109, 114} Dies ist unter anderem auf die charakteristische Kronen-Konformation von TCO zurückzuführen, die eine hohe konformationelle Spannung aufweist.^{34, 109, 115, 116} Analog zu Cycloalkenen führt auch bei Cycloalkinen die Ringspannung zu einer erhöhten Reaktivität gegenüber Tetrazinen. Ursache hierfür ist die Abweichung der Dreifachbindung von der linearen

Geometrie. Durch die Einführung zusätzlicher kleiner Ringe am Cyclooctin, wie beispielsweise in Bicyclo[6.1.0]non-4-in (BCN), kann die Reaktionsgeschwindigkeit weiter gesteigert werden. So reagiert BCN im Vergleich zu Cyclooctin etwa 47-mal schneller mit Diphenyltetrazin.¹¹⁷ Eine Übersicht der am häufigsten verwendeten Dienophile für die bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren mittels IEDDA-Reaktion sind in Abbildung 14 dargestellt.

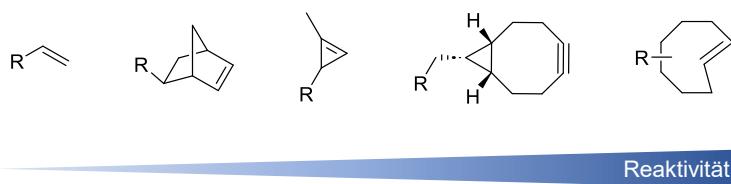


Abbildung 14: Übersicht geeigneter Dienophile für die IEDDA-Reaktion mit Tetrazinen. Hierbei ist die Vinyl-Gruppe die am wenigsten reaktive, während TCO die reaktivste Gruppe darstellt.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Dienophil können Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von $k_2 = 10^{-2}$ bis $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erreicht werden, wobei IEDDA-Reaktionen mit BCN und TCO die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen.^{34, 118} Im Gegensatz zu TCO, welches synthetisch anspruchsvoll ist und in Gegenwart von Thiolen zum weniger reaktiven CCO isomerisieren kann, zeichnet sich BCN durch eine höhere chemische Stabilität aus und ist zudem synthetisch leichter zugänglich.^{97, 115} Die Verwendung reaktiver Dienophile ist jedoch mit einem erhöhten sterischen Anspruch verbunden, der die Interaktion dieser modifizierten Nukleoside mit zellulären Kinasen beeinflusst.⁷⁸ Wie zuvor beschrieben zeigen endogene Kinasen eine hohe Substratspezifität, welche die Phosphorylierung und demnach den Einbau von Nukleosiden mit sterisch anspruchsvollen Modifikationen in Nukleinsäuren deutlich einschränkt.^{78, 119} Zur systematischen Untersuchung der Auswirkungen der Modifikationsgröße auf die Effizienz der metabolischen Markierung zellulärer DNA analysierten *Wagenknecht et al.* den Einbau von modifizierten 2'-Desoxynukleosiden mit unterschiedlichen sterischen Anforderungen.¹²⁰ Ein erfolgreicher Einbau der vinyl-, methylcyclopropen- sowie norbornenmodifizierten 2'-Desoxyuridine konnte ausschließlich unter optimierten Kultivierungsbedingungen erreicht werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Einbaueffizienz von der Molekülgröße.¹²⁰

2 Metabolische Markierung mit Nukleotiden

Zur Überwindung der Einschränkungen der metabolischen Markierung wurden Strategien entwickelt, die den intrazellulären Phosphorylierungsprozess umgehen. Das Ziel dieser Strategien besteht darin, Nukleosid-Reporter mit sterisch gehinderten, aber hochreaktiven Funktionalitäten wie beispielweise BCN oder TCO für die bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren zugänglich zu machen. Neben dem zuvor beschriebenen Einsatz mutierter⁹² oder viraler Enzyme^{66, 95} zur Erweiterung der Substratspezifität ist es möglich, die intrazelluläre Phosphorylierung durch die Bereitstellung der entsprechenden Mono-, Di- oder Triphosphate der modifizierten Nukleoside teilweise oder vollständig zu umgehen. Der anionische Charakter der Phosphate verhindert jedoch deren Zellpermeabilität.¹²¹ Eine Möglichkeit zur effizienten intrazellulären Bereitstellung von Nukleotiden ist die Synthese von Pronukleotiden. Hierbei werden die negativ geladenen Phosphatgruppen der Mono-, Di- oder Triphosphate mit bioreversiblen Gruppen maskiert, um den Nukleotiden einen ausreichend lipophilen Charakter zu verleihen und dadurch deren Zellgängigkeit signifikant zu verbessern. Ursprünglich wurde das Konzept der Pronukleotide für eine Anwendung in der medizinischen Chemie entwickelt, um die pharmakologischen Eigenschaften von Nukleotid-Analoga zu verbessern. Diese kommen hauptsächlich als Therapeutika in der antiviralen und antitumoralen Therapie zum Einsatz.¹²²⁻¹²⁶ Die Pronukleotid-Strategie ermöglicht eine effiziente zelluläre Aufnahme, unabhängig von spezifischen Transportersystemen, und bietet einen direkten Zugang zu biologisch aktiven Nukleotiden. Die intrazelluläre Freisetzung erfolgt in Abhängigkeit von der jeweiligen Schutzgruppe durch enzymatische oder chemische Demaskierung. Basierend auf den Erkenntnissen der entwickelten antiviralen und antitumoralen Monophosphat-*Prodrugs*^{122, 127-129} konnten Royzen *et al.* im Jahr 2019 zum ersten Mal die Pronukleotid-Strategie auf die bioorthogonale Markierung von RNA ausweiten.¹³⁰ Hierfür wurde zunächst das 4TCO-modifizierte Adenosinmonophosphat an der 5'-Monophosphat-Gruppe durch ein Aryl-Phosphoramidit maskiert (Abbildung 15).¹³⁰

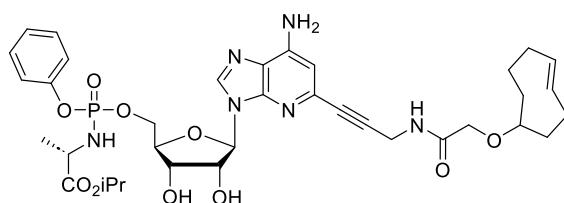


Abbildung 15: Struktur des Phosphoramidit-Pronukleotids eines 4TCO-modifizierten Adenosins für die bioorthogonale Markierung von RNA.¹³⁰

Nach intrazellulärer Aufnahme wird das maskierte Monophosphat durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt und nach weiteren Phosphorylierungsschritten in die zelluläre RNA inkorporiert. Eine anschließende Detektion der TCO-markierten RNA erfolgte durch IEDDA-Reaktion mit einem tetrazinfunktionalisierten Oregon Green 488.¹³⁰

Als Alternative zu den enzymatisch abspaltbaren Maskierungsgruppen entwickelten Meier *et al.* das sogenannte *cycloSal*-Konzept.¹³¹⁻¹³³ Diese Strategie basiert auf Salicylalkohol-Derivaten als Maskierungseinheit, die über einen Phosphorsäurediester zyklisch mit der Phosphatgruppe des NMP verknüpft sind (Abbildung 16). Der dabei entstehende NMP-Triester verleiht dem Pronukleotid lipophile Eigenschaften und ermöglicht so die Aufnahme in die Zelle durch passive Diffusion. Intrazellulär wird die *cycloSal*-Maske bei pH > 7 selektiv durch Hydrolyse abgespalten, wobei das NMP freigesetzt wird (Abbildung 16).¹³³⁻¹³⁵

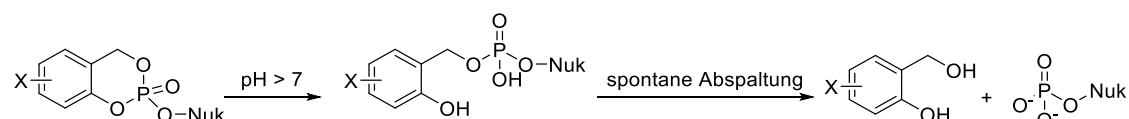


Abbildung 16: Struktur und chemische Aktivierung von *cycloSal*-Verbindungen. Nuk = Nukleosid.^{135, 136}

Das *cycloSal*-Konzept wird hauptsächlich in der Entwicklung antiviraler Medikamente angewendet, beispielsweise zur Behandlung von HIV- oder EBV-Infektionen.¹³⁷⁻¹³⁹ Eine Anwendung zur bioorthogonalen Markierung von Nukleinsäuren ist bislang nicht bekannt. Im mehrstufigen, durch Kinasen katalysierten Phosphorylierungsprozess von Nukleosiden gilt insbesondere der erste Phosphorylierungsschritt als geschwindigkeitsbestimmend. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch die nachfolgenden Phosphorylierungsschritte zur Bildung der entsprechenden Nukleosiddiphosphate (NDP) und -triphosphate (NTP) durch die jeweiligen Mono- bzw. Diphosphat-Kinasen limitierend sein können.^{20, 136} Aus diesem Grund werden Strategien benötigt, die modifizierten NDP sowie NTP für die intrazelluläre Aufnahme bereitzustellen. Die Ausweitung der *cycloSal*-Strategie auf NDP scheiterte vor allem an der Instabilität der energiereichen Phosphorsäureanhydrid-Bindung. Statt der gewünschten Freisetzung des NDP wurde in Hydrolysestudien überwiegend die Bildung des entsprechenden NMPs beobachtet.^{136, 140}

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen entwickelten Meier *et al.* das Diphosphat-Pronukleotid Konzept (DiPPro-Konzept), als alternative Maskierungsstrategie für NDP.^{136, 141} Das hierfür

eingesetzte Bis(acyloxybenzyl)-Konzept (BAB-Konzept) wurde ursprünglich von *Thomson et al.* für NMP-Pronukleotide entworfen.¹⁴² Die Maskierung der NDP mit Acyloxybenzyl-Gruppen (AB-Gruppen) erfolgt ausschließlich an der β -Phosphatgruppe, während die verbleibende negative Ladung der α -Phosphatgruppe zur Stabilisierung des Pyrophosphats dient.¹³⁶ Nach intrazellulärer Aufnahme erfolgt die Freisetzung des NDP durch enzymatische Esterspaltung (Abbildung 17).

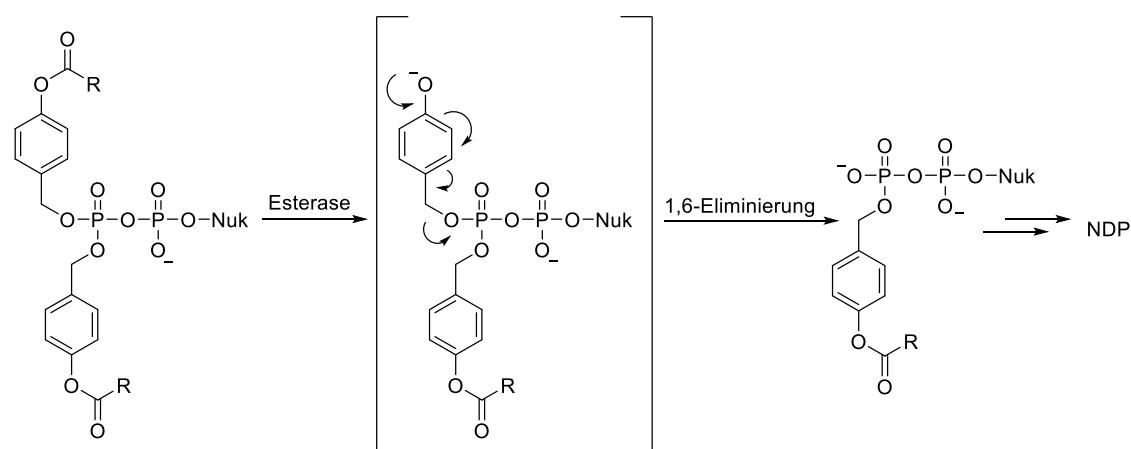


Abbildung 17: Struktur und enzymatischer Aktivierungsweg von BAB-Verbindungen zur Freisetzung des NDP.¹³⁶

Das dadurch gebildete Phenolat zerfällt daraufhin in einer 1,6-Eliminierung durch spontane Spaltung der Benzyl-C-O-Bindung zum monomaskierten NDP.^{136, 143} Durch Wiederholung dieses Mechanismus wird schließlich das NDP freigesetzt. Hydrolysestudien zeigten, dass DiPPro-Verbindungen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen *cycloSal*-Diphosphaten eine hohe chemische Stabilität aufweisen und gleichzeitig eine schnelle sowie effiziente enzymatische Abspaltung der Maskierungsgruppen in Zellextrakten erfolgt.^{136, 140, 143} Das DiPPro-Konzept konnte bereits erfolgreich für die intrazelluläre Bereitstellung unterschiedlicher modifizierter NDP, insbesondere im Bereich der antiviralen sowie antitumoralen Therapie, eingesetzt werden.^{141, 143, 144}

Um eine vollständige Unabhängigkeit von intrazellulären Phosphorylierungsprozessen durch endogene Kinasen zu erreichen, ist die Einbringung von NTP in die Zelle erforderlich. Dieses Ziel wurde durch die Erweiterung des DiPPro-Konzepts auf NTP im sogenannten Triphosphat-Pronukleotid-Konzept (TriPPPPro-Konzept) realisiert.¹²¹ Die symmetrische Maskierung der terminalen γ -Phosphatgruppe mit AB-Maskierungsgruppen, ermöglicht die

zelluläre Aufnahme durch passive Diffusion. Die intrazelluläre Abspaltung erfolgt analog zu der zuvor beschriebenen Abspaltung der DiPPro Maskierungsgruppen.¹³⁶ Meier *et al.* konnten die erfolgreiche Anwendung des TriPPPPro-Konzepts für die bioorthogonale Markierung zellulärer sowie viraler DNA unter Verwendung des 2TCO_a-modifizierten TriPPPPro zeigen (Abbildung 18).¹²¹

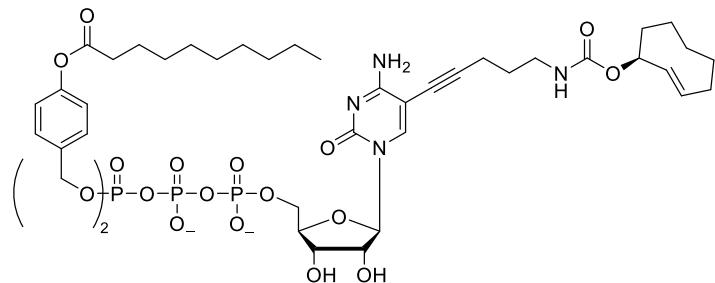


Abbildung 18: Struktur des 2TCO_a-modifizierten TriPPPros für die bioorthogonale Markierung neu synthetisierter DNA.¹²¹

Das modifizierte TriPPPPro konnte erfolgreich nach intrazellulärem Transport und Demaskierung in neu synthetisierte DNA lebender Zellen eingebaut werden. Die anschließende Detektion der TCO-markierten DNA erfolgte durch IEDDA-Reaktion mit fluorogenen zellgängigen Tetrazin-Fluorophor Konjugaten.¹²¹

Unter den verfügbaren Strategien stellt neben den Pronukleotid-Konzepten der von Kraus *et al.* entwickelte synthetische Nukleosidtriphosphat-Transporter (SNT-Transporter, **SNTT1**) einen vielversprechenden Ansatz dar.¹⁴⁵ Hierbei handelt es sich um ein bifunktionelles Molekül, bestehend aus einer Rezeptor-Einheit sowie einem zellpenetrierenden Anteil aus acht Aminocapronsäure/Arginin-Paaren, welche eine schnelle und effiziente Translokation über die Plasmamembran innerhalb weniger Sekunden ermöglichen.^{20, 145} Die Rezeptor-Einheit, ein Per-6-amino-β-cyclodextrin, ist in der Lage einen stabilen nicht-kovalenten Komplex mit dem zu transportierenden Triphosphat zu bilden (Abbildung 19).¹⁴⁵ Kraus *et al.* postulieren für die intrazelluläre Freisetzung des Triphosphats von der Rezeptor-Einheit eine kompetitive Verdrängung durch natürlich vorkommende NTP, wie Adenosintriphosphat (ATP).

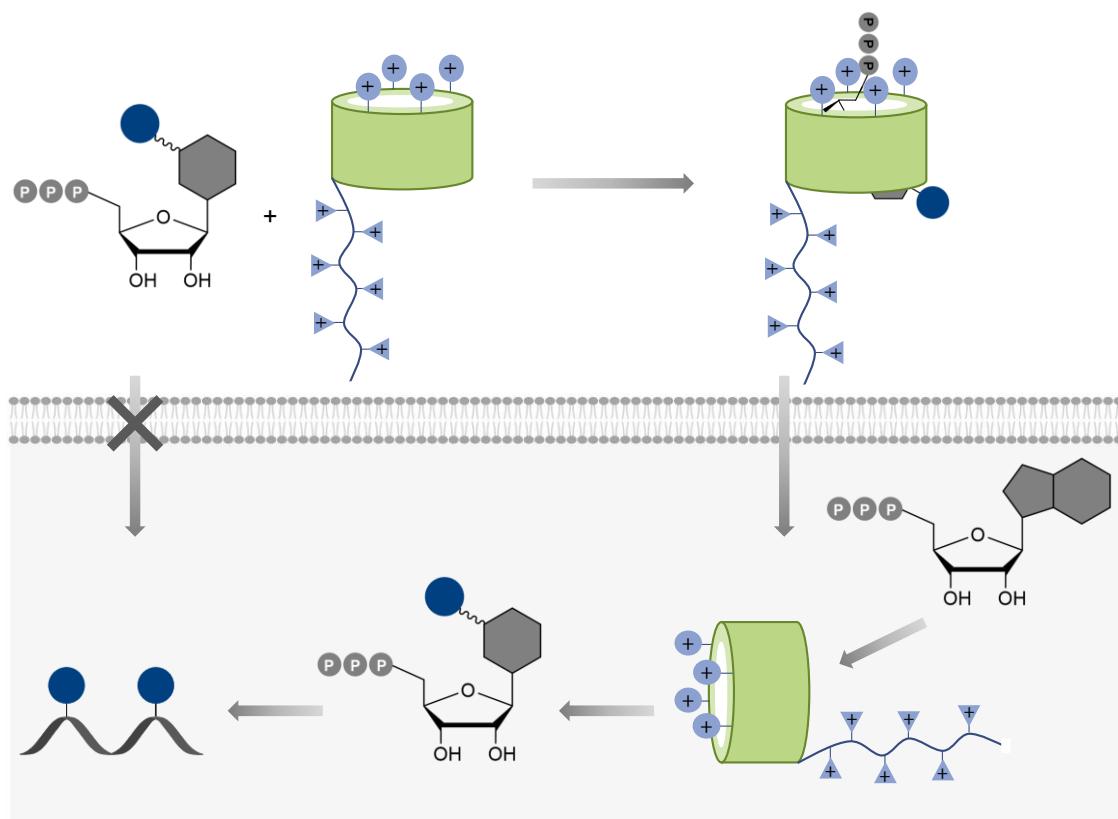


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Transports von modifizierten Nukleosidtriphosphaten in die Zelle mit Hilfe des SNT-Transporters.¹⁴⁵

Der SNT-Transporter konnte bereits erfolgreich für die Fluoreszenzmarkierung zellulärer DNA mit verschiedenen Fluorophor-gekoppelten NTP, wie beispielsweise Alexa-488-dUTP und Cy3-dUTP, eingesetzt werden.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Die Verwendung eines mit Thiazol-Orange modifizierten dCTPs (dC^{CO}TP) ermöglichte darüber hinaus die direkte Visualisierung neu synthetisierter DNA mittels Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM).¹⁴⁶ Nach dem Einbau der modifizierten NTP in die DNA weist Thiazol-Orange im Vergleich zu dem freien dC^{CO}TP eine verringerte Fluoreszenzlebenszeit auf, was die Echtzeit-Visualisierung von *de novo* synthetisierter DNA in lebenden U2OS-Zellen ab dem Zeitpunkt der Bildung ermöglicht.¹⁴⁶ Die Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren mittels Farbstoff-gekoppeltem NTP ermöglicht zwar eine unmittelbare Visualisierung der markierten Nukleinsäuren, jedoch führt das Vorhandensein freier NTP zu einem hohen unspezifischen Hintergrundsignal. Dies erfordert in den meisten Fällen eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, um freies NTP durch Waschschritte entfernen zu können. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern und gleichzeitig waschfreie Bedingungen zu ermöglichen, ist die Verwendung von fluorogenen Tetrazin-Farbstoff Konjugaten für die

Zwei-Schritt-Markierung entscheidend.²⁰ *Hocek et al.* demonstrierten die zweistufige bioorthogonale Markierung von DNA mit TCO- und BCN-modifizierten NTP in lebenden Zellen.¹⁴⁸ Diese wurden mittels **SNTT1** in die Zelle transportiert und nach erfolgreicher Inkorporation in die DNA in einer IEDDA-Reaktion mit fluorogenen Tetrazin-Fluorophor Konjugaten visualisiert.¹⁴⁸

Die zuvor beschriebenen Markierungsstrategien wurden bislang hauptsächlich für die metabolische Markierung von DNA eingesetzt, entsprechende Anwendungen für RNA sind bisher nicht bekannt.

III. Themenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen Strategien entwickelt und implementiert werden, die den metabolischen Einbau von Nukleosid- bzw. Nukleotid-Analoga mit hoch reaktiven chemischen Reportergruppen in neu synthetisierte zelluläre RNA ermöglichen. Ziel ist es, durch eine darauffolgende spezifische Detektion der markierten RNA mittels IEDDA-Reaktion mit einem fluorogenen Tetrazin-Farbstoff-Konjugat eine Echtzeit-Visualisierung der RNA in lebenden Zellen zu ermöglichen. Dies soll dazu beitragen, RNA-abhängige dynamische Prozesse in der nativen zellulären Umgebung untersuchen und aufklären zu können.

Hierzu werden vier unterschiedliche Strategien hinsichtlich ihrer Eignung für die bioorthogonale Markierung von RNA evaluiert (Abbildung 20). Neben dem Einsatz eines modifizierten Nukleosids sollen insbesondere modifizierte Nukleosidtriphosphate verwendet werden, mit dem Ziel, die Limitierungen durch die Substratspezifität endogener Kinasen zu umgehen. Im Rahmen dieser Arbeit werden diese daher zunächst synthetisiert und umfassend charakterisiert. Für die intrazelluläre Aufnahme der anionischen, modifizierten NTP werden verschiedene Transportstrategien untersucht. Hierbei sollen die bereits für die bioorthogonale Markierung von DNA etablierten Strategien des TriPPPPro-Konzepts sowie des SNT-Transporters auf die RNA-Markierung übertragen und auf ihre Effizienz untersucht werden. Darüber hinaus sollen anorganisch-organische-Hybridnanopartikel (IOH-NP) synthetisiert und umfassend charakterisiert werden. Darauf aufbauend sollen die IOH-NP auf ihre Eignung als zelluläre Nukleotid-Transporter untersucht werden.

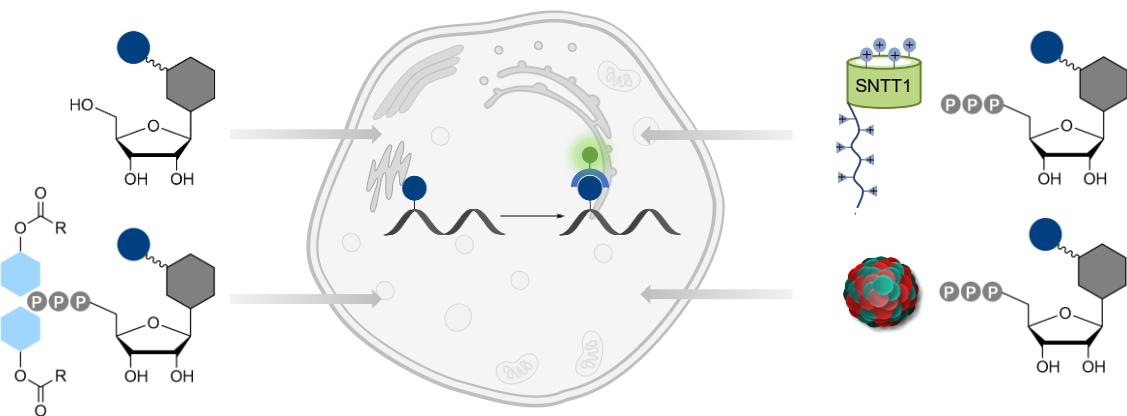


Abbildung 20: Übersicht möglicher Strategien zur bioorthogonalen Markierung von RNA.

Themenstellung

IV. Modifizierte Nukleoside für die metabolische Markierung von RNA

1 Design des 1-methylcyclopropenmodifizierten Nukleosids 1

Die bioorthogonale Markierung mittels IEDDA-Reaktion zählt zu den fortschrittlichsten und selektivsten Methoden zur spezifischen Visualisierung von Nukleinsäuren in ihrer nativen Umgebung. Unter den verfügbaren chemischen Reportern sind insbesondere Cyclopropene aufgrund ihrer geringen Größe vielversprechend für die bioorthogonale Markierung von RNA und DNA. Unsubstituierte Cyclopropene reagieren mit Tetrazinen in einer IEDDA-Reaktion unter Bildung stabiler Diazanorcaradienen mit hohen Reaktionsgeschwindigkeiten.¹⁰⁹ Aufgrund ihrer Ringspannung von 55.2 kJ/mol¹⁰⁸ und der damit einhergehenden hohen Reaktivität weisen Cyclopropene bei Raumtemperatur jedoch eine geringe Stabilität im Vergleich zu anderen chemischen Reportern wie beispielsweise BCN auf. Zudem neigen sie zur Dimerisierung sowie Polymerisation.^{149, 150} Durch die Einführung von Methylsubstituenten kann die Stabilität der Cyclopropene erhöht werden, ohne dabei einen signifikanten Einfluss auf die sterischen Eigenschaften sowie die Reaktionsgeschwindigkeit zu nehmen.¹⁵¹ Es konnte gezeigt werden, dass 1-Methylcyclopropene den besten Kompromiss aus Reaktivität und Stabilität darstellen.^{120, 152}

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher das 1-methylcyclopropenmodifizierte Nukleosid **1** für eine Anwendung in der metabolischen Markierung von RNA entworfen (Abbildung 21). Der strukturelle Aufbau des modifizierten Nukleosids wurde gezielt an die Anforderungen der späteren Anwendung im zellulären System angepasst. Als Anknüpfungspunkt des chemischen Reporters wurde aus synthetischen Gründen die C3-Position des Cyclopropens gewählt. Da das Substitutionsmuster der Cyclopropene einen entscheidenden Einfluss auf dessen Reaktivität gegenüber Tetrazinen in der IEDDA-Reaktion hat, muss bei der Wahl der Linkerstruktur auf deren elektronische Eigenschaften geachtet werden. Elektronenziehende Substituenten stabilisieren den Cyclopropenring und führen zu einer verminderten Reaktivität. Im Gegensatz dazu führen elektronenreiche Substituenten zu einer gesteigerten Reaktivität.³⁴ Devaraj *et al.* konnten zeigen, dass Carbamat-substituierte Cyclopropene eine um zwei Größenordnungen höhere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante aufweisen als Cyclopropen-Carboxamide.¹⁵¹ Darüber hinaus konnten Wagenknecht *et al.* zeigen, dass Harnstoff-substituierte Cyclopropene,

trotz einer verstärkten elektronenschiebenden Wirkung, keine weitere Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirken.¹⁵³ Deswegen fiel für das hier betrachtete Nukleosid **1** die Wahl auf einen Carbamat-Linker. Um die Akzeptanz des cyclopropenmodifizierten Nukleosids **1** durch metabolisierende Enzyme zu gewährleisten, wurde die 5-Position des Uridins modifiziert. Wie zuvor beschrieben konnten Kristallstrukturanalysen der substratgebundenen Uridin-Cytidin-Kinase (UCK) zeigen, dass diese Position für strukturelle Veränderungen des Substrats geeignet ist, da hier das aktive Zentrum des Enzyms ausreichend Raum für Modifikationen zulässt.⁷⁸

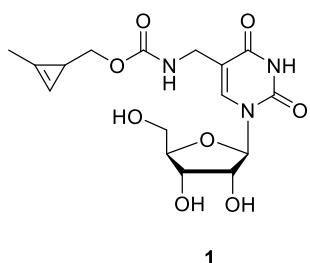
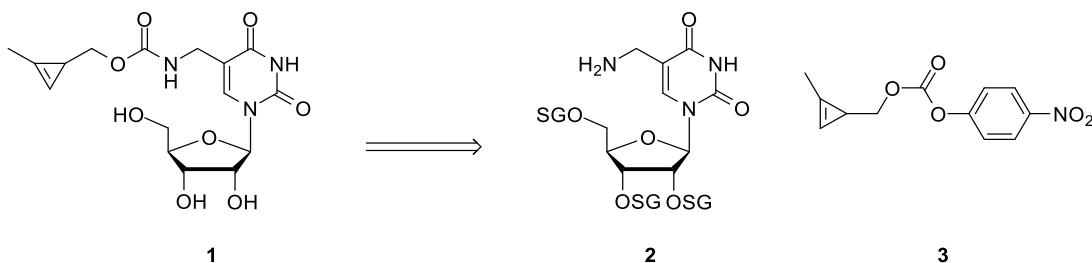
**1**

Abbildung 21: Struktur des 1-methylcyclopropenmodifizierten Nukleosids **1** für die bioorthogonale Markierung von RNA.

Prescher et al. konnten zeigen, dass disubstituierte Cyclopropene, die eine Methylgruppe in der C1-Position tragen, mit Tetrazinen reagieren, während 3,3-disubstituierte Cyclopropene keine Reaktivität gegenüber Tetrazinen in einer IEDDA-Reaktion zeigen.¹⁵² Dieser Reaktivitätsunterschied lässt sich durch eine sterische Hinderung der Methylgruppe bei 3,3-disubstituierten Cyclopropenen im Übergangszustand der IEDDA-Reaktion erklären. Die Substitution an C3-Position wirkt sich dagegen nicht auf die Reaktivität gegenüber Nitriliminen in einer Photoclick-Reaktion aus. Die Unterschiede im Reaktivitätsprofil von 1,3- und 3,3-disubstituierten Cyclopropenen bieten somit die Möglichkeit einer dualen, orthogonalen Markierung von Biomolekülen.^{152, 153}

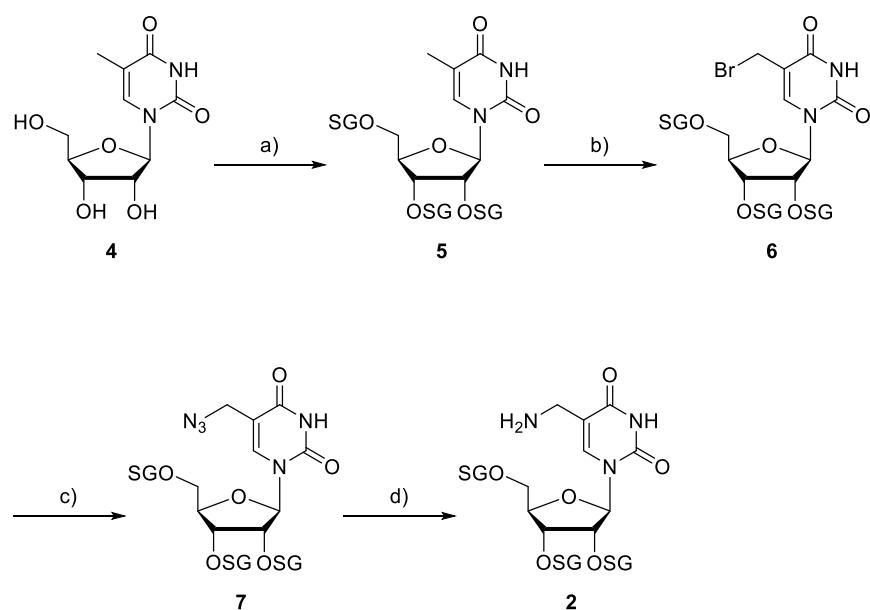
2 Synthese des 1-Methylcyclopropenmodifizierten Nukleosids 1

Das 1-Methylcyclopropenmodifizierte Nukleosid **1** wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Kupplung und anschließende Entschützung des aminofunktionalisierten Uridins **2** mit dem aktivierten 1-Methylcyclopropen (1-MCP) **3** unter Ausbildung eines Carbamats synthetisiert (Schema 1).



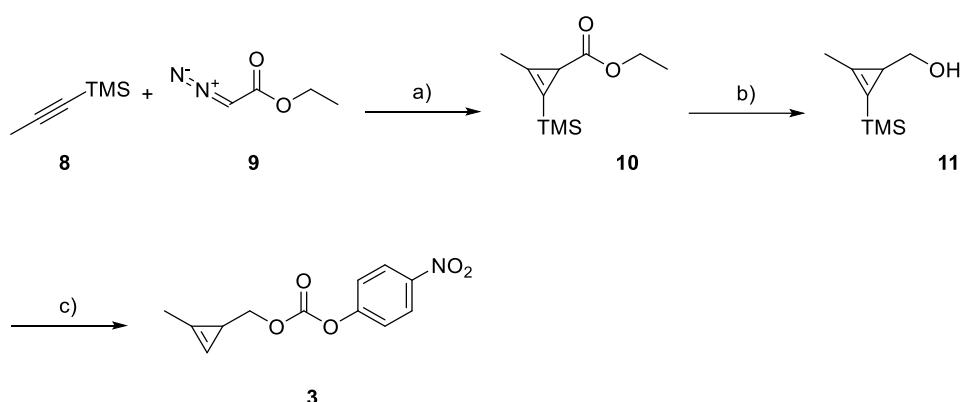
Schema 1: Retrosynthese des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** aus den folgenden Bausteinen: aminomodifiziertes Nukleosid **2** und Cyclopropen **3**. Das Zielmolekül wird nach Kupplung und anschließender Entschützung der Schutzgruppen erhalten. SG = Schutzgruppe.

Die Synthese des Uridins **2** erfolgte nach einer im Arbeitskreis *Wagenknecht* bereits etablierten Synthesestrategie ausgehend von 5-Methyluridin (**4**) (Schema 2).¹⁵³ Zunächst wurden die Hydroxylgruppen in 2'-, 3'- sowie 5'-Position von **4** mit *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Schutzgruppen versehen, um unerwünschte Nebenreaktionen im weiteren Reaktionsverlauf zu verhindern. Die Einführung der Schutzgruppen erfolgte mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) in Gegenwart von Imidazol als Base. Anschließend wurde das TBDMS-geschützte Nukleosid **5** einer radikalischen *Wohl-Ziegler*-Reaktion mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) als Bromquelle unterzogen. Die Reaktion wurde durch Dibenzoylperoxid (DBPO) als Radikalstarter initiiert. Das bromierte Nukleosid **6** wurde nach wässriger Aufarbeitung direkt in einer nukleophilen Substitution mit Natriumazid umgesetzt. Nukleosid **7** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 31 % über zwei Stufen erhalten werden. Durch Pd/C-katalysierte Hydrierung mit elementarem Wasserstoff konnte das aminomodifizierte Nukleosid **2** in einer Ausbeute von 50 % erhalten werden.



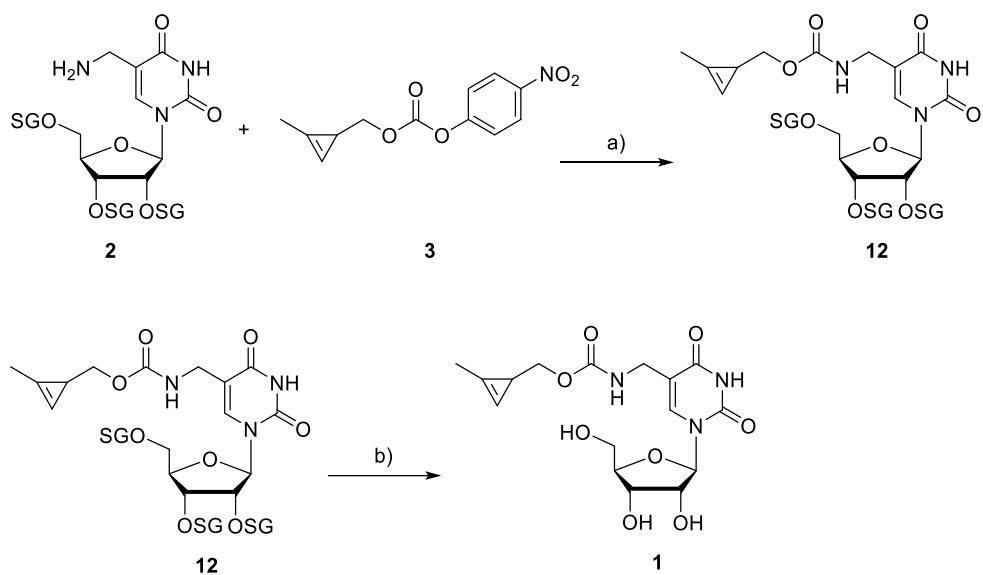
Schema 2: Synthese des aminomodifizierten Nukleosids 2. a) 4.00 Äq. TBDMS-Cl, 8.00 Äq. Imidazol, DMF, 50 °C, 72 h, 94 %. b) 2.10 Äq. NBS, 0.03 Äq. DBPO, Benzol, 85 °C, 2.5 h. c) 2.00 Äq. Natriumazid, DMF, 65 °C, 3 h, 31 % über zwei Stufen. d) 0.340 Äq. Pd/C, H₂, Methanol, RT, 4h, 50 %. SG = TBDMS.

1-MCP **10** wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift von *Fox et al.* synthetisiert (Schema 3).¹⁵⁴ Hierzu wurde Ethyldiazoacetat **9** mit 1-(Trimethylsilyl)-Propin (**8**) in einer rhodiumkatalysierten Cycloaddition umgesetzt. Die reaktive Spezies ist hierbei ein durch Stickstofffreisetzung *in situ* generiertes Carben, welches in einer Cycloaddition mit Alkin **8** reagiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **10** in einer Ausbeute von 48 % erhalten. Die moderate Ausbeute kann unter anderem durch den flüchtigen Charakter kleiner Cyclopropenderivate erklärt werden. Im nächsten Schritt wurde der erhaltene 1-Methylcyclopropenester **10** mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) zum entsprechenden Alkohol **11** reduziert und anschließend mit 4-Nitrophenylchloroformiat aktiviert, um nachfolgend eine Kupplung mit Nukleosid **2** zu ermöglichen. Die Aktivierung mit 4-Nitrophenylchloroformiat erfolgte unter Zugabe von Pyridin nach einer Vorschrift von *Wittmann et al.*¹⁵⁵ Die Zugabe von Pyridin zum Reaktionsgemisch erfolgte zur Neutralisation der *in situ* gebildeten Salzsäure. Pyridin, als schwache organische Base, reagiert mit HCl unter Bildung von Pyridiniumchlorid, wodurch eine Akkumulation von Salzsäure verhindert und somit unerwünschte Nebenreaktionen vermieden wurden. Zusätzlich zur Aktivierung erfolgte eine Abspaltung der Trimethylsilyl (TMS)-Schutzgruppe *in situ* durch Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF). Die TMS-Schutzgruppe gewährleistete in vorherigen Syntheseschritten die Stabilisierung des Cyclopropens.



Schema 3: Synthese des aktivierten 1-MCP-Bausteins **3**. a) 1.00 Äq. Ethyldiazoacetat (**9**), 0.020 Äq. Rh₂(OAc)₄, 2.00 Äq. 1-(Trimethylsilyl)-Propin (**8**), RT, 2 h, 48 %. b) 2.00 Äq. DIBAL-H (1 M in DCM), DCM, -78 °C, 2 h, 67 %. c) I TBAF (1 M in THF), THF, RT, 2 h; II 2.70 Äq. 4-Nitrophenylchloroformiat, Pyridin, RT, 18 h, 36 %. TMS = Trimethylsilyl.

Die Synthese des Zielmoleküls **1** erfolgte im nächsten Schritt durch die Kupplung der beiden zuvor synthetisierten Bausteine **2** und **3** (Schema 4). Die Ausbeute der Carbamatbildung, welche unter anderem von der Nukleophilie des Amins abhängt, wurde durch die Zugabe von Triethylamin als Base gesteigert. Das erhaltene Nukleosid **12** wurde ohne weitere säulenchromatographische Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Nach Abspaltung der TBDMS-Gruppen wurde das 1-Methylcyclopropenmodifizierte Nukleosid **1** in einer Ausbeute von 46 % erhalten. Zur selektiven Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen wurde Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet.

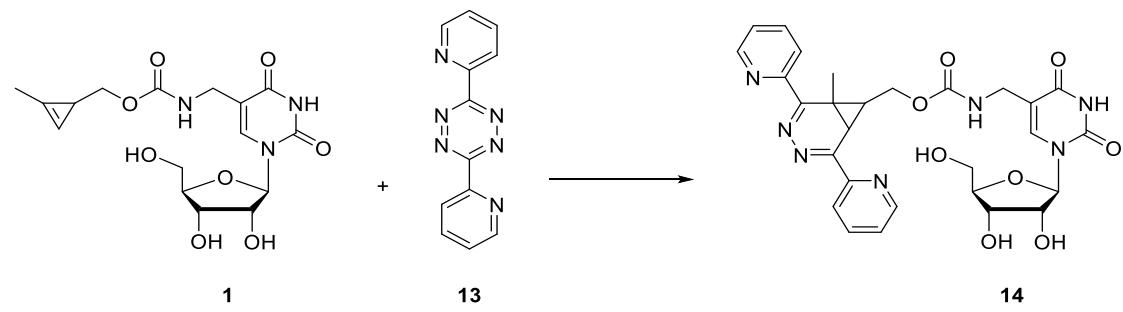


Schema 4: Synthese des Zielmoleküls **1**. a) 1.00 Äq. **2**, 1.40 Äq. **3**, 4.20 Äq. Et₃N, DMF, 40 °C, 2 h. b) 7.00 Äq. Triethylamin-Trihydrofluorid, THF, RT, 24 h, 46 %. SG = TBDMS.

3 Experimente *in vitro*

3.1 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels HPLC

Das synthetisierte 1-MCP-modifizierte Nukleosid **1** wurde als Dienophil in einer IEDDA-Reaktion *in vitro* untersucht. Hierfür wurde als Reaktionspartner das kommerziell erhältliche Tetrazin **13** ausgewählt (Schema 5).



Schema 5: IEDDA-Reaktion des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** mit dem dipyridylylsubstituierten Tetrazin **13** zum „Click“-Produkt **14**. Der Übersichtlichkeit wegen werden keine Stereoisomere angegeben.

Für die Untersuchung der „Click“-Reaktion wurden die Reaktionspartner **1** und **13** in einem Verhältnis von 5:1 (0.5 mM **1**, 0.1 mM **13**) in Wasser mit einem DMSO-Anteil von 1 % bei Raumtemperatur inkubiert. Hierfür wurden zunächst Stammlösungen der Reaktanden in DMSO angefertigt. Die Durchführung der Reaktion im wässrigen Milieu ist im Hinblick auf eine Anwendung in zellulärer Umgebung essenziell. Nach einer Reaktionszeit von 10 h wurde das Reaktionsgemisch mittels HPLC analysiert. Thymidin wurde als interner Standard (IS) verwendet.

Das Chromatogramm der „Click“-Reaktion von **1** und **13** zeigt neben dem Peak des Nukleosids **1** einen neuen Peak bei einer Retentionszeit von 25.4 min sowie einen Peak bei 27.8 min (Abbildung 22). Letzterer konnte durch LC-MS-Analyse dem Dimerisierungsprodukt von **1** zugeordnet werden. Wie bereits beschrieben, kann es bei reaktiven Cyclopropenen bereits bei Raumtemperatur zur Dimerisierung bzw. Polymerisierung kommen. Der neu entstandene Peak bei 25.4 min konnte mittels LC-MS-Analyse dem Reaktionsprodukt **14** zugeordnet werden, was eine erfolgreiche IEDDA-Reaktion zeigt. Da das Chromatogramm des Reaktionsgemisches keine weiteren Peaks unerwünschter Nebenprodukte aufweist, kann auf eine selektive Reaktion mit hoher Ausbeute geschlossen werden. Tetrazin **13**, welches im Unterschuss eingesetzt wurde, konnte nach einer Reaktionszeit von 10 h im Chromatogramm des Reaktionsgemisches nicht mehr detektiert werden, was auf einen vollständigen Umsatz und somit ebenfalls auf eine erfolgreiche „Click“-Reaktion hindeutet.

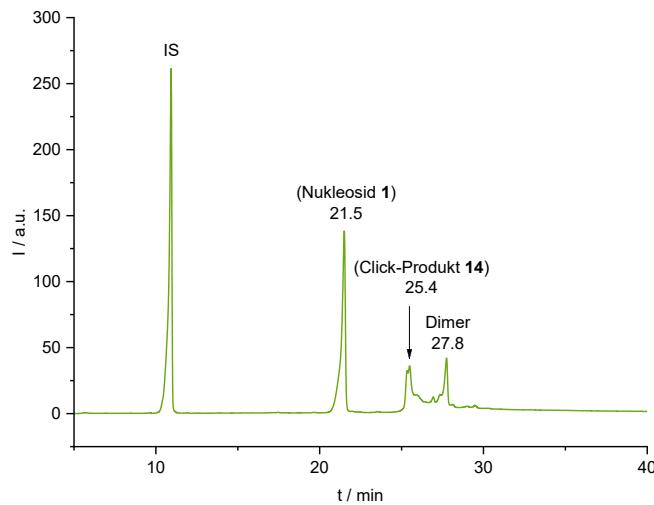


Abbildung 22: Chromatogramm der „Click“-Reaktion zwischen Nukleosid **1** (0.5 mM) und Tetrazin **13** (0.1 mM) in Wasser/DMSO 99:1, nach 10 h Inkubation bei Raumtemperatur. HPLC-Methode: 0 bis 30 % Acetonitril in 30 min bei 30 °C, interner Standard: Thymidin, Injektionsvolumen: 10 µL.

Zur detaillierten Untersuchung des Reaktionsverlaufes der IEDDA-Reaktion wurde die Reaktion über einen Zeitraum von 10 h mittels HPLC verfolgt. Die „Click“-Reaktion wurde entsprechend den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt. In definierten Zeitintervallen von jeweils 1 h wurde eine Probe aus dem Reaktionsgemisch entnommen (Abbildung 23). Bereits nach 1 h ist eine vollständige Abnahme des Tetrazinpeaks bei einer Retentionszeit von 27.1 min zu erkennen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Reaktion bereits nach einer Stunde abgeschlossen ist. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass die Intensität des Nukleosidpeaks bei 21.5 min nach einer Reaktionszeit von 1 h annähernd konstant bleibt. Bereits nach einer Reaktionszeit von 1 h ist der Produktpeak von **14** detektierbar. Die Intensität des Produktpeaks nimmt im weiteren Verlauf der Reaktion kontinuierlich zu. Erst nach einer Reaktionszeit von 9 h ist sie annähernd konstant. Eine Erklärung für den zeitlich verzögerten Anstieg des Produktpeaks liefert der zweistufige Mechanismus der IEDDA-Reaktion. Das finale „Click“-Produkt entsteht infolge einer Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Freisetzung von Stickstoff im zweiten Reaktionsschritt. Auffällig ist zudem der als Doppelpeak erscheinende Produktpeak, was auf die Bildung von Diastereomeren hindeutet und mittels LC-MS Analyse bestätigt werden konnte.

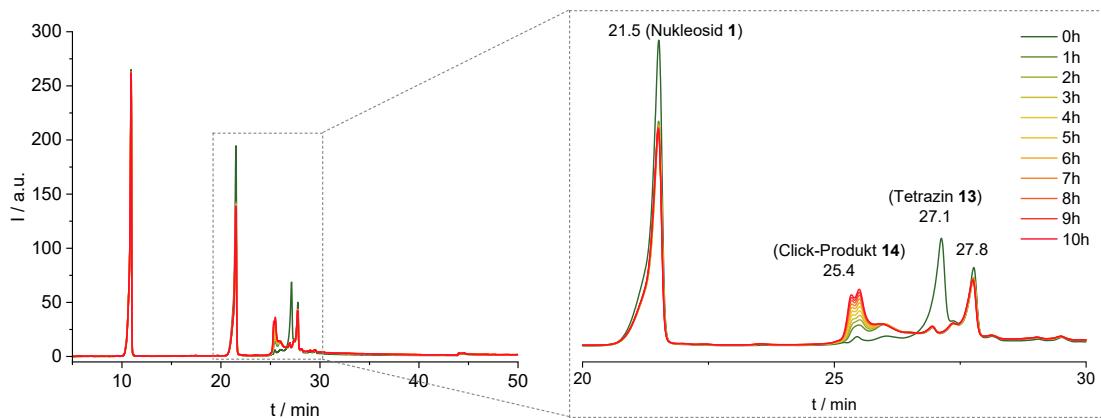
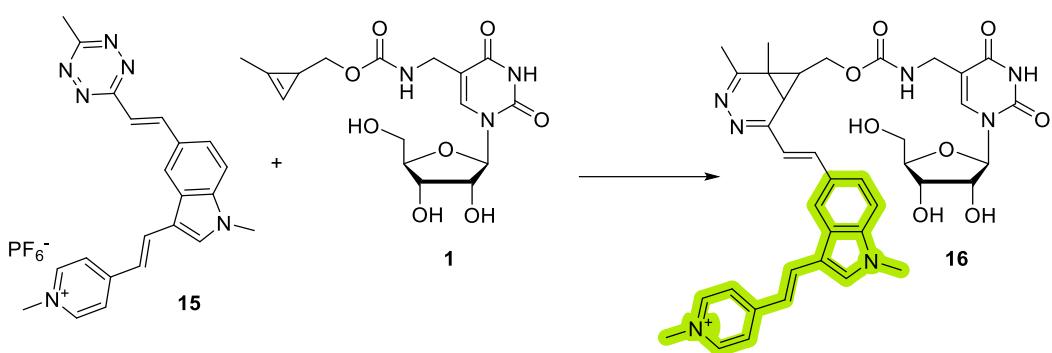


Abbildung 23: Reaktionsverlauf der IEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **1** (0.5 mM) und Tetrazin **13** (0.1 mM) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) über einen Reaktionszeitraum von insgesamt 10 h. Die HPLC-Analyse der Reaktionsmischung erfolgte unmittelbar nach der Zugabe der Reaktanden (0 h) und anschließend in einem Intervall von 1 Stunde. HPLC-Methode: 0 bis 30 % Acetonitril in 30 min bei 30 °C, Interne Standard: Thymidin, Injektionsvolumen: 10 µL.

3.2 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie

Besonders fluorogene Sonden haben sich als leistungsstarkes Werkzeug für die Visualisierung biologischer Prozesse in Echtzeit etabliert.¹⁰⁶ Charakteristisch für diese Art von Sonden ist, dass diese erst nach Reaktion mit einem geeigneten Reaktionspartner fluoreszieren, was allgemein als *Turn on* bezeichnet wird.^{39, 49, 156} Diese Eigenschaft minimiert die Hintergrundfluoreszenz durch ungebundenen Farbstoff und ermöglicht somit in Zellexperimenten ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis ohne zusätzliche Waschschrifte.⁴⁷ Tetrazine zeichnen sich neben ihrer Rolle als reaktive Gruppe in bioorthogonalen Reaktionen insbesondere durch ihren einzigartigen fluorogenen Charakter aus. Dieser beruht auf der Fähigkeit, die Fluoreszenz der gebundenen Fluorophore effizient zu löschen (*Quenching*).^{39, 46, 157} Durch IEDDA-Reaktion mit geeigneten Dienophilen wird das Tetrazin unter Freisetzung von molekularem Stickstoff irreversibel verändert, wodurch die quenchende Wirkung aufgehoben wird.^{46, 106} In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl fluorogener Tetrazin-Sonden entwickelt, die unter anderem erfolgreich in der intrazellulären Markierung von Proteinen⁴⁷, Phospholipiden¹⁵¹ sowie Tubulin-Netzwerken³⁹ in lebenden Zellen eingesetzt wurden. Neben der Konjugation von Tetrazinen mit etablierten organischen Farbstoffen wie BODIPY^{39, 156}, Fluorescein⁴⁷, Rhodamin⁴⁷ und Cumarin³⁹ stellen Cyanin-Styryl-Farbstoffe eine weitere vielversprechende Klasse an Fluoreszenzfarbstoffen dar. Wie in Kapitel II beschrieben, entwickelten *Wagenknecht et al.* tetrazinbasierte Fluoreszenzsonden für die bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren, die durch Konjugation von Cyanin-Styryl-Farbstoffen an Tetrazine eine Zwei-Faktor-Fluorogenität in Gegenwart von DNA aufweisen. Diese Eigenschaft macht die Sonde zu einem leistungsfähigen Werkzeug für die spezifische Visualisierung von Nukleinsäuren in lebenden Zellen.

Zur Untersuchung des *Turn ons* sowie zur Bestimmung der Kinetik der „Click“-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und dem tetrazinfunktionalisierten Cyanin-Styryl-Farbstoff **15** wurde die Reaktion fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (Schema 6). Dieser wurde von *Philipp Geng* im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert und charakterisiert.¹⁵⁸



Schema 6: IEDDA-Reaktion des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** mit dem fluorogenen tetrazinfunktionalisierten Cyanin-Styryl Farbstoff **15** zum fluoreszenten „Click“-Produkt **16**.

Hierfür wurden die Reaktionspartner **1** und **15** zur Reaktion gebracht und der Verlauf für 7 h in definierten Zeitintervallen von 10 min mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Da die IEDDA-Reaktion einer Kinetik zweiter Ordnung folgt, wurde zur Vereinfachung der kinetischen Auswertung das Dienophil **1** in einem fünffachen Überschuss eingesetzt, sodass eine Reaktion pseudo-erster Ordnung angenommen werden kann. Um die Übertragbarkeit auf biologische Systeme sicherzustellen, wurde die Reaktion in Wasser mit einem DMSO-Anteil von 1 % durchgeführt. Um den Anstieg der Fluoreszenzintensität bewerten zu können, wurde zunächst das Fluoreszenzspektrum des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** in Abwesenheit des Reaktionspartners **1** gemessen.

Das erhaltene Fluoreszenzspektrum der „Click“-Reaktion zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität über den gesamten Beobachtungszeitraum von 7 h (Abbildung 24 A). Zur Bestimmung des *Turn on*s wurde die Fluoreszenzintensität des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats vor Reaktionsbeginn mit der des gebildeten IEDDA-Produkts ins Verhältnis gesetzt. Für die „Click“-Reaktion zwischen **1** und **15** konnte so ein *Turn on* von 16 berechnet werden, welcher mit dem *Turn on* eines literaturbekannten 1-Methylcyclopropenmodifizierten DNA-Nukleosids (*Turn on* 23) vergleichbar ist.¹²⁰ Dieses wurde bereits erfolgreich für die metabolische Markierung neu synthetisierter DNA in fixierten Zellen eingesetzt.¹²⁰ Darüber hinaus wurde die Reaktionskinetik durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit bestimmt. (Abbildung 24 B). Die Auswertung erfolgte über monoexponentielle Kurvenanpassung, wobei unter Berücksichtigung der Konzentration des Dienophils **15** die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 bestimmt wurde. Es wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $k_2 = 1.87 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten. Ein literaturbekanntes 1-MCP

Derivat, das ebenfalls über einen Carbamat-Linker verknüpft ist, weist mit $k_2 = 2.78 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine Geschwindigkeitskonstanten in der gleichen Größenordnung auf.¹⁵²

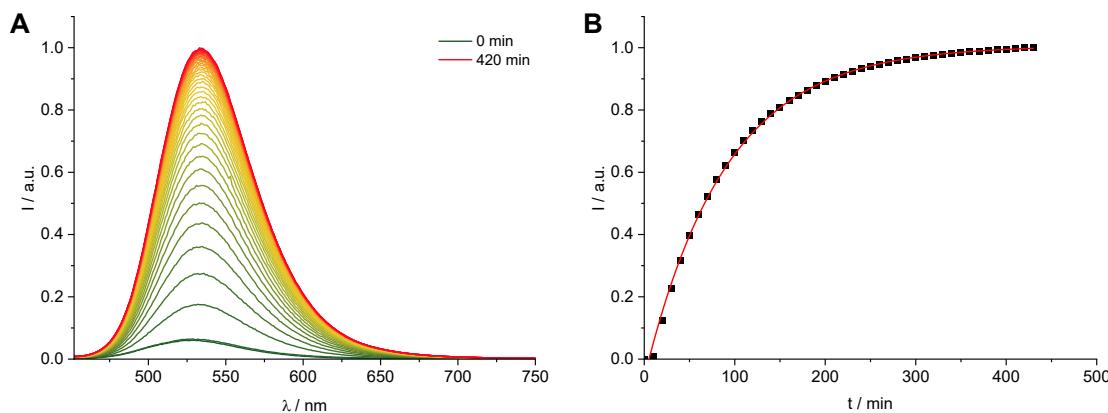
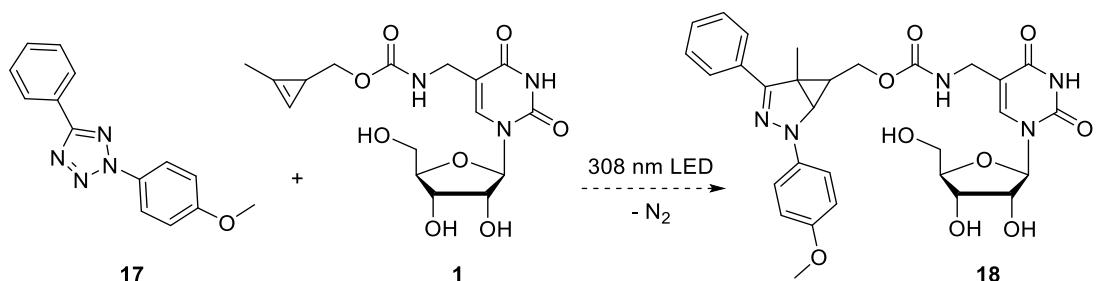


Abbildung 24: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der IEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15**. A) Anstieg der Fluoreszenzintensität im Verlauf der IEDDA-Reaktion zwischen **1** (100 μM) und **15** (20 μM) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$ zwischen 452 - 750 nm bei 20 °C. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Zeitintervall von 10 min für 7 h. B) Kinetische Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit. Exponentielle Anpassungsfunktion: $y = a+b \cdot \exp(-kx)$.

Es zeigte sich durch die Experimente *in vitro*, dass sich IEDDA-Reaktionen mit Cyclopropenen weniger durch eine höchstmögliche Reaktivität, sondern vielmehr durch einen ausgewogenen Kompromiss zwischen Reaktivität und chemischer Stabilität in zellulärer Umgebung auszeichnen. Darüber hinaus profitieren Cyclopropene von ihrer geringen Molekülgröße, was zu einer potenziell verbesserten Akzeptanz durch zelluläre Enzymsysteme führt.

3.3 Untersuchung der Reaktivität in einer Photoclick-Reaktion

Im Hinblick auf eine potenzielle Anwendung des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** in einer dualen, orthogonalen Markierung von RNA in Kombination mit 3-MCP-modifizierten Nukleosiden, wurde im nächsten Schritt die Reaktivität des synthetisierten Nukleosids in einer Photoclick-Reaktion untersucht. Hierzu wurde das literaturbekannte Diaryltetrazol **17** eingesetzt (Schema 7).¹⁵⁹ Nach Bestrahlung von Tetrazolen mit Licht geeigneter Wellenlänge entstehen hochreaktive Nitrilimine, die in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit Dipolarophilen, wie beispielsweise Alkenen, zu Pyrazolinonen reagieren.¹⁶⁰ Der lichtinduzierte Charakter der Reaktion erlaubt eine spatiotemporale Kontrolle¹⁶¹, was insbesondere für die Anwendung in lebenden Systemen von großem Vorteil ist.



Schema 7: Schema der Photoclick-Reaktion zwischen dem 1-MCP-modifizierten Nukleosid **1** und dem Diaryltetrazol **17** zum Photoclick-Produkt **18**.

Die Photoclick-Reaktion zwischen **1** und **17** wurde in einem Gemisch aus Acetonitril und PBS-Puffer in einem Verhältnis von 1:1 durchgeführt und der Reaktionsverlauf nach definierten Belichtungsintervallen mittels HPLC untersucht. Die Reaktanden wurden hierfür in einem Verhältnis von 5:1 (0.5 mM Nukleosid **1**, 0.1 mM Tetrazol **17**) ausgehend von Stammlösungen in DMSO zur Reaktion gebracht. Thymidin wurde als interner Standard verwendet. Nach definierten Belichtungszeiten mit einer 308 nm LED wurde eine Probe des Reaktionsgemisches entnommen (Abbildung 25 A). Deren HPLC-Analyse zeigt neben dem Peak des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** bei einer Retentionszeit von 12.7 min sowie dem Peak des Diaryltetrazols **17** bei 45.6 min einen neuen Peak bei 19.9 min. Zusätzlich ist bei 14.7 min das Dimerisierungsprodukt des Nukleosids detektierbar. Die Auftragung der Peakflächen der Reaktanden sowie des neu entstandenen Peaks gegen die Belichtungszeit zeigt, dass die Peakfläche von **17** mit zunehmender Belichtungszeit exponentiell abnimmt, während die Peakfläche des Nukleosids **1** annähernd konstant bleibt. Gleichzeitig ist eine Zunahme der Peakfläche bei einer Retentionszeit von 19.9 min zu beobachten (Abbildung 25 B).

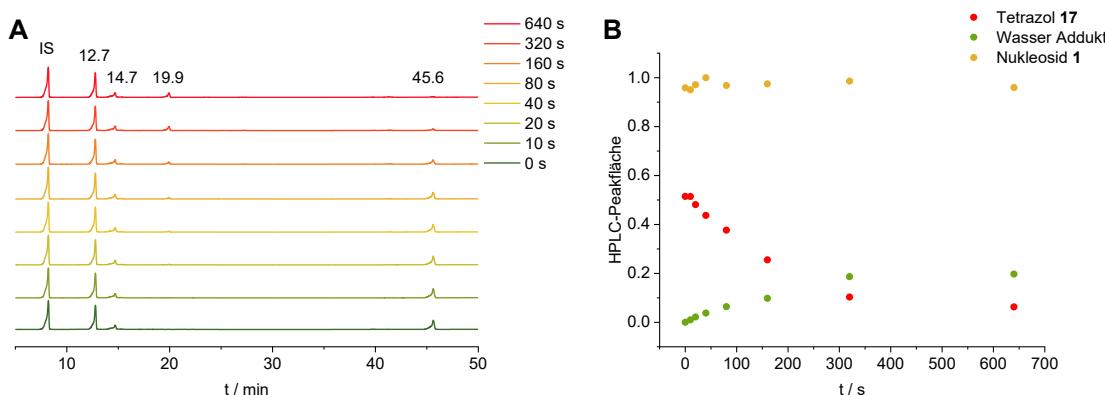


Abbildung 25: A) Reaktionsverlauf der Photoclick-Reaktion zwischen Nukleosid **1** (0.5 mM) und Tetrazol **17** (0.1 mM) in Acetonitril/DPBS-Puffer 1:1 über einen Belichtungszeitraum von insgesamt 640 s. Die Analyse der Reaktionsmischung erfolgte unmittelbar vor der Belichtung der Reaktanden (0 h) sowie nach definierten Belichtungsintervallen ($t = 0$ s, 10 s, 20 s, 40 s, 80 s, 160 s, 320 s, 640 s) mit einer 308 nm LED ($P = 50 \pm 5 \mu\text{W}$) HPLC-Methode: 0 bis 60 % Acetonitril in 40 min bei 25 °C, interner Standard: Thymidin, Injektionsvolumen: 10 μL . B) Auftragung der HPLC-Peakflächen der Edukte **1** und **17** sowie des entstehenden Nebenprodukts (Wasseraddukt) gegen die Belichtungszeit.

Dies lässt darauf schließen, dass keine spezifische Photoclick-Reaktion zwischen dem Nukleosid **1** und Tetrazol **17** stattfindet, sondern ein Nebenprodukt gebildet wird. Aufgrund des hochreaktiven Charakters des durch Photolyse generierten Nitrilimins kann es zu unerwünschten Nebenreaktionen mit Nukleophilen, wie beispielsweise Wasser, kommen. In wässriger Umgebung ist daher ein bekanntes Nebenprodukt der Photoclick-Reaktion das Wasseraddukt, was durch LC-MS Analyse bestätigt werden konnte.¹ Ergänzend zur Analyse der Reaktivität des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** in der IEDDA-Reaktion mit Tetrazinen sowie in der Photoclick-Reaktion mit Tetrazolen im Rahmen dieser Arbeit, wurde das entsprechende 3-MCP-modifizierte Nukleosid im Rahmen der Masterarbeit von Jasmin Muuß untersucht. Dabei zeigte sich ein gegenüber dem 1-MCP-modifizierten Nukleosid **1** entgegengesetztes Reaktivitätsprofil. Während das 3-MCP-modifizierte Nukleosid mit Tetrazol **17** in einer Photoclick-Reaktion mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_2 = 9.44 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ reagiert, konnte keine Reaktivität gegenüber Tetrazinen beobachtet werden.¹

Zusammenfassend konnten die erhaltenen Ergebnisse die postulierte inverse Reaktivität der 1-MCP- und 3-MCP-modifizierten Nukleoside in der IEDDA- sowie in der Photoclick-Reaktion bestätigen und so die Grundlage für deren Anwendung zur dualen Markierung von Nukleinsäuren schaffen. *Wagenknecht et al.* konnten bereits durch den Einsatz isomerer Methylcyclopropene als chemische Reporter eine duale bioorthogonale sowie orthogonale Markierung von DNA mittels IEDDA und Photoclick-Reaktion erzielen.¹⁵³

¹Durchgeführt in der Masterarbeit von J.Muuß, Karlsruher Institut für Technologie, 2024

4 *In cellulo* Experimente

Im nächsten Schritt wurden erste Zellexperimente durchgeführt, um die Eignung des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** in der bioorthogonalen Markierung von RNA in Zellen zu untersuchen. Eine grundlegende Voraussetzung hierfür ist neben der zellulären Aufnahme des Nukleosids dessen intrazelluläre Aktivierung durch endogene Kinasen. Besonders der initiale Phosphorylierungsschritt stellt dabei, wie in Kapitel II beschrieben, den limitierenden Faktor der metabolischen Markierung dar.⁷⁸

Zur metabolischen Markierung wurden Vero-Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit 100 µM des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** inkubiert. In diesem Zeitraum soll sowohl die zelluläre Aufnahme des Nukleosids als auch dessen enzymatische Umwandlung zum entsprechenden NTP sowie die anschließende Inkorporation in die neu synthetisierte RNA erfolgen. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert sowie permeabilisiert, um überschüssiges, ungebundenes Nukleosid zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 µM Farbstoff **15** über Nacht inkubiert. Aufgrund der fluorogenen Eigenschaften des verwendeten Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** konnte auf zusätzliche Waschschrifte vor der Bildgebung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie verzichtet werden. Zur Validierung des experimentellen Aufbaus wurde ein vinylmodifiziertes 2'-Desoxynukleosid (VdU) als Positivkontrolle eingesetzt, welches bereits erfolgreich für die metabolische Markierung von DNA beschrieben wurde.¹⁰¹

Die erhaltenen Zellbilder (Abbildung 26) zeigen für die Positivkontrolle ein deutliches Fluoreszenzsignal im Nukleus im Emissionsbereich von **15** ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$), während für die Negativkontrolle keine Fluoreszenz detektiert werden konnte. Auch in den Zellen, die mit 1-MCP-modifiziertem Nukleosid **1** inkubiert wurden, konnte keine signifikante Fluoreszenz detektiert werden.

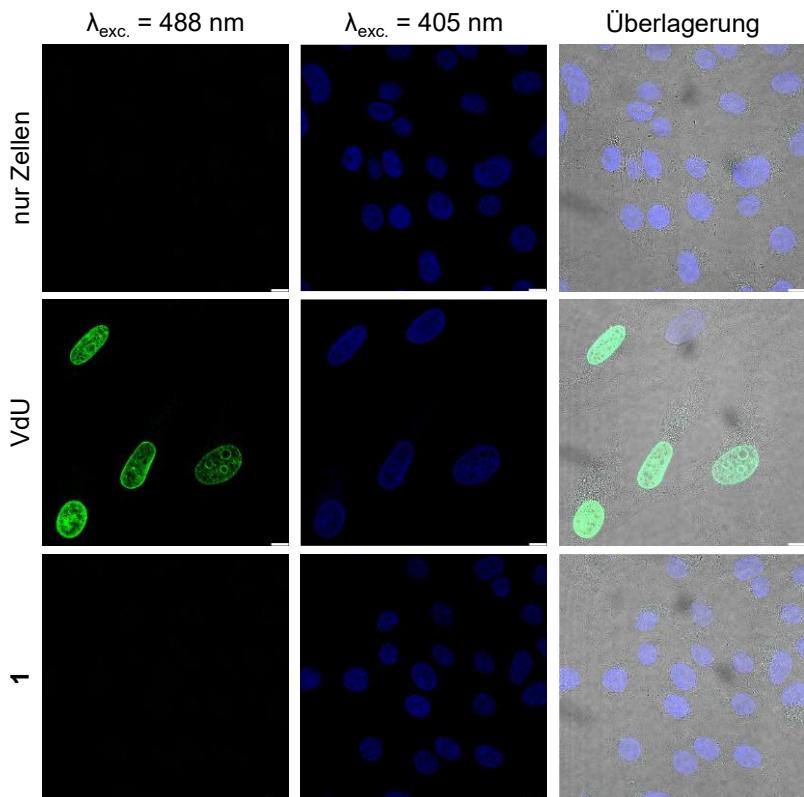


Abbildung 26: Bioorthogonale Markierung von RNA mittels IEDDA-Reaktion unter Verwendung von Nukleosid **1** und Tetrazin **15**. Vero-Zellen wurden mit $100 \mu\text{M}$ **1** in DMEM für 48 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Vero-Zellen mit $100 \mu\text{M}$ VdU in DMEM für 48 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Zugabe eines modifizierten Nukleosids inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert sowie permeabilisiert und anschließend über Nacht mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ in DMEM inkubiert. Die Visualisierung der Zellen erfolgte nach Inkubation mit Hoechst für 5 min über konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Fluorophor **15** (grün): $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, 10 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$; Hoechst (blau): $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, 5 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 450 - 500 \text{ nm}$). Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Dies deutet auf eine nicht erfolgreiche bioorthogonale Markierung unter den gewählten Bedingungen hin. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der mangelnden Substratkompatibilität der zellulären Kinasen mit dem modifizierten Nukleosid liegen, wodurch eine effiziente Phosphorylierung zum entsprechenden NTP und ein Einbau in die RNA verhindert wird. Darüber hinaus spielt die Inkubationszeit vermutlich eine entscheidende Rolle. Basierend auf der Funktion und Struktur weist RNA im Vergleich zu DNA deutlich kürzere Halbwertszeiten auf. Deshalb kann eine Inkubationszeit von 48 h für die metabolische Markierung von RNA zu lang sein, da möglicherweise ein Abbau markierter RNA bereits stattgefunden hat. Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die metabolischen Markierungen von RNA mit Nukleosid **1** näher zu untersuchen, sind weitere Zellexperimente erforderlich. Ebenfalls denkbar ist, dass die 1-MCP

Modifikation innerhalb der Zelle für das Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** sterisch nicht zugänglich ist.

Um letzteres zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die zelluläre RNA nach Inkubation mit dem modifizierten Nukleosid **1** isoliert und anschließend in der IEDDA-Reaktion mit Fluorophor **15** *in vitro* umgesetzt. Für die RNA-Extraktion, wurden zunächst Vero-Zellen mit 100 µM des modifizierten Nukleosids ausgesät und für 48 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die unter identischen Bedingungen mit der entsprechenden Menge DMSO inkubiert wurden. Die anschließende Isolierung der zellulären RNA erfolgte mittels Trizol®-Chloroform-Extraktion. Trizol® lysiert die Zellen, denaturiert zelluläre Proteine und inaktiviert RNasen, zum Schutz der RNA.¹⁶² Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Phasentrennung durch Zentrifugation bildete sich ein Drei-Phasen-System, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthält. Diese wurde mit dem *Zymo Clean & Concentrator Kit* aufkonzentriert. Für die IEDDA-Reaktion wurde die aufgereinigte RNA über Nacht mit 5 µM des Fluorophors **15** inkubiert. Um überschüssigen, nicht umgesetzten Farbstoff aus der Reaktionslösung zu entfernen, wurde die RNA erneut mit dem *Zymo Clean & Concentrator Kit* aufgereinigt. Die markierte RNA wurde anschließend mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert (Abbildung 27 A). Das erhaltene Fluoreszenzspektrum der markierten RNA zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikante Fluoreszenz, was die Annahme bestätigt, dass unter den gewählten Bedingungen kein metabolischer Einbau von Nukleosid **1** in die RNA stattfindet. Um potenzielle Konzentrationsunterschiede zwischen der markierten RNA und der Negativkontrolle feststellen zu können, wurden die Proben zusätzlich mittels UV-Vis-Absorptionsspektroskopie analysiert (Abbildung 27 B). Die Absorption bei $\lambda = 260\text{ nm}$ steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Nukleinsäurekonzentration. Da die Extinktionen beider Proben bei $\lambda = 260\text{ nm}$ nahezu identisch waren, konnte ein signifikanter Unterschied in der RNA-Konzentration ausgeschlossen werden.

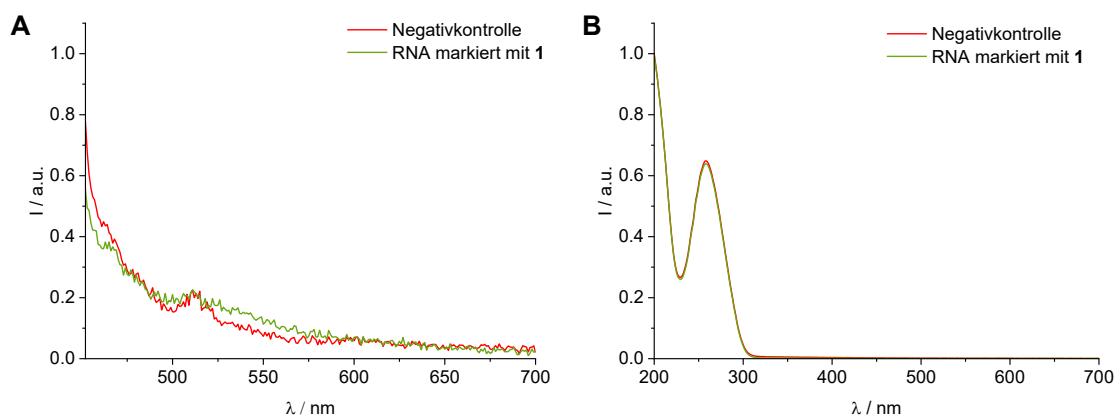


Abbildung 27: A) Fluoreszenzspektren von mit Nukleosid **1** markierter isolierter zellulärer RNA nach IEDDA-Reaktion mit Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** ($5 \mu\text{M}$ **15** in DMEM über Nacht, *in vitro*) sowie unmarkierter Kontroll-RNA. $\lambda_{\text{exc.}} = 437 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 452 - 800 \text{ nm}$, Slits: 5 nm, 20°C . B) UV-Vis-Absorptionsspektrum von mit Nukleosid **1** markierter isolierter zellulärer RNA sowie unmarkierter Kontroll-RNA.

5 Zusammenfassung

Um das Repertoire modifizierter RNA-Nukleoside für die bioorthogonale Markierung von RNA zu erweitern, befasste sich dieses Kapitel mit der Synthese, *in vitro* Charakterisierung sowie der Anwendung des 1-Methylcyclopropenmodifizierten Nukleosids **1** *in cellulo*.

Das 1-MCP-modifizierte Nukleosid **1** wurde zunächst durch Kupplung und anschließende Entschützung des aminofunktionalisierten Nukleosid-Bausteins **2** und dem aktivierten Cyclopropen-Baustein **3** über einen Carbamat-Linker erhalten. Die IEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazin **15** konnte anschließend fluoreszenzspektroskopisch sowie über HPLC-Analyse umfassend charakterisiert werden um deren *Turn on* sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zu bestimmen. Da es sich bei Tetrazin **15** um ein fluorogenes Tetrazin handelt, konnte für die IEDDA-Reaktion mit Nukleosid **1** ein *Turn on* von 16 bestimmt werden. Insbesondere für eine Markierung und Visualisierung von Nukleinsäuren in lebenden Zellen ist ein hoher *Turn on* vorteilhaft, da das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert wird und somit auch unter waschfreien Bedingungen eine differenzierte Detektion spezifischer Signale möglich ist. Basierend auf vorangegangenen Studien⁴⁹ kann aufgrund der Zwei-Faktor-Fluorogenität des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** davon ausgegangen werden, dass der ermittelte *Turn on* nach Inkorporation des Nukleosids in RNA signifikant höher ist und daher für eine effiziente Visualisierung *in cellulo* ausreichend ist. Zudem wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k_2 = 1.87 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die IEDDA-Reaktion von **1** mit Tetrazin **15** bestimmt. Je nach verwendetem Tetrazin-Dienophil-Paar bewegen sich die Geschwindigkeitskonstanten literaturbekannter IEDDA-Reaktionen zwischen 1 und $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.³⁴ Die für die Reaktion zwischen **1** und **15** bestimmte Geschwindigkeitskonstante k_2 , befindet sich damit am unteren Ende des für IEDDA-Reaktionen charakteristischen Bereiches. Für eine Anwendung in der bioorthogonalen Markierung gelten Geschwindigkeitskonstanten von mindestens $1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ als ausreichend, damit die Markierung auch bei niedrigen Konzentrationen effizient ablaufen kann.⁸ Neben der Reaktionsgeschwindigkeit ist auch die Größe und Stabilität der chemischen Reportergruppe entscheidend. 1-Methylcyclopropene stellen einen guten Kompromiss aus Stabilität und Reaktivität dar und werden daher vielseitig für die bioorthogonale Markierung von Biomolekülen eingesetzt.^{155, 163-165} Darüber hinaus konnte keine Reaktivität des Nukleosids **1** in einer Photoclick-Reaktion mit Tetrazol **17** beobachtet werden. Dieses selektive Reaktionsverhalten schafft die Grundlage für eine potenzielle Anwendung in der dualen, orthogonalen Markierung von RNA. Anschließend wurde die metabolische Inkorporation des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** in zelluläre RNA sowie deren anschließende Detektion

mittels IEDDA-Reaktion mit Tetrazin **15** untersucht. Dabei konnte nach einer Inkubationszeit von 48 h mit Nukleosid **1** und anschließender Inkubation der fixierten Zellen mit Fluorophor **15** keine spezifische Markierung der RNA nachgewiesen werden. Auch nach RNA-Isolation aus den mit Nukleosid **1** inkubierten Zellen und anschließender „Click“-Reaktion *in vitro* konnte mittels fluoreszenzspektroskopischer Analyse kein Nachweis der metabolischen RNA-Markierung gezeigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter den gewählten Bedingungen eine Inkorporation des 1-MCP-modifizierten Nukleosids **1** in zelluläre RNA nicht möglich ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der gewählten Inkubationszeit liegen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von RNA könnte bereits ein Abbau markierter RNA stattgefunden haben. Darüber hinaus ist es denkbar, dass sich die hohe Substratspezifität der zellulären Stoffwechselenzyme limitierend auf die schrittweise Phosphorylierung des Nukleosids **1** zum Nukleosidtriphosphat auswirkt und somit kein Einbau in die neu synthetisierte RNA stattfindet. Weiterführende Experimente mit verkürzten Inkubationszeiten oder mutierten Kinasen mit erweiterter Substratspezifität sind erforderlich, um dies zu untersuchen und aufzuklären.

V. Modifizierte Nukleotide für die metabolische Markierung von RNA

Wie in Kapitel IV beschrieben wurde, konnte eine bioorthogonale Markierung zellulärer RNA mit dem 1-MCP-modifizierten RNA-Nukleosid **1** im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Als möglicher Grund hierfür wird unter anderem die unzureichende Aktivierung des Nukleosidanalogas zum Triphosphat aufgrund der Substratspezifität endogener Kinasen vermutet. Unter den Nukleosid-Derivaten, die bislang erfolgreich für die metabolische Markierung von RNA eingesetzt wurden, gehören insbesondere die vinylmodifizierten Nukleoside VU und VA, zu den prominentesten Vertretern.⁷⁸ Doch obwohl sich die Vinyl-Gruppe durch ihre geringe Größe auszeichnet und damit vinylmodifizierte Nukleoside geeignete Substrate für zelluläre Kinasen und Polymerasen sind, besitzen sie vergleichsweise geringe Reaktionsgeschwindigkeiten in bioorthogonalen Reaktionen.^{78, 166} Insbesondere für eine erfolgreiche Anwendung in lebenden Zellen sollten bioorthogonale Reaktionen Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $10^3 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufweisen, um dynamische zelluläre Prozesse, wie enzymatische Reaktionen bei physiologischen Konzentrationen verfolgen zu können.¹⁶⁷ Hochreaktive Dienophile für IEDDA-Reaktionen, wie Norbornen-, BCN- und TCO-modifizierte Nukleoside werden aufgrund ihrer Größe häufig nicht effizient zu den entsprechenden NTP umgesetzt.^{78, 93, 168, 169} Wie in Kapitel II beschrieben, wurden verschiedene Strategien entwickelt, um dieses enzymatische *Bottleneck* zu umgehen. Durch den Einsatz modifizierter Triphosphate ist es möglich, die gesamte enzymatische Phosphorylierungskaskade zu umgehen, wodurch auch der Einbau sterisch anspruchsvoller Nukleotide in zelluläre Nukleinsäuren denkbar ist.

Daher wurde im Rahmen dieses Kapitels das BCN-modifiziertes Uridintriphosphat **20** synthetisiert und zunächst *in vitro* auf dessen *Turn on* Effekt und Reaktionskinetik in einer IEDDA-Reaktion mit Tetrazin **15** untersucht. Anschließend wurde das BCN-modifizierte NTP **20** auf dessen Anwendung in der metabolischen Markierung von RNA in Zellen unter Verwendung von **SNTT1** getestet. BCN zeichnet sich unter anderem durch eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu TCO^{116, 170} sowie durch eine schnelle Reaktionskinetik in IEDDA Reaktionen aus. Hierdurch ist eine effiziente Markierung von Biomolekülen selbst bei niedrigen Konzentrationen möglich. Die Verknüpfung des chemischen Reporters mit dem Nukleotid soll hierbei über einen starren Propargylamin-Linker erfolgen. *Wagenknecht et al.* konnten zeigen, dass die Linkerstruktur von BCN-modifizierten DNA-Nukleosiden einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit in IEDDA-Reaktionen hat. Im Vergleich zu einem flexiblen Linkersystem konnten mit dem Einsatz von unterschiedlichen Nukleotiden mit starrem Linker

zwei- bis dreimal so hohe Geschwindigkeitskonstanten in IEDDA-Reaktionen erreicht werden.⁴⁹

158

1 Synthese des bicyclononinmodifizierten Nukleosidtriphosphats 20

Für die Synthese des BCN-modifizierten Nukleotids **20** wurde zunächst das entsprechende Nukleosid **19** synthetisiert (Abbildung 28).

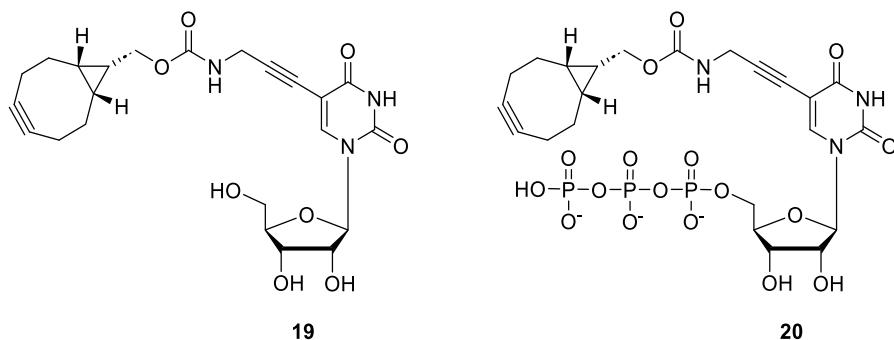
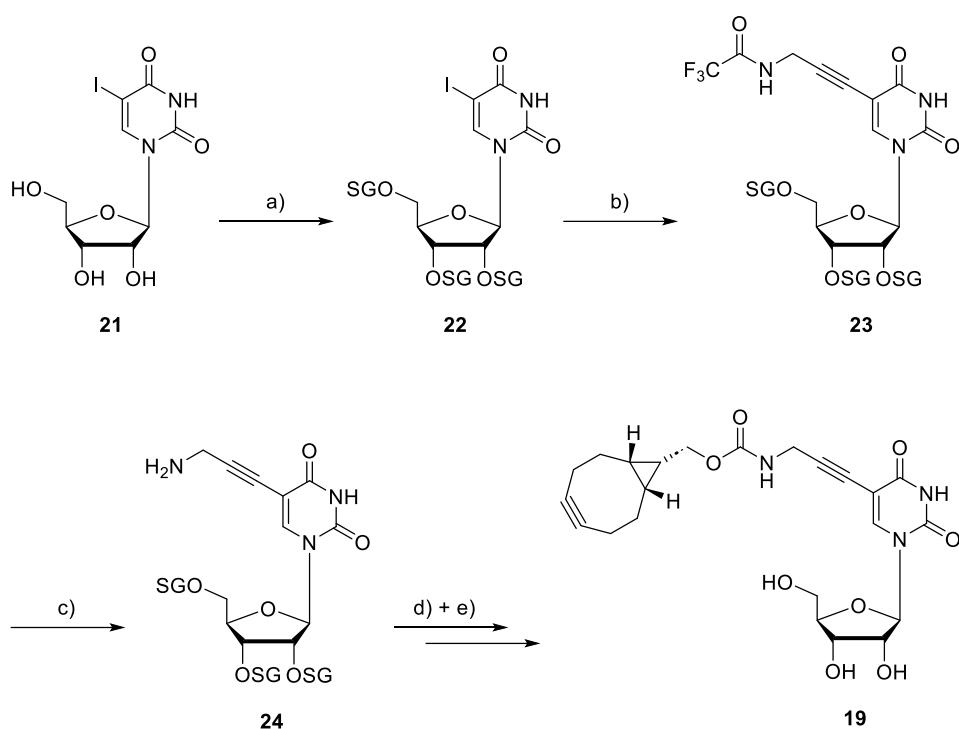


Abbildung 28: Struktur des BCN-modifizierten Nukleosids **19** sowie des entsprechenden BCN-modifizierten Nukleosidtriphosphat **20**.

Die Synthese von Nukleosid **19** erfolgte entsprechend einer Syntheseroute, die in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* im Rahmen der Masterarbeit von *Eileen List* etabliert wurde. Hierfür wurde im ersten Schritt die 2'- 3'- und 5'-OH-Gruppe des kommerziell erhältlichen 5-Ioduridins **21** durch Reaktion mit TBDMS-Cl und Imidazol in Pyridin geschützt (Schema 8). Das erhaltene TBDMS-geschützte Nukleosid **22** wurde anschließend in einer Sonogashira-Kupplung mit trifluoracetylgeschütztem Propargylamin umgesetzt, um den Linker an der 5-Position einzuführen. Nach Abspaltung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen erfolgte die Kupplung des BCN-NHS-Carbonats an das aminofunktionalisierte Nukleosid **24**. Durch selektive Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen mit Triethylamin-Trihydrofluorid wurde das BCN-modifizierte Nukleosid **19** in einer Gesamtausbeute von 33 % über 5 Schritte erhalten.

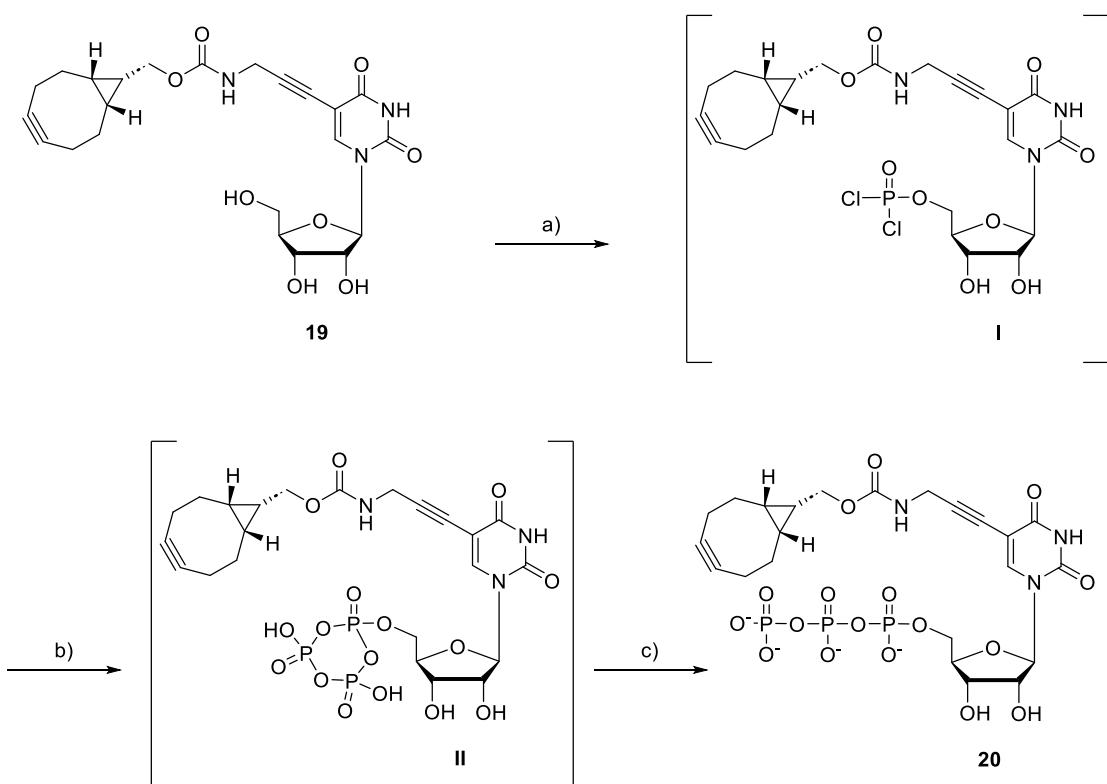


Schema 8: Synthese des BCN-modifizierten Nukleosid **19**. a) 4.00 Äq. TBDMS-Cl, 6.00 Äq. Imidazol, Pyridin, 50 °C, 2.5 h, 92 %. b) 1.50 Äq. trifluoracetylgeschütztes Propargylamin, 4.00 Äq. Et₃N, 0.20 Äq. CuI, 0.10 Äq. Pd(PPh₃)₄, THF, 50 °C, 3 h, 80 %. c) 6.00 Äq. NaOH, MeOH, 70 %. d) 1.00 Äq. BCN-NHS-Carbonat, 0.95 Äq. Nukleosid **24**, 4.00 Äq. Et₃N, THF, RT, 24 h, 73 %. e) 8.00 Äq. Triethylamin-Trihydrofluorid, THF, RT, 21 h, 76 %. SG = TBDMS.

Anschließend wurde Nukleosid **19** nach der *Ludwig*-Methode in das entsprechende BCN-modifizierte Nukleosidtriphosphat **20** überführt.¹⁷¹ Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Synthesen von Nukleosidtriphosphaten¹⁷²⁻¹⁷⁴ handelt es sich bei der *Ludwig*-Methode um eine *one-pot* Reaktion, die in drei Schritten abläuft und keine Isolation der Zwischenprodukte erfordert.¹⁷⁵ Sie basiert auf der initialen Bildung eines Dichlorophosphatintermediats, gefolgt von der Umsetzung mit einem Pyrophosphat-Anion und anschließender Hydrolyse zum Nukleosidtriphosphat (Schema 9).^{171, 175}

Im ersten Schritt der Triphosphorylierung wurde Nukleosid **19** nach einer modifizierten Synthesevorschrift von *Yoshikawa et al.* mit Phosphoroxychlorid (POCl₃) in Trimethylphosphat (TMP) zum entsprechenden Dichlorophosphatintermediat **I** umgesetzt.¹⁷⁶ Die Verwendung von Trialkylphosphaten zeigt eine positive Auswirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit und begünstigt zudem die Phosphorylierung an der 5'-Position ungeschützter Nukleoside.^{176, 177} Dies ist auf die Ausbildung eines Nukleosid-Trialkylphosphat-Komplexes zurückzuführen, durch den die 5'-OH Gruppe aktiviert wird.¹⁷⁷ Zusätzlich wurde dem Reaktionsgemisch

1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin als Protonenschwamm zugesetzt, um die *in situ* entstehende Salzsäure durch Bildung des entsprechenden Hydrochlorids abzufangen. Dadurch werden unerwünschte Nebenreaktionen minimiert und milder Reaktionsbedingungen ermöglicht,¹⁷⁸ was insbesondere bei modifizierten Nukleosiden von Vorteil ist. Das entstandene Dichlorophosphatintermediat **I** wird anschließend *in situ* mit Tributylammoniumpyrophosphat und Tributylamin in DMF zum cyclischen Intermediat **II** umgesetzt, welches im letzten Schritt durch Hydrolyse in das finale Triphosphat **20** überführt wurde.

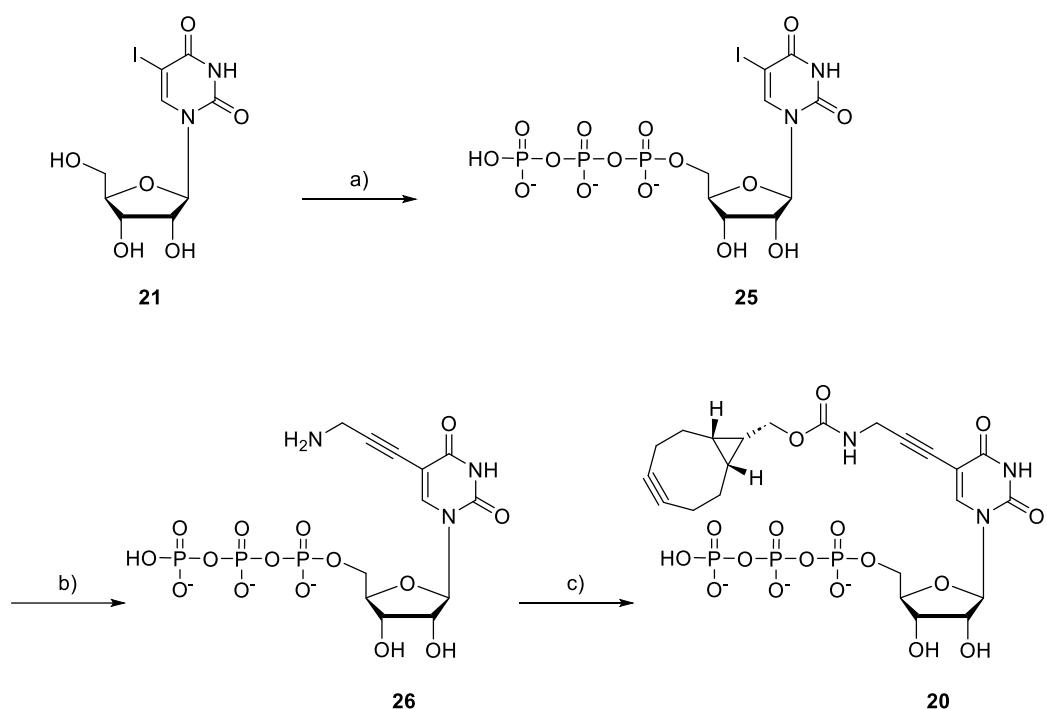


Schema 9: Synthese des BCN-modifizierten Nukleosidtriphosphats **20** nach der Ludwig-Methode. a) 1.45 Äq. POCl_3 , 1.50 Äq. 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm), Trimethylphosphat, -20 °C, 5 h. b) 6.00 Äq. Tributylammoniumpyrophosphat, 4.40 Äq. Tributylamin, DMF, 0 °C bis RT, 45 min. c) Hydrolyse durch Zugabe von Wasser, RT, 4 h, 2 %.

Das BCN-modifizierte NTP **20** wurde nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC in einer Ausbeute von 2 % erhalten. Die geringe Ausbeute der Triphosphorylierung ist in erster Linie auf Nebenreaktionen während der Synthese zurückzuführen. Bereits im ersten Schritt kann es zur Hydrolyse des gebildeten Dichlorophosphatintermediats **I** zum entsprechenden Monophosphat kommen. Zudem ist durch die Verwendung von Trialkylphosphaten als Lösungsmittel keine

vollständig Regioselektivität gegeben, wodurch eine Phosphorylierung an der 2'- sowie 3'-OH Gruppe möglich ist. Die 5'-OH Gruppe ist zusätzlich durch die Größe der Modifikation sterisch abgeschirmt, was sich limitierend auf den Angriff in der 5'-Position auswirken kann. Darüber hinaus kann es infolge der Instabilität der Anhydrid-Bindung während der Aufarbeitung und Lagerung zur Hydrolyse des NTPs zum entsprechenden Nukleosiddiphosphat (NDP) sowie Nukleosidmonophosphat (NMP) kommen. Aufgrund der geringen Ausbeute der Triphosphorylierung im letzten Syntheseschritt beläuft sich die Gesamtausbeute über sechs Stufen auf 0.6 %. Daher wurde die Synthesestrategie im Folgenden optimiert.

Zunächst wurde die ausbeutelimitierende Phosphorylierung zum Triphosphat an den Beginn der Syntheseroute verlagert, sodass Nukleotid **20** ausgehend vom kommerziell erhältlichen 5-Ioduridin **21** synthetisiert werden konnte (Schema 10). Die Umsetzung zum Triphosphat **25** erfolgte analog der zuvor beschriebenen NTP-Synthese. Auf den Einsatz von 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin als Protonenschwamm wurde verzichtet, da in diesem Fall kein modifiziertes Nukleosid eingesetzt wurde. Anstelle der zuvor beschriebenen Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC wurde das NTP mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. NTP **25** konnte dabei in einer signifikant höheren Ausbeute von 16 % isoliert werden. Die höhere Ausbeute ist unter anderem auf die optimierte Aufreinigungsstrategie sowie auf die verbesserte Zugänglichkeit der 5'-OH Gruppe infolge der fehlenden Modifikation zurückzuführen. Ausgehend von 5-Iod-NTP **25** wurde anschließend der Propargylamin-Linker mittels *Sonogashira*-Kreuzkupplung eingeführt, wodurch das aminomodifizierte NTP **26** in einer Ausbeute von 48 % erhalten wurde. Die moderate Ausbeute kann unter anderem auf den flüchtigen Charakter des ungeschützten Propargylamins zurückgeführt werden. Auf den Einsatz einer Schutzgruppe am Propargylamin sowie Schutzgruppen am Nukleosid wurde bewusst verzichtet, um die Syntheseroute von 6 Schritten auf insgesamt 3 Schritte zu verkürzen. Es konnte gezeigt werden, dass die freie OH-Gruppen von Nukleotid **25** sowie das freie primäre Amin des Propargylamins keinen negativen Einfluss auf die Kupplung haben. Im letzten Schritt erfolgte die Anbindung der BCN-Modifikation durch Reaktion des aminomodifizierten NTPs **26** mit dem kommerziell erhältlichen BCN-NHS-Carbonat unter Bildung eines Carbamats. Aufgrund der Polarität der NTP, durch die Triphosphatgruppe sowie durch die freien OH-Gruppen, erfolgte die Aufreinigung ausschließlich über automatisierte Flash-Säulenchromatographie unter Verwendung von *Reversed-Phase* Chromatographiesäulen.



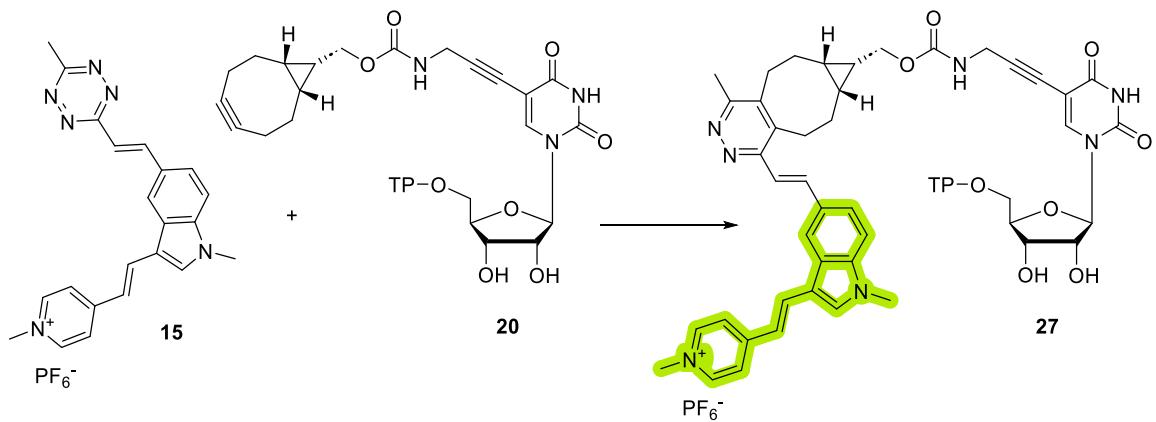
Schema 10: Synthese des BCN-modifizierten Nukleosidtriphosphats **20**. a) i. 1.20 Äq. POCl_3 , Trimethylphosphat, 0°C , 24 h; ii. 0.85 Äq. Tris(tetrabutylammonium)-hydrogenpyrophosphat, 6.00 Äq. Tributylamin, Acetonitril, 0°C , 20 min; iii. Wasser, RT, 1 h, 16 %. b) 2.40 Äq. 5-Propargylamin, 10.0 Äq. Et_3N , 0.142 Äq. CuI , 0.054 Äq. $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 0.120 Äq. $\text{Tri}(2\text{-furyl})\text{phosphin}$, DMSO , 50°C , 2 h, 48 %. c) 1.40 Äq. BCN-NHS-Carbonat, 4.20 Äq. Et_3N , DMSO , 40°C , 2 h, 42 %.

Durch die Optimierung der Syntheseroute konnte das BCN-modifizierte NTP **20** in einer Gesamtausbeute von 3 % über drei Schritte erhalten werden. Der wesentliche Vorteil der optimierten Syntheseroute liegt in der Reduktion der Syntheseschritte sowie in der Verwendung des kostengünstigen und kommerziell erhältlichen 5-Ioduridins **21**.

2 In vitro Experimente

2.1 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie

Das synthetisierte BCN-modifizierte NTP **20** wurde anschließend auf dessen Eignung als chemischer Reporter in einer IEDDA-Reaktion untersucht (Schema 11).



Schema 11: IEDDA-Reaktion zwischen dem fluorogenen tetrazinfunktionalisierten Cyanin-Styryl Farbstoff **15** und dem BCN-modifizierten Nukleosidtriphosphat **20** zum fluoreszenten „Click“-Produkt **27**. Abkürzung TP steht für Triphosphat.

Dazu wurde die Reaktion zwischen NTP **20** und dem zuvor beschriebenen fluorogenen Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** mittels Fluoreszenzspektroskopie, wie zuvor (Kapitel IV, Abschnitt 3.2) beschrieben, untersucht. Die Charakterisierung der Reaktion erfolgte hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit sowie des durch die IEDDA-Reaktion induzierten Fluoreszenzanstiegs (*Turn on*). Das erhaltene Fluoreszenzspektrum der „Click“-Reaktion zeigt einen kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität über den Reaktionsverlauf von 3.5 Stunden (Abbildung 29).

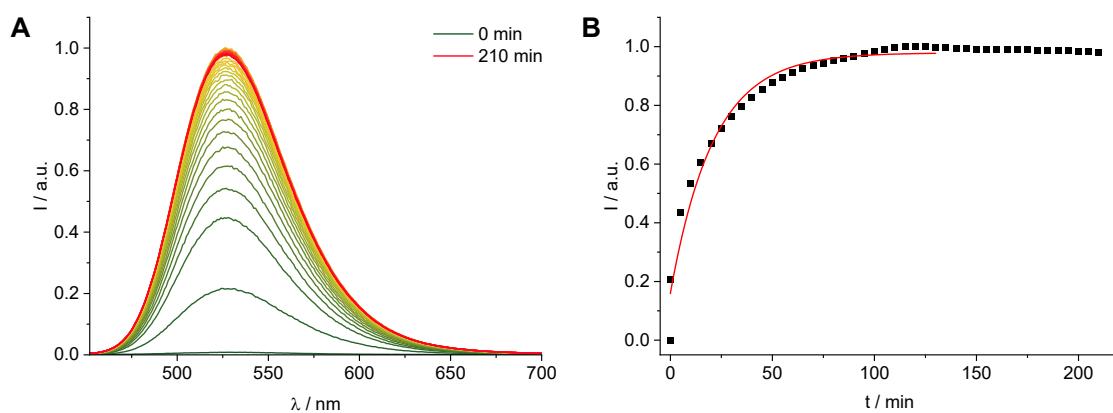


Abbildung 29: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der IEDDA-Reaktion zwischen dem BCN-modifizierten NTP **20** und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15**. A) Anstieg der Fluoreszenzintensität im Verlauf der IEDDA-Reaktion zwischen NTP **20** (200 μ M) und Fluorophor **15** (20 μ M) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm zwischen 452 - 750 nm bei 20 °C und Slits 2. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Zeitintervall von 5 min für 3.5 h. B) Kinetische Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit t. Exponentielle Anpassungsfunktion: $y = a + b \cdot \exp(-kx)$.

Für die „Click“-Reaktion zwischen NTP **20** und Fluorophor **15** konnte ein *Turn on* von 88 bestimmt werden. Dieser ist im Vergleich zu dem entsprechenden BCN-modifizierten DNA-Nukleosid aus der Literatur dreifach höher, was vermutlich auf die Einführung der negativ geladenen Triphosphatgruppe zurückgeführt werden kann.⁴⁹ Wagenknecht *et al.* konnten zeigen, dass im Vergleich zu Nukleosiden deutlich höhere *Turn on*-Werte mit einzel- sowie doppelsträngiger DNA erreicht werden.^{49, 107} Dies ist unter anderem auf die nicht-kovalente Vorkoordination von Fluorophor **15** an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat der DNA zurückzuführen.⁴⁹ Unter Berücksichtigung der Konzentration des eingesetzten Dienophils wurde, wie zuvor beschrieben (Kapitel IV Abschnitt 3.2), für die IEDDA-Reaktion zwischen **20** und **15** eine Geschwindigkeitskonstante $k_2 = 4.0 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten, welche im unteren Bereich der für IEDDA typischen Reaktionsgeschwindigkeiten von $1 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegt.³⁴ In vorausgegangenen kinetischen Studien mit BCN-modifizierter DNA und Fluorophor **15** konnten maximale *Turn on*-Werte von bis zu 560 und Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $k_2 = 284.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt werden.⁴⁹ Basierend auf diesen Ergebnissen können für BCN-modifizierte einzelsträngige sowie doppelsträngige RNA vergleichbare *Turn on* Werte und Geschwindigkeitskonstanten angenommen werden.⁴⁹ Diese signifikante Erhöhung nach Einbau modifizierter Nukleoside in Oligonukleotide ist auf die Zwei-Faktor-Fluorogenität des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** zurückzuführen. Durch Wechselwirkung mit Oligonukleotiden und der damit verbundenen sterischen Hinderung werden strahlungsfreie Relaxationsprozesse, die typischerweise durch intramolekulare Rotation der Methylenbrücke initiiert werden, blockiert.

Dies führt zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität und wird als strukturelle Fluorogenität bezeichnet.^{49, 158} Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das BCN-modifizierte NTP **20** *in vitro* in einer IEDDA-Reaktion mit dem Tetrazin-Fluorophor Konjugat **15** mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von $k_2 = 4.0 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und einem *Turn on* von 88 reagiert.

3 *In cellulo* Experimente

Anschließend wurde das synthetisierte BCN-modifizierte NTP **20** auf dessen Anwendungsmöglichkeit in der metabolischen Markierung von neu gebildeter RNA in Zellen untersucht. Da Triphosphate aufgrund ihres polyanionischen Charakters nicht in der Lage sind die Zellmembran zu überqueren, wurde **SNTT1** verwendet, um eine gezielte, effiziente und schnelle Aufnahme von **20** in die Zelle zu ermöglichen.¹⁴⁵ Nach erfolgter zellulärer Aufnahme und der Inkorporation in die RNA durch endogene RNA-Polymerasen kann die markierte RNA anschließend über IEDDA-Reaktion mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugate **15** selektiv detektiert werden.

Um den **SNTT1**-vermittelten intrazellulären Transport sowie den Einbau des modifizierten Triphosphats **20** in die RNA unabhängig von der bioorthogonalen „Click“ Reaktion in der Zelle verfolgen zu können, wurde im ersten Schritt die metabolische Markierung mit dem fluoreszenten NTP **27** untersucht. Das Zellexperiment sollte zudem als Positivkontrolle für die metabolische Markierung mit NTP **20** dienen. Um das fluoreszente „Click“-Produkt **27** zu erhalten, wurde das BCN-modifizierte NTP **20** *in vitro* in einem Verhältnis von 1:1 mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** in Wasser mit einem DMSO-Anteil von 1 % umgesetzt. Der zelluläre Transport von NTP **27** erfolgte nach einem Protokoll von Kraus *et al.*¹⁴⁵ Hierfür wurden HeLa-Zellen für 10 min mit einer äquimolaren Lösung von NTP **27** und **SNTT1** in Tricin-Puffer (*Treatment*-Lösung) behandelt und anschließend in Minimum Essential Medium (MEM- α [+]) 10% dialysiertes Fetales Kälberserum (FKS)) für definierte Zeitintervalle (0.5 h, 1 h, 2 h und 3 h) inkubiert, um eine Inkorporation in die RNA zu ermöglichen. Im Gegensatz zu serumhaltigem Medium enthält der verwendete Tricin-Puffer keine Phosphate, die aufgrund ihrer negativen Ladung mit dem SNT-Transporter interagieren und in Konkurrenz zu den modifizierten-NTP treten können. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen, um überschüssiges nicht eingebautes NTP **27** zu entfernen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen ein deutliches Fluoreszenzsignal im Zytoplasma der Zelle (Abbildung 30 C). Werden die Zellen als Negativkontrolle entweder mit SNT-Transporter in Abwesenheit des

Nukleotids (Abbildung 30 A) oder mit dem Nukleotid ohne Zugabe des SNT-Transporters (Abbildung 30 B) inkubiert, lässt sich kein Fluoreszenzsignal detektieren. Diese Ergebnisse deuten auf einen erfolgreichen zellulären Transport sowie Einbau von NTP **27** in die neu gebildete RNA hin.

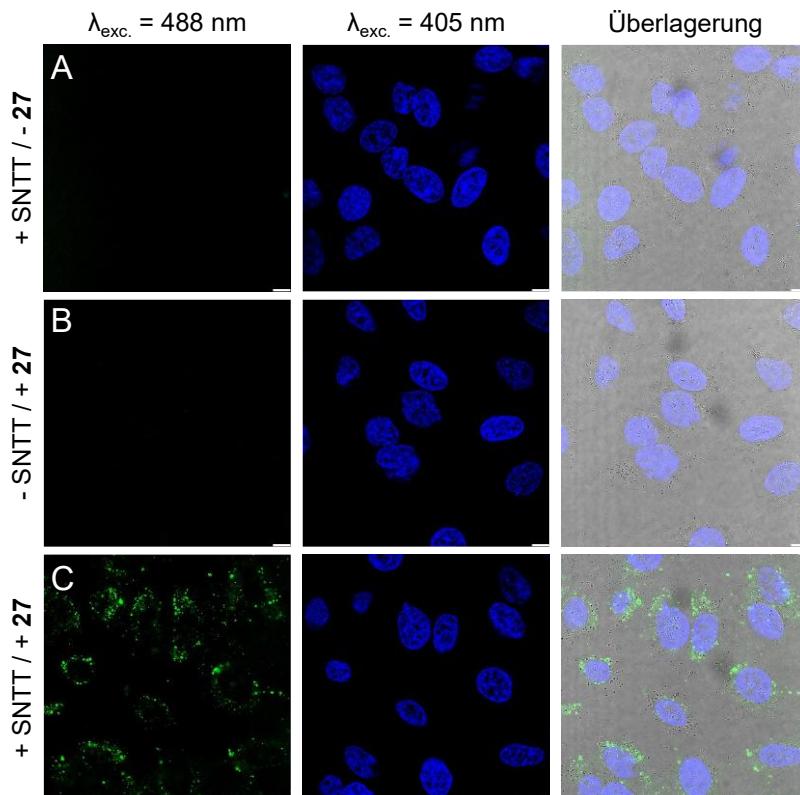


Abbildung 30: SNTT1-vermittelte bioorthogonale Markierung von RNA in HeLa Zellen. A) Negativkontrolle: HeLa-Zellen wurden mit 10 μ M SNTT1 in Tricin Puffer für 10 min und anschließend für 3 h in Medium inkubiert. B) HeLa-Zellen wurden mit 10 μ M NTP **27** in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 3 h in Medium inkubiert. C) HeLa Zellen wurden mit NTP **27** und SNTT1 (10 μ M) in Tricin Puffer für 10 min und anschließend in Medium für 3 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen (inklusive Negativkontrollen) mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Zellen erfolgte nach Inkubation mit Hoechst für 5 min über konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Fluorophor **15** (grün): $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, 10 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$; Hoechst (blau): $\lambda_{\text{exc.}} = 405 \text{ nm}$, 5 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 450 - 500 \text{ nm}$). Maßstab: 10 μm .

Der Vergleich der unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigt keinen signifikanten Unterschied im Fluoreszenzsignal, was darauf schließen lässt, dass bereits nach 0.5 h ein Einbau von **27** in die RNA stattgefunden hat (Abbildung 52 im Anhang).

Basierend auf diesem Zellexperiment wurde anschließend das BCN-modifizierte NTP **20** im Rahmen der SNTT1-vermittelten metabolischen Markierung von RNA untersucht. Hierzu wurden HeLa-Zellen entsprechend dem vorherigen Protokoll, für 10 Minuten mit NTP **20**

(10 µM) und **SNTT1** (10 µM) in Tricin Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 2 h inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) und anschließender Inkubation mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** für 5 h, wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Aufgrund der Fluorogenität des Fluorophors **15** kann theoretisch auf Waschschrifte verzichtet werden. Unter waschfreien Bedingungen konnte jedoch eine Akkumulation des Farbstoffs in den Nukleoli beobachtet werden (Abbildung 53 im Anhang), weshalb die Zellen vor der Visualisierung mit DPBS-Puffer gewaschen wurden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, analog zum vorherigen Experiment mit NTP **27**, eine punktuelle Fluoreszenz im Zytoplasma der Zelle (Abbildung 31). Im Vergleich zu NTP **27** ist die Signalintensität jedoch geringer. Dies deutet darauf hin, dass der Anteil an eingebautem Reporter, der für die IEDDA-Reaktion mit Fluorophor **15** zugänglich ist, begrenzt ist.

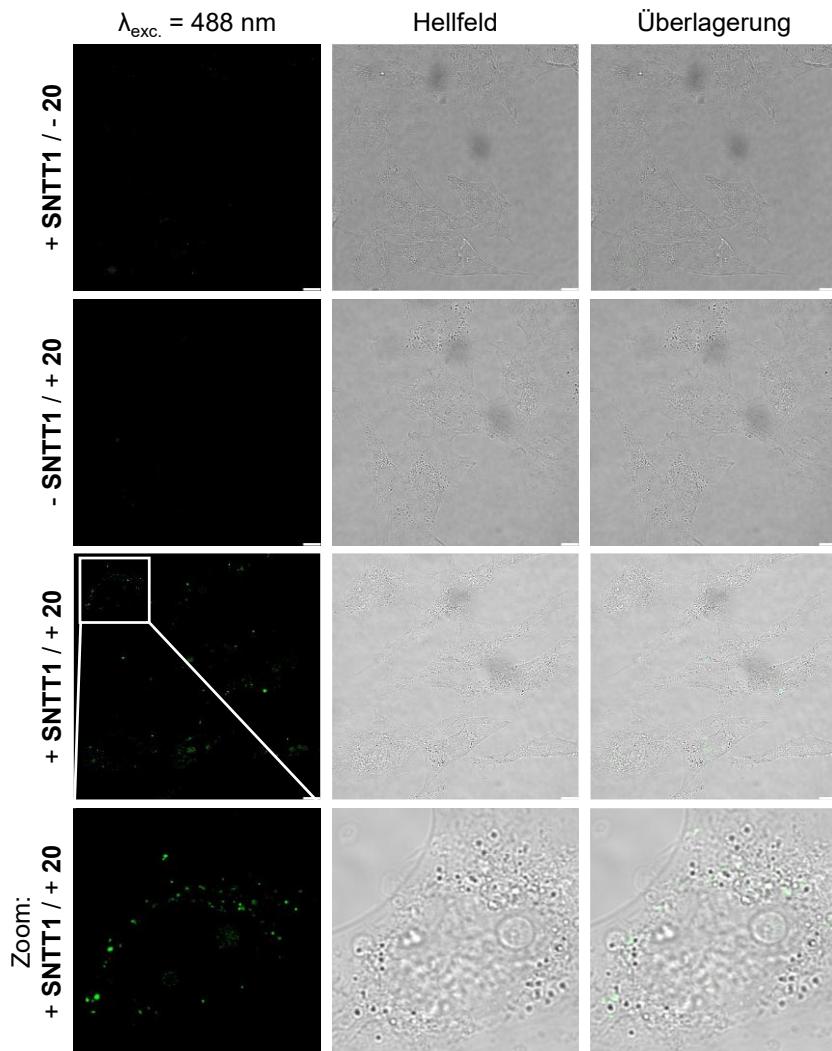


Abbildung 31: SNTT1-vermittelte bioorthogonale Markierung von RNA in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit NTP **20** und SNTT1 (10 µM) in Tricin Puffer für 10 min und anschließend in Medium für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Zellen erfolgte nach Inkubation mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** (1 µM) in Medium für 5 h über konfokale Fluoreszenzmikroskopie ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, 10 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 500 – 550 \text{ nm}$). Maßstab: 10 µm.

Um den metabolischen Einbau des BCN-modifizierten NTPs **20** sowie des fluoreszenten NTPs **27** in die RNA zu überprüfen und die Erkenntnisse aus den Zellexperimenten zu bestätigen, wurde die modifizierte RNA aus den Zellen wie zuvor beschrieben (Kapitel IV, Abschnitt 4) isoliert und fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Hierzu wurden 1.5×10^5 Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten mit *Treatment*-Lösung behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden in Medium, wurde die gesamte zelluläre RNA mittels Trizol®-Chloroform Extraktion aus den Zellen isoliert und mit dem *Zymo Clean & Concentrator Kit* aufgereinigt und weiter aufkonzentriert. Als

Negativkontrolle dienten Zellen, die unter identischen Bedingungen ohne Zugabe des entsprechenden NTP (**20** und **27**) sowie **SNTT1** inkubiert wurden. Im Fall des BCN-modifizierten NTP **20** wurde die isolierte RNA anschließend über Nacht mit dem Fluorophor **15** inkubiert. Um überschüssigen, nicht reagierten Farbstoff aus der Reaktionslösung zu entfernen, wurde die RNA erneut aufgereinigt. Die anschließende fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikante Fluoreszenz (Abbildung 32). Auch nach Inkubation der Zellen mit dem bereits fluoreszenten NTP **27** ist für die isolierte RNA keine Fluoreszenz detektierbar (Abbildung 54 im Anhang), was auf eine nicht erfolgreiche metabolische Inkorporation der modifizierten NTP **20** und **27** in die RNA hindeutet.

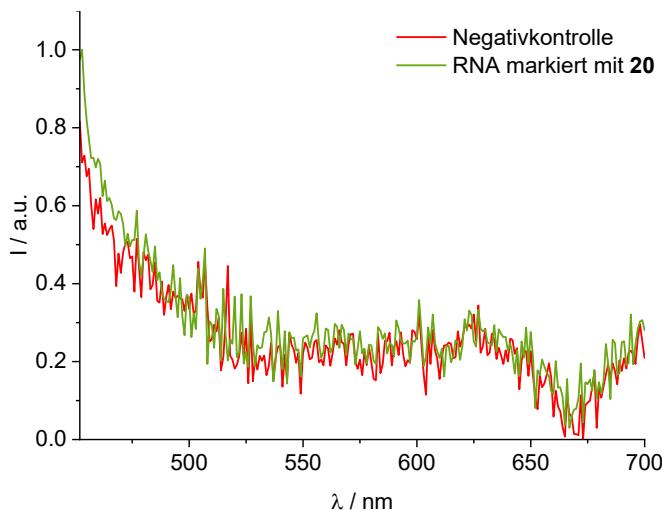


Abbildung 32: Fluoreszenzspektren von mit NTP **20** markierter isolierter zellulärer RNA nach IEDDA-Reaktion mit Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** (1 μM über Nacht, *in vitro*) sowie unmarkierter Kontroll-RNA. $\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 452 - 800 \text{ nm}$, Slits: 5 nm, 20 °C.

Die auf Grundlage der Zellexperimente getroffene Annahme eines erfolgreichen Einbaus der modifizierten NTP in die zelluläre RNA konnte durch die Isolation der RNA und die anschließende fluoreszenzspektroskopische Analyse nicht bestätigt werden. Das im Zytosol detektierte Fluoreszenzsignal in den Zellbildern (Abbildung 30 und 31) ist demnach nicht auf markierte RNA zurückzuführen. Zum einen kann es sich hierbei um freies, nicht inkorporiertes Nukleotid handeln, welches auch durch Waschschrifte nicht aus der Zelle entfernt werden konnte. Darüber hinaus ist es möglich, dass der **SNTT1**-vermittelte Transport nicht über direkte Translokation durch die Zellmembran, sondern über Endozytose erfolgt. In diesem Fall müsste das modifizierte NTP zunächst aus dem Endosom freigesetzt werden, damit ein Einbau in die RNA erfolgen kann. Gelingt der *endosomal escape* nicht, kann es entweder zur Akkumulation

des NTPs in den Endosomen der Zelle oder nach Aufnahme lysosomaler Enzyme zu dessen enzymatischem Abbau kommen. Die detektierte punktuelle Fluoreszenz im Zytoplasma deutet zudem auf eine vesikuläre Struktur hin. Um dies zu untersuchen, sind jedoch weiterer Zellexperimente erforderlich. Da endozytische Prozesse energieabhängig sind, könnte beispielsweise durch eine kontrollierte Veränderung der Temperatur von 37 °C auf 4 °C, die Aufnahme blockiert werden und so einen Nachweis für die Endozytose liefern. Darüber hinaus kann durch Kolokalisation mit Endosomen- sowie Lysosomen-Markern gezielt untersucht werden, ob sich die NTP in diesen Zellkompartimenten befinden.

4 Zusammenfassung

Der durch **SNTT1**-vermittelte Transport repräsentiert eine vielversprechende Strategie zur gezielten intrazellulären Bereitstellung modifizierter NTP. Derzeitig beschränkt sich die Anwendung des SNT-Transporters auf die bioorthogonale Markierung von neu synthetisierter DNA in Zellen. Um das Konzept auf die bioorthogonal Markierung von RNA auszuweiten, befasste sich Kapitel V mit der Synthese und Charakterisierung des BCN-modifizierten NTP **20**. Im Anschluss daran wurde die **SNTT1**-vermittelte zelluläre Aufnahme sowie die anschließende metabolische Inkorporation des modifizierten NTP in zelluläre RNA untersucht. Hierfür wurde zunächst das entsprechende NTP **20** ausgehend von kommerziell erhältlichem 5-Ioduridin in einer 6-stufigen Syntheseroute in einer Gesamtausbeute von 0.6 % synthetisiert. Hierbei zeigte sich die Triphosphorylierung als ausbeutelimitierender Schritt. Durch Optimierung der Syntheseroute konnte die Anzahl der notwendigen Schritte signifikant reduziert und die Gesamtausbeute auf 3 % gesteigert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Triphosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe als auch die Anbindung der Linker-Struktur über eine Sonogashira-Kreuzkupplung sowie die anschließende Konjugation der bioorthogonalen Gruppe ohne vorheriges Einführen von Schutzgruppen möglich ist. Das synthetisierte NTP **20** wurde im Anschluss auf dessen Eignung in der IEDDA-Reaktion mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** untersucht. Analog zu Kapitel IV wurde hierfür die Reaktion zwischen NTP **20** und Fluorophor **15** fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, um den *Turn on* sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zu bestimmen. Hierbei wurde ein *Turn on* Wert von 88 erhalten. Dieser im Vergleich zu NTP **1** signifikant höhere *Turn on* lässt sich auf die Einführung der negativen Phosphatgruppen zurückführen, welche die Vorkomplexierung des kationischen Tetrazin-Konjugats begünstigen.

Darüber hinaus konnte eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von $k_2 = 4.0 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten werden. Wie bereits diskutiert, liegt k_2 an der unteren Grenze der IEDDA-typischen Geschwindigkeitskonstanten. Es ist jedoch insbesondere im Hinblick auf die zelluläre Anwendung zu berücksichtigen, dass sich die Geschwindigkeitskonstanten von freiem NTP und modifizierter RNA signifikant unterscheiden können. Anschließend wurde die Eignung des synthetisierten BCN-modifizierten NTP **20** in Kombination mit dem SNT-Transporter für die bioorthogonale Markierung von RNA untersucht. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen konnte mittels Konfokalmikroskopie ein Fluoreszenzsignal im Zytoplasma detektiert werden. Durch RNA-Isolation sollte der Einbau in die RNA bestätigt werden. Dabei konnte nach fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung der isolierten RNA kein Signal im Emissionsbereich

des Fluorophors festgestellt werden. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen kann eine erfolgreiche metabolische Inkorporation von NTP **20** in zelluläre RNA ausgeschlossen werden. In weiterführenden Experimenten ist zu untersuchen, weshalb eine Fluoreszenz im Zytoplasma detektiert werden kann, jedoch keine effiziente Inkorporation in die RNA erfolgt. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die zelluläre Aufnahme der NTP durch den SNT-Transporter nicht über direkte Translokation, sondern überwiegend über endozytische Prozesse vermittelt wird. Zur Aufklärung dieses Mechanismus sind ergänzende Untersuchungen erforderlich, wie etwa temperaturabhängige Blockaden der Endozytose oder Kolokalisationsstudien.

VI. TriPPPro für die metabolische Markierung von RNA

1 Design der TriPPPro Reporter

Zur effizienten Bereitstellung hochreaktiver, aber sterisch gehinderter Nukleotid-Reporter für die bioorthogonale Markierung von Nukleinsäuren können die in Kapitel II beschriebenen Pronukleotid-Strategien^{121, 131, 179-183} angewendet werden. Durch diese Methoden ist es möglich, die Substratspezifität von endogenen Kinasen zu umgehen. Ziel dieser Forschung ist die Synthese von Triphosphat Pronukleotiden (TriPPPro) mit reaktiven chemischen Reportern wie BCN oder TCO, um eine bioorthogonale Markierung von RNA mit sterisch gehinderten Gruppen zu ermöglichen. Das TriPPPro-Konzept basiert auf der Maskierung der γ -Phosphatgruppe von NTP mit zwei enzymatisch spaltbaren lipophilen Acyloxybenzyl-Gruppen (AB-Gruppen).¹²¹ Durch die Verwendung des bereits vorgestellten fluorogenen Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** soll der Fokus auf einer Anwendung in lebenden Zellen (*Live-Cell-Imaging*) unter waschfreien Bedingungen mit niedriger Hintergrundfluoreszenz liegen. Mit der Entwicklung neuartiger RNA-TriPPPro soll das Repertoire an Nukleotiden, die für die metabolische Markierung von RNA zur Verfügung stehen, erweitert werden, um deren Funktion und Dynamik in zellulären Systemen gezielt untersuchen und somit eine Grundlage für zukünftige Anwendungen in Forschung, Diagnostik und Therapie schaffen zu können.

Zunächst wurde in Kooperation mit *J. Iven H. Knaack* aus der Arbeitsgruppe von *Chris Meier* an der Universität Hamburg, das in Abbildung 33 gezeigte *endo*-BCN-modifizierte TriPPPro **28** synthetisiert. Um einen Vergleich zwischen BCN und 2TCOa-modifizierten TriPPPro zu ermöglichen sowie die Effizienz der metabolischen Inkorporation von Uridinen gegenüber Cytidinen zu untersuchen, wurden zusätzlich die TriPPPro **29**, **30** und **31** von *J. Iven H. Knaack* synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

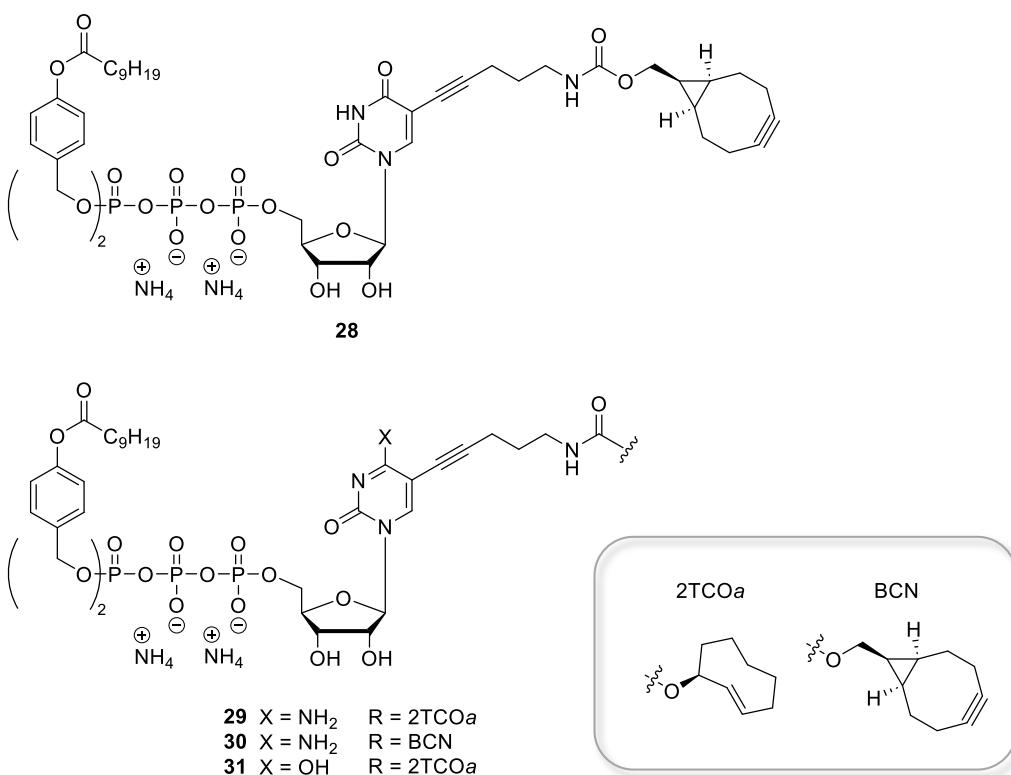


Abbildung 33: Struktur der BCN- und 2TCOa-modifizierten TriPPPPro **28 – 31.**

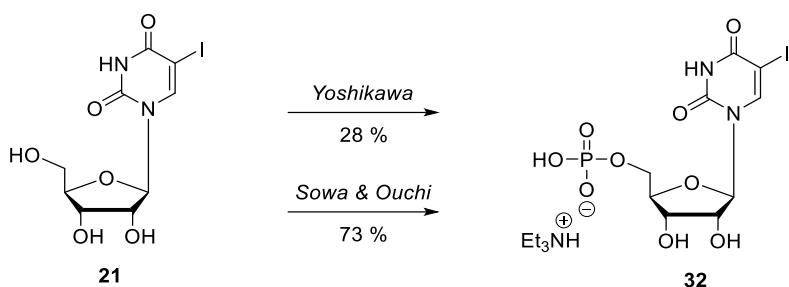
Das Design der Nukleotid-Reporter basierte auf den 2'-Desoxycytidin Analoga, die bereits von *Meier et al.* für die metabolische Markierung von DNA eingesetzt wurden.¹²¹ Um die gewünschte Modifikation gezielt an der C5-Position der Nukleobase einzuführen, wurde für die Synthese 5-Ioduridin und 5-Iodcytidin verwendet. Wie bereits in der Literatur beschrieben, werden Modifikationen an dieser Position gut von zellulären Polymerasen akzeptiert.^{166, 184, 185} Um ausreichend Distanz zwischen der Nukleobase und der entsprechenden bioorthogonalen Gruppe zu schaffen, wurde ein 5-Amino-1-pentinyl Linker verwendet.¹⁸⁶ Als bioorthogonal reaktive Gruppen wurden 2TCOa und BCN eingesetzt, da sie eine hohe IEDDA-Reaktivität aufweisen und sich daher als geeignete und vielfach eingesetzte chemische Reporter für bioorthogonale „Click“-Reaktionen etabliert haben.^{148, 156, 187, 188} Die Maskierung der endständigen γ -Phosphatgruppe erfolgte durch Acyloxybenzyl-Gruppen (AB-Gruppe), für die ein C9 Alkyl-Rest (C9-AB) gewählt wurde. Die Länge der Alkylkette beeinflusst maßgeblich die chemische Stabilität und Lipophilie der Verbindung und stellt somit einen entscheidenden Faktor für die Einbaueffizienz der TriPPPPro dar. *Meier et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass Alkylketten mit einer Kettenlänge $> \text{C}_{15}$ zu Löslichkeitsproblemen während der Synthese führen

und die Bildung von Micellen begünstigen, was für das hier beschriebene Vorhaben nachteilig ist.^{189, 190}

2 Synthese eines BCN-modifizierten TriPPPPro

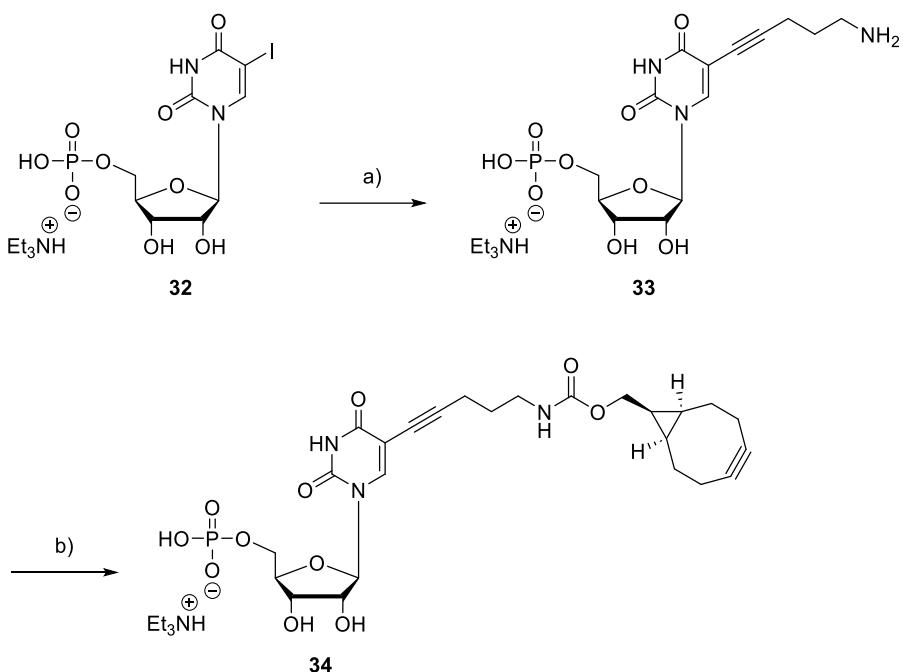
Die Synthese des BCN-modifizierten TriPPPPro **28** erfolgte nach der *H*-Phosphonat-Methode. Dieser Syntheseansatz ermöglicht den einfachen Zugang zu TriPPPPro-Verbindungen ausgehend von den entsprechenden Monophosphaten.¹⁹¹ Daher wurde zunächst das entsprechende BCN-modifizierte Nukleosidmonophosphat (NMP) **34** synthetisiert. Hierfür wurde kommerziell erhältliches 5-Ioduridin **21** im ersten Schritt nach einer modifizierten Synthesevorschrift von *Yoshikawa et al.* zum entsprechenden 5'-O-Nukleosidmonophosphat **32** umgesetzt (Schema 12).¹⁷⁶ Dies erfolgte mit POCl₃ und 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin als Protonenschwamm in Trimethylphosphat bei -10 °C und anschließender Hydrolyse des Dichlorphosphatintermediats durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer). Die Wahl der Base wirkt sich hierbei auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus und unterdrückt unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Bildung von 2'- und 3'-Monophosphaten.^{178, 192} Nach Aufreinigung des Rohprodukts mittels automatisierter *Reversed-Phase*-Säulenchromatographie konnten Verunreinigungen durch TMP sowie durch den Protonenschwamm im ¹H-NMR nachgewiesen werden. Zur vollständigen Abtrennung der Verunreinigungen wurde das Rohprodukt ein wiederholtes Mal säulenchromatographisch aufgereinigt, um das 5-Ioduridinmonophosphat **32** in einer Ausbeute von 28 % zu isolieren.

Aufgrund der geringen Ausbeute sowie der zeitintensiven Aufreinigung wurde im Anschluss eine alternative Methode zur Synthese von 5'-O-Nukleosidmonophosphaten getestet. Entsprechend der Vorschrift von *Sowa* und *Ouchi* wurde 5-Ioduridin **21** bei 0 °C mit POCl₃, Pyridin und Wasser in einem Verhältnis von 2:1:2 in Acetonitril umgesetzt (Schema 12).¹⁹³ Unter diesen Bedingungen bildet sich ein Addukt aus Tetrachlorpyrophosphat und Pyridiniumchlorid, welches als aktives Phosphorylierungsreagenz in der 5'-O-Phosphorylierung agiert.¹⁹³ Nach Hydrolyse wurde der pH-Wert durch Zugabe von Ammoniumbicarbonat eingestellt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Durch Zugabe von Triethylamin und anschließender Evaporation des Lösungsmittels wurde das Gegenion von Ammonium zu Triethylammonium getauscht. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das 5-Ioduridinmonophosphat **32** in einer Ausbeute von 73 % erhalten werden. Im Vergleich zur 5'-O-Phosphorylierung nach *Yoshikawa*¹⁷⁶ konnte keine Reduktion der Aufreinigungsschritte erreicht werden, jedoch wurde die Ausbeute signifikant erhöht.



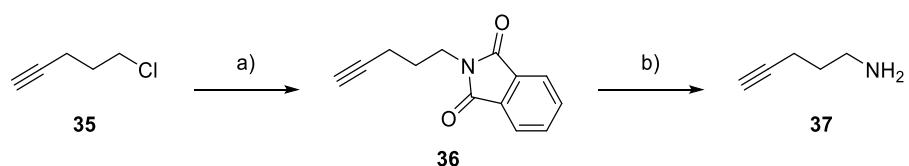
Schema 12: Synthese des 5-Iodouridinmonophosphats **32**. *Yoshikawa*: i) 1.50 Äq. POCl_3 , 1.50 Äq. 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm), Trimethylphosphat, -20 °C, 5 h. ii) Hydrolyse durch Zugabe von 100 mM TEAB-Puffer, 0 °C, 1 h, 28 %. *Sowa & Ouchi*: i) 19.1 Äq. Acetonitril, 4.40 Äq. POCl_3 , 4.80 Äq. Pyridin, 2.50 Äq. Wasser, 0 °C, 2.5 h. ii) Hydrolyse durch Zugabe von eiskaltem Wasser, 73%.

Im Anschluss wurde 5-Amin-1-pentin **37** unter Sonogashira-Kreuzkupplungsbedingungen, mit Pd₂(dba)₃ als Katalysator und Tri(2-furyl)phosphin als Ligand, eingeführt (Schema 13). Um die Löslichkeit des Triethylammoniumsalzes von **32** sicherzustellen, wurde die Reaktion in DMSO durchgeführt. Das aminmodifizierte Nukleosidmonophosphat **33** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 81 % erhalten.



Schema 13: Synthese des BCN-modifizierten Uridinmonophosphats **34**. a) 0.054 Äq. Pd₂(dba)₃, 0.12 Äq. Tri(2-furyl)phosphin, 0.15 Äq. CuI, 7.00 Äq. Et₃N, 1.50 Äq. 5-Amino-1-pentin **37**, DMSO, 50 °C, 1 h, 81 %. b) 3.50 Äq. Et₃N, 1.15 Äq. BCN-NHS-Carbonat, DMSO, RT, 1 h, 84 %.

Die Synthese von **37** erfolgte über eine zweistufige Gabriel-Synthese nach einer literaturbekannten Synthesevorschrift von *Guan et al.* (Schema 14).¹⁹⁴ Dafür wurde 5-Chlor-1-pentin **35** im ersten Schritt mit Kaliumphthalimid zum entsprechenden Alkylphthalimid **36** in einer Ausbeute von 85 % umgesetzt. Kaliumphthalimid wurde *in situ* aus Phthalimid und Kaliumiodid sowie Kaliumcarbonat erzeugt. Im nächsten Schritt wurde **36** mit Hydrazin in einer Hydrazinolyse zu 5-Amino-1-pentin **37** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt in einer Ausbeute von 85 % erhalten.

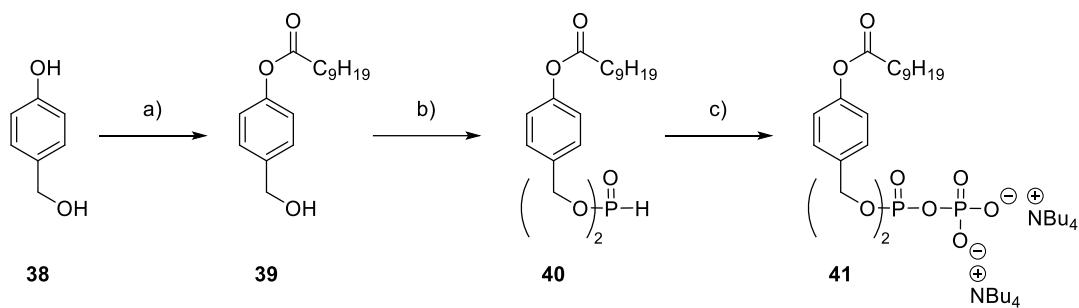


Schema 14: Synthese des 5-Amino-1-pentin Linkers **37**. a) 1.20 Phthalimid, 1.00 Äq. Kaliumcarbonat, 0.012 Äq. Kaliumiodid, DMF, 70 °C, 16 h, 85 %. b) 10.0 Äq. Hydrazin-Monohydrat, Ethanol, 70 °C, 3 h, 85 %.

Im nächsten Schritt erfolgte die Anbindung des chemischen Reporters. Hierfür wurde das aminmodifizierte NMP **33** mit kommerziell erhältlichem BCN-NHS-Carbonat unter basischen Bedingungen umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Automatisierte RP₁₈ Flash-Säulenchromatographie) wurde das BCN-modifizierte Uridinmonophosphat **34** in einer Ausbeute von 84 % isoliert.

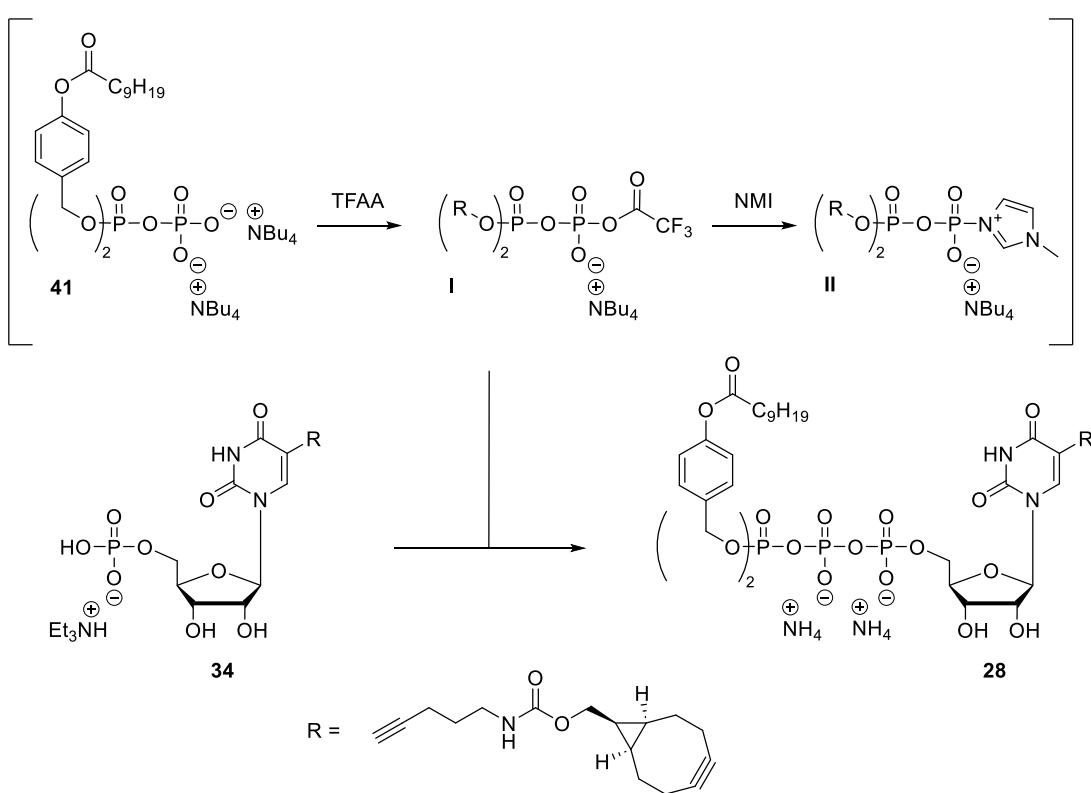
Für die anschließende Synthese von TriPPPPro **28** nach der H-Phosphonat-Methode, wurde zunächst bis[C9AB]-H-Phosphonat **40** nach einer literaturbekannten Vorschrift synthetisiert.^{191, 195} Hierfür wurde die phenolische Hydroxylfunktion von 4-Hydroxybenzylalkohol **38** im ersten Schritt durch Umsetzung mit Decanoylchlorid acyliert (Schema 15). Die moderate Ausbeute von 47 % lässt sich durch die Bildung unerwünschter Nebenprodukte erklären. Neben der Acylierung der benzylischen OH-Gruppe ist auch die Bildung eines zweifach acylierten Nebenprodukts denkbar. Das erhaltene 4-(Hydroxymethyl)-phenyldecanoat **39** wurde anschließend mit Diphenylphosphat in Pyridin umgesetzt. Nach Aufreinigung konnte das entsprechende H-Phosphonat **40** in einer Ausbeute von 65 % isoliert werden. Entsprechend der H-Phosphonat-Methode zur Synthese von TriPPPPro wurde im nächsten Schritt bis[C9AB]-H-Phosphonat **40** zunächst mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) aktiviert und anschließend mit einem Überschuss an Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat umgesetzt. Das

entsprechende Pyrophosphat **41** wurde nach Extraktion mit DCM sowie Waschen mit 1 M Ammoniumacetat-Lösung erhalten. Aufgrund der geringen Stabilität von **41** wurde es ohne weitere Aufreinigung direkt in der nachfolgenden TriPPPPro-Synthese eingesetzt.



Schema 15: Synthese von bis[C9AB]-Pyrophosphat **41**. a) 0.91 Äq. Decanoylchlorid in THF über 1 h, THF, RT, 18 h, 47 %. b) 2.20 Äq. **39**, 1.00 Äq. Diphenylphosphit, Pyridin, 40 °C, 3 h, 65 %. c) 2.50 Äq. N-Chlorsuccinimid, Acetonitril, 50 °C, 3.5 h, 3.00 Äq. Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat, RT, 1 h.

Die Kupplung von NMP **34** mit dem frisch synthetisierten Pyrophosphat **41** zum fertigen TriPPPPro **28** (Schema 16) erfordert eine schrittweise Aktivierung des Pyrophosphats mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und *N*-Methylimidazol (NMI). Hierfür wurde nach einer Vorschrift von *Gollnest et al.* das Pyrophosphat **41** mit TFAA in Acetonitril bei 0 °C umgesetzt, um das TFA-aktivierte Pyrophosphat I zu erhalten.¹⁹¹ Bei anschließender Zugabe von NMI, kommt es zum nukleophilen Angriff am Phosphor, wobei *in situ* unter Abspaltung von Trifluoressigsäure das NMI-aktivierte Pyrophosphat II gebildet wird. Das TriPPPPro **28** wurde nach Zugabe des BCN-modifizierten NMP **34** und säulenchromatographischer Aufreinigung (automatisierte RP₁₈-Flash-Säulenchromatographie) sowie Ionenaustauschchromatographie als Ammoniumsalz in einer Ausbeute von 32 % erhalten.



Schema 16: Synthese des BCN-modifizierten TriPPPros **28**. i) 1.00 Äq. **41**, 5.00 Äq. TFAA, 8.00 Äq. Et_3N , Acetonitril, RT, 15 min. ii) 5.00 Äq. Et_3N , 2.50 Äq. N-Methylimidazol, DMF, RT, 15 min, 0.46 Äq. **34**, RT, 3 h, 32 %.

Die Synthese der TriPPPPro **29 – 31** erfolgte analog zur zuvor beschriebenen Syntheseroute und wurde von *J. Iven H. Knaack* durchgeführt.

Zusätzlich zu den 2TCO_a- und BCN-modifizierten TriPPPPro **28 – 31** wurden die entsprechenden Triphosphate **43 – 45** synthetisiert sowie das Triphosphat **42** von *J. Iven H. Knaack* zur Verfügung gestellt, um deren Eigenschaften, wie den *Turn on* sowie die Reaktionskinetik in der IEDDA-Reaktion mit dem Tetrazin-Fluorophor Konjugat **15**, zu untersuchen (Abbildung 34). Darüber hinaus bieten die synthetisierten 2TCO_a- und BCN-modifizierten NTP **42 – 45** die Möglichkeit das TriPPPPro-Konzept mit der SNTT1-vermittelten metabolischen Markierung miteinander zu vergleichen.

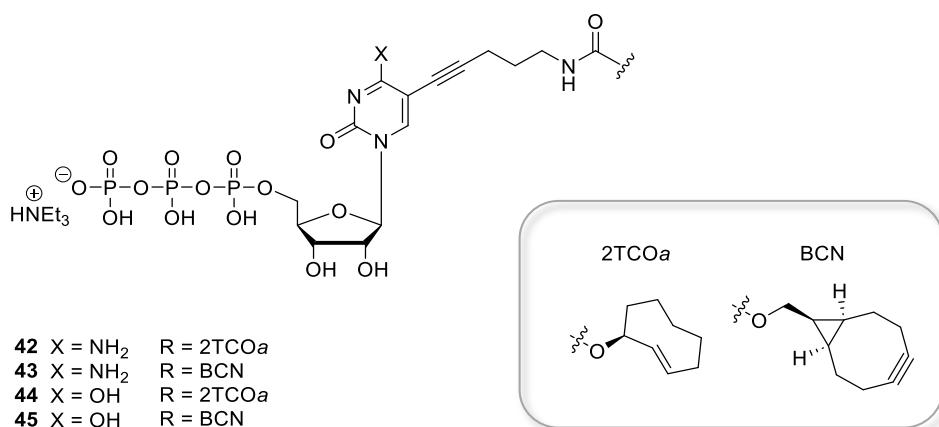
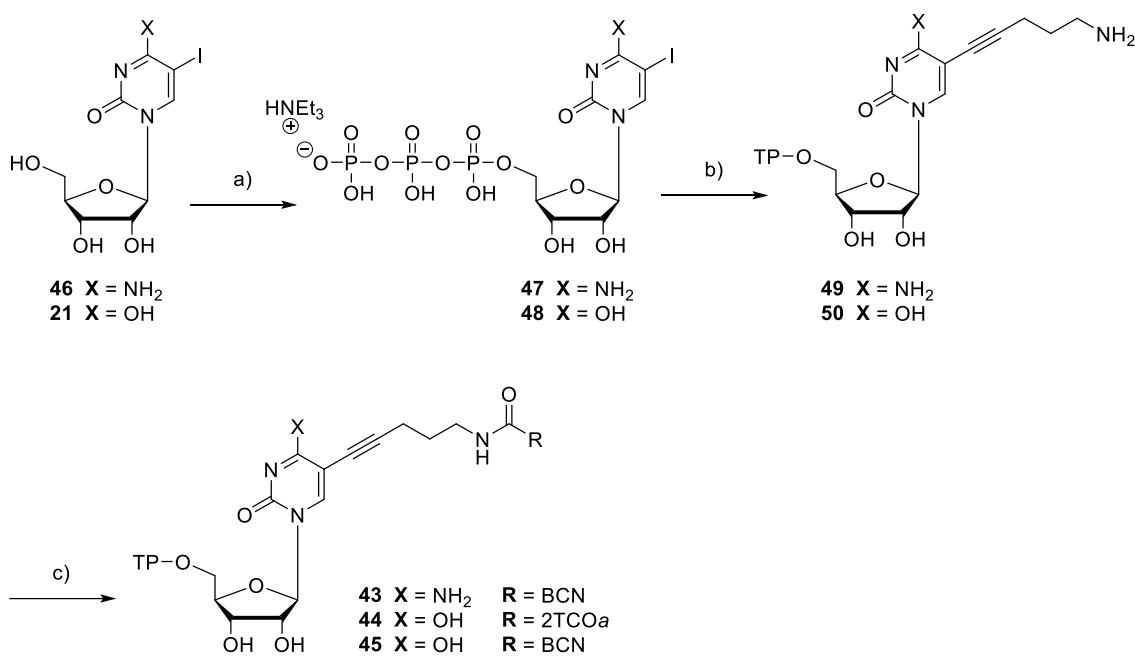


Abbildung 34: Struktur der 2TCOa- und BCN-modifizierten Nukleosidtriphosphate **42 – 45**.

Die Synthese der NTP **43 – 45** erfolgte analog zu der in Kapitel V beschriebenen Synthese modifizierter NTP ausgehend von 5-Ioduridin **21** bzw. 5-Iodecytidin **46** in drei Schritten (Schema 17). Im ersten Schritt erfolgte die Triphosphorylierung nach *Ludwig* durch Umsetzung der Nukleoside **21** und **46**.¹⁷¹ Analog zu den zuvor beschriebenen Monophosphaten wurde anschließend 5-Amino-1-pentin **37** als Linker an die NTP **47** und **48** mittels Sonogashira-Kreuzkupplung angebunden. Die nach säulenchromatographischer Aufreinigung (automatisierte RP₁₈-Flash-Säulenchromatographie) in Ausbeuten von 73 % und 72 % erhaltenen aminfunktionalisierten NTP **49** (CTP) und **50** (UTP) wurden und im nächsten Schritt mit dem entsprechenden 2TCOa- oder BCN-NHS-Carbonat umgesetzt, um die bioorthogonalen Reporter einzuführen. Die BCN-modifizierten NTP **43** und **45** sowie das 2TCOa-modifizierte NTP **44** konnten so in Ausbeuten von 35 – 69 % erhalten werden. Die Synthese des 2TCOa-modifizierte NTPs **42** erfolgte analog zur zuvor beschriebenen Syntheseroute und wurde von *J. Iven H. Knaack* durchgeführt.



Schema 17: Synthese der 2TCOa- und BCN-modifizierten Nukleosidtriphosphate **43 – 45**. a) i. 1.20 Äq. POCl₃, Trimethylphosphat, 0 °C, 24 h; ii. 0.85 Äq. Tris(tetrabutylammonium)-hydrogenpyrophosphat, 6.00 Äq. Tributylamin, Acetonitril, 0 °C, 20 min; iii. Hydrolyse durch Zugabe von Wasser, RT, 1 h, 16 %. b) 0.054 Äq. Pd₂(dba)₃, 0.12 Äq. Tri(2-furyl)phosphin, 0.15 Äq. CuI, 7.00 Äq. Et₃N, 2.00 Äq. 5-Amino-1-penten **37**, DMSO, 50 °C, 2 h, 72 %. c) 4.20 Äq. Et₃N, 1.40 Äq. BCN-NHS-Carbonat, DMSO, 40 °C, 2 h, 35 %.

3 In vitro Experimente

3.1 Untersuchung der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie

Es wurde zunächst die IEDDA-Reaktion zwischen den synthetisierten NTP **42 – 45** und dem fluorogenen Tetrazin-Fluorophor Konjugat **15** *in vitro* wie zuvor beschrieben untersucht. Die erhaltenen Fluoreszenzspektren der „Click“-Reaktionen zwischen den BCN-modifizierten NTP **43** und **45** und dem Tetrazin-Fluorophor Konjugat **15** zeigen bis zum Erreichen eines Plateaus einen kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abbildung 35 A, Abbildung 55 und 56 im Anhang). Im Gegensatz hierzu weisen die Fluoreszenzspektren der 2TCOa-modifizierten NTP **42** und **44** zwei aufeinanderfolgende Anstiege der Fluoreszenzintensität mit einer transienten Abnahme der Fluoreszenz auf (Abbildung 35 B, Abbildung 57 und 58 im Anhang).

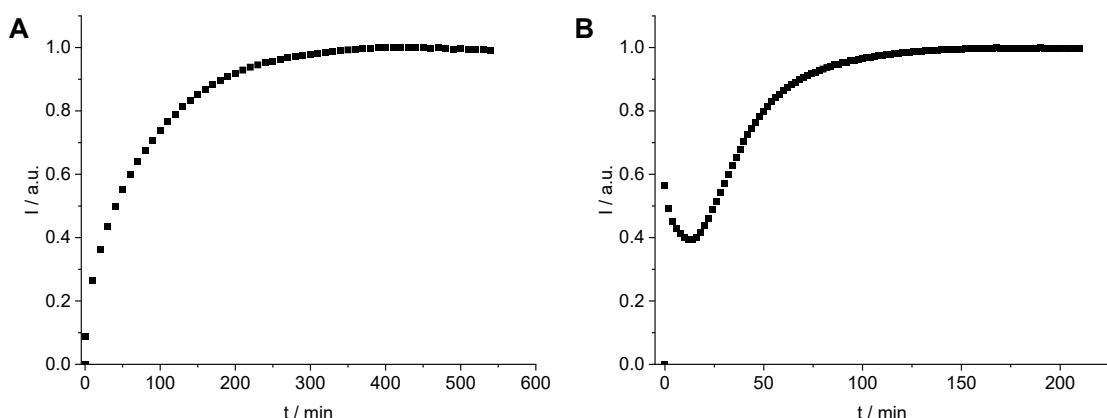
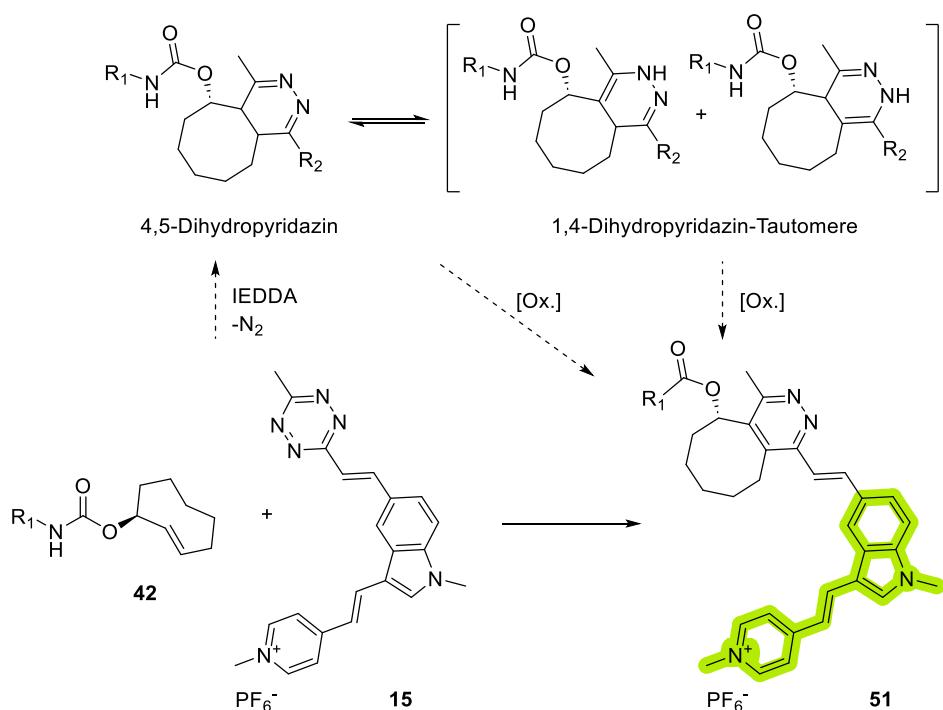


Abbildung 35: Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit t. A) IEDDA-Reaktion zwischen dem BCN-modifizierten NTP **43** und Fluorophor **15**. B) IEDDA-Reaktion zwischen dem 2TCO α -modifizierten NTP **42** und Fluorophor **15**.

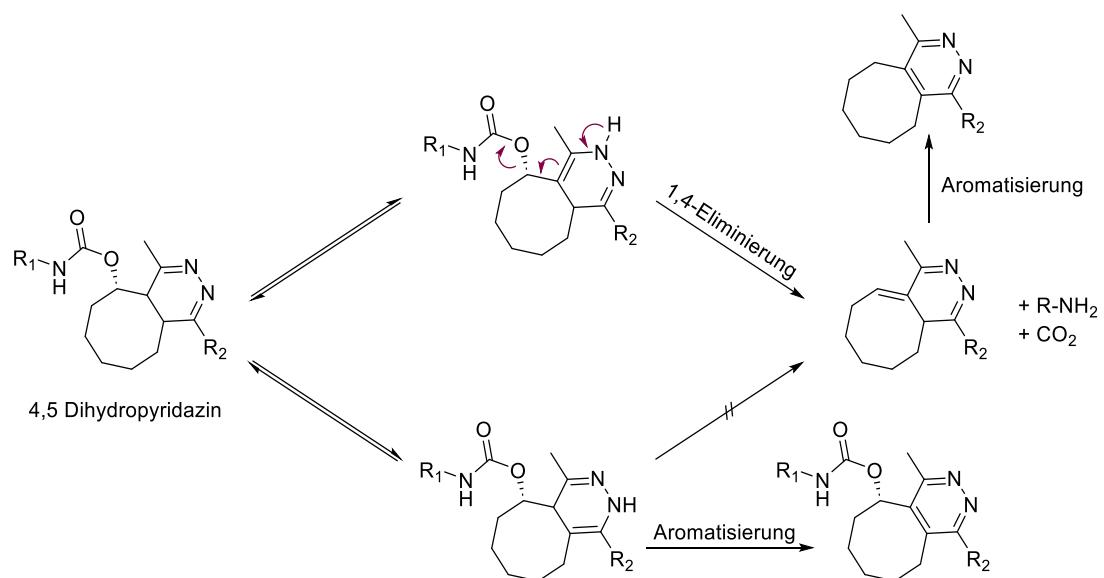
Eine mögliche Erklärung für den sukzessiven Anstieg der Fluoreszenzintensität könnte im unterschiedlichen Reaktionsverlauf der chemischen Reporter innerhalb der IEDDA-Reaktion liegen. Während bei der Reaktion mit Alkinen als Dienophil, wie BCN, direkt ein aromatisches „Click“-Produkt entsteht, verläuft die Reaktion zwischen Alkenen, wie 2TCO α , und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** über einen zweistufigen Mechanismus. Reagiert 2TCO α mit **15** wird zunächst Stickstoff in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion freigesetzt, wobei sich ein nicht-aromatisches 4,5-Dihydropyridazin bildet, das anschließend entweder zum entsprechenden 1,4-Dihydropyridazin tautomerisiert und durch Oxidation in das aromatische Pyridazin überführt wird (Schema 18).^{34, 196}



Schema 18: IEDDA-Reaktion zwischen dem fluorogenen tetrazinfunktionalisierten Cyanin-Styryl Farbstoff **15** und dem 2TCO α -modifizierten Nukleosidtriphosphat **42** zum fluoreszenten „Click“-Produkt **51**. R₁ = CTP **49**, R₂ = Cyanin-Styryl-Farbstoff. Auf die Darstellung von Regioisomeren von **51** wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Darüber hinaus ist die vorübergehende Abnahme der Fluoreszenzintensität im Fall der 2TCO α -modifizierten NTP **42** und **44** wahrscheinlich auf die Abspaltung und anschließende Dissoziation des geclikten Fluorophors **15** vom Nukleotid infolge einer 1,4-Eliminierung zurückzuführen. Entsteht im Rahmen einer IEDDA-Reaktion zwischen einem Tetrazin und einem Carbamat-verknüpften 2TCO α -Derivat ein 1,4-Dihydropyridazin als Zwischenprodukt, kann dieses durch eine 1,4-Eliminierung des Substituenten mit nachfolgender Aromatisierung zum Pyridazin weiterreagieren (Schema 19). Hierbei kommt es zur Bildung einer exocyclischen Doppelbindung, gefolgt von einer Decarboxylierung und der Freisetzung des aminmodifizierten Substituenten.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ Diese im Anschluss an die IEDDA-Reaktion stattfindende Eliminierung wird als „Click-to-release“¹⁹⁷ bezeichnet und ermöglicht neben einer breiten Anwendung der IEDDA-Reaktion in der Biokonjugation eine Anwendung in der Prodrug-Aktivierung²⁰⁰, Radioimmuntherapie²⁰¹ sowie kontrollierten Wirkstofffreisetzung.²⁰² Die massenspektrometrische Untersuchung der Reaktionslösung im Anschluss an die IEDDA-Reaktion zwischen NTP **42** und Fluorophor **15** konnte das Eliminierungsprodukt und somit die Annahme der 1,4-Eliminierung bestätigen. Zusätzlich zeigte die kinetische Analyse der

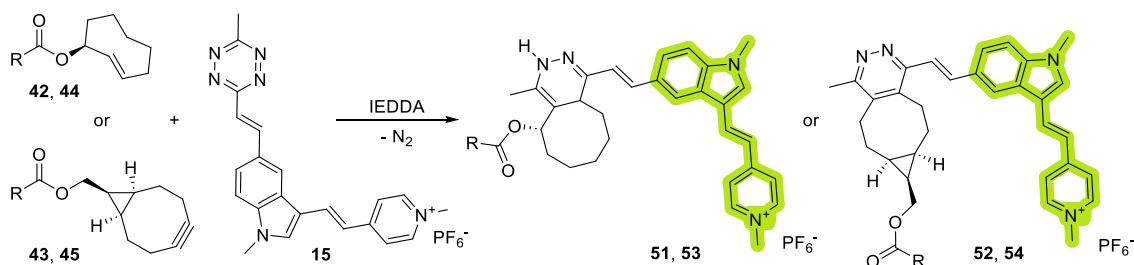
„Click“-Reaktion zwischen dem nicht-eliminierenden 4TCO und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** einen Anstieg ohne vorübergehende Abnahme der Fluoreszenzintensität. Dies unterstützt die Annahme, dass die 1,4-Eliminierung für die transient auftretende Fluoreszenzabsenkung im Fall der 2TCO_a-modifizierten NTP **42** und **44** verantwortlich ist. Mit der Oxidation des Dihydropyridazin als Zwischenprodukt zum aromatischen Pyridazin ist eine 1,4-Eliminierung nicht mehr möglich, was zu einem weiteren Anstieg der Fluoreszenzintensität führt. Die Bildung des aromatischen Pyridazins als Produkt konnte ebenfalls über Massenspektrometrie nachgewiesen werden.



Schema 19: „Click-to-release“ Mechanismus mit 2TCO_a als „Click“-Partner in einer IEDDA-Reaktion mit Tetrazinen.
R₁ = CTP **49** oder UTP **50**, R₂ = Cyanin-Styryl-Farbstoff.

Anhand der Fluoreszenzintegrale vor Reaktionsbeginn sowie nach dem Erreichen des Plateaus konnten für die 2TCO_a- und BCN-modifizierten NTP **42 – 45** *Turn on* Werte zwischen 30 und 45 bestimmt werden (Tabelle 1). Zwischen den chemischen Reportern, BCN und 2TCO_a konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Im Vergleich zu dem zuvor charakterisierten BCN-modifizierten NTP **20**, für das ein *Turn on* von 88 bestimmt wurde, sind die *Turn on*-Werte der NTP **43** und **45** signifikant niedriger. Da sich die BCN-modifizierten NTP **20** und **43** bzw. **45** ausschließlich in der Länge des Linkers unterscheiden, kann ein Einfluss der Linkerstruktur auf den *Turn on* angenommen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden analog zu der in Kapitel IV 3.2 beschriebenen Vorgehensweise bestimmt (Tabelle 1, Abbildung 55 – 58 im Anhang).

Tabelle 1: IEDDA-Reaktion zwischen den BCN- und 2TCO α -modifizierten NTP **42 – 45** und Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** zu den „Click“-Produkten **51 – 54**. R = AP-CTP für **42, 43, 51**, and **52**. R = AP-UTP für **44, 45, 53**, and **54**.



Nukleotid	“Click”-Produkt	Turn on	$k_2 [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
42	51	45	2.5 ± 0.05
44	53	31	9.0 ± 0.30
43	52	32	1.1 ± 0.04
45	54	36	1.3 ± 0.05

Für die 2TCO α -modifizierten NTP **42** und **44** wurden im Vergleich zu den BCN-modifizierten NTP **43** und **45** leicht höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erhalten. Dies kann durch die höhere intrinsische Ringspannung von 2TCO α erklärt werden. Diese Spannung hebt das Energieniveau des höchsten besetzten Molekülorbitals (HOMO) des Dienophils an, was zu einer gesteigerten Reaktivität gegenüber dem elektronenarmen Dien (hier Tetrazin) in einer IEDDA-Reaktion führt. Die für die 2TCO α -modifizierten NTP **42** und **44** erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten beziehen sich hingegen auf den gesamten Reaktionsverlauf. Die initiale „Click“-Reaktion verläuft im Vergleich zu den BCN-modifizierten NTP deutlich schneller (Abbildung 35 B).

Wagenknecht et al. konnten zeigen, dass für IEDDA-Reaktionen mit BCN-modifizierter DNA im Vergleich zu den entsprechenden BCN-modifizierten DNA-Nukleosiden deutlich höhere Turn on-Werte sowie Geschwindigkeitskonstanten erhalten werden.⁴⁹ Basierend auf diesen Erkenntnissen ist auch für BCN- und 2TCO α -modifizierte einzelsträngige sowie doppelsträngige RNA eine signifikante Erhöhung dieser Parameter zu erwarten.

4 *In cellulo* Experimente

4.1 Untersuchung der Metabolischen Markierung mittels RNA-Isolation

Im Anschluss an die fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung wurde die TriPPPPro-Strategie auf ihre Eignung zur metabolischen Inkorporation von 2TCO_a- und BCN-modifizierten Nukleotid-Reportern in zelluläre RNA untersucht.

Hierfür wurden Vero-Zellen mit 5 µM des BCN-modifizierten TriPPPros **30** für insgesamt 4 h inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h erfolgte eine Erneuerung des Inkubationsmediums. Um eine enzymatische Demaskierung der TriPPPPro in serumhaltigem Medium zu verhindern und deren extrazelluläre Stabilität während der Inkubation zu sichern, wurde ein serumfreies Medium (VP-SFM) mit einem geringen Proteingehalt (< 5 µg/mL) gewählt. Eine vorzeitige extrazelluläre Demaskierung würde die zelluläre Aufnahme verhindern und sich negativ auf die Markierungseffizienz auswirken. Als Negativkontrolle wurden die Zellen in VP-SFM ohne Zugabe von TriPPPPro, jedoch unter Zusatz der äquivalenten Menge DMSO inkubiert. Anschließend wurde die gesamten zellulären RNA wie zuvor beschrieben isoliert, aufgereinigt und anschließend mit 5 µM des Tetrazin-Farbstoff Konjugats **15** inkubiert. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigt das Fluoreszenzspektrum der BCN-markierten RNA ein deutliches Fluoreszenzsignal (Abbildung 36).

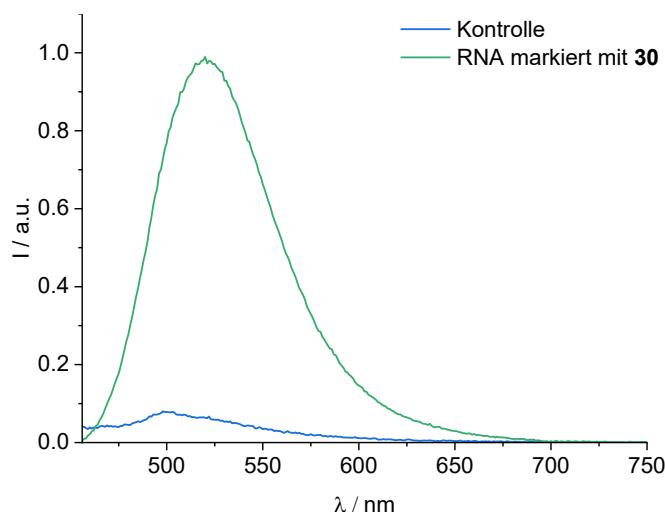


Abbildung 36: Fluoreszenzspektren isolierter zellulärer RNA, die mit TriPPPPro **30** (grün) markiert wurde, im Vergleich zu unmarkierter Kontroll-RNA $\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 452 - 800 \text{ nm}$, Slits: 5 nm, 20 °C.

Dies weist auf eine erfolgreiche metabolische Inkorporation des BCN-modifizierten Nukleotids **43** in neu synthetisierte zelluläre RNA durch endogene RNA-Polymerasen hin. Grundlegend hierfür ist die effiziente intrazelluläre Aufnahme der TriPPPPro sowie die enzymatische Abspaltung der Maskierungsgruppen, die zur Freisetzung des aktiven NTP führt. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Eignung der TriPPPPro-Strategie für die metabolische RNA-Markierung.

Um die Effizienz der TriPPPPro-Strategie mit der **SNTT1**-vermittelten metabolischen Markierung zu vergleichen, wurde im nächsten Schritt das entsprechende BCN-modifizierte NTP **43** in SNT-Transporter-Zellexperimenten untersucht. Hierfür wurden Vero-Zellen nach einer Vorschrift von *Kraus et al.* für 10 min mit einer äquimolaren Lösung aus NTP **43** und **SNTT1** (60 µM, *Treatment*-Lösung) inkubiert.¹⁴⁵ Eine Inkubationszeit von 10 min ist ausreichend, um einen effizienten intrazellulären Transport zu gewährleisten und gleichzeitig die Zytotoxizität gering zu halten.¹⁴⁵ Die *Treatment*-Lösung wurde entfernt und die Zellen für 4 h in DMEM inkubiert, um eine Inkorporation in die zelluläre RNA zu ermöglichen. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne SNT-Transporter und Nukleotid **43** in Tricin-Puffer und anschließend in DMEM inkubiert. Die Isolation der zellulären RNA sowie die anschließende „Click“-Reaktion mit Fluorophor **15** erfolgte analog zur zuvor beschriebenen Vorgehensweise. Die fluoreszenzspektroskopische Analyse der markierten RNA ergab im Vergleich zur Negativkontrolle ein deutliches Fluoreszenzsignal, was auf einen erfolgreichen **SNTT1**-vermittelten intrazellulären Transport sowie metabolischen Einbau des BCN-modifizierten NTPs **43** in die RNA hinweist (Abbildung 37). Im Vergleich zur TriPPPPro-Strategie ist das beobachtete Fluoreszenzsignal jedoch deutlich geringer, was auf eine verminderte Markierungseffizienz unter diesen Bedingungen schließen lässt.

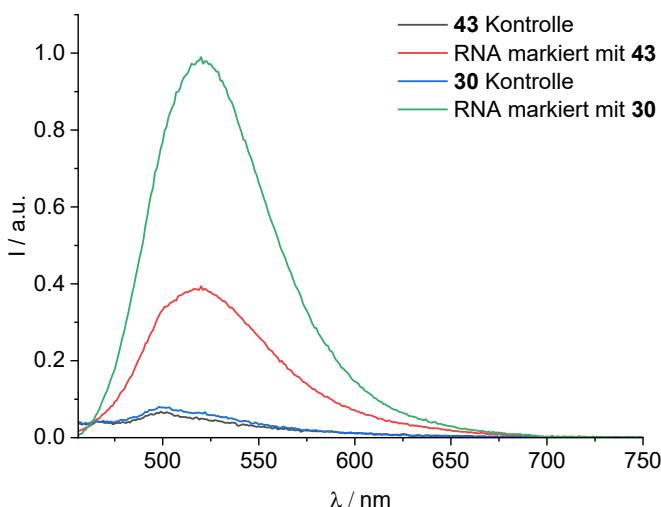


Abbildung 37: Fluoreszenzspektren von isolierter zellulärer RNA, die mit NTP **43** (rot) oder TriPPPPro **30** (grün) markiert wurde, im Vergleich zu unmarkierter Kontroll-RNA $\lambda_{\text{exc.}} = 437 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 452 - 800 \text{ nm}$, Slits: 5 nm, 20 °C.

4.2 TriPPPPro für die RNA-Markierung Lebender Zellen

Im nächsten Schritt sollte die Effizienz der TriPPPPro **28 – 31** für die bioorthogonale Markierung neu synthetisierter RNA in lebenden Zellen untersucht werden. Die im Folgenden beschriebenen Experimente *in cellulo* wurden in Kooperation mit der Gruppe von Jens Bosse vom *Centre for Structural Systems Biology* (CSSB) in Hamburg von Dörte Stalling durchgeführt und ausgewertet. Für die Markierungsexperimente wurden Vero-Zellen über einen Zeitraum von 3 h mit 5 µM der 2TCOa- sowie BCN-modifizierten TriPPPPro **28 – 31** in VP-SFM inkubiert. Um überschüssiges, nicht eingebautes Nukleotid zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit DPBS-Puffer gewaschen. Die markierte RNA wurde im nächsten Schritt mit dem fluorogenen Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** visualisiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Fluorophor **15** inkubiert wurden, um den Umfang einer unspezifischen Markierung unter waschfreien Bedingungen bewerten zu können. Die erhaltenen Zellbilder der Negativkontrolle zeigen nahezu keine Fluoreszenz, was auf eine minimale unspezifische Markierung hinweist. Im Gegensatz dazu weisen Zellen, die mit den TriPPPPro **28 – 31** inkubiert wurden, eine starke intranukleäre Fluoreszenz im Bereich der Nukleoli sowie eine Fluoreszenz im Zytoplasma auf (Abbildung 38, Abbildung 59 im Anhang). Ein signifikanter Unterschied zwischen den TriPPPPro **28 – 31** konnte dabei anhand der Quantifizierung der Signalintensitäten der Nukleoli jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 60 im Anhang). Die TriPPPPro zeigten keinerlei Hinweise auf eine mögliche Zytotoxizität, was mit vorherigen Studien zur DNA-Markierung übereinstimmt.¹²¹

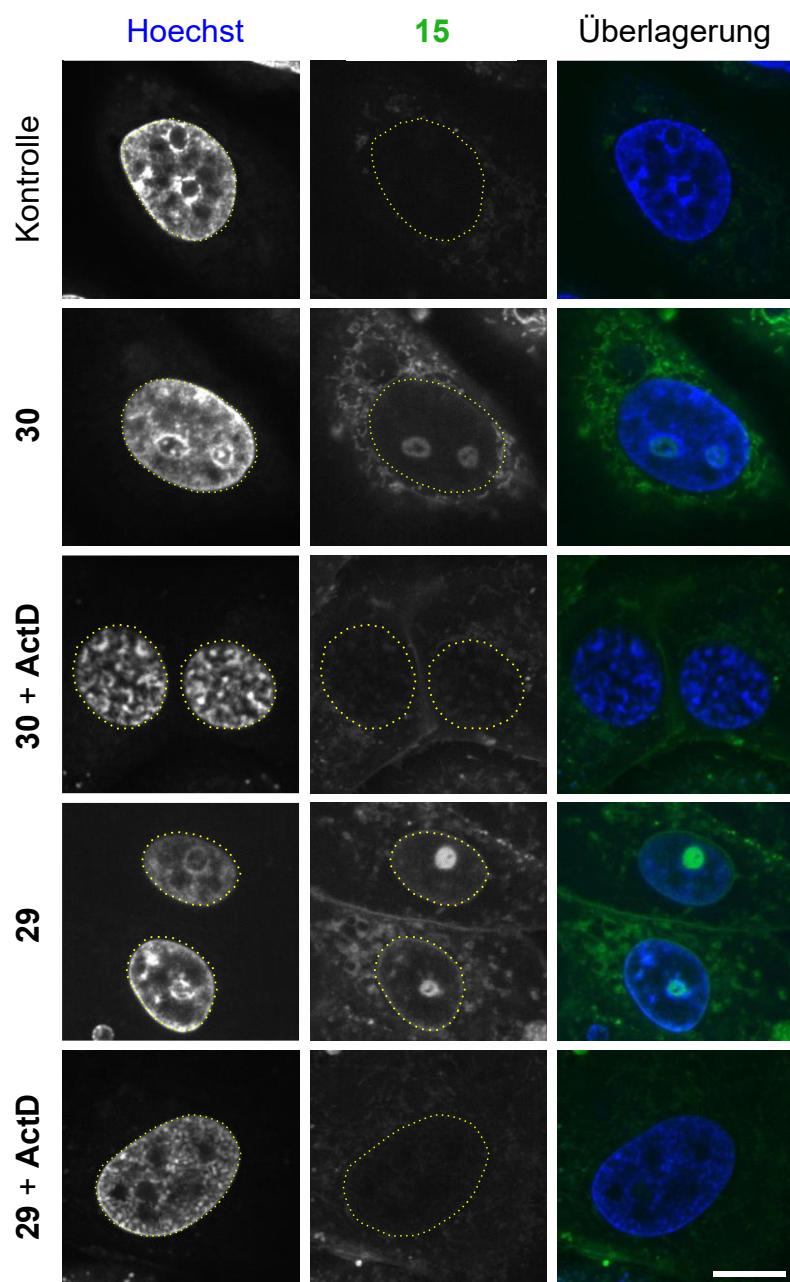


Abbildung 38: Bioorthogonale Markierung neu synthetisierter RNA unter Verwendung der 2TCO_a- und BCN-modifizierten TriPPPro **29** und **30**. Vero-Zellen wurden mit VP-SFM gewaschen und anschließend für 3 h mit 5µM TriPPPro sowie mit bzw. ohne Actinomycin D (ActD) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit VP-SFM gewaschen und ActD wurde, wenn angegeben, erneut zugegeben. Nach Inkubation mit Tetrazin-Fluorophor Konjugat **15** für 30 min zur Visualisierung TriPPPro markierter RNA (grün) wurden die Zellen mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gegengefärbt (blau). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (80 % Intensität, 600 ms Expositionszeit). Die Detektion erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von Hoechst erfolgte mit einem 405 nm Laser (50 % Intensität, 200 ms Expositionszeit). Die Detektion erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 400 - 550$ nm. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht umrandet (gelbe gestrichelte Linie). Maßstab: 10 µm. Abbildung zur Verfügung gestellt von D. Stalling (CSSB Hamburg).

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung einer Transkriptionshemmung mit Actinomycin D auf die RNA-Markierung untersucht. Actinomycin D ist ein Zytostatikum, das in niedriger Dosierung als spezifischer Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Synthese wirkt, indem es in die DNA interkaliert.²⁰³ Wie in Abbildung 38 und Abbildung 59 im Anhang zu erkennen, ist bei Zugabe von Actinomycin D im Vergleich zur Kontrolle ohne Actinomycin D kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Dies bestätigt, dass die intrazellulär freigesetzten 2TCO_a- und BCN-modifizierten NTP als Substrat für die zelluläre RNA-Polymerase dienen und metabolisch in neu synthetisierte RNA inkorporiert werden. Um zusätzlich nachzuweisen, dass es sich bei den beobachteten fluoreszenten intranukleären Foci um Nukleoli handelt, wurde eine Gegenfärbung der 5.8S rRNA mittels Immunmarkierung durchgeführt. Nukleoli stellen RNA-reiche Subkompartimente des Zellkerns dar und sind für die Biogenese ribosomaler RNA verantwortlich.²⁰⁴ Die 5.8S rRNA ist Bestandteil der 60S-Untereinheit eukaryotischer Ribosomen und dementsprechend in den Nukleoli angereichert.²⁰⁵ Für die Immunmarkierung wurden die Zellen zunächst mit PFA fixiert und anschließend mit Triton X-100 permeabilisiert. Vor der Inkubation mit den primären sowie sekundären Antikörpern erfolgte eine Blockierung mit bovinem Serum-Albumin (BSA), um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Die erhaltenen Zellbilder zeigen eine deutliche Kolokalisation der 5.8rRNA mit dem Fluoreszenzsignal markierter RNA (Abbildung 39).

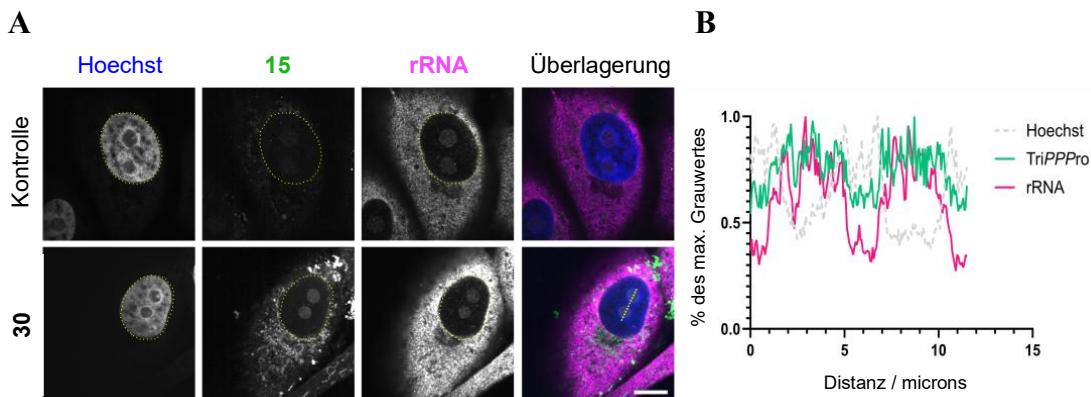


Abbildung 39: Bioorthogonale Markierung neu synthetisierter RNA und Kolokalisation ribosomaler RNA (rRNA). A) Vero-Zellen wurden mit VP-SFM gewaschen und anschließend mit 5 µM TriPPPro **30** für 3 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit VP-SFM gewaschen und mit 5 µM Fluorophor **15** (grün) und Hoechst (blau) für 1 h inkubiert. Nachdem die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden, wurde die RNA mittels Immunfluoreszenz markiert (pink) und die Zellen mikroskopiert. Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (80 % Intensität, 600 ms Expositionszeit). Die Detektion erfolgte zwischen $\lambda_{em} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von Hoechst erfolgte mit einem 405 nm Laser (50 % Intensität, 200 ms Expositionszeit). Die Anregung des Alexa-Fluor 647 erfolgte mit einem 638 nm Laser (75 % Intensität, 200 ms Expositionszeit). Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht umrandet (gelbe gestrichelte Linie). Maßstab: 10 µm. B) Das Liniendiagramm zeigt die Kolokalisation von neu synthetisierter markierter RNA (TriPPPro, grün) mit rRNA (pink) in den Nukleoli innerhalb des Zellkerns. Abbildung zur Verfügung gestellt von D. Stalling (CSSB Hamburg).

Dies spricht dafür, dass es sich bei den beobachteten fluoreszenten Foci um Nukleoli handelt und ein Einbau der TriPPPro-Reporter in RNA stattgefunden hat. Die beobachtete fluoreszente Markierung der Nukleoli stimmt darüber hinaus mit den Ergebnissen von *Salic et al.* zur metabolischen Markierung von RNA mit 5-Ethynyluridin (EU) überein, bei der ebenfalls eine Anreicherung des Signals in den Nukleoli nachgewiesen werden konnte.⁶⁸

4.3 NTP für die Bioorthogonale Markierung von RNA in Zellen

In Abschnitt 4.2 konnte gezeigt werden, dass die nach intrazellulärer Demaskierung der TriPPPro **28 – 31** freigesetzten 2TCO_a- und BCN-modifizierten NTP von der RNA-Polymerase als Substrat erkannt und effizient in neu synthetisierte RNA eingebaut werden. Im nächsten Schritt wurde die Effizienz des SNT-Transporters **SNTT1** zur metabolischen Markierung von RNA in Zellen untersucht. Da in den Zellexperimenten mit den TriPPPro **28 – 31** kein signifikanter Unterschied bezüglich der Einbaueffizienz beobachtet werden konnte, wurden die SNT-Transporter-Experimente ausschließlich mit dem BCN-modifizierten NTP **43** durchgeführt. Um den intrazellulären Transport sowie den Einbau von NTP **43** in die RNA unabhängig von der bioorthogonalen „Click“-Reaktion in der Zelle verfolgen zu können, wurde zunächst die

metabolische Markierung mit dem fluoreszenten NTP **52** untersucht. Dieses wurde durch IEDDA Reaktion zwischen NTP **43** und Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** erhalten. Für die „Click“-Reaktion wurden die Reaktionspartner in einem Verhältnis von 1:1 in Wasser mit 1 % DMSO zur Reaktion gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 10 h wurde das Lösungsmittel entfernt und das „Click“-Produkt **52** für die nachfolgenden Zellexperimente in der gewünschten Konzentration in Tricin-Puffer gelöst.

Der intrazelluläre Transport von NTP **52** erfolgte nach einem Protokoll von Kraus *et al.*¹⁴⁵ Hierfür wurden Vero-Zellen für 10 min mit NTP **52** (60 µM) und **SNTT1** (60 µM) in Tricin-Puffer behandelt. Nach dem Entfernen der **SNTT1**/NTP-Lösung wurden die Zellen in DMEM für definierte Zeitspannen (10 min und 4 h) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Vero-Zellen mit **SNTT1** in Abwesenheit des NTPs oder mit NTP ohne Zugabe von **SNTT1** inkubiert (Abbildung 60 und 61 im Anhang). Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit DRAQ5 (10 µM in DMEM), woraufhin die Zellen lebend mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert wurden. Die erhaltenen Aufnahmen zeigen eine deutlich nachweisbare intrazelluläre Fluoreszenz, wobei die Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen Zellen variiert (Abbildung 40).

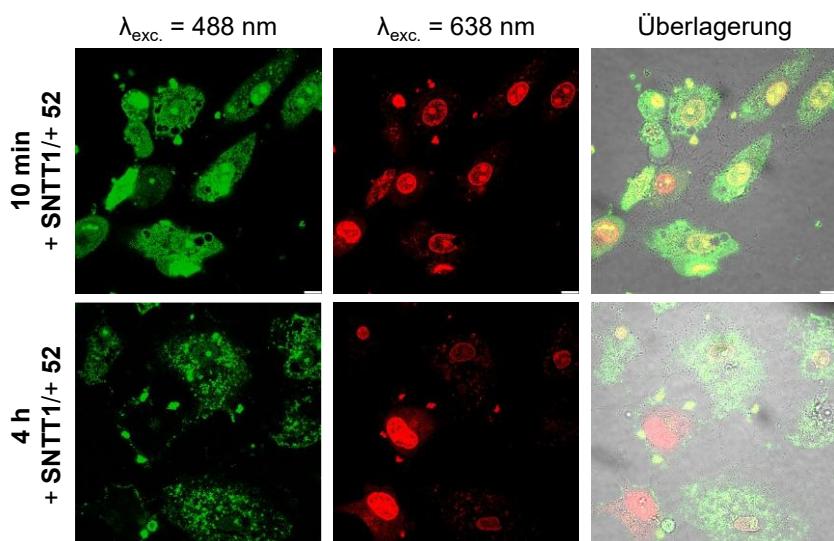


Abbildung 40: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit NTP **52** und **SNTT1** (60 µM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min bzw. 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lebend mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegengefärbt (rot). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700$ nm. Maßstab: 10 µm.

Die erhaltenen Zellbilder weisen auf einen effizienten intrazellulären Transport des fluoreszenten NTPs **52** unter Verwendung des SNT-Transporters hin. Nach einer Inkubationszeit von 10 min ist die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einer 4 h-Inkubation signifikant höher. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die intrazelluläre Anreicherung von NTP **52** im Verlauf mehrerer Stunden nach dem Entfernen der **SNTT1**/NTP-Lösung abnimmt. Kraus *et al.* konnten in SNT-Transporter Experimenten mit einem Alexa-488-dUTP-Konjugat ebenfalls eine zeitabhängige Abnahme der intrazellulären Fluoreszenz, unter anderem durch spontanen Efflux des NTPs, feststellen.¹⁴⁵

Unabhängig von der Inkubationszeit zeigen die erhaltenen Zellbilder eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der Nukleoli sowie im Zellkern und Zytoplasma der Zelle. Da aufgrund der Eigenfluoreszenz von NTP **52** keine Unterscheidung zwischen inkorporiertem und freiem NTP möglich ist, wurden die Zellen im Anschluss mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mit DPBS-Puffer gewaschen, um nicht eingebautes NTP **52** aus den Zellen zu entfernen (Abbildung 41). Als Negativkontrolle wurden Vero-Zellen mit **SNTT1** in Abwesenheit des NTPs oder mit NTP ohne Zugabe von **SNTT1** inkubiert (Abbildung 62 und 63 im Anhang).

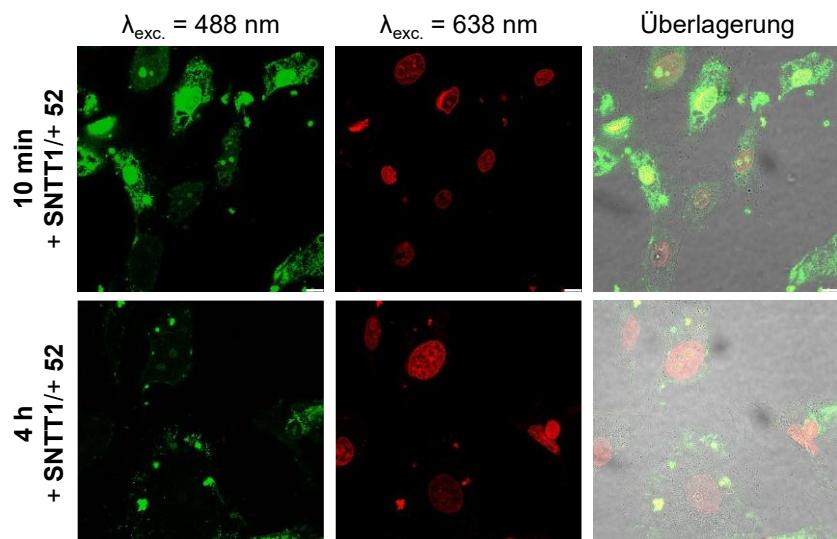


Abbildung 41: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit NTP **52** und **SNTT1** (60 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min bzw. 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegengefärbt (rot). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700$ nm. Maßstab: 10 μ m.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach der Fixierung zeigen für eine Inkubationszeit von 4 h eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma. Die verbleibende zytoplasmatische Fluoreszenz ist vermutlich auf Aggregate des nicht eingebauten NTPs **52** zurückzuführen. Darüber hinaus ist das zuvor beobachtete Fluoreszenzsignal in den Nukleoli nach dem Fixierungs- und Waschschritt in abgeschwächter Intensität weiterhin zu erkennen. Dies deutet auf einen erfolgreichen Einbau des BCN-modifizierten NTPs **52** in die neu synthetisierte RNA hin. Auch bei kürzeren Inkubationszeiten von 10 min ist eine Abnahme der zytoplasmatischen Fluoreszenz sowie ein signifikantes Fluoreszenzsignal in den Nukleoli zu beobachten. In einigen Zellen ist die Fluoreszenz im Zytoplasma und Nukleus jedoch weiterhin so stark, dass darauf geschlossen werden kann, dass trotz der Waschschritte freies NTP **52** nicht vollständig aus den Zellen entfernt werden konnte. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen eingebautem und freiem NTP ist unter diesen Bedingungen daher nicht möglich.

Aus diesem Grund wurden weitere Zellexperimente mit verringelter Konzentration des fluoreszenten NTPs **52** durchgeführt. Anstelle von 60 µM wurden 35 µM NTP **52** verwendet. Nachdem die *Treatment*-Lösung entfernt wurde, wurden die Zellen analog zum vorherigen Zellexperiment für 10 min bzw. 4 h in DMEM inkubiert. Basierend auf den zuvor beschriebenen Zellexperimenten wurden die Zellen anschließend fixiert, permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen, um nicht inkorporiertes NTP **52** zu entfernen. Die erhaltenen Zellbilder zeigen bei einer Inkubationszeit von 10 min nach dem Entfernen der *Treatment*-Lösung ein deutliches Fluoreszenzsignal im Bereich der Nukleoli (Abbildung 42). Werden die Zellen als Negativkontrolle mit SNT-Transporter in Abwesenheit des Nukleotids (Abbildung 42 A) oder mit dem Nukleotid ohne Zugabe des SNT-Transporters (Abbildung 42 B) inkubiert, lässt sich kein Fluoreszenzsignal detektieren.

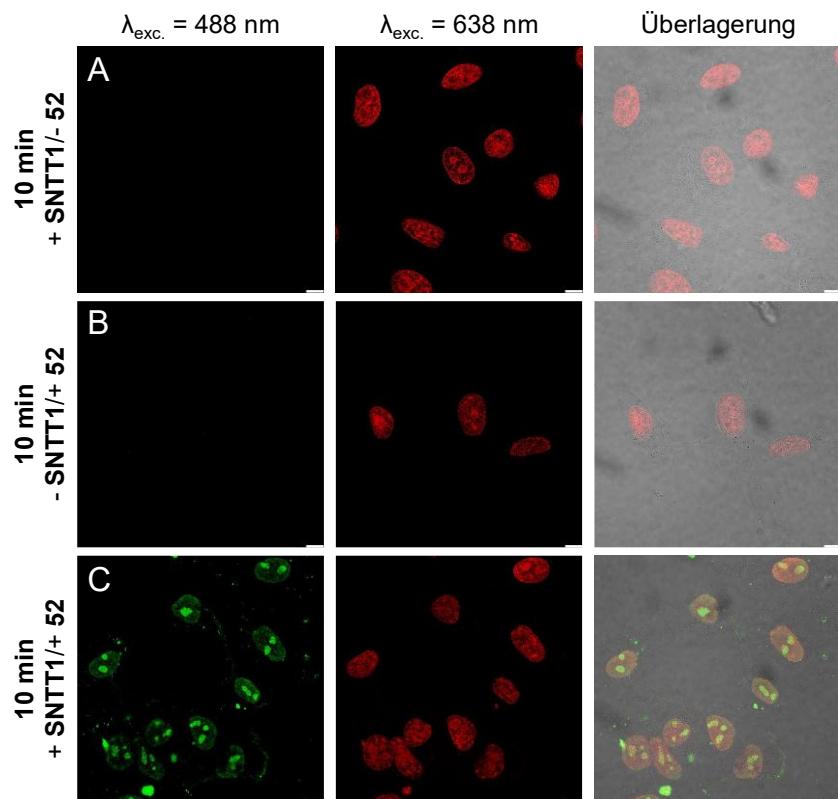


Abbildung 42: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit 35 μ M SNTT1 in Tricin Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. B) Vero-Zellen wurden mit 35 μ M NTP 52 in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP 52 und SNTT1 (35 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (inklusive Negativkontrollen) mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Leica DMI8, TCS SP8 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv ausgestattet ist, mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegengefärbt (rot). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700$ nm. Maßstab: 10 μ m.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine erfolgreiche metabolische Inkorporation von NTP 52 in die neu synthetisierte RNA hin. Im Vergleich zur Inkubation mit 60 μ M NTP 52, lässt sich für eine Konzentration von 35 μ M zudem eine deutlich verringerte Hintergrundfluoreszenz beobachten. Auch nach einer Inkubationszeit von 4 h ist ein Fluoreszenzsignal im Bereich der Nukleoli detektierbar (Abbildung 64 im Anhang). Ein Vergleich der unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigt jedoch eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz sowie eine geringere Fluoreszenz im Bereich der Nukleoli für eine Inkubationszeit von 4 h. Diese Beobachtungen weisen auf eine verminderte Markierungseffizienz mit zunehmender Inkubationszeit hin. Dies

könnte auf einen bereits erfolgten Abbau der fluoreszenzmarkierten RNA in einzelne Nukleosidbausteine im Verlauf der Zeit zurückzuführen sein.

Im nächsten Schritt wurde die Effizienz der SNT-Transporter vermittelten metabolischen Markierung von RNA mit NTP **52** durch Extraktion der markierten RNA und anschließender fluoreszenzspektroskopischer Analyse weiter untersucht. Die Isolation und Aufreinigung der zellulären RNA erfolgte entsprechend der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die erhaltenen Fluoreszenzspektren von mit NTP **52** markierter RNA zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle ein deutliches Fluoreszenzsignal für Inkubationszeiten von 30 min und 4 h (Abbildung 43).

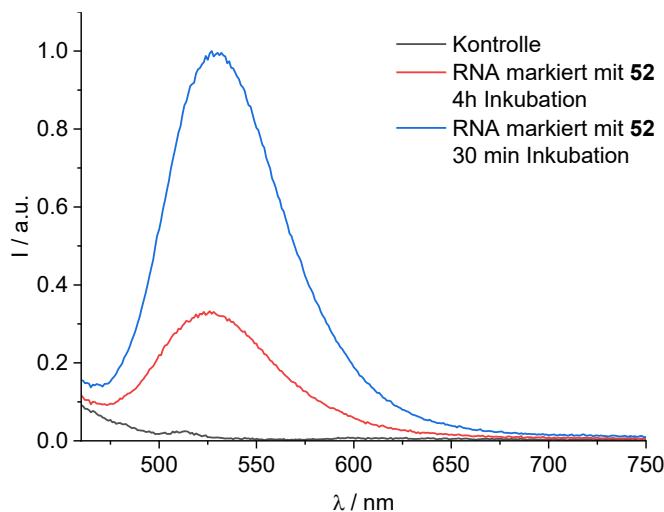


Abbildung 43: Fluoreszenzspektren von isolierter zellulärer RNA, die mit NTP **52** für 30 min (blau) oder 4 h (rot) inkubiert wurde, im Vergleich zu unmarkierter Kontroll-RNA $\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 452 - 800 \text{ nm}$, Slits: 5 nm, 20 °C.

Der Vergleich der Inkubationszeiten zeigt einen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzintensität, was die zuvor getroffene Annahme bestätigt, dass die Markierungseffizienz der SNTT1-vermittelten metabolischen Markierung von RNA von der Inkubationszeit abhängt. Im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 4 h führt eine kürzere Inkubationszeit von 30 min zu einer effizienteren Markierung der zellulären RNA. Zusammenfassend können durch die RNA-Isolationsexperimente die Beobachtungen der Zellexperimente bestätigt werden, dass NTP **52** erfolgreich unter Verwendung des SNT-Transporters in Zellen transportiert und anschließend in neu gebildete RNA inkorporiert wird.

Basierend auf den Ergebnissen der Zellexperimente mit dem fluoreszenten NTP **52** wurde anschließend das BCN-modifizierte NTP **43** im Rahmen der **SNTT1**-vermittelten bioorthogonalen Markierung von RNA untersucht. Hierzu wurden Vero-Zellen entsprechend dem vorherigen Protokoll, für 10 min mit einer äquimolaren Menge NTP **43** und **SNTT1** in Tricin Puffer und anschließend für 10 min bzw. 4 h in DMEM inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Vero-Zellen mit **SNTT1** in Abwesenheit des NTPs oder mit NTP **43** ohne Zugabe von **SNTT1** inkubiert (Abbildung 65 und 66 im Anhang). Im Anschluss wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert, um freies NTP wegzuwaschen. Für die nachfolgende IEDDA-Reaktion wurden die Zellen mit dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15** (5 µM in DMEM) über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Zellbilder sind in Abbildung 44 dargestellt.

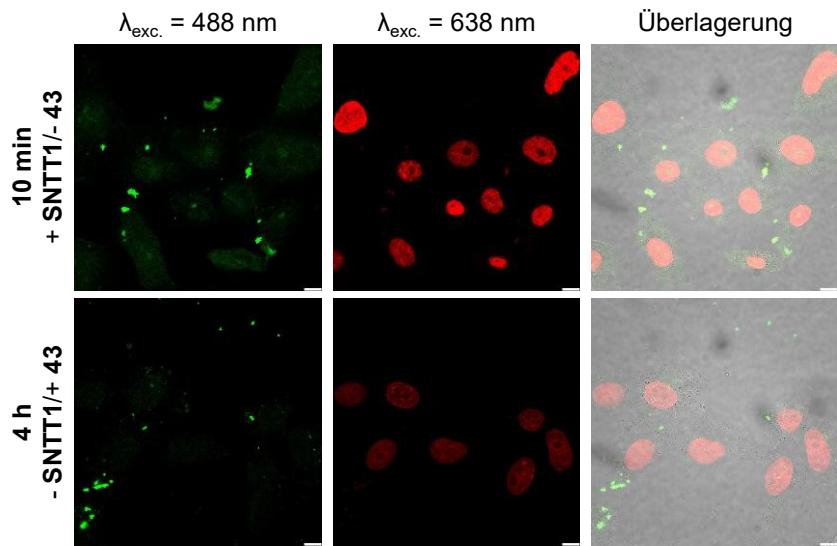


Abbildung 44: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit NTP **43** und SNTT1 ($60 \mu\text{M}$) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min bzw. 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit $5 \mu\text{M}$ des Tetrazin-Fluorophor Konjugats **15** über Nacht in DMEM inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit DRAQ5 gegenfärbt (rot) und die Zellen mit einem Leica DMI8, TCS SP8 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv ausgestattet ist, mikroskopiert. Die Zellkerne Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700 \text{ nm}$. Maßstab: 10 μm .

Für eine Inkubationszeit von 4 h nach dem Entfernen der **SNTT1/NTP**-Lösung ist keinerlei Fluoreszenz im Bereich der Nukleoli detektierbar, was auf eine nicht erfolgreiche bioorthogonale Markierung von RNA mit NTP **43** in Zellen hindeutet. Eine Fluoreszenzmarkierung konnte lediglich mit isolierter RNA beobachtet werden, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben wurde. Dies lässt darauf schließen, dass der Anteil an chemischem Reporter, der in die RNA inkorporiert wurde und für die intrazelluläre IEDDA Reaktion mit Fluorophor **15** zugänglich ist, limitiert ist. Im Gegensatz dazu lässt sich für eine Inkubationszeit von 10 min eine schwache Fluoreszenz im Bereich der Nukleoli detektieren, was auf einen Einbau des NTPs **43** in die zelluläre RNA und eine erfolgreiche IEDDA-Reaktion mit Fluorophor **15** *in cellulo* schließen lässt. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inkubationszeit im Falle der **SNTT1**-vermittelten bioorthogonalen Markierung von RNA einen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der Markierung hat. Die Inkorporation von NTP **43** in die zelluläre RNA könnte zusätzlich durch Isolation markierter RNA und anschließender fluoreszenzspektroskopischer Untersuchung bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Dieses Kapitel befasste sich mit der Anwendung des TriPPPPro-Konzepts zur effizienten Bereitstellung hochreaktiver, aber sterisch gehinderter Nukleotid-Reporter für die bioorthogonale Markierung von RNA in lebenden Zellen. Durch die Maskierung von BCN- und 2TCO α -modifizierten NTP mit biolabilen Acyloxybenzyl-Gruppen (AB-Gruppen) konnte deren Lipophilie deutlich gesteigert und somit eine intrazelluläre Aufnahme ohne den Einsatz eines synthetischen Transporters erreicht werden. Zunächst wurde in Kooperation mit *J. Iven H. Knaack* aus der Arbeitsgruppe von *Chris Meier* das BCN-modifizierte TriPPPPro **28** nach der *H*-Phosphonat-Methode synthetisiert. Hierfür wurde das entsprechende NMP ausgehend von kommerziell erhältlichem 5-Ioduridin synthetisiert und anschließend mit dem zuvor synthetisierten bis[C9AB]-Pyrophosphat **41** umgesetzt. Das finale TriPPPPro **28** konnte in einer Ausbeute von 32 % isoliert werden. Um einen Vergleich zwischen den chemischen Reportern BCN und 2TCO α zu ermöglichen, sowie Einflüsse der Nukleobase auf die Inkorporationseffizienz zu untersuchen, wurden die BCN- und 2TCO α -modifizierten TriPPPPro **29** bis **31** von *J. Iven H. Knaack* zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus wurden die entsprechenden BCN- und 2TCO α -modifizierten NTP **43 – 45** in drei Schritten ausgehend von 5-Ioduridin bzw. 5-Iodcytidin synthetisiert. Dies ermöglichte in den nachfolgenden Zellexperimenten einen direkten Vergleich des TriPPPPro-Konzepts mit der SNTT1-vermittelten metabolischen Markierung von RNA. Die synthetisierten NTP wurden im Anschluss auf deren Eignung in der IEDDA-Reaktion mit dem fluorogenen Tetrazin-Konjugat **15** untersucht. Analog zu Kapitel IV wurde die IEDDA-Reaktion fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, um den *Turn on* sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Für die synthetisierten NTP konnten *Turn on*-Werte im Bereich von 31 – 45 erhalten werden. Beim Vergleich der chemischen Reporter 2TCO α und BCN konnte dabei kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. *Turn on* Werte im Bereich von 20 – 50 können, basierend auf der zuvor demonstrierten metabolischen Markierung von DNA in HeLa-Zellen, als ausreichend für eine effiziente metabolische Markierung von Nukleinsäuren unter waschfreien Bedingungen angesehen werden.¹²⁰ Auf der Grundlage vorangegangener Studien kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass nach metabolischer Inkorporation in die RNA aufgrund der Zwei-Faktor-Fluorogenität des verwendeten Fluorophors **15** signifikant höhere *Turn on*-Werte sowie Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erzielt werden. Beide Reporter eignen sich demnach für die Visualisierung von modifizierter RNA in lebenden Zellen. Für die 2TCO α -modifizierten NTP **42** und **44** wurden im Vergleich zu den BCN-modifizierten NTP **43** und **45** leicht größere Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erhalten, was auf die höhere Ringspannung und somit

gesteigerte Reaktivität von TCO zurückzuführen ist. Die erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten liegen in dem für IEDDA-Reaktionen charakteristischen Bereich und eignen sich demnach für eine zelluläre Anwendung.³⁴

In Zellexperimenten mit Vero-Zellen wurde anschließend die Effizienz der metabolischen Markierung mit den synthetisierten TriPPPPro untersucht. Nach Inkubation mit den TriPPPPro **42 – 45** und anschließender Click-Reaktion mit Fluorophor **15** konnte eine deutliche Fluoreszenz in intranuklearen Foci in lebenden Zellen detektiert werden. Durch Transkriptionshemmung mit Actinomycin D sowie Kolokalisation mit 5.8S RNA wurde die metabolische Markierung neu synthetisierter RNA bestätigt. Durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in den Nukleoli konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass zwischen den einzelnen TriPPPPro kein signifikanter Unterschied der Einbaueffizienz besteht. Zusätzlich wurde nach Isolation der markierten RNA und anschließender IEDDA-Reaktion *in vitro* der Einbau der modifizierten NTP fluoreszenzspektroskopisch bestätigt. Im Gegensatz dazu konnte mit dem SNT-Transporter nach Inkubation mit dem entsprechenden BCN-modifizierten NTP **52** keine metabolische Markierung von RNA in Zellen erreicht werden. Da jedoch nach RNA-Isolation und anschließender IEDDA-Reaktion *in vitro* ein Fluoreszenzsignal detektiert wurde, kann angenommen werden, dass der für die IEDDA-Reaktion zugängliche Anteil des eingebauten BCN-Reporters *in cellulo* limitiert ist.

In Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Markierung neu synthetisierter zellulärer RNA in Echtzeit unter waschfreien Bedingungen mit einer minimalen Hintergrundfluoreszenz durch Kombination der TriPPPPro-Strategie mit dem fluorogenen Tetrazin-Farbstoff-Konjugat **15** realisierbar ist. Durch diesen Ansatz ist es möglich, die zuvor beschriebenen Limitierungen der konventionellen Markierungsstrategien von zellulärer RNA zu umgehen. Zudem ermöglicht der modulare Aufbau der TriPPPPro zukünftig eine einfache Ausweitung der Strategie auf die Purine Adenosin und Guanosin sowie weitere chemische Reportergruppen. Somit bietet die in dieser Arbeit präsentierte Strategie ein vielversprechendes, chemisch modulares Werkzeug für die Echtzeit-Visualisierung von RNA in unterschiedlichen Zellmodellen sowie viralen Systemen.

VII. Anorganisch organische Hybridnanopartikel für die metabolische Markierung von RNA

Nanopartikel werden laut International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definiert als Partikel von beliebiger Form mit einer Mindestgröße von 1 bis 100 nm.²⁰⁶ Sie bilden die Grundlage vieler neuer Konzepte und Materialien zur gezielten und selektiven Verabreichung therapeutischer Wirkstoffe, beispielsweise im Rahmen einer Krebstherapie.^{207, 208} Neben Nanomaterialien, die auf organischen, anorganischen, lipid-, und protein- sowie glykanbasierten Verbindungen beruhen, stehen auch Nanopartikel auf Basis synthetischer Polymere im Fokus der Forschung.^{209, 210} Ein wichtiger Aspekt für die klinische Anwendung ist die Wirkstoffbeladung, welche bei den zuvor genannten Trägermaterialien in der Regel äußerst gering ist (<10 Gew.-%). Um die erforderliche Wirkstoffdosis am Zielort zu erreichen ohne große Mengen an Trägermaterial zu verwenden, wurde das Konzept der anorganisch-organischen Hybridnanopartikel (IOH-NP) entwickelt.²¹¹⁻²¹³ Hierbei handelt es sich um Nanopartikel, die aus einem anorganischen Kation und einem organischen Anion zusammengesetzt sind.²¹¹ Ein wesentlicher Vorteil dieser Nanomaterialien ist unter anderem die hohe Wirkstoffbeladung von 70 – 90 Gew.-%. Dieses Konzept wurde bereits effizient als Wirkstofftransportsystem für das Nukleosidanalogon Gemcitabin-Monophosphat (GMP) in Pankreaskarzinom-Zelllinien (PDAC-Zelllinie, engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*) sowie Mäusen als Zytostatika eingesetzt.²¹¹ Die GMP-IOH-NP zeigten hierbei eine höhere antitumorale Wirksamkeit im Vergleich zu freiem nicht phosphoryliertem Gemcitabin (GEM) und konnten somit die Nachteile der GEM-basierten PDAC-Therapie überwinden.²¹¹

Ziel dieses Projekts ist das Konzept der anorganisch-organischen Hybridnanopartikel als Wirkstofftransporter auf modifizierte Nukleosidtriphosphate für die bioorthogonale Markierung von RNA zu übertragen. Durch den Einsatz von IOH-NP als Transportsystem soll eine effiziente zelluläre Aufnahme modifizierter NTP erzielt und so die metabolische Inkorporation bioorthogonaler Gruppen in Nukleinsäuren unabhängig von endogenen Kinasen ermöglicht werden. Zu diesem Zweck wurden IOH-NP aus einem anorganischen Kation und den BCN-modifizierten NTP **43** und **45** synthetisiert. Die Synthese sowie Charakterisierung der Nanopartikel wurde von *Kai-Ching Fan* (AOC, KIT) aus der Gruppe von *Claus Feldmann* durchgeführt. Um anschließend die intrazelluläre Aufnahme der IOH-NP untersuchen zu können, wurden zusätzlich Nanopartikel synthetisiert, die mit einem Fluorophor markiert sind.

1 Synthese und Charakterisierung der IOH-NP

Insbesondere für die Verwendung der Nanopartikel in zellbasierten Assays wurden die IOH-NP so konzipiert, dass sie schwer- bzw. unlöslich in Wasser und in wässriger Suspension bei einem pH-Wert von 7.0 bis 7.5 stabil sind. Die Wasserunlöslichkeit wird hierbei maßgeblich durch die Wahl des anorganischen Kations bestimmt. Die Verwendung von Zirkoniumphosphat-basierten Hybridnanopartikeln mit Zirconyl $[ZrO]^{2+}$ als anorganischem Kation und einem organischen Phosphat-Anion $[ROPO_3]^{2-}$ hat sich in diesem Zusammenhang als besonders geeignet herausgestellt.^{211, 213} Als Organophosphat-Anion wurden die BCN-modifizierten NTP **43** und **45** verwendet, deren Synthese in Kapitel VI Abschnitt 2 beschrieben wurde. Für die Synthese der $[ZrO]_2[NTP]$ Nanopartikel wurde zunächst das entsprechende NTP in Wasser gelöst. Im Anschluss erfolgte die Zugabe einer wässrigen Zirconylchlorid-Lösung (Abbildung 45). Die erhaltene Suspension wurde für 2 min kräftig gerührt, um die Partikelkeimbildung sowie das Partikelwachstum zu steuern. Nach mehrmaliger Aufreinigung durch Zentrifugation und Resuspendierung in Wasser wurden die Nanopartikel $[ZrO]_2[NTP43]$ und $[ZrO]_2[NTP45]$ erhalten.

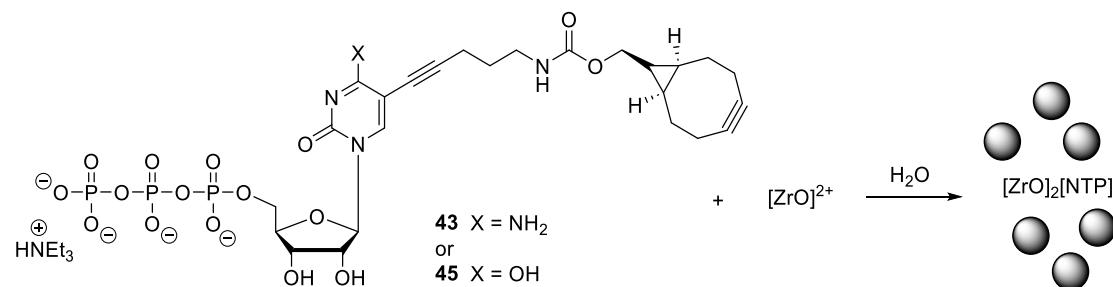


Abbildung 45: Synthese der $[ZrO]_2[NTP43]$ und $[ZrO]_2[NTP45]$ IOH-NPs aus Zirconyl $[ZrO]^{2+}$ als anorganisches Kation und den BCN-modifizierten NTPs **43** und **45** als organisches Phosphat-Anion.

Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte im Anschluss mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS, engl. *dynamic light scattering*) und Rasterelektronenmikroskopie (SEM, engl. *scanning electron microscopy*), um deren Partikelgröße und Größenverteilung zu bestimmen. Zusätzlich wurde das Zeta-Potenzial der Nanopartikel bestimmt, um deren kolloidale Stabilität zu bewerten. Die DLS der wässrigen Nanopartikel-Suspension ergab einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 66 ± 25 nm für $[ZrO]_2[NTP45]$ (Abbildung 46). Im Vergleich dazu wurde mittels SEM ein mittlerer Partikeldurchmesser von 30 ± 7 nm bestimmt. Das Auftreten von

Agglomeraten in den SEM-Aufnahmen kann auf den Trocknungsprozess der wässrigen Nanopartikel-Suspension im Zuge der Probenvorbereitung zurückzuführen sein (Abbildung 46 B). Die Abweichung der Partikelgröße zwischen den beiden Messmethoden ist darauf zurückzuführen, dass die DLS den hydrodynamischen Durchmesser der Partikel erfasst. Dieser umfasst neben dem eigentlichen Kernpartikel auch die umgebende Solvathülle (hier: adsorbierte Wassermoleküle).

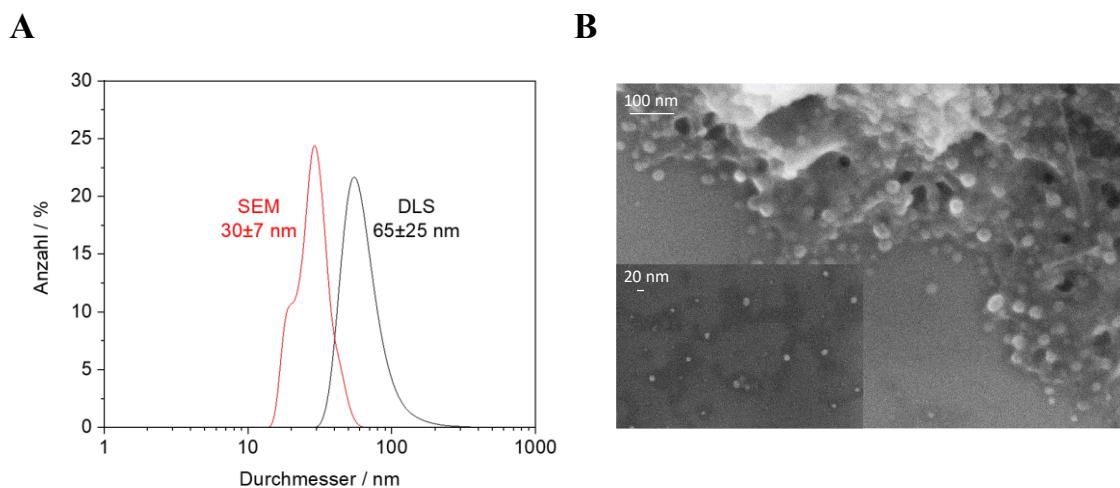


Abbildung 46: Charakterisierung der $[ZrO]_2[NTP45]$ IOH-NP. A) Partikelgrößenverteilung , bestimmt mittels DLS und SEM. B) SEM-Bilder der $[ZrO]_2[NTP45]$ IOH-NP bei einer Vergrößerung von 100 nm sowie 20 nm. Abbildungen zur Verfügung gestellt von Kai-Ching Fan.

Für die IOH-NP $[ZrO]_2[NTP43]$ wurde mittels DLS ein bimodaler Größenverteilungsbereich ermittelt (Abbildung 67 im Anhang), mit einem mittleren hydrodynamischen Radius von 34 ± 6 nm (50 %) bzw. 69 ± 30 nm (50 %). Nanopartikel mit vergleichbaren hydrodynamischen Radien^{211, 212} konnten bereits erfolgreich als zelluläre Wirkstofftransporter für biomedizinische Anwendungen eingesetzt werden.

Für Anwendungen in biologischen Systemen ist neben der Partikelgröße die kolloidale Stabilität der IOH-NP bei einem physiologischen pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Kolloidale Stabilität beschreibt die Eigenschaft von Nanopartikel in Suspension gleichmäßig verteilt vorzuliegen, ohne dass es zu Flockungs-, Agglomerations- und Aggregationsvorgängen kommt. Eine solche Stabilisierung erfolgt unter anderem durch elektrostatische Abstoßung gleichartig geladener Teilchen. Zur Beurteilung der Stabilität der synthetisierten IOH-NP kann das Zeta-Potenzial genutzt werden. Dieses liefert Rückschlüsse auf die Oberflächenladung der

Nanopartikel und damit auf die Stabilität der Dispersion. Die IOH-NP weisen bei einem pH-Wert von 7 eine negative Oberflächenladung mit einem Zeta-Potenzial größer -30 mV auf. Ein absolutes Zeta-Potenzial von $>|30|$ mV gilt als Indikator für eine hohe elektrostatische Stabilisierung und somit für eine kolloidale Stabilität der Suspension.

Im nächsten Schritt wurden die erhaltenen IOH-NP mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR Spektroskopie) auf das Vorhandensein der BCN-modifizierten NTP **43** und **45** untersucht. Hierzu wurden zunächst FT-IR-Spektren der NTP **43** und **45** aufgenommen, um charakteristische Schwingungen zu identifizieren. Anschließend wurden die FT-IR-Spektren der Nanopartikel mit diesen Referenzspektren verglichen, um die Signale der NTP innerhalb der IOH-NP nachweisen zu können. Die FT-IR-Spektren der BCN-modifizierten NTP **43** und **45** weisen bei einer Wellenzahl von $1800 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ eine charakteristische Schwingung der Carbonylgruppen auf (Abbildung 47).

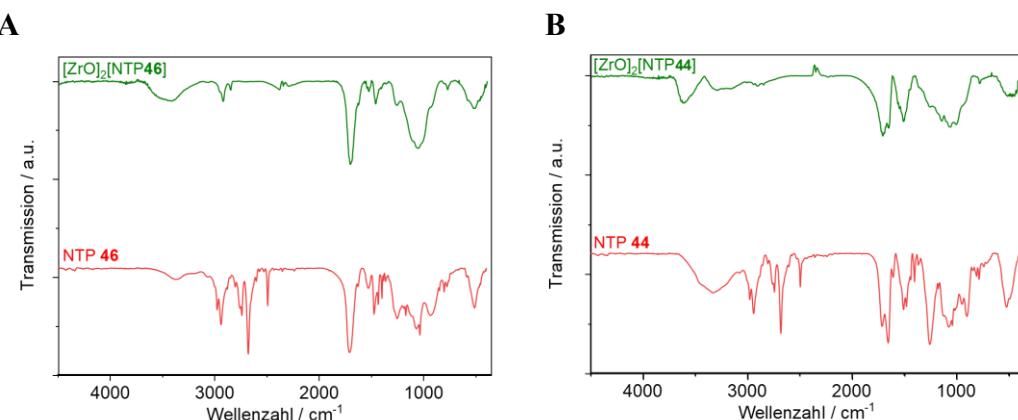


Abbildung 47: A) FT-IR-Spektrum der Nanopartikel $[\text{ZrO}]_2[\text{NTP}45]$ (grün) sowie das Referenzspektrum des BCN-modifizierten NTPs **45** (rot) B) FT-IR-Spektrum der Nanopartikel $[\text{ZrO}]_2[\text{NTP}43]$ (grün) sowie das Referenzspektrum des BCN-modifizierten NTPs **43** (rot). Abbildungen zur Verfügung gestellt von Kai-Ching Fan.

Zudem ist im Bereich zwischen 3200 cm^{-1} und 3600 cm^{-1} eine breite Absorptionsbande erkennbar, die der O-H und N-H Strettschwingungen zugeordnet werden kann. Die Signalverbreiterung ist hierbei unter anderem auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen.²¹⁴ Im Spektrum von NTP **43** ist diese Absorptionsbande deutlich stärker ausgeprägt, was darauf zurückzuführen ist, dass Cytidin im Vergleich zu Uridin eine Aminogruppe an der C4-Position hat, die zwei zusätzliche N-H Strettschwingungen liefert. Eine breite OH-Schwingungsbande weist zudem auf das

Vorhandensein von an der Oberfläche der Nanopartikel adsorbiertem Wasser hin. Außerdem zeigen die modifizierten NTP **43** und **45** Phosphatbanden ($\nu(P=O)$, $\nu(P-OH)$) im Bereich von $1250 - 900 \text{ cm}^{-1}$, welche charakteristisch für die Triphosphat-Gruppe ist. Darüber hinaus sind in den Referenzspektren der IOH-NP bei Wellenzahlen von 2765 cm^{-1} , 2739 cm^{-1} , 2677 cm^{-1} und 2492 cm^{-1} die charakteristischen Banden des Triethylammonium-Gegenions zu finden.²¹⁴ Der Vergleich der Referenzspektren mit den Spektren der $[\text{ZrO}]_2[\text{NTP43}]$ und $[\text{ZrO}]_2[\text{NTP45}]$ IOH-NP zeigt das Vorhandensein aller zuvor beschriebenen charakteristischen Schwingungen der BCN-modifizierten NTP **43** und **45** in den Nanopartikeln. Der Vergleich der Referenzspektren der freien NTP mit den Spektren der Nanopartikel zeigt zudem das Fehlen der charakteristischen Absorptionsbanden des Triethylammonium-Gegenions, was die erfolgreiche Ausbildung der Nanopartikel bestätigt.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen IOH-NP $[\text{ZrO}]_2[\text{NTP43}]$ und $[\text{ZrO}]_2[\text{NTP45}]$ wurden Nanopartikel synthetisiert, die mit einem Fluorophor markiert wurden. Hierdurch ist in den nachfolgenden Zellexperimenten eine fluoreszenzbasierte Verfolgung der zellulären Aufnahme der IOH-NP möglich. Als Fluoreszenzmarker wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-647P1 modifiziertes Desoxyuridintriphosphat (DY-647P1-dUTP, **DUT647**) eingesetzt. Aufgrund der intensiven Emission des Farbstoffs müssen nur geringe Mengen von ca. 0.01 mol% des Farbstoff-Anions eingesetzt werden. Die Synthese der Nanopartikel erfolgte analog zur zuvor beschriebenen Synthese, mit dem Unterschied, dass vor der Injektion der Zirconylchlorid-Lösung **DUT647** zu der jeweiligen Lösung aus NTP **43** oder **45** in Wasser hinzugegeben wurde. Auf diese Weise wurden die fluoreszenzmarkierten Nanopartikel $[\text{ZrO}]^{2+}_2[(\text{NTP43})_{>0.99}(\text{DUT647})_{<0.01}]^4$ und $[\text{ZrO}]^{2+}_2[(\text{NTP45})_{>0.99}(\text{DUT647})_{<0.01}]^4$ in einer Konzentration von 1.4 mg/mL für NTP **43** und 1.0 mg/mL für NTP **45** erhalten. Als Indikator für die erfolgreiche Synthese der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel kann deren blaue Farbe herangezogen werden, die charakteristisch für den verwendeten Farbstoff ist. Die Integration von **DUT647** wurde zusätzlich über das Anregungs- und Emissionsspektrum der Nanopartikel nachgewiesen (Abbildung 48). Die erhaltenen Spektren der fluoreszenzmarkierten IOH-NP stimmen mit dem Spektrum von gelösten **DUT647** aus der Literatur überein, was die erfolgreiche Integration des Fluorophors in die Nanopartikel zusätzlich bestätigt.²¹¹

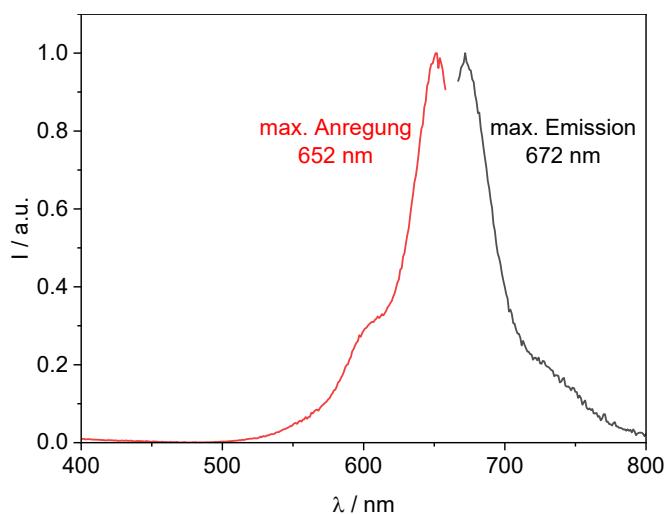


Abbildung 48: Anregungs- und Emissionsspektrum der **DUT647**-markierten $[ZrO]^{2+}_2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ -IOH-NP. Abbildungen zur Verfügung gestellt von Kai-Ching Fan.

Die Partikelgröße der IOH-NP $[ZrO]^{2+}_2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ und $[ZrO]^{2+}_2[(NTP45)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ wurde im Anschluss mittels DLS bestimmt. Im Vergleich zu den IOH-NP $[ZrO]_2[NTP43]$ und $[ZrO]_2[NTP45]$ weisen die fluoreszenzmarkierten IOH-NP einen deutlich größeren hydrodynamischen Radius von 139 ± 50 nm auf (Abbildung 49). Dagegen hat die **DUT647**-Markierung keinen Einfluss auf die kolloidale Stabilität der Nanopartikel. Sie weisen ein negative Oberflächenladung mit Zeta-Potenzialen zwischen -38 mV und -42 mV auf.

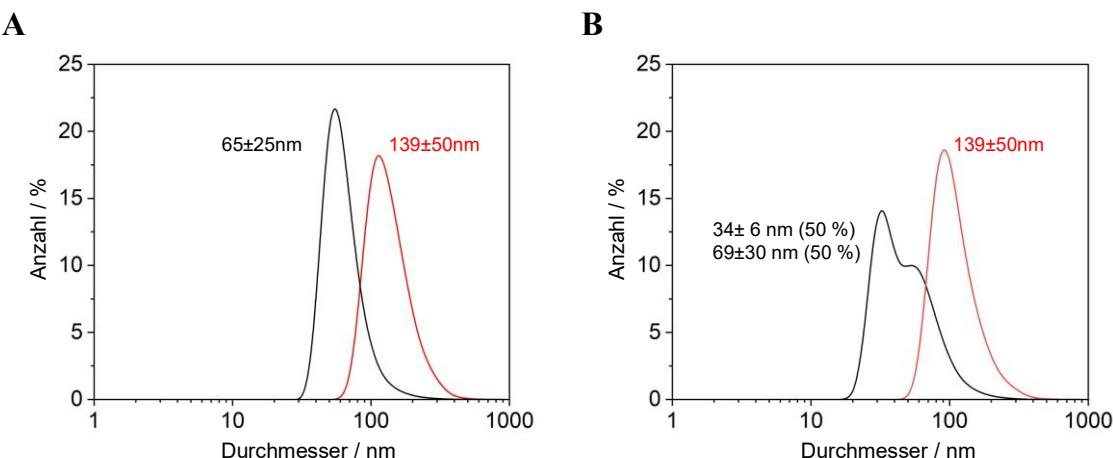


Abbildung 49: Partikelgröße und Partikelverteilung bestimmt durch DLS. A) IOH-NPs $[ZrO]_2[NTP45]$ (schwarz) und **DUT647**-markierte IOH-NPs $[ZrO]^{2+}_2[(NTP45)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ (rot). B) IOH-NPs $[ZrO]_2[NTP43]$ (schwarz) und **DUT647**-markierte IOH-NPs $[ZrO]^{2+}_2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ (rot). Abbildungen zur Verfügung gestellt von Kai-Ching Fan.

2 *In cellulo* Experimente

2.1 MTT-Test

Im Anschluss an die Synthese und Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten IOH-NP $[ZrO]^{2+}_2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^{4-}$ und $[ZrO]^{2+}_2[(NTP45)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^{4-}$ wurde deren potenzielle Zytotoxizität mittels Zellproliferationsassay (MTT-Test) untersucht. Der MTT-Test beruht auf der enzymatischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoniumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum violetten, wasserunlöslichen Formazan durch metabolisch aktive, lebende Zellen.²¹⁵ Die Absorption des gebildeten Formazans kann anschließend photometrisch im charakteristischen Detektionsbereich ($\lambda = 500 - 600$ nm) gemessen werden. Der Vergleich der Messwerte mit einer Negativkontrolle (Zellen, die nur mit dem MTT-Reagenz behandelt wurden) erlaubt die Bestimmung der Stoffwechselaktivität, die unter den definierten Versuchsbedingungen mit der Zellviabilität korreliert.

Für den MTT-Test wurden Vero-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.1 µg/mL) der jeweiligen IOH-NP für 72 h inkubiert. Hierbei wurden insbesondere die Konzentrationsbereiche betrachtet, die für die anschließenden Zellexperimente relevant sind (Konzentrationen ≤ 1 µg/mL). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit dem MTT-Reagenz behandelt. Um das gebildete Formazan in Lösung zu bringen, wurden die Zellen mit einer Lösung aus 10 % Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) in 0.01 M Salzsäure inkubiert. Die Zellviabilität wurde als Prozentwert relativ zur Negativkontrolle in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der IOH-NP dargestellt (Abbildung 50).

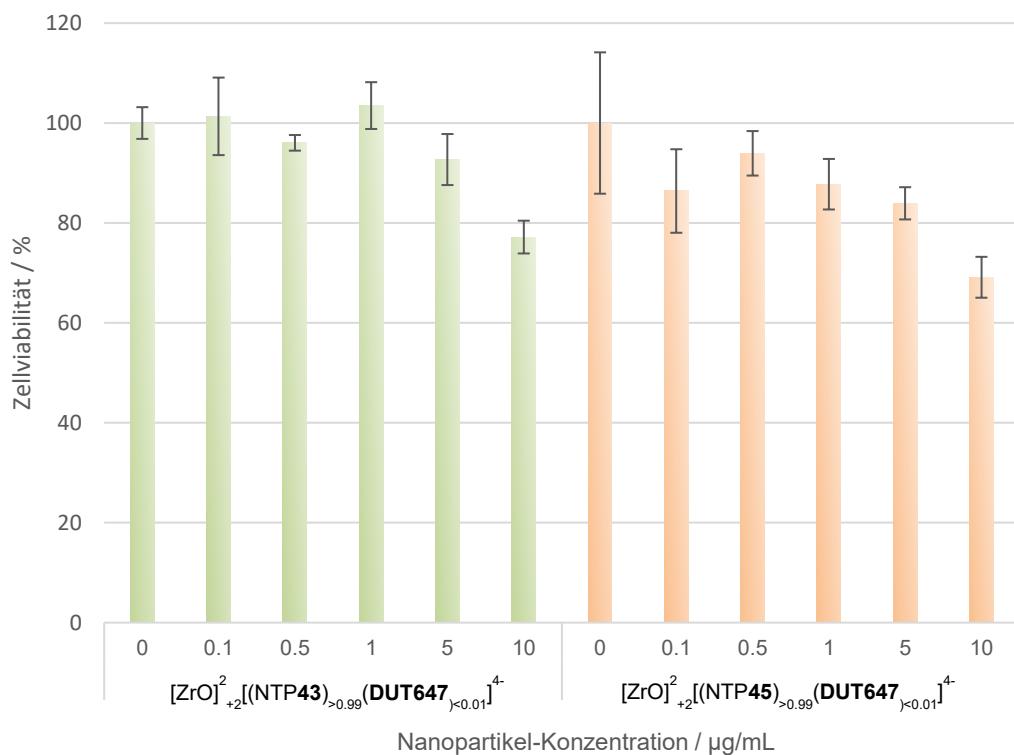


Abbildung 50: Zellviabilität von Vero-Zellen nach 72 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der **DUT647**-markierten IOH-NP $[ZrO]^{2+}2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4-$ und $[ZrO]^{2+}2[(NTP45)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4-$, bestimmt mittels MTT-Test. Die Viabilität wird in Prozent relativ zur unbehandelten Kontrolle (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dargestellt.

Die untersuchten **DUT647**-markierten IOH-NP $[ZrO]^{2+}2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4-$ und $[ZrO]^{2+}2[(NTP45)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4-$ zeigen keine signifikante Zytotoxizität im relevanten Konzentrationsbereich von $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$. Für höhere Konzentrationen von 5 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lässt sich eine geringe bis moderate konzentrationsabhängige Zytotoxizität im Vergleich zur Negativkontrolle (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) beobachten. Wobei auch für die höchste getestete Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ noch circa 69 % Zellviabilität für IOH-NP mit NTP 45 und 77 % Zellviabilität für IOH-NP mit NTP 43 erhalten bleibt. Im Allgemeinen zeigen die IOH-NPs mit NTP 45 als Anion für die untersuchten Konzentrationen eine leicht höhere Zytotoxizität im Vergleich zu Nanopartikeln mit NTP 43. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen des MTT-Tests schließen, dass beide **DUT647**-markierten IOH-NP unter den getesteten Bedingungen keine signifikante Zytotoxizität zeigen und daher zur metabolischen Markierung von RNA in Zellen eingesetzt werden können.

2.2 Untersuchung der Zellulären Aufnahme

Für eine potenzielle Anwendung der IOH-NP zur metabolischen Markierung von neu synthetisierter RNA in Zellen, ist eine effiziente intrazelluläre Aufnahme sowie die nachfolgende effiziente Freisetzung der modifizierten NTP von entscheidender Bedeutung. Daher wurde im nächsten Schritt die Aufnahme der **DUT647**-markierten IOH-NP $[ZrO]^{2+}_2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ in Vero-Zellen untersucht. Für den experimentellen Nachweis der zellulären Aufnahme wurden Vero-Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Nanopartikel-Konzentrationen (12.5 ng/mL, 0.1 µg/mL, 1 µg/mL) inkubiert. Da die fluoreszenzmarkierten IOH-NP im zuvor beschriebenen MTT-Test bei Konzentrationen von $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ keine signifikante Zytotoxizität zeigten, wurden für die Untersuchungen der zellulären Aufnahme ausschließlich Konzentrationen bis maximal 1 µg/mL eingesetzt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen mit DPBS-Puffer gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst gegenfärbt. Die Visualisierung der Zellen erfolgte anschließend über konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 51).

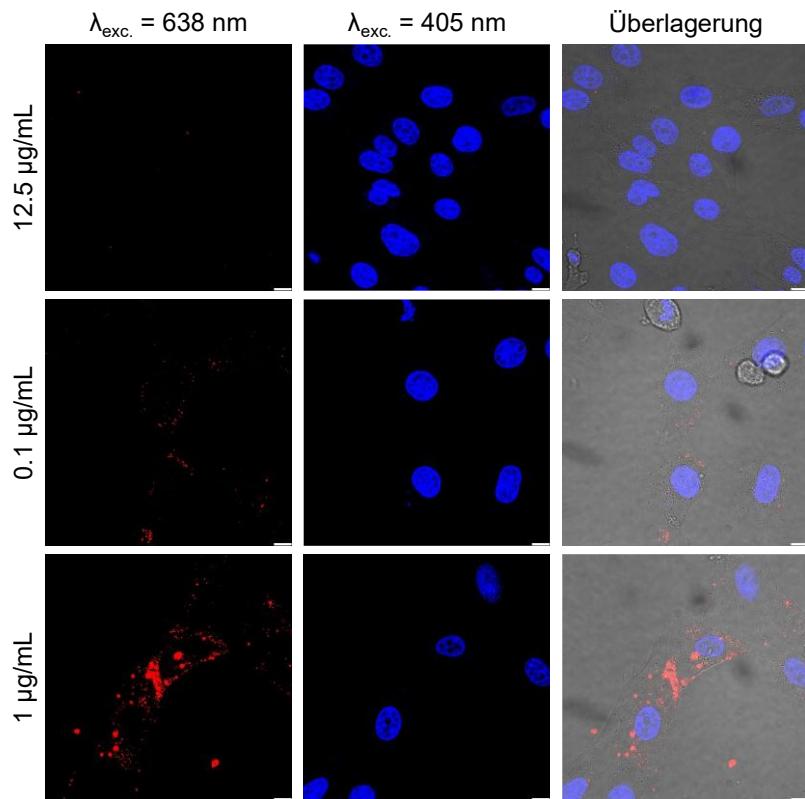


Abbildung 51: zelluläre Aufnahme der DUT647-markierten IOH-NP $[ZnO]^{2+}2[(NTP43)_{0.99}(DUT647)_{<0.01}]^4$ in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der IOH-NP (12.5 ng/mL, 0.1 µg/mL, 1 µg/mL) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lebend mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gegengefärbt (blau). Die Anregung von DUT647 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Anregung von Hoechst erfolgte mit einem 405 nm Laser (5 % Intensität). Maßstab: 10 µm.

Die erhaltenen Zellbilder zeigen eine konzentrationsabhängige zelluläre Aufnahme der IOH-NPs nach einer Inkubationszeit von 24 h. Während für eine Konzentration von 12.5 ng/mL keine signifikante intrazelluläre Fluoreszenz zu erkennen ist, ist für die höchste Nanopartikelkonzentration von 1 µg/mL ein deutliches Fluoreszenzsignal im Zytoplasma der Zelle detektierbar. Für eine Konzentration von 0.1 µg/mL lässt sich ebenfalls eine zytoplasmatische Fluoreszenz detektieren, die im Vergleich zu einer Konzentration von 1 µg/mL jedoch deutlich schwächer ist. In beiden Fällen handelt es sich um eine punktuelle Fluoreszenz im Zytoplasma. Es ist anzunehmen, dass die Internalisierung der IOH-NP über endozytische Mechanismen erfolgt. Ein derartiger Aufnahmemechanismus wurde bereits für viele nanopartikelbasierte-Transportsysteme beschrieben, bei denen die Nanopartikel nach der Internalisierung überwiegend in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert sind.^{211, 212, 216, 217} Erfolgt die zelluläre Aufnahme über Endozytose, fusionieren die endozytischen Vesikel innerhalb der Zelle und bilden frühe Endosomen, in denen die Sortierung der aufgenommenen

Cargo-Moleküle stattfindet. Hier wird entschieden, ob diese zur Plasmamebran zurück, über den retrograden Transport zum Golgi-Apparat weitergeleitet oder in Lysosomen potenziell abgebaut werden.^{218,219} Für die effiziente intrazelluläre Bereitstellung der modifizierten NTP ist sowohl die Dissoziation der Nanopartikel als auch die Freisetzung der NTP aus den Kompartimenten des endozytischen Transportweges entscheidend. Es konnte gezeigt werden, dass das Zeta-Potenzial und somit die kolloidale Stabilität der IOH-NP $[ZrO]_2[NTP45]$ mit sinkendem pH-Wert signifikant abnimmt (-36.6 ± 6 mV bei pH = 7 und -5.2 ± 6 mV bei pH = 3, Abbildung 68 im Anhang). Da es während der Reifung der Endosomen zu einer sukzessiven Abnahme des pH-Wert von etwa 7 auf ~ 4.5 im Lysosomen kommt²¹⁷, kann von einer geringeren Stabilität der Nanopartikel im Laufe des Transportweges ausgegangen werden, was die Dissoziation der IOH-NP begünstigt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die synthetisierten fluoreszenzmarkierten Nanopartikel trotz eines hydrodynamischen Radius[‘] von 139 ± 50 nm von Vero-Zellen nach 24 h Inkubation internalisiert werden und eine zytoplasmatische Lokalisierung aufweisen. Die intrazelluläre Aufnahme konnte bereits ab einer Konzentration von $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ nachgewiesen werden. Aufgrund der geringeren Partikelgröße der IOH-NP $[ZrO]_2[NTP43]$ und $[ZrO]_2[NTP45]$ im Vergleich zu den DUT647-markierten IOH-NP, kann von einer erhöhten Aufnahmeeffizienz ausgegangen werden. Die Aufnahmestudien zeigen, dass die synthetisierten IOH-NP als effiziente Transportsysteme für modifizierte NTP geeignet sind und somit für eine bioorthogonale Markierung von RNA in Zellen in Frage kommen.

3 Zusammenfassung

Um die Limitierung der intrazellulären Phosphorylierung durch endogene Kinasen zu umgehen und somit auch Nukleoside mit sterisch anspruchsvollen Modifikationen für die metabolische Markierung von RNA nutzbar zu machen, befasste sich dieses Kapitel mit der Anwendung anorganisch-organischer Hybridnanopartikel als Transportsystem für BCN-modifizierte NTP.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst IOH-NP aus Zirconyl $[ZrO]^{2+}$ als anorganischem Kation und den BCN-modifizierten NTP **43** bzw. **45** als organische Phosphat-Anionen $[ROPO_3]^{2-}$ synthetisiert. Die Synthese und anschließende Charakterisierung der IOH-NP wurde von *Kai Ching Fan* aus der Gruppe von *Claus Feldmann* durchgeführt. Im Hinblick auf eine Anwendung in zellbasierten Assays wurden die IOH-NP so konzipiert, dass sie in Wasser nur schwer bzw. unlöslich sind und bei einem pH-Wert von 7.0 bis 7.5 stabil sind. Die Partikelgröße sowie

Größenverteilung der IOH-NP wurde mittels DLS und SEM bestimmt. Für die $[ZrO]_2[NTP45]$ IOH-NP konnte eine einheitlichen Partikelgröße von 30 ± 7 nm (SEM-Daten) bestimmt werden. Nanopartikel mit vergleichbarer Partikelgröße^{211, 212} wurden bereits erfolgreich als zelluläre Wirkstofftransporter für biomedizinische Anwendungen eingesetzt. Darüber hinaus weisen die synthetisierten IOH-NP bei physiologischen pH-Werten eine hohe kolloidale Stabilität, mit absoluten Zeta-Potenzialen von $>|30|$ mV auf. Hierdurch kann von einer ausreichenden Stabilität für eine Anwendung in zellulärer Umgebung ausgegangen werden. Zusätzlich wurde die chemische Zusammensetzung der IOH-NP mittels FT-IR-Spektroskopie validiert. Hierbei wurden die Nanopartikel hauptsächlich auf charakteristische Schwingungsbanden, wie die Carbonyl-Bande, der BCN-modifizierten NTP **43** bzw. **45** untersucht. Um eine Untersuchung der zellulären Aufnahme der Nanopartikel mittels Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, wurden zusätzlich die fluoreszenzmarkierten IOH-NP ($[ZrO]^{2+}_2[(NTP43)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^{4-}$ und $[ZrO]^{2+}_2[(NTP45)_{>0.99}(DUT647)_{<0.01}]^{4-}$) synthetisiert und charakterisiert. Die erfolgreiche Inkorporation des Fluorophor-markierten UTP (**DUT647**) wurde durch die charakteristische Emission des Farbstoffs bei einer Wellenlänge von $\lambda = 672$ nm validiert. Die Toxizität der fluoreszenzmarkierten IOH-NP wurde mittels MTT-Tests bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Bereich der getesteten Konzentrationen (0.1 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) keine signifikante Toxizität von den IOH-NP ausgeht und diese daher für eine Anwendung in Zellen geeignet sind. Darüber hinaus wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre Aufnahme der IOH-NP in Vero-Zellen nach 24 h Inkubation bereits ab einer Konzentration von 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nachgewiesen. Somit konnte die Effektivität der synthetisierten IOH-NP als Transportsysteme für die Aufnahme modifizierter NTP in die Zelle bewiesen werden. In weiterführenden Experimenten wie beispielsweise Kolokalisationsstudien muss untersucht werden, ob die Internalisierung der IOH-NP tatsächlich über endozytische Aufnahmemechanismen erfolgt. Weiterhin muss experimentell bestätigt werden, ob eine Dissoziation der IOH-NP und somit Freisetzung der modifizierten NTP erfolgt. Dies bildet die Grundlage für eine Anwendung der IOH-NP in der bioorthogonalen Markierung von RNA in Zellen.

VIII. Experimenteller Teil

1 Material und Methoden

Lösungsmittel und Reagenzien

Die im Rahmen dieser Arbeit für Synthese und Analytik verwendeten Lösungsmittel entsprachen der Reinheitsstufe *pro analysis* und wurden, wenn nicht explizit angegeben, ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte verwendet. Die für die Synthese verwendeten trockenen Lösungsmittel wurden von den Herstellern *ACROS Organics*, *Sigma Aldrich* sowie *Fisher Scientific* bezogen und unter Inertgas sowie teilweise über Molekularsieb gelagert. Für die säulenchromatographische Aufreinigung synthetisierter Verbindungen wurden, falls nicht anders angegeben, technische Lösungsmittel verwendet. Für die Auf trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie die Aufreinigung mittels automatisierter Säulenchromatographie wurden ausschließlich hochreine organische Lösungsmittel (*HPLC grade*) der Firma *VWR Chemicals* sowie ultrafiltriertes und entionisiertes Wasser eingesetzt. Letzteres wurde aus einer *MERCK Millipore Q8-Anlage* entnommen. Die, speziell für die NMR-Spektroskopie verwendeten deuterierten Lösungsmittel wurden von der Firma *Eurisotop* bezogen.

Die für die Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *BLD Pharm*, *Carl Roth*, *Fisher Scientific*, *Merck*, *Sigma-Aldrich* sowie *Tokyo Chemical Industry (TCI)* bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Reaktionsführung

Sauerstoff- sowie hydrolyseempfindliche Synthesen wurden unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon (Argon 5.0, 99.999 % Reinheit) oder Stickstoff durchgeführt. Die hierfür verwendeten Glasapparaturen wurden zunächst, entsprechend der *Schlenk*-Technik, mehrfach im Hochvakuum erhitzt und anschließend mit Argon geflutet. Flüssigkeiten wurden mit Kunststoffspritzen und V2A-Edelstahlkanülen oder durch Verwendung von *Eppendorf*-Pipetten überführt. Feststoffe wurden auf Analysewaagen der Firma *Ohaus* eingewogen und anschließend in pulverisierter Form eingesetzt. Reaktionen ohne spezifische Temperaturangabe wurden bei Raumtemperatur (21 °C) durchgeführt, während für Reaktionen, die eine Durchführung bei tieferen Temperaturen erforderten, folgende Kältemischungen eingesetzt wurden: 0 °C Eis in Wasser, -15 °C Eis und Natriumchlorid (NaCl) Mischung, -78 °C Trockeneis in Isopropanol. Lösungsmittel wurden,

wenn nicht anders angegeben, bei 40 °C bzw. 50 °C unter vermindertem Druck an einem wasser- oder stickstoffgekühlten Rotationsverdampfer entfernt.

Spektroskopie und Spektrometrie

NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopische Daten wurden bei Raumtemperatur auf einem *Bruker Avance Neo* 400 MHz Spektrometer, einem *Bruker Avance III HD* 400 MHz, einem *Bruker Avance I* 500 MHz oder einem *Bruker Avance III HD* 600 MHz Spektrometer aufgenommen. Dazu wurden 5 – 10 mg der synthetisierten Verbindung in 500 µL deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Die chemische Verschiebung δ wurde relativ zur Referenzsubstanz Trimethylsilan (TMS) in *parts per million* (ppm) angegeben. Zur internen Kalibrierung der ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektren diente das Signal der verbleibenden, nicht volldeuterierten Lösungsmittel:

CDCl_3	$^1\text{H}: \delta = 7.26 \text{ ppm}$	$^{13}\text{C}: \delta = 77.16 \text{ ppm}$
DMSO-d_6	$^1\text{H}: \delta = 2.50 \text{ ppm}$	$^{13}\text{C}: \delta = 39.52 \text{ ppm}$
Methanol- d_4	$^1\text{H}: \delta = 3.31 \text{ ppm}$	$^{13}\text{C}: \delta = 49.00 \text{ ppm}$
D_2O	$^1\text{H}: \delta = 4.79 \text{ ppm}$	

Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben. Zur Beschreibung der Signalmultiplizität wurden folgende Abkürzungen oder Kombinationen dieser verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett), hept (Heptett), br. s (verbreitertes Singulett) und m (Multiplett). Zur weiteren Charakterisierung wurden zweidimensionale NMR-Experimente ($\text{H},\text{H-COSY}$, HSQC, HMBC) durchgeführt.

Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Messungen der synthetisierten Verbindungen wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) sowie des Instituts für organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Die hochauflösenden Massespektren wurde mit einem *Q Exactive Plus* Spektrometer von *Thermo Scientific* oder mit einem *Agilent 6224 ESI-ToF* Spektrometer unter Verwendung der

Elektrospray-Ionisation (ESI) als Ionisierungsmethode aufgenommen. Des Weiteren wurden MALDI-ToF-Spektren (*engl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*) an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* aufgenommen. Hierbei wurde eine gesättigte Lösung von 2'4'6'-Trihydroxyacetophenon-Monohydrat (THAP, ges. Acetonitril/Wasser 1:1 + 0.1 % TFA) als Matrix verwendet. In Abhängigkeit der zu detektierenden Substanz wurde mit positiver oder negativer Spannung gemessen. Die Signale wurden über das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) charakterisiert und der Molekülionenpeak mit der Abkürzung $[M]^+$ beschrieben. Die typischerweise detektierten Quasimolekülien wurden wie folgt beschrieben: $[M+H]^+$ im Positivmodus und $[M-H]^-$ im Negativmodus. Im Falle von Natrium- oder Kalium-Addukten wurden folgende Abkürzungen verwendet: $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$.

UV-Vis Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektroskopische Messungen im ultravioletten (UV) und sichtbaren (Vis) Spektralbereich wurden an einem *Cary 3500 Multicell* Spektrophotometer mit Peltier-Element der Firma *Agilent* aufgenommen. Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 20 °C in Quarzglas Küvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Probenvolumen von 500 µL oder 1500 µL durchgeführt.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden an einem, mit Peltier-Element ausgestatteten, *Fluoromax-4* Fluoreszenzspektrometer von *Horiba Scientific* (früher *Jobin-Yvon*) bei 20 °C aufgenommen. Das Spektrometer wurde über den Peak der Raman-Streuung von Wasser referenziert und die erhaltenen Spektren wurden gegen das Signal des verwendeten Lösungsmittels korrigiert. Es wurden Spektrophotometer Küvetten aus Quarz der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Probenvolumen von 500 µL oder 1500 µL verwendet.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminiumplatten (Kieselgel 60, F₂₅₄, Schichtdicke: 0.250 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion UV-aktiver Substanzen erfolgte durch Anregung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$ oder $\lambda = 366 \text{ nm}$. Im Falle von UV-inaktiven Substanzen wurden Färbereagenzien in Form von Tauchlösungen als Nachweis eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte durch kontrolliertes Erwärmen im Heißluftstrom. Folgende Färbelösungen wurden verwendet:

Kaliumpermanganat Lösung 1.50 g KMnO₄, 10.0 g K₂CO₃, 1.25 mL

10 % Natriumhydroxid, 100 mL Wasser
für oxidierbare Verbindungen

Ninhydrin Lösung 3.00 g Ninhydrin, 200 mL Ethanol
für Amine

Schwefelsäure Lösung 3 % H₂SO₄ in Methanol
für Kohlenhydrate

Flash-Säulenchromatographie

Die erhaltenen Rohprodukte wurden, soweit nicht anders angegeben, säulenchromatographisch unter Verwendung von Kieselgel 60 (SiO₂, Porengröße 60 Å, Partikelgröße 40.0 – 60.0 µm) der Firma *Sigma Aldrich* als stationäre Phase aufgereinigt. Die Probengemische wurden entweder im entsprechenden Laufmittel gelöst (*wet load*) oder auf Kieselgel 60 adsorbiert (*dry load*), auf die Säule aufgebracht. Zusätzlich wurde die stationäre Phase mit Quarzsand der Firma *Riedel-de Haën* als Schutzschicht bedeckt. Die Trennung erfolgte bei Überdruck, welcher mittels einer Handpumpe erzeugt wurde.

Automatisierte Flash-Säulenchromatographie

Für die automatisierte Flash-Chromatographie wurde das *puriFlash® 430* System von *Interchim* oder das Gerätesystem *Isolera™* der Firma *Biotage®* mit Gradientenpumpe, integriertem Detektor und Fraktionssammler verwendet. In Abhängigkeit des zu trennenden Gemisches wurden entweder MN RS 43 g/120 g C18 ec-Säulen (*Macherey-Nagel*) oder mit DEAE-Sephadex® A-25 selbst gepackte Plastik-Kartuschen verwendet. Für jedes Gegenion (Ammonium, Triethylammonium oder Tetrabutylammonium) wurden individuelle Säulen verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur Verfolgung von Reaktionsfortschritten wurde ein *1260 Infinity II LC*-Gerät (Pumpe *G7111A*, Autosampler *G7129A*, Detektor *DAD G7117C, Agilent Technologies*) mit einer *EC 125/3 Nucleodur 100-5 C18 ec Säule* sowie einem *EC 4/3 Nucleodur 100-5 C18 ec* Vorsäulensystem (*Macherey-Nagel*) und *OpenLAB CDS* als Software verwendet. Bei der verwendeten Methode handelt es sich um einen Gradienten aus Acetonitril in Tetrabutylammoniumacetat-Puffer (2.00 mM in H₂O, pH 6.00, 5 – 80 %, 0 – 20 min) mit einer Flussrate von 1.00 mL/min

Zur Untersuchung und Verfolgung von bioorthogonalen Reaktionen *in vitro*, wurde das *Dionex Ultimate3000* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (HPLC-System) der Firma *Thermo Scientific* verwendet. Das Gerät verfügt über eine Autosampler, ein Pumpenmodul, einen Säulenofen, einen Multidiodenarray, einen RS-Fluoreszenzdetektor sowie einen Fraktionssammler. Analytische Trennungen erfolgten unter Verwendung einer analytischen Umkehrphasen-Chromatographiesäule der Firma *VDSpher*, Modell *OptiBio PUR 300 C-18-SE* (250 x 4.60 mm, 5 µm). Alle Analysen wurden mit einem Injektionsvolumen von 10 µL bei einer Temperatur von 25 °C (Photoclick-Reaktion) bzw. 30 °C (IEDDA-Reaktion) und einer Flussgeschwindigkeit von 1.00 mL/min. Als mobile Phase diente ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Wasser, dessen Zusammensetzung abhängig von der bioorthogonalen Reaktion Tabelle 2 bzw. Tabelle 3 entnommen werden kann. Die Detektion der Analyten erfolgte mittels UV-Diodenarray-Detektor bei einer Wellenlänge von λ = 260, 290 sowie 370 nm für die Photoclick-Reaktion sowie λ = 260 und 290 nm für die IEDDA-Reaktion. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software *Chromeleon 7*.

Tabelle 2: verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der IEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazin **13**

Zeit [min]	% Acetonitril in Wasser
0.00	0
30.00	30
40.00	30
40.01	80
50.00	80
50.01	0
60.00	0

Tabelle 3: verwendeter Gradient der mobilen Phase zur HPLC-Analyse der Photoclick-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazol **17**.

Zeit [min]	% Acetonitril in Wasser
0.00	0
15.00	40
30.00	40
40.00	60
45.00	80
50.00	90
55.00	90
55.01	0
65.00	0

Zur semipräparativen Aufreinigung wurde eine Umkehrphasen-Chromatographiesäule der Firma *VDSpher*, Modell *OptiBio PUR 300 C-18-SE* (250 x 10.0 mm, 5 µm) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C und einer Flussrate von 2.50 mL/min. Die Rohprodukte wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und über den in Tabelle 4 beschrieben Gradienten aufgetrennt. Als mobile Phase diente ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und TEAB-Puffer (50 mM, pH = 7). Das BCN-modifizierten NTP **20** wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert und fraktioniert aufgesammelt. Das Vorhandensein von NTP **20** in den entsprechenden Fraktionen wurde mittels MALDI-ToF nachgewiesen.

Tabelle 4: verwendeter Gradient der mobilen Phase zur Aufreinigung des BCN-modifizierten NTPs **20**.

Zeit [min]	% Acetonitril in Wasser
0.00	0
40.00	20
40.01	90
55.00	90
55.0	0
65.00	0

Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrischer Kopplung

Die LC-MS Analysen wurden an einem *Ultimate3000* HPLC-System von *Thermo Scientific* durchgeführt, welches mit einem *LTQ Orbitrap Elite ESI* mass Analytator von *Thermo Scientific* gekoppelt ist. Die Trennung erfolgte mit einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule der Firma *VDSpher*, Modell *OptiBio PUR 300 C-18-SE* (250 x 4.60 mm, 5 µm) entsprechend des in Tabelle 2 aufgeführten Gradienten.

Gefriertrocknung

Zu lyophilisierende Verbindungen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Zur Gefriertrocknung von Volumina \leq 2 mL wurde eine *Alpha RVC Vakuumzentrifuge* der Firma *Christ* verwendet, während für Volumina \geq 2 mL eine *Beta 2-8 LSCbasic* von der Firma *Christ* verwendet wurde.

Belichtungsapparatur – Photoclick-Reaktion

Die im Zuge der Photoclick-Reaktion durchgeführten Belichtungen erfolgten an einer von der Universität Regensburg sowie der Werkstatt des Instituts für physikalische Chemie am KIT entwickelten und gebauten Belichtungsapparatur. Hierfür wurde eine 308 nm LED (*DUV310-5D351EV*) der Firma *Roithner Laser Technik GmbH* verwendet. Für die Belichtung wurden Quarzküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines *Lauda Alpha R8* Thermostats konstant auf 25 °C gehalten.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren, die aus Vero-Zellen isoliert wurde, wurde an einem *ND-100* Spektrometer der Firma *NanoDrop Technologies LLC* bestimmt. Hierbei wurde der Modus *Nucleic Acid* bei $\lambda = 260$ nm verwendet und ein Probenvolumen von 1.00 μL eingesetzt.

Ionenaustausch mit Dowex NH_4^+

Für den Ionenaustausch wurde eine Chromatographiesäule mit *Dowex® 50W X8* (H-Form, Partikelgröße: 16 – 50 mesh) gepackt und zur Konditionierung mit Wasser gespült, bis das Eluat farblos war. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 1.00 M Salzsäure, gefolgt von Wasser gespült, bis ein neutraler pH-Wert erreicht wurde. Danach wurde die Säule mit 10 %iger Ammoniaklösung und anschließend erneut mit Wasser bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes gespült. Die entsprechende Verbindung wurde in Wasser gelöst, auf die konditionierte Säule aufgetragen und mit mehreren Säulenvolumina Wasser eluiert. Die eluierte Verbindung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

Triethylammoniumbicarbonat-Puffer

Zur Herstellung von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer) wurden 3 kg CO_2 in eine 1.00 M Lösung von Triethylamin in Wasser unter kontinuierlichem Rühren eingeleitet. Der so erhaltene Puffer (1.00 M, pH 7.40) wurde entsprechend mit Wasser verdünnt.

Zentrifugation

Zu zentrifugierende Proben wurden in einer *Micro Star 17R* Mikrozentrifuge von *VWR* mit integrierter Kühlung zentrifugiert. Sofern nicht anders angeben, wurden die Proben bei 12.000 x g zentrifugiert.

2 Zelllabor

Konfokalmikroskopie

Die Zellen wurden an einem *Leica DMI8, TCS SP8* Mikroskop mit einem *HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2* Objektiv mikroskopiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte im *Lightning*-Modus mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln und einer Scangeschwindigkeit von 700 Hz mit der Software LAS X 3.5.7.23225. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software *Leica X office 1.4.6.28422*. Die Anregungswellenlängen (λ_{exc}) der verwendeten Farbstoffe sowie die entsprechenden Detektionsbereiche sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 5: Anregungswellenlängen und Detektionsbereiche, der für die Konfokalmikroskopie verwendeten Farbstoffe.

	λ_{exc} [nm]	Detektionsbereich [nm]
DRAQ5	636	650 - 700
Hoechst33342	405	450 - 500
15	488	500 - 550

Mikroplattenlesegerät (Microplate Reader)

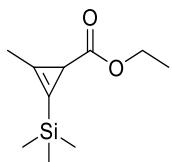
Die Auswertung der MTT-Tests erfolgte an einem *CLARIOstar Plus* von *BMG LABTECH*. Die Absorption der individuellen Proben wurde bei $\lambda = 570$ nm sowie $\lambda = 595$ nm bestimmt.

Tricin-Puffer

Für die Zellexperimente mit Synthetischem Nukleosid Triphosphat Transporter (SNT-Transporter, engl. *synthetic nucleoside triphosphate transporter*) wurde Tricin-Puffer verwendet. Der Puffer enthält folgende Bestandteile: Tricin (0.896 g/L, 5.00 mmol/L), Glucose (2.00 g/L, 11.0 mmol/L), NaCl (7.33 g/L, 125 mmol/L), CaCl₂ (0.200 g/L, 1.80 mmol/L), MgSO₄ (0.100 g/L, 0.800 mmol/L), KCl (0.400 g/L, 5.40 mmol/L). Der pH-Wert des Puffers wurde mit NaOH auf 7.40 bei 31.0 °C eingestellt.¹⁴⁵

3 Organisch-chemische Synthesen

Verbindung 10



C₁₀H₁₈O₂Si
198,1076 g/mol

168 mg Rh₂(OAc)₄ (380 µmol, 0.020 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt. Anschließend wurden 5.63 ml 1-Trimethylsilyl-propin (4.27 g, 38.0 mmol; 2.00 Äq.) zugegeben. Dem Gemisch wurde mit Hilfe eines Spritzenautomaten 2.00 mL Ethyldiazoacetat (2.17 g; 19.0 mmol; 1.00 Äq.) mit einer Geschwindigkeit von 1.7 mL/h zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator abzentrifugiert und dreimal mit je 10 mL DCM gewaschen. Das Zentrifugat sowie die Waschlösung wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂; DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit in einer Ausbeute von 1.78 g (9.00 mmol; 48 %) erhalten.

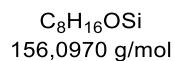
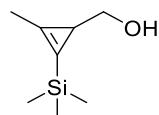
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 4.10 (qd, *J* = 7.1, 3.8 Hz, 2H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.97 (s, 1H, CH), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 0.18 (s, 9H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 177.2, 122.7, 104.3, 60.0, 21.4, 14.6, 12.0, -1.4.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 199.1149 [M+H]⁺, (gefunden): 199.1148 [M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁰

Verbindung 11



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 2.00 g **10** (10.1 mmol, 1.00 Äq.) in 20 mL trockenem Dichlormethan (DCM) gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf -78 °C heruntergekühlt und 20.0 mL Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H, 1 M in DCM, 20.2 mmol, 2.00 Äq.) über einen Zeitraum von 60 Minuten unter Verwendung einer Spritzenpumpe zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 2 Stunden bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Rochelle-Salz-Lösung beendet. Es wurden 200 mL Wasser zugegeben, die organische Phase abgetrennt und anschließend zweimal mit Diethylether (je 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , *n*-Hexan/Diethylether 4:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als hellgelbe Flüssigkeit in einer Ausbeute von 1.063 g (6.80 mmol, 67 %) erhalten.

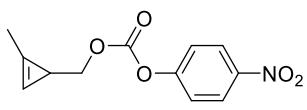
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 3.48 (d, J = 4.6 Hz, 2H, CH_2), 2.21 (s, 3H, CH_3), 1.56 (t, J = 4.6 Hz, 1H, CH), 0.17 (s, 9H, CH_3).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 135.6, 111.4, 69.4, 22.3, 13.6, -1.0.

HRMS (ESI): m/z (berechnet): 155.0898 [M-H] $^-$, (gefunden): 155.0886 [M-H] $^-$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁰

Verbindung 3



C₁₂H₁₁NO₅
249,0637 g/mol

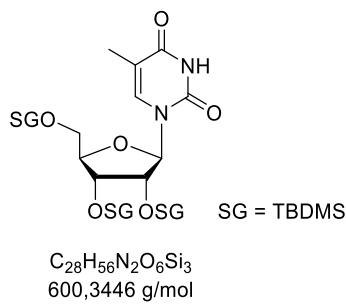
In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden unter Argon-Atmosphäre 200 mg **11** (1.28 mmol, 1.00 Äq.) in 7 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Es wurden 1.47 mL Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (TBAF 1 M in THF) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur röhren gelassen. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung auf 0 °C herunter gekühlt und 5.44 mL Pyridin sowie 0.696 g 4-Nitrochloroformiat (3.45 mmol, 2.70 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderterem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, *n*-Hexan/EE 7:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde in Form einer gelben Flüssigkeit erhalten (116 mg, 465 µmol, 36 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.28 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.39 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, CH_{arom.}), 6.61 (s, 1H, CH), 4.21 (dd, *J* = 10.9, 5.1 Hz, 1H, CH₂), 4.14 (dd, *J* = 10.9, 5.5 Hz, 1H, CH₂), 2.18 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.78 (td, *J* = 5.3, 1.6 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 155.9, 152.8, 145.4, 125.4, 122.0, 120.3, 101.8, 77.55, 16.8, 11.8.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁰

Verbindung 5



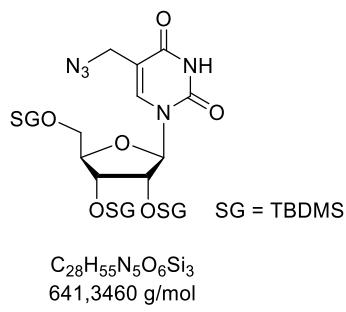
In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 5.00 g Ribothymidin (19.4 mmol, 1.00 Äq.) sowie 10.5 g Imidazol (155 mmol, 8.00 Äq.) in 50 mL trockenem Dimethylformamid (DMF) gelöst. Anschließend wurden 11.7 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl, 77.5 mmol, 4.00 Äq.) im Argon-Gegenstrom zugegeben und die Reaktionslösung für 72 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde mit 200 mL Wasser gequencht und anschließend dreimal mit jeweils 150 mL Ethylacetat (EtOAc) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat (MgSO_4) getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , *n*-Hexan/EtOAc 3:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 10.9 g (18.1 mmol, 94 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.29 (s, 1H, NH), 7.46 (d, J = 1.3 Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 6.02 (d, J = 6.5 Hz, 1H, CH), 4.14 – 4.10 (m, 1H, CH), 4.08 – 4.04 (m, 1H, CH), 4.02 (q, J = 2.3 Hz, 1H, CH), 3.89 (dd, J = 11.6, 2.3 Hz, 1H, CH_2), 3.74 (dd, J = 11.6, 2.2 Hz, 1H, CH_2), 1.93 (d, J = 1.3 Hz, 3H, CH_3), 0.96 (s, 9H, CH_3), 0.91 (s, 9H, CH_3), 0.86 (s, 9H, CH_3), 0.14 (d, J = 2.1 Hz, 6H, CH_3), 0.09 (s, 3H, CH_3), 0.07 (s, 3H, CH_3), 0.02 (s, 3H, CH_3), -0.05 (s, 3H, CH_3).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 163.6, 150.5, 135.9, 111.0, 87.5, 86.1, 75.4, 72.6, 63.3, 26.2, 26.0, 25.8, 18.7, 18.2, 18.1, 12.5, -4.3, -4.4, -4.5, -4.7, -5.2, -5.2.

HRMS (ESI): m/z (berechnet): 601.3519 [M+H]⁺, (gefunden): 601.3528 [M+H]⁺.

Verbindung 7



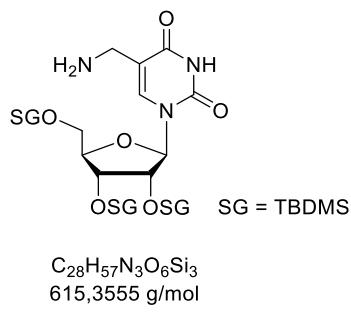
In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 1.00 g der Verbindung **5** (1.66 mmol, 1.00 Äq.), 622 mg N-Bromsuccinimid (NBS, 3.49 mmol, 2.10 Äq.) und 12.1 mg Dibenzoylperoxid (DBPO, 49.9 μ mol, 0.03 Äq.) in 7 mL Benzol gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 85 °C erhitzt und für 2.5 Stunden röhren gelassen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Natriumthiosulfat-Lösung beendet. Anschließend wurden 200 mL EtOAc zugegeben und mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in einem ausgeheizten Kolben unter Argon-Atmosphäre in 6.5 mL trockenem DMF gelöst und mit 216 mg Natriumazid (3.33 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 65 °C erhitzt und für 3 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 mL EtOAc beendet und anschließend mit Wasser sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde im Anschluss über MgSO₄ getrocknet, filtriert und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂, *n*-Hexan/EtOAc 5:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als hellbrauner Feststoff in einer Ausbeute von 327 mg (509 μ mol, 31 % über zwei Stufen) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.20 (s, 1H, NH), 7.71 (s, 1H, CH_{arom.}), 6.02 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH), 4.20 – 4.14 (m, 1H, CH), 4.14 – 4.09 (m, 1H, CH), 4.07 – 4.02 (m, 3H, CH, CH₂), 3.90 (dd, *J* = 11.6, 2.3 Hz, 1H, CH₂), 3.75 (dd, *J* = 11.6, 2.2 Hz, 1H, CH₂), 0.97 (s, 9H, CH₃), 0.92 (s, 9H, CH₃), 0.87 (s, 9H, CH₃), 0.15 (s, 6H, CH₃), 0.10 (s, 3H, CH₃), 0.08 (s, 3H, CH₃), 0.03 (s, 3H, CH₃), -0.03 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 162.2, 149.9, 139.1, 109.8, 87.8, 86.3, 75.7, 72.4, 63.3, 47.1, 26.3, 26.0, 25.8, 18.8, 18.2, 18.1, -4.3, -4.4, -4.6, -4.7, -5.1, -5.3.

HRMS (ESI⁺): *m/z* (berechnet): 642.3533 [M+H]⁺, (gefunden): 642.3540 [M+H]⁺.

Verbindung 2



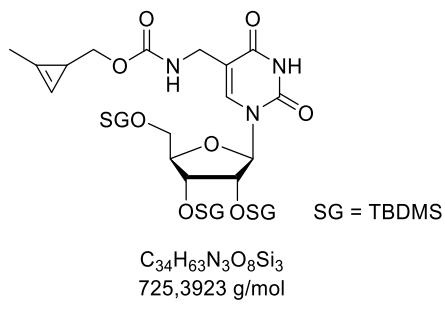
478 mg 7 (745 μ mol, 1.00 Äq) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon-Atmosphäre in 8 mL trockenem Methanol (MeOH) gelöst. Im Anschluss wurden 53.8 mg Palladium auf Kohle (Pd/C, 10%, 253 μ mol, 0.340 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Einleiten von Wasserstoff (H_2) gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert und mit einem Gemisch aus Dichlormethan (DCM) und MeOH im Verhältnis 4:1 nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH 20:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 230 mg (373 μ mol, 50 %) erhalten.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.57 (s, 1H, $CH_{arom.}$), 6.02 (d, J = 6.5 Hz, 1H, CH), 4.15 – 4.10 (m, 1H, CH), 4.08 – 4.01 (m, 2H, CH , CH), 3.88 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, CH_2), 3.74 (dd, J = 11.5, 2.3 Hz, 1H, CH_2), 3.54 (s, 2H, CH_2), 0.96 (s, 9H, CH_3), 0.91 (s, 9H, CH_3), 0.86 (s, 9H, CH_3), 0.14 (d, J = 1.5 Hz, 6H, CH_3), 0.09 (s, 3H, CH_3), 0.08 (s, 3H, CH_3), 0.02 (s, 3H, CH_3), -0.05 (s, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 163.0, 150.2, 136.4, 116.5, 87.6, 86.2, 75.5, 72.6, 63.3, 40.1, 26.2, 26.0, 25.8, 18.7, 18.2, 18.1, -4.3, -4.3, -4.5, -4.7, -5.1, -5.2.

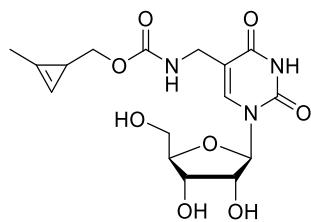
HRMS (ESI $^-$): m/z (berechnet): 616.3628 [M+H] $^+$, (gefunden): 616.3633 [M+H] $^+$.

Verbindung **12**



248 mg **2** (403 µmol, 1.00 Äq) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon-Atmosphäre in 4.5 mL trockenem DMF gelöst. Es wurden 234 µL Triethylamin (171 mg, 1.69 mmol, 4.20 Äq.) sowie 86.5 mg **3** (347 µmol, 1.40 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei 40 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das erhaltene Produkt ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

Verbindung 1



$C_{16}H_{21}N_3O_8$
383,1329 g/mol

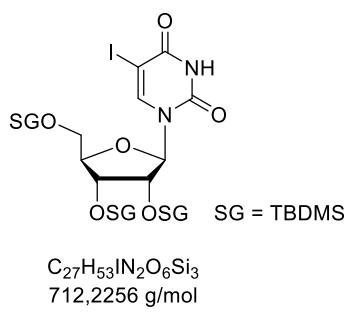
Zu einer Lösung aus 181 mg **12** (249 µmol, 1.00 Äq) in 6 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Argon-Atmosphäre 284 µL Triethylamin-Trihydrofluorid (281 mg, 1.74 mmol, 7.00 Äq.) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt wurde, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 44.0 mg (114 µmol, 46 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.93 (s, 1H, $CH_{\text{arom.}}$), 6.64 (s, 1H, CH), 5.91 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, CH), 4.19 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, CH), 4.14 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, CH), 4.00 (q, $J = 3.5$ Hz, 1H, CH), 3.95 (s, 3H, CH_2, CH_2), 3.86 – 3.80 (m, 2H, CH_2, CH_2), 3.74 (dd, $J = 12.2$, 3.4 Hz, 1H, CH_2), 2.12 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.66 – 1.58 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 165.2, 159.3, 152.4, 140.0, 122.2, 112.7, 102.9, 90.7, 86.4, 75.6, 73.4, 71.4, 62.5, 38.4, 18.3, 11.6.

HRMS (ESI): m/z (berechnet): 384.1401 [M+H]⁺, (gefunden): 384.1395 [M+H]⁺.

Verbindung 22



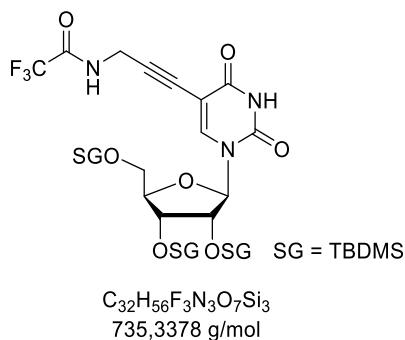
In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 1.00 g 5-Ioduridin **21** (2.70 mmol, 1.00 Äq.) sowie 1.10 g Imidazol (16.2 mmol, 6.00 Äq.) in 2 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 1.63 g TBDMs-Cl (10.8 mmol, 4.00 Äq.) im Argon-Gegenstrom zugegeben und die Reaktionslösung für 2.5 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit 5 mL Methanol unter ständigem Rühren gequencht. Anschließend wurde das Produktgemisch in DCM aufgenommen, in 5 %ige Salzsäure Lösung (20 mL) gegeben und dreimal mit je 40 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer 5 %igen Salzsäure-Lösung, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat (MgSO₄) getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/EtOAc 20:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.77 g (2.49 mmol, 92 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.21 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, CH_{arom.}), 6.02 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 4.13 – 4.09 (m, 1H, CH), 4.07 – 4.03 (m, 2H, CH, CH), 3.90 (dd, *J* = 11.6, 2.0 Hz, 1H, CH₂), 3.74 (dd, *J* = 11.6, 2.0 Hz, 1H, CH₂), 0.99 (s, 9H, CH₃), 0.91 (s, 9H, CH₃), 0.86 (s, 9H, CH₃), 0.20 (s, 6H, CH₃), 0.10 (s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃), 0.03 (s, 3H, CH₃), -0.05 (s, 3H, CH₃).

HRMS (ESI⁺): *m/z* (berechnet): 713.2329 [M+H]⁺, (gefunden): 713.2320 [M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^{49, 221}

Verbindung 23



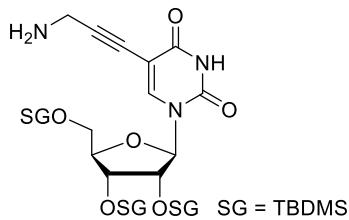
Verbindung **22** (500 mg, 701 µmol, 1.00 Äq.), Kupferiodid (CuI) (27.0 mg, 140 µmol, 0.20 Äq.) sowie Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) (81.0 mg, 701 µmol, 0.10 Äq.) wurden in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt, evakuiert und unter Argon-Atmosphäre gebracht. Die Ausgangsstoffe wurden in 5 mL trockenem THF in Lösung gebracht. Anschließend wurden 389 µL Et_3N (284 mg, 2.81 mmol, 4.00 Äq.) und 123 µL Trifluoracetyl-geschütztes-Propargylamin (159 mg, 1.05 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2.5 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit 5 %iger Salzsäure-Lösung, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat (MgSO_4) getrocknet. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/EtOAc 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 80 % erhalten (412 mg, 560 µmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.45 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 5.98 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, CH), 4.35 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2), 4.14 – 4.08 (m, 1H, CH), 4.08 – 4.02 (m, 2H, CH, CH), 3.95 (dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz, 1H, CH_2), 3.75 (dd, $J = 11.8, 1.8$ Hz, 1H, CH_2), 0.97 (s, 9H, CH_3), 0.91 (s, 9H, CH_3), 0.87 (s, 9H, CH_3), 0.17 (s, 6H, CH_3), 0.09 (s, 6H, CH_3), 0.04 (s, 3H, CH_3), -0.02 (s, 3H, CH_3).

HRMS (ESI): m/z (berechnet): 736.3451 [M+H]⁺, (gefunden): 736.3446 [M-H]⁻.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁴⁹

Verbindung 24



$C_{30}H_{57}N_3O_6Si_3$
639,3555 g/mol

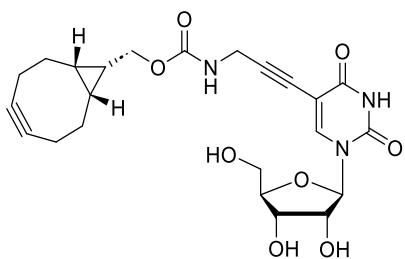
Zu einer Lösung aus Verbindung 23 (400 mg, 543 µmol, 1.00 Äq.) in 2.5 mL MeOH wurde eine Lösung aus 130 mg NaOH (3.26 mmol, 6.00 Äq.) in 300 µL Wasser tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL DCM aufgenommen, zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/EtOAc 8:2) aufgereinigt. Das Produkt wurde als hellbrauner Feststoff in einer Ausbeute von 70 % (244 mg, 382 mmol) erhalten.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.98 (s, 1H, $CH_{arom.}$), 5.99 (d, J = 5.8 Hz, 1H, CH), 4.14 – 4.09 (m, 1H, CH), 4.07 – 4.03 (m, 2H, CH, CH_2), 3.94 (dd, J = 11.7, 1.8 Hz, 1H, CH_2), 3.75 (dd, J = 11.6, 1.5 Hz, 1H, CH_2), 3.59 (s, 2H, CH_2), 0.98 (s, 9H, CH_3), 0.91 (s, 9H, CH_3), 0.87 (s, 9H, CH_3), 0.19 (s, 6H, CH_3), 0.09 (s, 6H, CH_3), 0.03 (s, 3H, CH_3), -0.02 (s, 3H, CH_3).

HRMS (ESI⁻): m/z (berechnet): 638.3482 [M-H]⁻, (gefunden): 638.3486 [M-H]⁻.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁴⁹

Verbindung 19



$C_{23}H_{27}N_3O_8$
473,1798 g/mol

Verbindung 24 (104 mg, 163 μ mol, 1.00 Äq.) wurde unter Argon-Atmosphäre in 2 mL trockenem THF gelöst. Anschließend wurden 95.0 μ L Et₃N (70.0 mg, 687 μ mol, 4.00 Äq.) und 50.0 mg BCN-NHS-Carbonat (172 μ mol, 1.40 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL DCM aufgenommen, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat (MgSO₄) getrocknet. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt.

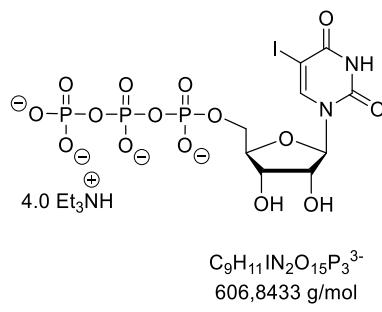
Das erhaltene Rohprodukt (100 mg, 123 μ mol, 1.00 Äq.) wurde unter Argon-Atmosphäre in 3 mL trockenem THF gelöst. Anschließend wurden 160 μ L Triethylamin-Trihydrofluorid (158 mg, 980 μ mol, 8.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung auf 50 °C erhitzt und für 16 h bei gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff in einer Ausbeute von 76 % erhalten (44.0 mg, 93.0 μ mol).

¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) = 8.34 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.88 (d, J = 4.0 Hz, 1H, CH), 4.21 – 4.14 (m, 4H, CH₂, CH, CH), 4.07 (s, 2H, CH₂), 4.04 – 4.00 (m, 1H, CH), 3.87 (dd, J = 12.3, 2.6 Hz, 1H, CH₂), 3.75 (dd, J = 12.3, 2.9 Hz, 1H, CH), 2.31 – 2.11 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.68 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.45 – 1.27 (m, 1H, CH), 0.95 (t, J = 9.6 Hz, 2H, CH, CH).

HRMS (ESI): m/z (berechnet): 474.1871 [M+H]⁺, (gefunden): 474.1873 [M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.⁴⁹

Verbindung 25 / 48



Unter Argon-Atmosphäre wurde 5-Ioduridin **21** (500 mg, 1.40 mmol, 1.00 Äq.) in 3 mL Trimethylphosphat (TMP) gelöst und auf 0 °C herunter gekühlt. Anschließend wurden 150 µL Phosphoroxychlorid (POCl_3 , 250 mg, 1.60 mmol, 1.20 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung bei 0 °C für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde eine Emulsion aus Tris(tetrabutylammonium)-hydrogenpyrophosphat (1.04 g, 1.10 mmol, 0.85 Äq.) und 1.93 mL Tributylamin (1.50 g, 8.10 mmol, 6.00 Äq.) in 1.5 mL in trockenem Acetonitril bei 0 °C zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 20 Minuten gerührt, gefolgt von der Zugabe von 100 mL Wasser. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurde mit Dichlormethan (2 x 80 mL) extrahiert und die wässrige Phase lyophilisiert. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels automatisierter Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sephadex® A25 Säule, 0 M bis 1 M TEAB-Puffer in 60 min). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 216 mg (4.0 TEA, 211 µmol, 16 %) erhalten.

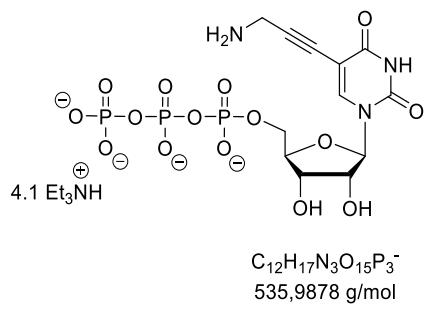
¹H-NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8.29 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 5.95 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, CH), 4.47 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, CH), 4.41 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, CH), 4.32 – 4.19 (m, 3H, CH, CH_2), 3.20 (q, $J = 6.5$, 5.6 Hz, 25H, $\text{Et}_3\text{N}^+\text{H}-\text{CH}_2$), 1.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 36H, $\text{Et}_3\text{N}^+\text{H}-\text{CH}_3$).

¹³C-NMR (101 MHz, D_2O) δ (ppm) = 170.5, 157.6, 145.1, 88.3, 83.1, 73.5, 69.4, 64.9, 46.6, 8.2.

³¹P-NMR (162 MHz, D_2O) δ (ppm) = -6.41 (d, $J = 21.0$ Hz), -11.58 (d, $J = 20.0$ Hz), -22.54 (t, $J = 20.5$ Hz).

HRMS (ESI⁻): m/z (berechnet): 608.8579 [M-H]⁻, (gefunden): 608.8571 [M-H]⁻.

Verbindung 26



Verbindung **25** (216 mg, 216 µmol, 1.00 Äq.), Kupferiodid (CuI) (6.00 mg, 31.6 µmol, 0.142 Äq.), Tri(2-furyl)phosphin (6.20 mg, 26.7 µmol, 0.120 Äq.) sowie Tris(dibenzylideneaceton)dipalladium(0) (Pd₂(dba)₃) (11.0 mg, 12.0 µmol, 0.054 Äq.) wurden in einem ausgeheizten Kolben vorgelegt, evakuiert und unter Argon-Atmosphäre gebracht. Die Ausgangsstoffe wurden in 2.5 mL trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht. Anschließend wurden 310 µL Triethylamin (Et₃N, 225 mg, 2.22 mmol, 10.0 Äq.) und 34.0 µL 5-Aminopentin (29.4 mg, 534 µmol, 2.40 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt mittels automatisierter *Reversed-Phase* (RP₁₈) Säulenchromatographie (100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde Verbindung **26** als Triethylammoniumsalz (TEA-Salz, 4.1 TEA) in Form eines hellgelben Feststoffs erhalten (102 mg, 107 µmol, 48 %).

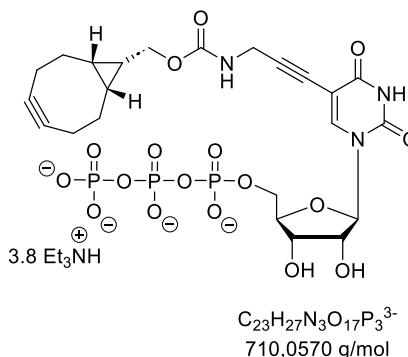
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.40 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.96 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, CH), 4.45 (m, 1H, CH), 4.39 – 4.23 (m, 4H, CH, CH, CH₂), 3.94 (s, 2H, CH₂), 3.19 (q, *J* = 7.3 Hz, 25H, Et₃N⁺H-CH₂), 1.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 37H, Et₃N⁺H-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 175.6, 162.6, 145.5, 98.2, 89.4, 82.5, 82.4, 74.7, 68.2, 63.9, 59.0, 46.6, 29.7, 8.2.

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -6.27 (d, *J* = 21.1 Hz), -11.36 (d, *J* = 19.1 Hz), -22.09 (t, *J* = 20.1 Hz).

HRMS (ESI): *m/z* (berechnet): 535.9878 [M-H]⁻, (gefunden): 535.9880 [M-H]⁻.

Verbindung 20



Variante A:

Verbindung **19** (31.0 mg, 65.5 µmol, 1.00 Äq.) und 21.1 mg 1,8-Bis(N,N-dimethylamino)-naphthalin (Protonenschwamm, 98.3 µmol, 1.50 Äq.) wurde unter Argon-Atmosphäre in 656 µL TMP gelöst. Anschließend wurden 6.39 µL Phosphoroxychlorid (POCl_3 , 10.6 mg, 68.8 µmol, 1.05 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung bei -20 °C für 4 Stunden röhren gelassen. Anschließend wurden weitere 2.44 µL POCl_3 (4.02 mg, 26.1 µmol, 0.40 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 1 Stunde gerührt. Im Anschluss wurde eine Emulsion aus Tributylammoniumpyrophosphat (216 mg, 393 µmol, 6.00 Äq.) und 68.5 µL Tributylamin (53.4 mg, 288 µmol, 4.40 Äq.) in 782 µL in trockenem DMF zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde wurde 3.40 mL Wasser zugegeben und für weitere 4 Stunden gerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan (2 x 40 mL) extrahiert und die wässrige Phase lyophilisiert. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde Verbindung **20** als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 2 % (0.93 mg, 1.31 µmol) erhalten.

Variante B:

Verbindung **26** (27.0 mg, 26.2 µmol, 1.00 Äq.) wurde unter Argon-Atmosphäre in 2.5 mL trockenem DMSO gelöst. Anschließend wurden 15.0 µL Et_3N (11.1 mg, 110 µmol, 4.20 Äq.) und 10.7 mg BCN-NHS-Carbonat (36.6 µmol, 1.40 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei 40 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt mittels automatisierter *Reversed-Phase* (RP_{18}) Säulenchromatographie (100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde Verbindung **20** in Form eines beigen Feststoffs erhalten (3.8 TEA, 12.0 mg, 10.9 µmol, 42 %).

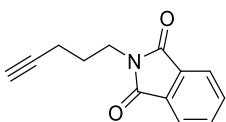
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.01 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.79 (d, J = 5.0, 1.6 Hz, 1H, CH), 4.29 (t, J = 3.0, 1.8 Hz, 1H, CH), 4.23 (t, J = 5.2, 1.7 Hz, 1H, CH), 4.16 – 4.03 (m, 5H, CH, CH₂, CH₂), 3.97 (s, 2H, CH₂), 3.04 (q, 23H, Et₃N⁺H-CH₂), 2.14 – 2.02 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.49 – 1.36 (m, 2H, CH₂), 1.32 – 1.23 (m, 1H, CH), 1.12 (t, J = 7.3, 1.5 Hz, 34H, Et₃N⁺H-CH₃), 0.82 (t, J = 10.0 Hz, 2H, CH, CH).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 158.1, 100.3, 99.5, 88.5, 82.9, 76.0, 73.6, 69.2, 46.5, 40.4, 28.5, 20.7, 19.7, 17.1, 8.4.

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -6.40 (d, J = 21.1 Hz), -11.35 (d, J = 20.1 Hz), -22.60 (t, J = 20.6 Hz).

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 712.0715 [M-H]⁻, (gefunden): 712.0728 [M-H]⁻.

Verbindung 36



C₁₃H₁₁NO₂
213,0790 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden unter Argon-Atmosphäre 1.03 mL 5-chloro-1-pentin (1.00 g, 9.75 mmol, 1.00 Äq.), 1.72 g Phthalimid (11.7 mmol, 1.20 Äq), 1.34 g Kaliumcarbonat (9.75 mmol, 1.00 Äq.) sowie 19.4 mg Kaliumiodid (117 µmol, 0.012 Äq.) in 10 mL trockenem DMF suspendiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 16 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 10 mL Wasser zugegeben und die Reaktionslösung viermal mit Diethylether (jeweils 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, DCM) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.77 g (8.30 mmol, 85 %) erhalten.

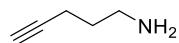
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 7.84 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H, CH_{arom.}), 7.71 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H, CH_{arom.}), 3.79 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 2.27 (td, *J* = 7.1, 2.7 Hz, 2H, CH₂), 1.97 – 1.88 (m, 3H, CH, CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 168.5, 134.1, 132.3, 123.4, 83.1, 69.1, 37.3, 27.4, 16.4.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 214.0863 [M+H]⁺, (gefunden): 214.0863 [M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁹⁴

Verbindung 37



C₅H₉N
83,0735 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 1.00 g Verbindung **36** unter Argon-Atmosphäre in trockenem Ethanol (EtOH) suspendiert. Im Anschluss wurden 2.28 mL Hydrazin-Monohydrat (2.35 g, 46.9 mmol, 10.0 Äq.) tropfenweise zugegeben, bis eine klare Reaktionslösung erhalten wurde. Die Reaktionslösung wurde für 3 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50 mL Wasser zugegeben und anschließend der pH-Wert durch Zugabe 2 M Salzsäure auf pH = 3.5 eingestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das erhaltene Filtrat unter verminderterem Druck eingeengt. Der Rückstand wurde auf 0 °C herunter gekühlt und 4.00 mL 10 M Natriumhydroxid-Lösung zugegeben. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit je 100 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt. Das Produkt wurde als hellgrüne Flüssigkeit in einer Ausbeute von 1.77 g (8.30 mmol, 85 %) erhalten.

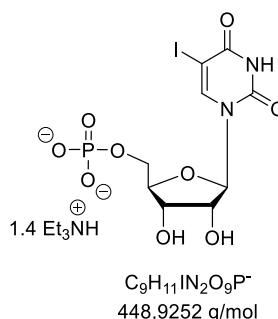
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 2.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 2.26 – 2.21 (m, 2H, CH₂), 1.93 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, CH), 1.91 (s, 2H, NH₂), 1.65 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 84.0, 68.7, 41.0, 31.9, 15.9.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 84.0808 [M+H]⁺, (gefunden): 84.0813 [M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁹⁴

Verbindung 32



Nach *Yoshikawa*¹⁷⁶:

In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argon-Atmosphäre 250 mg 5-Ioduridin **21** (675 µmol, 1.00 Äq.) sowie 217 mg 1,8-Bis(N,N-dimethylamino)-naphthalin (1.01 mmol, 1.50 Äq.) über Nacht im Hochvakuum vorgetrocknet. Anschließend wurden 7 mL TMP zugegeben und die erhaltene Reaktionslösung auf -20 °C herunter gekühlt. Im Anschluss daran erfolgte die tropfenweise Zugabe von 88.8 µL POCl₃ (979 µmol, 1.45 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde für 5 Stunden bei -20 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in 15 mL TEAB-Puffer (100 mM) gegeben und für 1 Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung mit DCM extrahiert und die wässrige Phase lyophilisiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash-Säulenchromatographie; 10 min 100 % Wasser, anschließend schrittweise über 30 min auf 100 % Acetonitril) zweimal aufgereinigt und lyophilisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 84.8 mg (3.4 TEA, 189 µmol, 28 %) erhalten.

Nach *Sowa und Ouchi*¹⁹³:

In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Stickstoff-Atmosphäre 2.70 mL trockenes Acetonitril (2.12 g, 51.6 mmol, 19.1 Äq.) vorgelegt. Anschließend wurden im Stickstoff-Gegenstrom 1.11 mL Phosphoroxychlorid (1.82 g, 11.9 mmol, 4.40 Äq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C herunter gekühlt und 1.05 mL trockenes Pyridin (1.03 g, 13.0 mmol, 4.80 Äq.) zugegeben. Im Anschluss wurden 122 µL Wasser (120 mg, 6.80 mmol, 2.50 Äq.) tropfenweise unter starker Rauchbildung zugegeben und die Reaktionslösung für 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Nachdem 1.00 g 5-Ioduridin **21** (2.70 mmol, 1.00 Äq.) im Stickstoff-Gegenstrom zugegeben wurden, wurde die Reaktionslösung weiter bei 0 °C gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels RP₁₈-HPLC verfolgt. Sobald voller Umsatz oder zunehmend unerwünschte Nebenprodukte zu beobachten waren, wurde die Reaktion

durch Pipettieren in eiskaltes Wasser hydrolysiert und der pH-Wert durch kontrollierte Zugabe von Ammoniumbicarbonat-Lösung auf pH = 8 eingestellt. Die erhaltene wässrige Lösung wurde lyophilisiert und der Rückstand säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash-Säulenchromatographie; 10 min 100 % Wasser, anschließend schrittweise über 30 min auf 100 % Acetonitril) aufgereinigt. Alle Produktfraktionen wurde vereint, mit Triethylamin (10.0 Äq.) versetzt und für 30 min gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter verminderterem Druck wurde das Rohprodukt erneut säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash-Säulenchromatographie) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.18 g (1.4 TEA, 1.98 mmol, 73 %) erhalten.

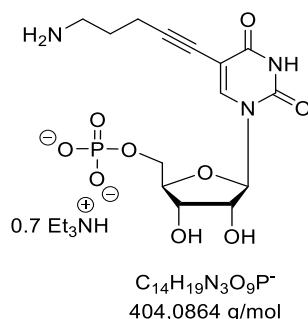
¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.26 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.92 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH), 4.37 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH), 4.31 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, CH), 4.27 – 4.23 (m, 1H, CH), 4.11 – 4.07 (m, 1H, CH₂), 4.07 – 4.02 (m, 1H, CH₂), 3.19 (q, *J* = 7.3 Hz, 9H, Et₃N⁺H-CH₂), 1.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 13H, Et₃N⁺H-CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O) δ (ppm) = 152.0, 146.4, 146.3, 89.0, 84.1, 84.0, 74.2, 70.2, 68.9, 64.4, 64.4, 47.0, 8.6.

³¹P-NMR (122 MHz, D₂O) δ (ppm) = 1.06.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 448.9252 [M-H]⁻, (gefunden): 448.9254 [M-H]⁻.

Verbindung 33



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Stickstoff-Atmosphäre 0.300 g Verbindung **32** (506 µmol, 1.00 Äq.), 25.0 mg Pd₂(dba)₃ (27.2 µmol, 0.054 Äq.), 14.1 mg Tri(2-furyl)phosphin (60.7 µmol, 0.12 Äq.) sowie 14.4 mg CuI (75.8 µmol, 0.15 Äq.) in 3 mL trockenem DMSO suspendiert. Anschließend wurden 493 µL Et₃N (358 mg, 7.00 Äq.) sowie 73.0 µL Verbindung **37** (63.0 mg, 758 µmol, 1.50 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 Stunde auf 50 °C erhitzt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Acetonitril/Wasser 7:3 v/v) überwacht. Nach vollständigem Umsatz des Ausgangsmaterials wurde das Lösungsmittel bei 50 °C im Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril (1:1 v/v) aufgenommen und über einen RP₁₈-Silica Plug filtriert. Das Filtrat wurde lyophilisiert und der Rückstand anschließend säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 5 min 100 % TEAB-Puffer, anschließend schrittweise über 30 min auf 100 % Acetonitril) aufgereinigt und lyophilisiert. Um überschüssige Puffersalze zu entfernen, wurde der erhaltene Feststoff mit Methanol coevaporiert und erneut aus Acetonitril/Wasser (1:1 v/v) lyophilisiert. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 225 mg (0.7 TEA, 408 µmol, 81 %) erhalten.

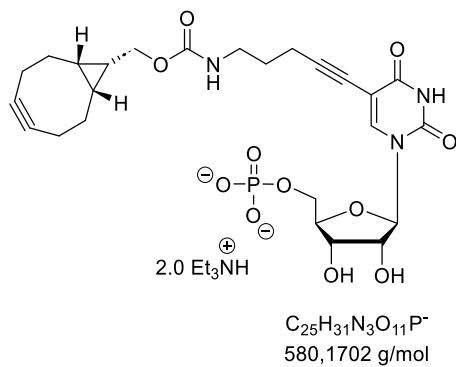
¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.19 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.99 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH), 4.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH), 4.34 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H, CH), 4.29 – 4.26 (m, 1H, CH), 4.12 – 4.08 (m, 1H, CH₂), 4.07 – 4.03 (m, 1H, CH₂), 3.23 – 3.16 (m, 6H, Et₃N⁺H-CH₂, CH₂), 2.59 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 1.97 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 1.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H, Et₃N⁺H-CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) δ (ppm) = 164.8, 150.8, 143.7, 100.0, 93.9, 88.5, 83.9, 83.9, 74.2, 72.4, 69.7, 63.5, 63.5, 46.6, 38.6, 25.2, 16.0, 8.2.

³¹P-NMR (243 MHz, D₂O) δ (ppm) = 4.64.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 564.0191 [M-H]⁻, (gefunden): 564.0195 [M-H]⁻.

Verbindung 34



In einem ausgeheizten Kolben wurde unter Stickstoff-Atmosphäre Verbindung **33** (100 mg, 635 µmol, 1.00 Äq.) in 3 mL trockenem DMSO suspendiert. Anschließend wurden 88.5 µL Et₃N (64.2 mg, 3.50 Äq.) sowie 60.8 mg BCN-NHS-Carbonat (209 µmol, 1.15 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur röhren gelassen. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Acetonitril/Wasser 7:3 v/v) überwacht. Nach vollständigem Umsatz des Ausgangsmaterials wurde das Lösungsmittel bei 50 °C im Ölumpenvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 5 min 100 % TEAB-Puffer, anschließend schrittweise über 30 min auf 100 % Acetonitril) aufgereinigt und lyophilisiert. Um überschüssige Puffersalze zu entfernen, wurde der erhaltene Feststoff mit Methanol coevaporiert und erneut aus Acetonitril/Wasser (1:1 v/v) lyophilisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 119 mg (2.0 TEA, 152 µmol, 84 %) erhalten.

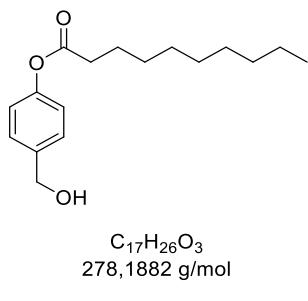
¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.03 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.96 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH), 4.27 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CH), 4.25 – 4.23 (m, 1H, CH), 4.15 – 4.09 (m, 3H, CH, CH₂), 4.08 – 4.05 (m, 2H, CH₂), 3.25 – 3.20 (m, 2H, CH₂), 3.04 (q, *J* = 7.3 Hz, 12H, Et₃N⁺H-CH₂), 2.43 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 2.33 – 2.13 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.76 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 1.67 – 1.56 (m, 2H, CH₂), 1.40 – 1.33 (m, 1H, CH), 1.25 (t, *J* = 7.3 Hz, 18H, Et₃N⁺H-CH₃), 0.99 – 0.89 (m, 2H, CH, CH).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) δ (ppm) = 164.7, 159.4, 151.7, 144.2, 101.7, 99.5, 94.9, 89.7, 85.7, 75.2, 72.8, 71.8, 65.7, 63.5, 47.5, 40.9, 29.9, 29.5, 22.2, 21.3, 19.0, 17.7, 9.6.

³¹P-NMR (243 MHz, D₂O) δ (ppm) = 1.29.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 580.1702 [M-H]⁻, (gefunden): 580.1705 [M-H]⁻.

Verbindung 39



In einem ausgeheizten Kolben wurde unter Argon-Atmosphäre 4-Hydroxybenzylalkohol (1.00 g, 8.06 mmol, 1.00 Äq.) in 7.5 mL trockenem THF gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1.52 mL Decanoylchlorid (1.40 g, 7.33 mmol, 0.91 Äq.) in 2.5 mL trockenem THF über 1 Stunde tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat unter verminderter Druck eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/EtOAc 20:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 944 mg (3.80 mmol, 47 %) erhalten.

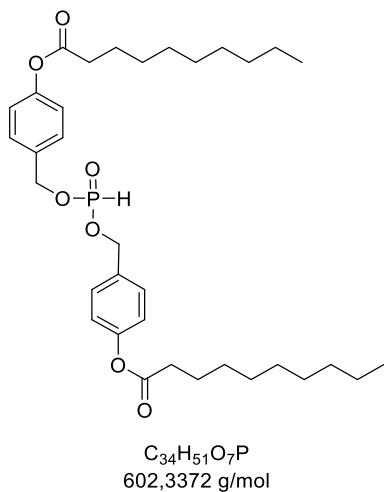
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.06 (d, J = 8.6 Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.68 (d, J = 3.7 Hz, 2H, CH_2), 2.55 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_2), 1.81 – 1.68 (m, 3H, CH_2 , OH), 1.44 – 1.37 (m, 2H, CH_2), 1.36 – 1.24 (m, 10H, 5 x CH_2), 0.92 – 0.85 (m, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 172.6, 150.3, 138.5, 128.2, 121.9, 64.9, 34.5, 32.0, 29.56, 29.4, 29.3, 25.1, 22.8, 14.3.

HRMS (ESI $^-$): m/z (berechnet): 279.1955 [M+H] $^+$, (gefunden): 279.1955 [M+H] $^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹²¹

Verbindung 40



Verbindung **39** (896 mg, 3.22 mmol, 2.20 Äq.) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argon-Atmosphäre in 4 mL trockenem Pyridin gelöst. Anschließend wurden 300 µL Diphenylphosphit (324 mg, 1.46 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 Stunden bei 40 °C Lösung gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und dreimal mit je 20 mL Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 571 mg (947 µmol, 65 %) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, CH_{arom.}), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, CH_{arom.}), 6.05 (d, *J* = 708.4 Hz 1H, PH), 5.12 – 4.97 (m, 4H, CH₂, CH₂), 2.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H, CH₂, CH₂), 1.75 (p, *J* = 7.4 Hz, 4H, CH₂, CH₂), 1.40 (dd, *J* = 11.2, 4.8 Hz, 4H, CH₂, CH₂), 1.36 – 1.25 (m, 20H, 10 x CH₂), 0.92 – 0.85 (m, 6H, CH₃, CH₃).

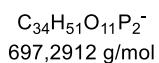
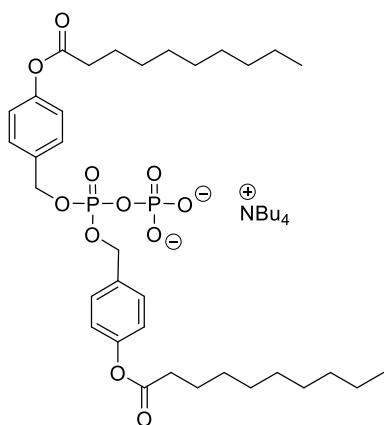
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 172.3, 151.1, 133.1, 129.4, 122.1, 66.9, 34.5, 32.0, 29.6, 29.4, 29.2, 25.0, 22.8, 14.2.

³¹P-NMR (243 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.71.

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 603.3445 [M+H]⁺, (gefunden): 603.3451 [M+H]⁺.

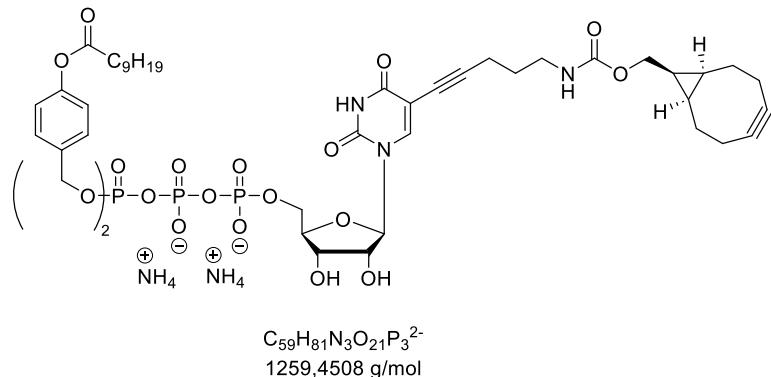
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.¹²¹

Verbindung 41



Bis[C9AB]-pyrophosphat **41** wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift synthetisiert.¹²¹ Verbindung **40** (159 mg, 263 µmol, 1.00 Äq.) wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Stickstoff-Atmosphäre in 10 mL trockenem Acetonitril gelöst. Anschließend wurden 88.0 mg N-Chlorsuccinimid (NCS, 658 µmol, 2.50 Äq.) im Stickstoff-Gegenstrom zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 50 °C erhitzt und für 3.5 Stunden gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels ¹H-NMR überwacht. Nach vollständigem Umsatz des Ausgangsmaterials wurde die Reaktionslösung tropfenweise in eine Lösung von Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat (0.4M in Acetonitril, 3.00 Äq.) eingetragen und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und mit Ammoniumacetat-Lösung (1.00 M in Wasser, 15 mL) und Wasser (15 mL) gewaschen. Für eine effizientere Phasentrennung wurde das Gemisch zentrifugiert. Die organische Phase wurde im Anschluss über Natriumsulfat (Na₂SO₄) getrocknet und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur entfernt. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt.

Verbindung 28



Zu einer 0 °C kalten Lösung von Verbindung **41** (262 g, 279 µmol, 1.00 Äq.) in 5 mL trockenem Acetonitril wurde tropfenweise eine Lösung aus Trifluoressigsäureanhydrid (194 µL, 293 mg, 1.39 mmol, 5.00 Äq.) und Et₃N (311 µL, 256 mg, 2.23 mmol, 8.00 Äq.) in 4 mL Acetonitril hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und mit 2 mL Methanol coevaporiert. Nachdem der Rückstand in 5 mL trockenem DMF gelöst wurde, wurden 194 µL Et₃N (141 mg, 1.39 mmol, 5.00 Äq.) sowie 56.0 µL N-Methylimidazol (57.2 mg, 697 µmol, 2.50 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Verbindung **34** (100 mg, 128 µmol, 0.46 Äq.) zugegeben wurde. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels RP₁₈-HPLC überwacht. Nach vollständigem Umsatz des Ausgangsmaterials wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 5 min 100 % H₂O, anschließend schrittweise über 30 min auf 100 % Acetonitril) aufgereinigt. Produktfraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und einer Ionenaustauschchromatographie (Dowex NH₄⁺) unterzogen. Nach erneuter Lyophilisation der Produktfraktionen wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 5 min 100 % H₂O, anschließend schrittweise über 30 min auf 100 % Acetonitril) aufgereinigt. Der Prozess aus Ionenaustauschchromatographie und säulenchromatographischer Aufreinigung (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie) wurde wiederholt, wobei das Produkt als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 52.5 mg (40.5 µmol, 32 %) erhalten wurde.

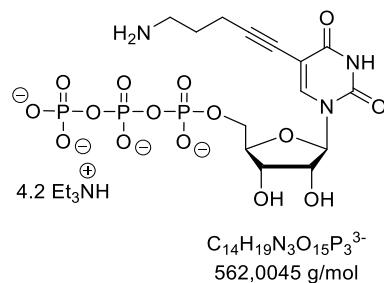
¹H-NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm) = 7.97 (s, 1H), 7.42 – 7.39 (m, 4H), 7.06 – 7.03 (m, 4H), 5.92 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.19 – 5.16 (m, 4H), 4.32 (dd, *J* = 5.4, 3.8 Hz, 1H), 4.29 – 4.21 (m, 3H), 4.14 – 4.08 (m, 3H), 3.23 – 3.19 (m, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.4 Hz), 2.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.28 – 2.11 (m, 7H), 1.76 – 1.70 (m, 8H), 1.66 – 1.54 (m, 3H), 1.39 – 1.27 (m, 32H), 0.92 – 0.89 (m, 8H).

¹³C-NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm) = 173.8, 164.6, 152.3, 151.6, 144.2, 135.1, 135.0, 130.5, 130.5, 122.8, 101.7, 99.5, 89.8, 85.2, 75.0, 71.4, 70.4, 70.4, 66.6, 63.5, 40.9, 35.1, 33.1, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 30.2, 29.5, 26.0, 23.8, 22.0, 21.4, 19.0, 17.8, 14.5, 9.2.

³¹P-NMR (243 MHz, MeOD) δ (ppm) = -11.66 (d, J = 18.7 Hz), -13.29 (d, J = 17.4 Hz), -23.82 (t, J = 18.7 Hz).

HRMS (ESI $^-$): m/z (berechnet): 1260.4581 [M-H] $^-$, (gefunden): 1260.4579 [M-H] $^-$.

Verbindung 50



Verbindung **48** (129 mg, 126 µmol, 1.00 Äq.), Kupferiodid (3.40 mg, 17.9 µmol, 15 mol%), Tri(2-furyl)phosphin (3.50 mg, 15.1 µmol, 12 mol% Äq.) sowie $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (6.20 mg, 6.80 µmol, 5.40 mol%) wurden in einem Schlenkkolben vorgelegt, evakuiert und unter Argon-Atmosphäre gebracht. Die Ausgangsstoffe wurden in 2.5 mL trockenem DMSO in Lösung gebracht. Anschließend wurden 176 µL Et_3N (128 mg, 1.30 mmol, 10.00 Äq.) und 5-Amino-1-pentin **37** (21.0 mg, 252 µmol, 2.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash-Säulenchromatographie; 100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Produkt in Form eines hellgelben Feststoffs (4.2 TEA, 90.0 mg, 90.8 µmol, 72 %) erhalten.

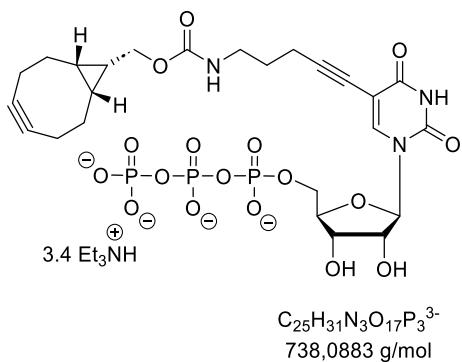
¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.15 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 6.02 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, CH), 4.46 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, CH), 4.34 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, CH), 4.31 – 4.23 (m, 3H, CH , CH_2), 3.20 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{Et}_3\text{N}^+\text{H}-\text{CH}_2$, CH_2), 2.58 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.94 (p, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 1.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{Et}_3\text{N}^+\text{H}-\text{CH}_3$).

¹³C-NMR (101 MHz, D_2O) δ (ppm) = 174.3, 158.1, 142.8, 92.2, 88.7, 82.4, 76.1, 75.2, 74.4, 68.8, 64.2, 46.4, 38.6, 25.5, 16.2, 8.5.

³¹P-NMR (162 MHz, D_2O) δ (ppm) = -6.18 (d, $J = 21.1$ Hz), -11.04 (d, $J = 20.1$ Hz), -22.03 (t, $J = 20.6$ Hz).

HRMS (ESI⁻): m/z (berechnet): 564.0191 [M-H]⁻, (gefunden): 564.0195 [M-H]⁻.

Verbindung 45



Unter Argon-Atmosphäre wurde Verbindung **50** (90.0 mg, 89.7 µmol, 1.00 Äq.) in 2.5 mL trockenem DMSO gelöst. Anschließend wurden 52.3 µL Et₃N (38.2 mg, 377 µmol, 4.20 Äq.) zugetropft. Nach Zugabe des BCN-NHS-Carbonats (29.2 mg, 126 µmol, 1.40 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf 40 °C erhitzt und für 2 Stunden gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Produkt in Form eines hellgrauen Feststoffs (3.4 TEA, 34.0 mg, 31.3 µmol, 35 %) erhalten.

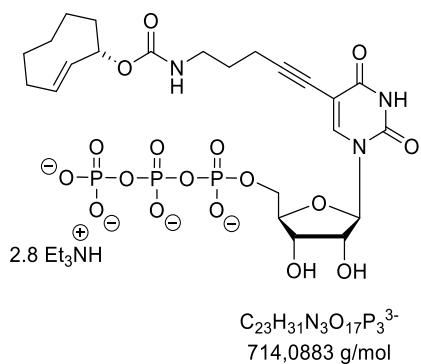
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.10 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.98 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH), 4.46 – 4.38 (m, 2H, CH, CH), 4.31 – 4.22 (m, 3H, CH, CH₂), 4.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH₂), 3.33 – 3.26 (m, 2H, CH₂), 3.21 (q, *J* = 7.3 Hz, 21H, Et₃N⁺H-CH₂), 2.50 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 2.29 – 2.18 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.80 (p, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 1.61 – 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 31H, CH, Et₃N⁺H-CH₃), 0.98 – 0.89 (m, 2H, CH, CH).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 150.8, 143.3, 100.6, 88.4, 73.7, 69.7, 65.1, 63.5, 46.6, 40.1, 28.2, 22.5, 19.7, 17.2, 17.0, 8.2.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -10.96 (d, *J* = 20.1 Hz), -11.61 (d, *J* = 21.1 Hz), -23.36 (t, *J* = 20.1 Hz).

HRMS (ESI⁺): *m/z* (berechnet): 741.1101[M]⁺, (gefunden): 741.1082 [M]⁺.

Verbindung 44



Unter Argon-Atmosphäre wurde Verbindung **50** (124 mg, 117 µmol, 1.00 Äq.) in 2.5 mL trockenem DMSO gelöst. Anschließend wurden 68.0 µL Et₃N (49.6 mg, 490 µmol, 4.20 Äq.) zugetropft. Nach Zugabe des BCN-NHS-Carbonats (43.0 mg, 163 µmol, 1.40 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf 40 °C erhitzt und für 2 Stunden gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Produkt in Form eines weißen Feststoffs (2.8 TEA, 81.0 mg, 80.0 µmol, 69 %) erhalten.

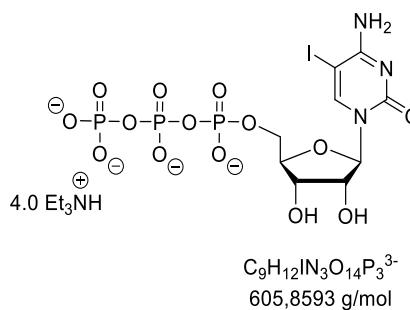
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.12 – 8.04 (m, 1H), 6.00 – 5.95 (m, 1H), 5.84 – 5.72 (m, 1H), 5.69 – 5.55 (m, 1H), 5.49 – 5.31 (m, 1H), 4.46 – 4.35 (m, 2H), 4.32 – 4.20 (m, 3H), 3.34 – 3.25 (m, 2H), 3.21 (q, *J* = 7.3 Hz, 18H), 2.54 – 2.45 (m, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 1H), 2.22 – 2.03 (m, 2H), 2.03 – 1.89 (m, 1H), 1.86 – 1.73 (m, 3H), 1.69 – 1.55 (m, 2H), 1.54 – 1.44 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 25H), 0.92 – 0.71 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 164.6, 158.5, 150.8, 143.3, 133.4, 118.3, 100.8, 96.1, 88.4, 83.5, 73.7, 69.7, 65.1, 46.6, 40.2, 35.2, 28.3, 27.7, 27.4, 25.8, 25.3, 22.7, 21.0, 16.8, 8.2.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -8.20 (d, *J* = 19.5 Hz), -11.45 (d, *J* = 20.1 Hz), -22.53 (t, *J* = 19.7, 18.1 Hz).

HRMS (ESI): *m/z* (berechnet): 718.1174 [M]⁺, (gefunden): 718.1185 [M]⁺.

Verbindung 47



Unter Argon-Atmosphäre wurde 5-Iodcytidine **46** (500 mg, 1.36 mmol, 1.00 Äq.) in 3 mL TMP gelöst und auf 0 °C herunter gekühlt. Anschließend wurden 152 µL POCl₃ (249 mg, 1.63 mmol, 1.20 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung für 2 Tage bei 0 °C röhren gelassen. Anschließend wurde eine Emulsion aus Tris(tetrabutylammonium)-hydrogenpyrophosphat (1.04 g, 1.20 mmol, 0.85 Äq.) und 1.93 mL Tributylamin (1.90 g, 8.10 mmol, 6.00 Äq.) in 1.5 mL in trockenem Acetonitril bei 0 °C zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 20 Minuten röhren gelassen, gefolgt von der Zugabe von 120 mL Wasser. Anschließend wurde mit DCM (3x 80 mL) extrahiert und die wässrige Phase lyophilisiert. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels automatisierter Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sephadex® A25 Säule, 0 M bis 1 M TEAB-Puffer in 60 min). Die Produktfraktionen wurden lyophilisiert und anschließend erneut säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 216 mg (4.0 TEA, 211 µmol, 16 %) erhalten.

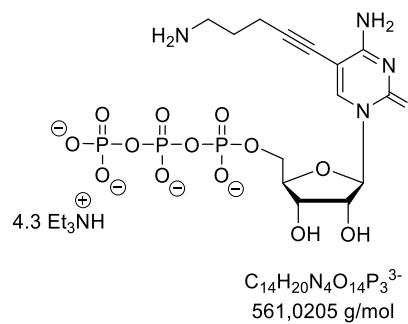
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.24 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.91 (d, J = 4.6 Hz, 1H, CH), 4.44 (t, J = 5.1 Hz, 1H, CH), 4.32 (t, J = 4.9 Hz, 1H, CH), 4.29 – 4.20 (m, 3H, CH, CH₂), 3.15 (q, J = 7.4 Hz, 25H, Et₃N⁺H-CH₂), 1.24 (t, J = 7.3 Hz, 36H, Et₃N⁺H-CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 164.6, 156.9, 147.5, 89.2, 83.0, 74.2, 68.9, 64.4, 58.2.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -6.44 (d, J = 21.1 Hz), -11.67 (d, J = 20.2 Hz), -22.59 (t, J = 20.6 Hz).

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 609.8884 [M+H]⁺, (gefunden): 609.8890 [M+H]⁺.

Verbindung 49



Verbindung **47** (175 mg, 161 µmol, 1.00 Äq.), CuI (4.40 mg, 22.9 µmol, 14.2 mol%), Tri(2-furyl)phosphin (4.50 mg, 19.3 µmol, 12 mol%) sowie Pd₂(dba)₃ (8.00 mg, 8.70 µmol, 5.4 mol%) wurden in einem Schlenkkolben vorgelegt, evakuiert und unter Argon-Atmosphäre gebracht. Die Ausgangsstoffe wurden in 2.5 mL trockenem DMSO in Lösung gebracht. Anschließend wurden 224 µL Et₃N (163 mg, 1.61 mmol, 10.0 Äq.) und 31.0 µL 5-Amin-1-pentin (32.2 mg, 322 µmol, 2.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei 50 °C röhren gelassen. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderterem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash-Säulenchromatographie; 100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 118 mg (4.3 TEA, 118 µmol, 73 %) erhalten.

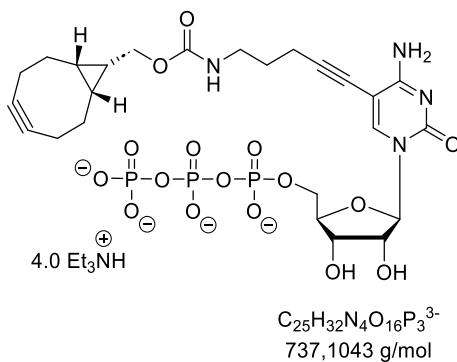
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.26 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.98 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, CH), 4.44 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH), 4.37 – 4.28 (m, 3H, CH, CH₂), 4.27 – 4.23 (m, 1H, CH), 3.22 – 3.16 (m, 2H, CH₂), 3.11 (q, *J* = 7.4 Hz, 27H, Et₃N⁺H-CH₂), 2.65 – 2.57 (m, 2H, CH₂), 1.99 – 1.90 (m, 2H, CH₂), 1.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 38H, Et₃N⁺H-CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 165.1, 156.2, 144.0, 95.5, 93.0, 89.6, 82.4, 74.7, 72.1, 68.2, 63.9, 38.4, 25.3, 16.2.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -6.15 (d, *J* = 21.0 Hz), -10.98 (d, *J* = 19.3 Hz), -21.99 (t, *J* = 20.3 Hz).

HRMS (ESI⁻): *m/z* (berechnet): 565.0496 [M+H]⁺, (gefunden): 565.0501 [M+H]⁺.

Verbindung 43



Verbindung **49** (118 mg, 118 µmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argon-Atmosphäre in trockenem 2.5 mL trockenem DMSO gelöst. Anschließend wurden 68.7 µL Et₃N (50.1 mg, 495 µmol, 4.20 Äq.) und 38.3 mg BCN-NHS-Carbonat (165 µmol, 1.40 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 2 Stunden bei 40 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter verminderter Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (RP₁₈ Automatisierte Flash- Säulenchromatographie; 100% 0.05 M TEAB-Puffer zu 100% Acetonitril in 30 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 55.0 mg (4.0 TEA, 47.9 µmol, 41 %) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 8.12 (s, 1H, CH_{arom.}), 5.97 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH), 4.40 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH), 4.32 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, CH), 4.30 – 4.26 (m, 3H, CH, CH₂), 4.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 3.34 – 3.28 (m, 2H, CH₂), 3.21 (q, *J* = 7.3 Hz, 24H, Et₃N⁺H-CH₃), 2.53 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 2.26 – 2.16 (m, 6H, 3 x CH₂), 1.81 (p, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 1.52 (m, 2H, CH₂), 1.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 37H, CH, Et₃N⁺H-CH₃), 0.89 (q, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH, CH).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 165.1, 156.2, 143.6, 100.2, 97.6, 93.7, 89.4, 82.8, 74.3, 69.1, 64.8, 63.5, 46.6, 40.3, 28.5, 27.3, 20.8, 19.3, 17.2, 8.2.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ (ppm) = -10.90 (d, *J* = 20.1 Hz), -11.53 (d, *J* = 21.1 Hz), -23.35 (t, *J* = 20.1 Hz).

HRMS (ESI⁺): *m/z* (berechnet): 739.1188 [M-H]⁺, (gefunden): 739.1200 [M-H]⁺.

4 Allgemeine Durchführung der „Click“-Experimente *in vitro*

Reaktionsverfolgung der IE DDA-Reaktion mittels HPLC

Um die IEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazin **13** mittels HPLC verfolgen zu können wurden zunächst Stammlösungen der Reaktanden in DMSO angefertigt. Die Reaktion wurden in doppelt deionisiertem Wasser durchgeführt. Um gerätebedingte Unregelmäßigkeiten auszugleichen, wurde allen Proben Thymidin als interner Standard (IS) zugesetzt. Das Nukleosid **1** wurde in einer Konzentration von 500 µM zusammen mit Thymidin in Wasser vorgelegt und anschließend 100 µM des Tetrazin **13** zugegeben (Tabelle 6). Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 300 µL. Das Reaktionsgemisch wurde unmittelbar nach Zugabe der Edukte sowie anschließend über einen Zeitraum von 10 Stunden in Intervallen von 1 h mittels RP-HPLC untersucht.

Tabelle 6: Eingesetzte Äquivalente und Mengen der Reagenzien für die Durchführung der IEDDA-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazin **13**.

Verbindung	Äquivalente	Ziel-Konzentration [µM]	Stammlösung	Volumen
			[mM]	[µL]
1	5.00	500	100	1.50
13	1.00	100	6.33	4.74
Thymidin (IS)	5.00	500	40.0	3.75

Reaktionsverfolgung der Photoclick-Reaktion mittels HPLC

Um die Photoclick-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazol **17** mittels HPLC zu untersuchen wurden Stammlösungen der Reaktanden in DMSO angefertigt. Die Reaktion wurde in Glasküvetten der Firma *Starna* in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und PBS-Puffer in einem Verhältnis von 1:1 durchgeführt. Um gerätebedingte Unregelmäßigkeiten auszugleichen, wurde allen Proben Thymidin als interner Standard (IS) zugesetzt. Die Reaktanden wurden in einem Verhältnis von 5:1 (Nukleosid zu Tetrazol) eingesetzt (Tabelle 7). Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 1.00 mL. Die Reaktionslösung wurde mit einer 308 nm LED bei 25 °C für folgende Zeiten von unten belichtet: 0 s, 10 s, 20 s, 40 s, 80 s, 160 s, 320 s, 640 s. Hierbei wurde mit Hilfe eines Dimmer der Firma *BASETech* eine Leistung von $50 \pm 5 \mu\text{W}$ eingestellt. Nach jedem Belichtungszeitraum wurde eine Probe der Reaktionslösung (20 µL) entnommen und mittels HPLC analysiert.

Tabelle 7: Eingesetzte Äquivalente und Mengen der Reagenzien für die Durchführung der Photoclick-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Tetrazol **17**.

Verbindung	Äquivalente	Ziel-Konzentration	Stammlösung	Volumen
		[μM]	[mM]	[μL]
1	5.00	500	100	5.00
17	1.00	100	6.33	15.8
Thymidin (IS)	5.00	500	40.0	12.5

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und des *Turn ons* der IEDDA-Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie

Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und des *Turn ons* wurde die IEDDA-Reaktion zwischen den entsprechenden Nukleosiden bzw. Nukleotiden mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Hierfür wurde eine Stammlösung des Nukleosids (20 mM Nukleosid **1**) und des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** (4 mM) in DMSO sowie Stammlösungen der Nukleotide (4 mM NTP **20** und **42 – 45**) in bidestilliertem Wasser angefertigt. Die Click-Reaktion wurde in Wasser mit einem DMSO-Anteil von 1 % durchgeführt. Für die „Click“-Reaktion zwischen Nukleosid **1** und Fluorophor **15** wurden jeweils 5 μL der Stammlösung mit doppelt destilliertem Wasser auf 1.00 mL aufgefüllt, sodass im „Click“-Ansatz eine Konzentration von 100 μM Nukleosid **1** zu 20 μM Fluorophor **15** erreicht wurde bzw. ein Verhältnis von Fluorophor/Dienophil von 1:5 vorlag. Für die „Click“-Reaktion zwischen den NTP **20** bzw. **42 – 45** und Fluorophor **15** wurden 25 μL des entsprechenden NTPs und 2.5 μL Fluorophor mit doppelt destilliertem Wasser auf 500 μL aufgefüllt, sodass im „Click“-Ansatz eine Konzentration von 200 μM NTP zu 20 μM Fluorophor **15** erreicht wurde bzw. ein Verhältnis von Fluorophor/Dienophil von 1:10 vorlag. Die fluoreszenzspektroskopische Verfolgung der „Click“-Reaktion erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen bis zum Erreichen eines Plateaus. Die Anregung des Farbstoffs **15** erfolgte bei dessen Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$). Die Emission wurde im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 452 \text{ nm}$ und 800 nm detektiert. Als Nullpunktmeßung (t_0) diente das Fluoreszenzspektrum des Fluorophors **15**, welches gegen einen Lösungsmittelblank (Wasser/DMSO 99:1) korrigiert wurde. Die erhaltenen zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren wurden jeweils gegen das Fluoreszenzspektrum der entsprechenden NTP bzw. des Nukleosids korrigiert. Zur Bestimmung des *Turn on* wurden die korrigierten Fluoreszenzspektren der Nullmessung sowie der Endfluoreszenz normiert und im Bereich zwischen $\lambda_{\text{em}} = 452 \text{ nm}$ und 800 nm integriert.

Der *Turn on* wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$Turn\ on = \frac{I_t}{I_0}$$

I_t = Fläche unterhalb des erhaltenen Fluoreszenzspektrums nach vollständigem Umsatz

I_0 = Fläche unterhalb des erhaltenen Fluoreszenzspektrums der Nullpunktmeßung (t_0)

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 wurden die berechneten Integrale unter den Fluoreszenzspektren gegen die Zeit aufgetragen. Da eine Kinetik pseudo-erster Ordnung angenommen wurde, erfolgte die Auswertung über eine monoexponentielle Kurvenanpassung.

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

Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_2 der Reaktion konnte aus der erhaltenen Steigung k_{obs} durch Einbeziehen der Konzentration des Dienophils erhalten werden.

$$k_2 = \frac{k_{obs}}{[Dienophil]}$$

Nachweis von Verbindungen sowie Produkte mittels LC-MS

Verbindung	Molekül-Ion	Berechnete Masse [m/z]	Gefundene Masse [m/z]
Nukleosid 1	[M+H] ⁺	384.1402	384.1395
Tetrazin 13	[M+H] ⁺	237.0883	237.0882
„Click“-Produkt 14	[M+H] ⁺	592.2151	592.2138
Dimer von 1	[M+H] ⁺	767.2703	767.2712
„Click“-Produkt 51	[M] ⁺	1055.2865	1055.2878
Eliminierungsprodukt	[M+H] ⁺	565.0424	565.0472

5 Zellexperimente

Materialien und Reagenzien

Die im Rahmen dieser Arbeit für die Zellkultur und Zellexperimente verwendeten Materialien, Reagenzien und Lösungen wurden kommerziell von den Herstellern *Biozym Scientific*, *Carl Roth*, *Eppendorf*, *Gibco[®]*, *Greiner Bio-One*, *Sigma Aldrich* und *Fisher Scientific* bezogen und, wenn nicht explizit angegeben, ohne weitere Aufreinigung oder Verarbeitung verwendet. Für die Quantifizierung der Zellproliferation sowie der Viabilität von Zellen wurde das *MTT-Zellproliferationskit I* von *Roche* verwendet. Für die Aufreinigung von Ribonukleinsäure (RNA) nach erfolgter TRIzol[®]/Chloroform Extraktion aus Zellen, wurde das *RNA Clean & Concentrator[™]-5 Kit* von *Zymo* verwendet.

Arbeitsbedingungen in der Zellkultur

Die Durchführung aller Zellexperimente erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer *safemate 1.2* Sicherheitswerkbank der Firma *BIOAIR*. Alle Verbrauchsmaterialien, die nicht steril verpackt erworben wurden, wurden vor der Verwendung autoklaviert. Materialien, Geräte und Schutzhandschuhe wurden vor dem Gebrauch mit einer 80 %igen Ethanol-Lösung in Wasser desinfiziert.

Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa Zellen, wt) von der Firma *ATCC*, Vero B4 Zellen (*DSMZ ACC 33*) sowie die humane Zelllinie A549 verwendet. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM, [+] 4.50 g/L D-Glucose, L-Glutamin, [+] Pyruvat, *Gibco[™]*), welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *Gibco[™]*) sowie 60.0 µg/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (1 U/mL P/S, *Gibco[™]*) versetzt wurde, bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchte von 90 % in einem Inkubator der Firma *Binder* kultiviert. Außerdem wurde *ROTI[™] Cell Eagles MEM-Alpha Medium* ohne Glutamin und ohne Nukleoside (No/No-Medium, *Carl Roth*) verwendet, welches mit 10 % dialysiertem FCS (*Gibco[™]*) und 60.0 µg/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (1 U/mL P/S, *Gibco[™]*) ergänzt wurde.

Bei Erreichen einer 80 – 90%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 5.00 ml *Dulbeccos Phosphate Buffered Saline* (DPBS, *Gibco[™]*) gewaschen und anschließend mit 1.00 mL einer 0.25 %igen Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C

inkubiert. Die Trypsinierung wurde im Anschluss durch Zugabe von 9.00 mL Medium gestoppt und die Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für Zellexperimente wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung in 96-well Platten von *Cellstar*, Petrischalen (60 mm/15 mm, *Greiner Bio-One*) oder μ -slides 8- bzw. 18-well (*ibidi GmbH*) überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer.

Zytotoxizitätstest (MTT-Test)

Für MTT-Tests wurden 1×10^5 Zellen/mL in einer 96-well Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in zellspezifischem Medium in den erforderlichen Konzentrationen als Testlösungen hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ L pro well der Testsubstanz behandelt und für 72 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen mit zellspezifischem Medium behandelt. Die äußeren Ränder der 96-well Platte wurden, aufgrund von Austrocknungsgefahr mit DBPS befüllt. Für jede zu testende Konzentration wurden 6 Replikate angefertigt, wovon 3 Replikate jeweils als Farbkontrolle dienten. Nach der Inkubationszeit von 72 Stunden wurde in jedes well der Positivkontrolle sowie der Farbkontrollen 5 μ L einer 20 %igen Triton X-100 Lösung zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 15 μ L MTT-Reagenz zugegeben und die Platte für weitere 3 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ L/well Lysis-Puffer (*solubilization buffer*) behandelt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde die Absorption des Formazans bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm und $\lambda = 550$ nm in einem Microplate Reader ausgelesen. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden die erhaltenen Messwerte innerhalb der Mehrfachbestimmungen gemittelt, die Farbkontrolle abgezogen und die Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden die Messwerte relativ zur Positivkontrolle (0 % Viabilität), die als Nullpunkt diente, und der unbehandelten Negativkontrolle (Referenz für 100 % Viabilität) normiert. Alle anderen Messwerte wurden entsprechend in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

Metabolische Markierung mittels IEDDA in fixierten Zellen

Es wurden 1×10^4 Zellen/well in μ -slides 8-well ausgesät und für 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit mit 100 μ M Nukleosid **1** in DMEM inkubiert. Als Positivkontrolle wurde dem Medium Vinyldesoxyuridin (VdU) in einer Konzentration von 100 μ M zugesetzt. Die eingesetzten Nukleoside wurden ausgehend von Stammlösungen in DMSO mit DMEM auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen

mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde entfernt und die Zellen einmal mit DPBS-Puffer gewaschen, bevor eine 0.5 %ige Triton X-100 Lösung in DPBS-Puffer zugegeben wurde und die Zellen für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS-Puffer gewaschen. Für die IEDDA-Reaktion wurden die Zellen mit 1.00 μ M bzw. 5 μ M des Tetrazin-Farbstoff-Konjugat **15** in DMEM (ausgehend von einer 4 mM Stammlösung in DMSO) über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bevor die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurden, erfolgte eine Färbung des Zellkerns mit Hoechst33342.

Herstellung Fluoreszente Nukleotide

Für SNT-Transporter Experimente sowie für RNA-Extraktion nach metabolischer Markierung mit SNT-Transporter wurde eine äquimolare Menge des entsprechenden Nukleotids (NTP **20** bzw. NTP **43**) mit Tetrazin-Farbstoff-Konjugat **15** in einer „Click“-Reaktion umgesetzt, um das entsprechende fluoreszente Nukleotid (preclicked Nukleotid) zu erhalten. Hierfür wurden zunächst 4 mM Stammlösungen der Nukleotide in Wasser sowie eine 4 mM Stammlösung des Fluorophors **15** in DMSO hergestellt. Die „Click“-Reaktion erfolgte in Wasser mit einem DMSO-Anteil von 1 %. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde der „Click“-Ansatz mittels SpeedVac vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Tricin Puffer auf die entsprechenden Konzentration gebracht.

SNT-Transporter Experimente

Es wurden 1×10^4 bzw. 1.5×10^4 Zellen in μ -slides 8-well ausgesät und 24 Stunden in DMEM bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Tricin Puffer gewaschen und mit einer Lösung von SNT-Transporter (**SNTT1**) und Nukleotid (NTP **20** bzw. NTP **43**) bzw. fluoreszentem Nukleotid (NTP **27** bzw. NTP **52**) in Tricin-Puffer (*Treatment*-Lösung) für 10 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die entsprechenden Konzentrationen können den in Kapitel IV und V beschriebenen Zellexperimenten entnommen werden. Die *Treatment*-Lösung wurde nachfolgend entfernt, die Zellen mit Medium gewaschen und anschließend für unterschiedliche Zeiten in DMEM inkubiert. Die Inkubationszeiten können den in Kapitel V und VI beschriebenen Zellexperimenten entnommen werden. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit SNT-Transporter allein (ohne Nukleotid), mit Nukleotid allein (ohne SNT-Transporter) sowie lediglich mit Tricin Puffer als *Treatment*-Lösung inkubiert.

Im Fall eines Fluoreszenten Nukleotid

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit DRAQ5 (10 µM) in DMEM oder Hoechst33342 in DMEM für 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Zellen mit DMEM gewaschen und anschließend mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde entfernt und die Zellen einmal mit DPBS-Puffer gewaschen, bevor eine 0.5 %ige Triton X-100 Lösung in DPBS-Puffer zugegeben wurde und die Zellen für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS-Puffer gewaschen und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

Im Fall einer „Click“-Reaktion in der Zelle

Im Anschluss an Inkubation wurden die Zellen für 15 min mit 4 % PFA fixiert, mit DPBS-Puffer gewaschen und mit 0.5 %iger Triton X-100 Lösung in DPBS-Puffer permeabilisiert (20 min, Raumtemperatur). Nachdem die Zellen zweimal mit DPBS-Puffer gewaschen wurden, wurde 1 µM bzw. 5 µM des Tetrazin-Farbstoff-Konjugats **15** in DMEM zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellen mit DMEM gewaschen, mit DRAQ5 (10 µM) in DMEM oder Hoechst33342 in DMEM versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Visualisierung der Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit DMEM.

RNA-Extraktion

Es wurden 1.5×10^5 Zellen in Petrischalen (60 mm/15 mm) ausgesät und für 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis eine Konfluenz von 80 – 90 % erhalten wurden. Die metabolische Markierung wurde anschließend wie nachstehend beschrieben durchgeführt, gefolgt von der RNA-Extraktion.

Metabolische Markierung mit Nukleosid

Es wurden 1×10^4 Zellen/well in μ-slides 8-well ausgesät und für 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit mit 100 μM Nukleosid **1** in DMEM inkubiert.

Metabolische Markierung mit TriPPPPro:

Für die metabolische Markierung mit TriPPPPro **30** wurde das Medium von DMEM zu einem serumsfreien Medium gewechselt (VP-SFM, *Gibco™*) und anschließend TriPPPPro **30** (5 μM, aus 4 mM Stammlösung in DMSO) in VP-SFM zugegeben. Das TriPPPPro Medium wurde nach 2 Stunden erneuert und die Zellen für weitere 2 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen ohne TriPPPPro **30** mit der entsprechenden Menge DMSO in VP-SFM inkubiert.

Metabolische Markierung mit SNT-Transporter:

Für die metabolische Markierung mit SNT-Transporter (BioTracker NTP, *Sigma Aldrich*) wurden die Zellen mit Tricin Puffer gewaschen und anschließend mit einer äquimolaren Lösung von SNT-Transporter und Nukleotid (NTP **20** bzw. **43**) bzw. preclicked Nukleotid (NTP **27** bzw. NTP **52**) in Tricin Puffer (*Treatment-Lösung*) für 10 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurde die *Treatment-Lösung* entfernt, die Zellen einmal mit DMEM gewaschen und anschließend in DMEM für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Tricin-Puffer ohne SNT-Transporter und Nukleotid inkubiert.

RNA-Extraktion

Für die Extraktion der zellulären RNA wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Zugabe von 2 mL TRIzol® (*Invitrogen*, 1 mL pro 10 cm²) lysiert. Das erhaltene Zelllysat wurde in Mikroreaktionsgefäße der Firma *Eppendorf* überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μL Chloroform pro 1 mL Zelllysat. Nach einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur, wurde das Gemisch bei einer Temperatur von

4 °C und 12 000 x g für 15 min zentrifugiert, wobei ein Dreiphasensystem erhalten wurde. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und anschließend unter Verwendung des RNA Clean & Concentrator Kits aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach der Herstelleranweisung. Zur Elution der RNA wurden 10 µL RNase- und DNase freies Wasser verwendet.

„Click“-Reaktion isolierter RNA

Für die IEDDA-Reaktion wurde die isolierte RNA mit 5 µM des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** in RNase- und DNase-freiem Wasser über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Hierfür wurde zunächst eine 4 mM Stammlösung des Tetrazin-Fluorophor-Konjugats **15** in DMSO hergestellt. Um unreagierten Farbstoff zu entfernen, wurde die RNA erneut unter Verwendung des RNA Clean & Concentrator Kits aufgereinigt und mit 10 µL RNase- und DNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA wurde an einem *ND-100* Spektrometer der Firma *NanoDrop Technologies LLC* bestimmt und die Nukleotid-Konzentration basierend auf der mittleren Nukleotidmasse berechnet. Anschließend wurde die isolierte RNA fluoreszenzspektroskopisch untersucht ($\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm, slits: 5 nm für Anregung und Emission).

IX. Abkürzungsverzeichnis

1-MCP	1-Methylcyclopropen
2'azaA	2'-Azidadenosin
2-EA	2-Ethynyladenosin
2-VA	2-Vinyladenosin
3H-dU	³ H-2'-Desoxyuridine
3H-U	³ H-Uridine
7-dVA	7-Deazavinyladenosin
7-EAA	7-Ethynyl-8-aza-7-deazaadenosin
AB	Acyloxybenzyl
abs.	Absolut
ActD	Actinomycin D
AmdU	5-(Azidmethyl)-2'-desoxyuridin
AMU	5-Azidmethyluridin
APU	5-Azidpropyluridin
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
ATU	Azid-propargyloxy-tetraethylen-glycoluridine
BARAC	Biarylazacyclooctin
BCN	Bicyclo[6.1.0]non-4-in
ber.	berechnet
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BrU	5-Bromuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCO	<i>cis</i> -Cycloocten
COT	Cyclooctin
CSSB	Centre for Structural Systems Biology
CTP	Cytidintriprophosphat
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, engl. <i>copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
CuI	Kupferiodid
d	Dublett
DBPO	Dibenzoylperoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIBAC	Aza-dibenzocyclooctin

DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DiPPro	Diphosphat-Pronukleotid
DLS	dynamischer Lichtstreuung, engl. <i>dynamic light scattering</i>
DMEM	Zellmedium, engl. <i>Dubelcco's modified eagles medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	5-Ethynylcytidin
EdA	7-Deaza-7-ethynyl-2'-desoxyguanosin
EdC	5-Ethynyl-2'-desoxycytidin
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
engl.	Englisch
ESI	Elektronensprayionisation
et al.	Und andere, <i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
EU	5-Ethynyluridin
F-ara-EdU	(2'S)-Desoxy-2'-fluor-5-ethynyluridin
FCS	Fetales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FLIM	Floreszenzlebensdauer-Mikroskopie, engl. <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie, engl. <i>fourier-transform infrared spectroscopy</i>
gef.	gefunden
GEM	Gemcitabin
GMP	Gemcitabin-Monophosphat
h	Stunde
HeLa	Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie (Henrietta Lacks)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital, engl. <i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HSV-TK	Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase
Hz	Hertz
IEDDA	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf, engl. <i>inverse electron-demand Diels-Alder reaction</i>
IOH-NP	anorganisch-organische-Hybridnanopartikel
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante

k	Geschwindigkeitskonstante
kJ	Kilojoule
L	Liter
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, engl. <i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>
LED	Leuchtdiode, engl. <i>light emitting diode</i>
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital, engl. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	Molarität
m	Multiplett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, engl. <i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MEM	Synthetisches Zellkulturmedium, engl. <i>minimum essential medium</i>
MeOH	Methanol
Mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N6PA	N ⁶ -Propylazidoadenosin
NBS	N-Bromsuccinimid
NCS	N-Chlorsuccinimid
NDP	Nukleosiddiphosphat
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMI	N-Methylimidazol
NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	Kernsprinresonanz, engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
norm.	normiert
NTP	Nukleosidtriphosphat
p	Pentett
p.a.	für analytische Zwecke, <i>pro analysi</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösungen, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibenzylideneaceton)dipalladium(0)
PDAC Zelllinie	Pankreaskarzinom-Zelllinien, engl. <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PEX	Primer-Verlängerung, engl. <i>primer extension</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PINK	engl. <i>probe for imaging nucleosidic alkene groups</i>
POCl ₃	Phosphoroxychlorid

ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
quant.	Quantitativ
RICK-Methode	engl. <i>capture of the newly transcribed RNA interactome using click chemistry</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
RP	Umkehrphase, engl. <i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s	Singulett
SARS-CoV-2	Schwerers-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus 2, engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Rasterelektronenmikroskopie, SEM, engl. <i>scanning electron microscopy</i>
SNTT	Synthetischer Nukleosidtriphosphat-Transporter, engl. <i>synthetic nucleoside triphosphate transporter</i>
SPAAC	Ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition, engl. <i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>
t	Triplet
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMS-Cl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TCO	<i>trans</i> -Cycloocten
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEA-Salz	Triethylammoniumsalz-Salz
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
TMP	Trimethylphosphat
TMS	Trimethylsilyl
ToF	Flugzeitmassenspektrometer, engl. <i>time-of-flight mass spectrometer</i>
TriPPPPro	Triphosphat Pronukleotid
Tyr	Tyrosin
Tz	Tetrazin
ü.N.	Über Nacht
UCK	Uridin-Cytidin Kinase
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolet
VdA	5-Vinyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin
VdU	5-Vinyl-2'-desoxyuridin

Vis	Sichtbar, engl. visible
VU	5-Vinyluridin
z.B.	Zum Beispiel
δ	Chemische Verschiebung
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge

X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Menschen bedanken, die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit und darüber hinaus unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht. Ich möchte mich bei Ihnen für Ihre stetige Unterstützung und die ausgewogene Balance aus notwendigem Freiraum und wertvoller, zielgerichteter Betreuung während meiner Promotion bedanken. Besonders schätze ich Ihr großes Vertrauen in mich und meine Arbeit sowie die Möglichkeit eigene Ideen einzubringen und umsetzen zu können. Bedanken möchte ich mich auch für die schöne und bereichernde Zeit im AKW die durch die gemeinsamen AK-Retreats in Obergurgl, die unterschiedlichsten AK-Ausflüge sowie den ein oder anderen gemeinsamen Aperol geprägt war.

Als nächstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Ute Schepers für die Zweitkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Chris Meier und Prof. Dr. Jens Bosse für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes in Hamburg und die wertvolle Kooperation und Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank, dem Graduiertenkolleg 2039. Der wertvolle interdisziplinäre Austausch sowie die vielfältigen Möglichkeiten zur Weiterbildung haben mir sehr dabei geholfen, mich fachlich sowie persönlich weiterzuentwickeln.

Zudem möchte ich mich bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen bedanken. Ihr habt die Zeit im AKW durch eure herzliche und hilfsbereite Art zu etwas ganz Besonderem gemacht. Vielen Dank für die unzähligen schönen Mittagspausen, Aperol-Abende, Feiern, AK-Ausflüge und vieles mehr!

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

Dr. Andreas Rapp und Lara Hirsch sowie der gesamten analytischen Abteilung des IOC für die zahlreichen analytischen Messungen und die tatkräftige Unterstützung bei allen Problemen.

Claudia Sommer und Ariane Kahl für die Unterstützung bei allen bürokratischen und organisatorischen Problemen und eure unfassbar herzliche, offene sowie positive Art. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr habt.

Danksagung

Annette Hochgesand für die unzähligen MALDI-Messungen, die Unterstützung bei Bestellungen und die vielen Anliegen, bei denen du mir stets geholfen hast. Vielen Dank, für die schönen Gespräche, vor allem früh morgens, wenn wir mit die einzigen im AKW waren, und für deine herzliche Art.

Julian Brückel, Lisa Rieger, Nicola Seul und Lara Fugger für das sorgfältige und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank, dass ihr euch trotz eures stressigen Alltags die Zeit genommen habt, mich dabei zu unterstützen.

Außerdem möchte ich mich von Herzen bei Iven und Dörte bedanken, den besten Kooperationspartnern überhaupt. Ich schätze die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung sehr und bin dankbar dafür, wie herzlich ihr mich in Hamburg aufgenommen habt.

XI. Anhang

1 Anhang zu Kapitel V

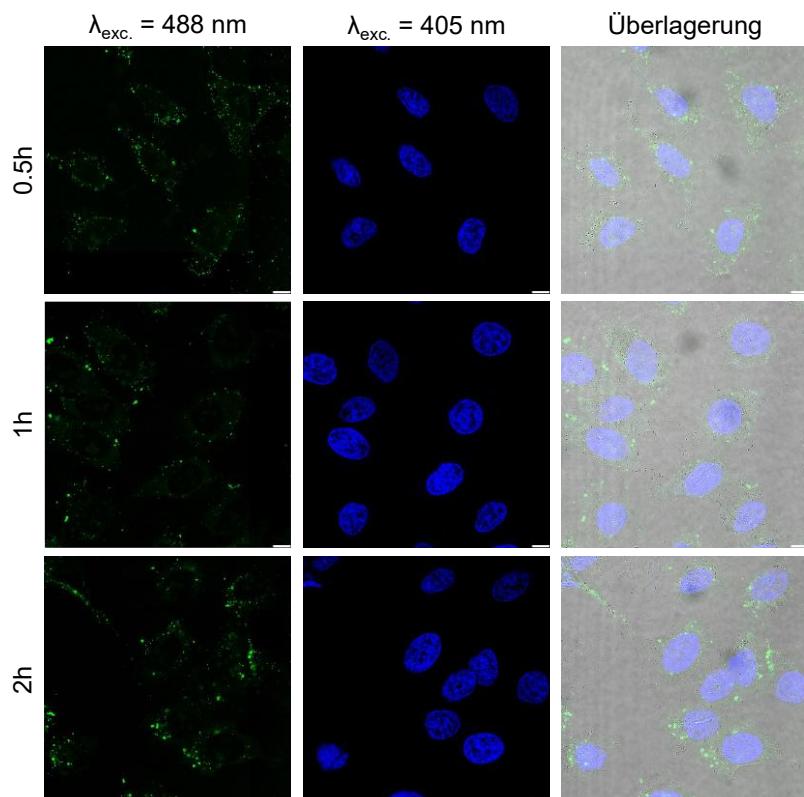


Abbildung 52: SNTT1-vermittelte bioorthogonale Markierung von RNA in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit NTP 27 und SNTT1 ($10 \mu\text{M}$) in Tricin Puffer für 10 min und anschließend in Medium für 0.5 h, 1 h, 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Zellen erfolgte nach Inkubation mit Hoechst für 5 min über konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Fluorophor 15 (grün): $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, 10 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$; Hoechst (blau): $\lambda_{\text{exc.}} = 405 \text{ nm}$, 5 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 450 - 500 \text{ nm}$). Maßstab: 10 μm .

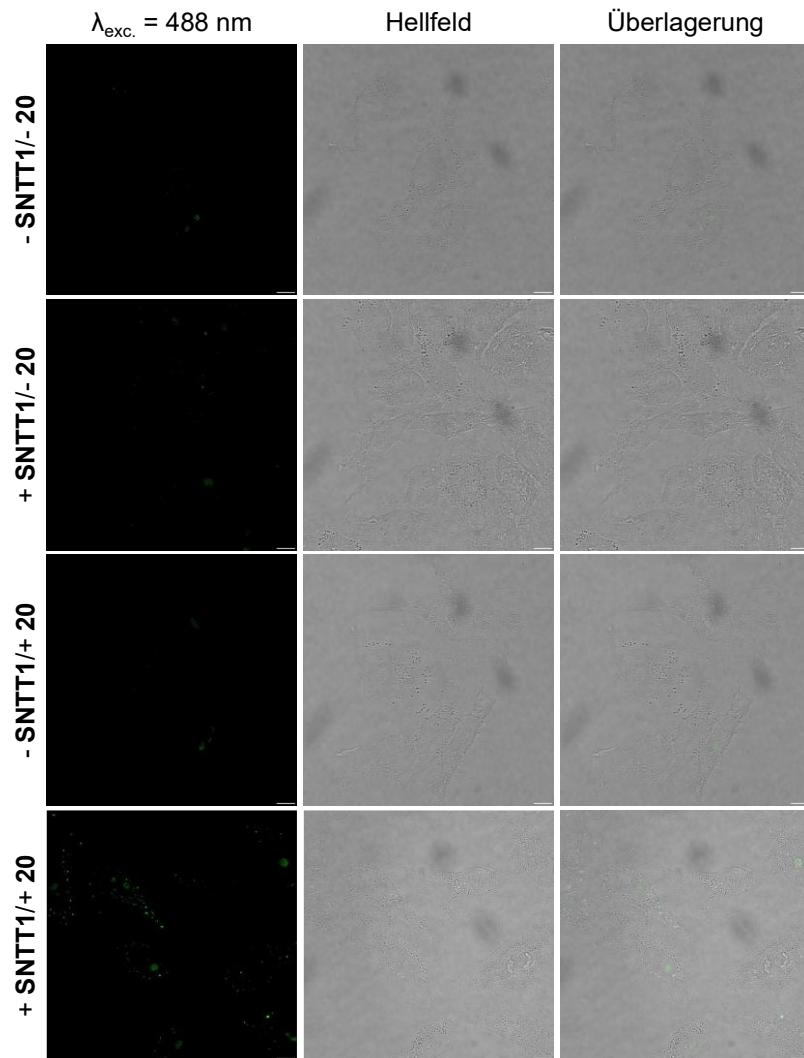


Abbildung 53: SNTT1-vermittelte bioorthogonale Markierung von RNA in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit NTP **20** und SNTT1 (10 μM) in Tricin Puffer für 10 min und anschließend in Medium für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Zellen erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Fluorophor **15** (grün): $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$, 10 % Laserintensität, $\lambda_{\text{em}} = 500 – 550 \text{ nm}$). Maßstab: 10 μm .

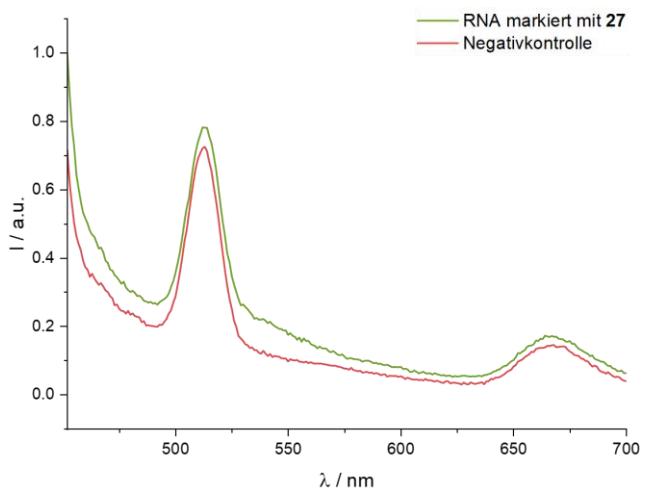


Abbildung 54: Fluoreszenzspektren von mit NTP 27 markierter isolierter zellulärer RNA sowie unmarkierter Kontroll-RNA. $\lambda_{\text{exc}} = 437 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 452 - 800 \text{ nm}$, Slits: 5 nm, 20 °C.

2 Anhang zu Kapitel VI

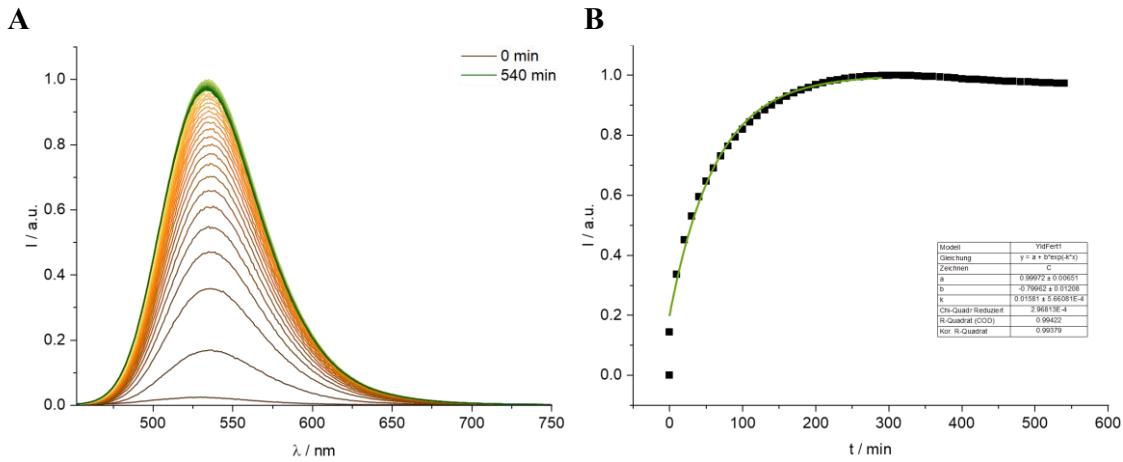


Abbildung 55: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der IEDDA-Reaktion zwischen dem BCN-modifizierten NTP **45** und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15**. A) Anstieg der Fluoreszenzintensität im Verlauf der IEDDA-Reaktion zwischen NTP **45** (200 µM) und Fluorophor **15** (20 µM) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm zwischen 452 - 750 nm bei 20 °C und Slits 2.5 nm. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Zeitintervall von 10 min für 9 h. B) Kinetische Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit t. Exponentielle Anpassungsfunktion: $y = a+b \cdot \exp(-kx)$.

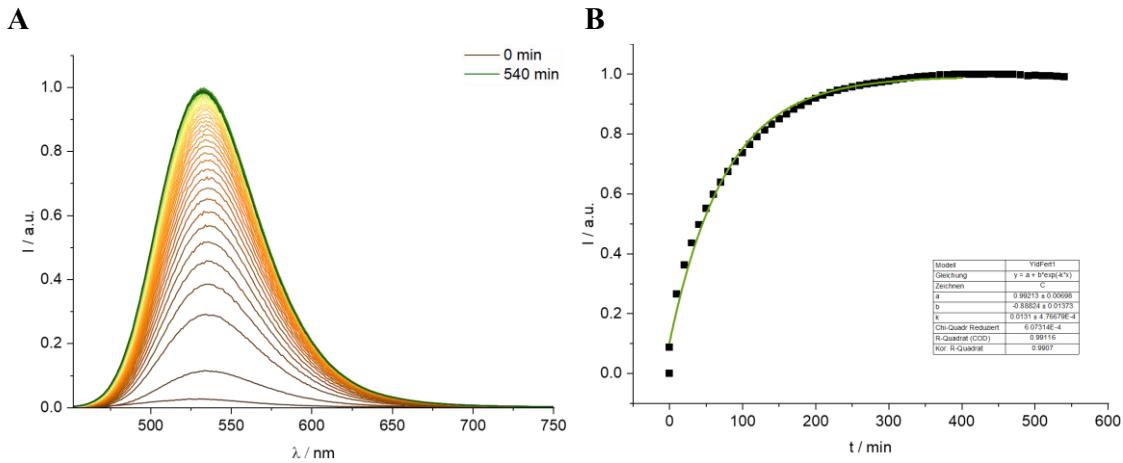


Abbildung 56: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der IEDDA-Reaktion zwischen dem BCN-modifizierten NTP **43** und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15**. A) Anstieg der Fluoreszenzintensität im Verlauf der IEDDA-Reaktion zwischen NTP **43** (200 µM) und Fluorophor **15** (20 µM) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm zwischen 452 - 750 nm bei 20 °C und Slits 2.5 nm. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Zeitintervall von 10 min für 9 h. B) Kinetische Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit t. Exponentielle Anpassungsfunktion: $y = a+b \cdot \exp(-kx)$.

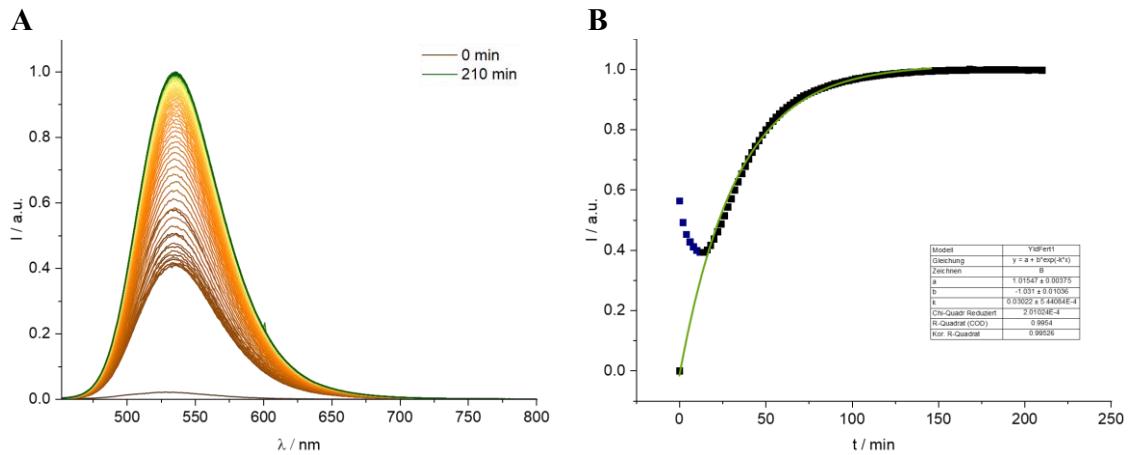


Abbildung 57: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der IEDDA-Reaktion zwischen dem TCO-modifizierten NTP **42** und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15**. A) Anstieg der Fluoreszenzintensität im Verlauf der IEDDA-Reaktion zwischen NTP **42** (200 μ M) und Fluorophor **15** (20 μ M) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm zwischen 452 - 750 nm bei 20 °C und Slits 2.5 nm. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Zeitintervall von 2 min für 3.5 h. B) Kinetische Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit t. Exponentielle Anpassungsfunktion: $y = a+b \cdot \exp(-kx)$.

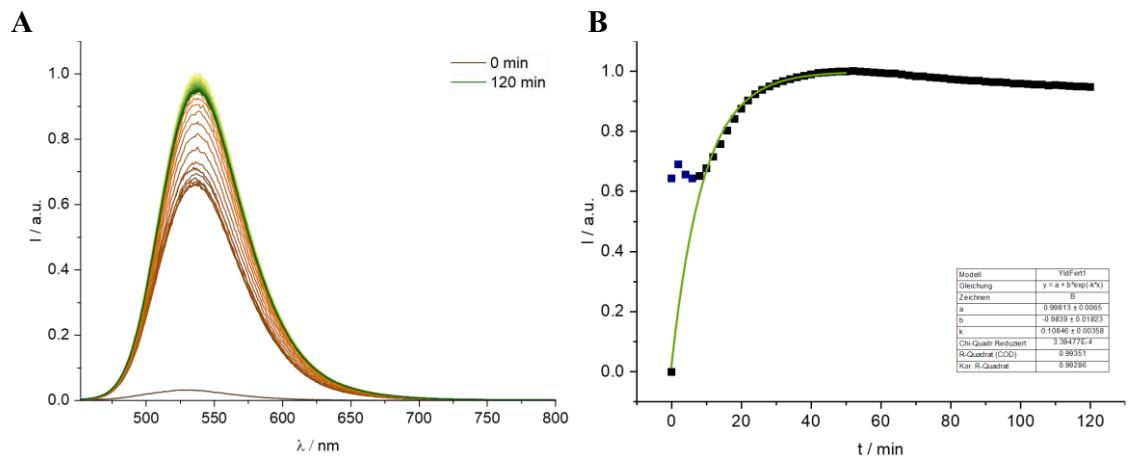


Abbildung 58: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der IEDDA-Reaktion zwischen dem TCO-modifizierten NTP **44** und dem Tetrazin-Fluorophor-Konjugat **15**. A) Anstieg der Fluoreszenzintensität im Verlauf der IEDDA-Reaktion zwischen NTP **44** (200 μ M) und Fluorophor **15** (20 μ M) in Wasser/DMSO (99:1 v/v%) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 437$ nm zwischen 452 - 750 nm bei 20 °C und Slits 2.5 nm. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in einem Zeitintervall von 2 min für 2 h. B) Kinetische Auftragung der integrierten Fluoreszenzintensität gegen die Reaktionszeit t. Exponentielle Anpassungsfunktion: $y = a+b \cdot \exp(-kx)$.

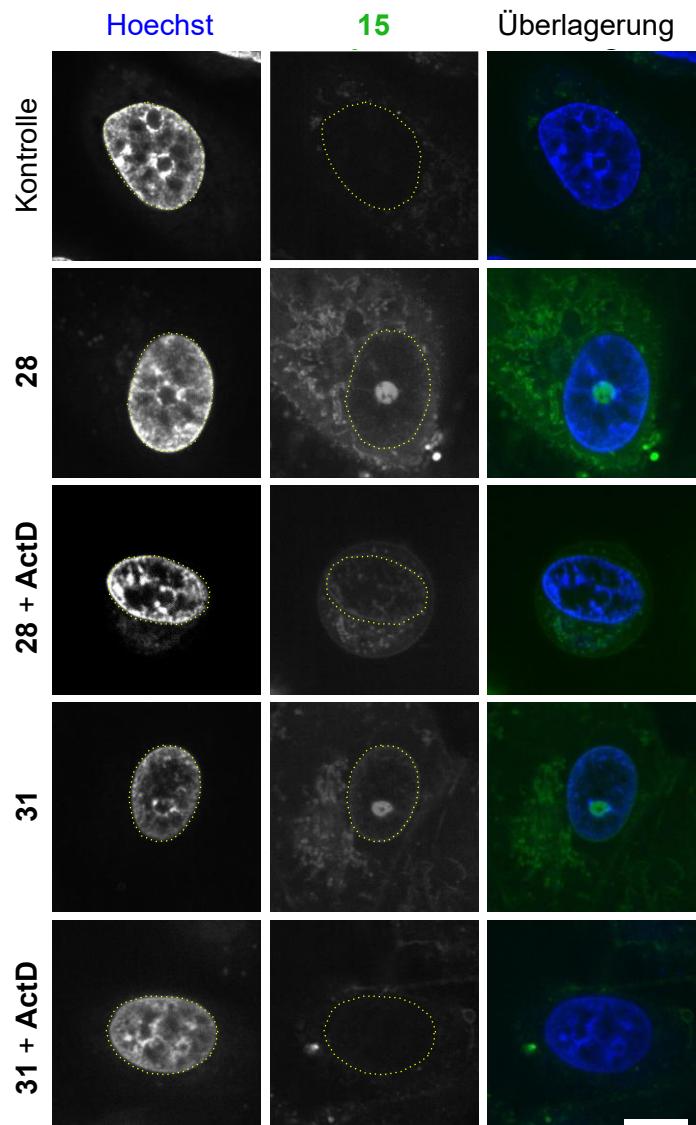


Abbildung 59: Bioorthogonale Markierung neu synthetisierter RNA unter Verwendung der 2TCO_a- und BCN-modifizierten TriPPPPro **28** und **31**. Vero-Zellen wurden mit VP-SFM gewaschen und anschließend für 3 h mit 5 µM TriPPPPro sowie mit bzw. ohne Actinomycin D (ActD) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit VP-SFM gewaschen und ActD wurde, wenn angegeben, erneut zugegeben. Nach Inkubation mit Tetrazin-Fluorophor Konjugat **15** für 30 min zur Visualisierung TriPPPPro markierter RNA (grün) wurden die Zellen mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gegenfärbt (blau). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (80 % Intensität, 600 ms Expositionszeit). Die Detektion erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von Hoechst erfolgte mit einem 405 nm Laser (50 % Intensität, 200 ms Expositionszeit). Die Detektion erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 400 - 550$ nm. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht umrandet (gelbe gestrichelte Linie). Maßstab: 10 µm. Abbildung zur Verfügung gestellt von D. Stalling (CSSB Hamburg).

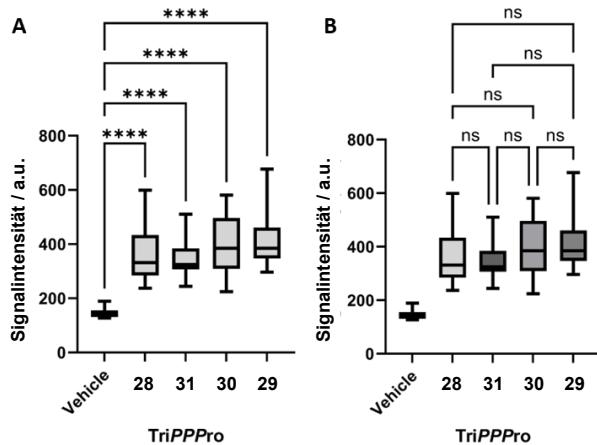


Abbildung 60: Signalintensitäten der Nukleoli nach Behandlung mit TriPPPro. A) Vergleich der Signalintensitäten der Nukleoli zwischen Vehikel behandelten und mit TriPPPro behandelten Zellen. B) Vergleich der Signalintensität der Nukleoli in Zellen, die mit verschiedenen TriPPPro behandelt wurden. Die Signalintensitäten wurden in mindestens 20 Nukleolen pro Bedingung gemessen. Die Boxplots stellen den Median und den Interquartilsabstand dar. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließend mit dem Dunn-Test für multiple Vergleiche bewertet. Signifikanzkennzeichnung: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) $, p < 0,0001$ (****).

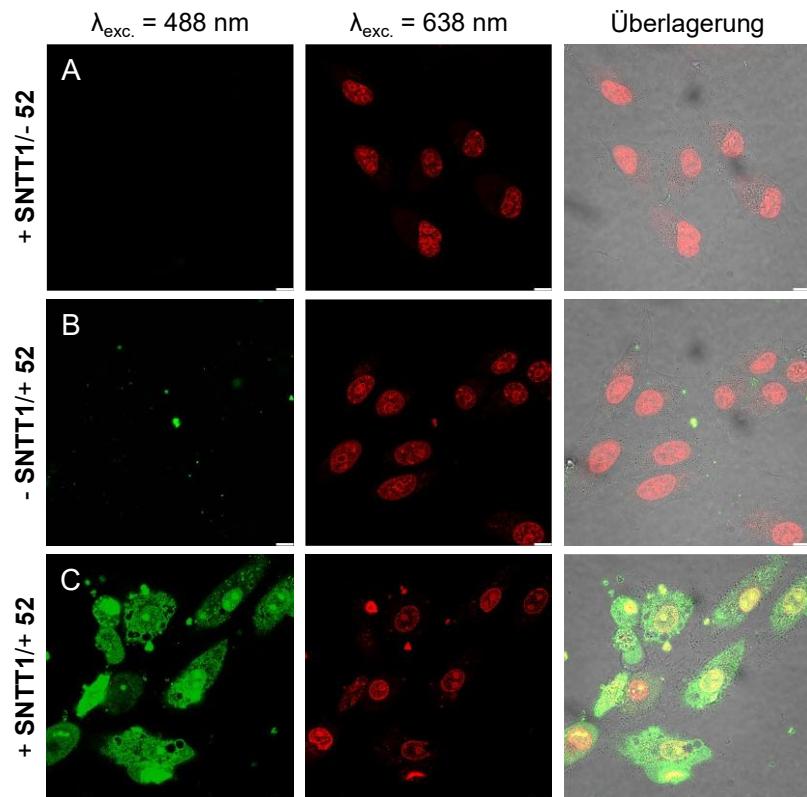


Abbildung 61: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. B) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit NTP 52 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP 52 und SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lebend mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegengefärbt (rot). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$. Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700 \text{ nm}$. Maßstab: 10 μm .

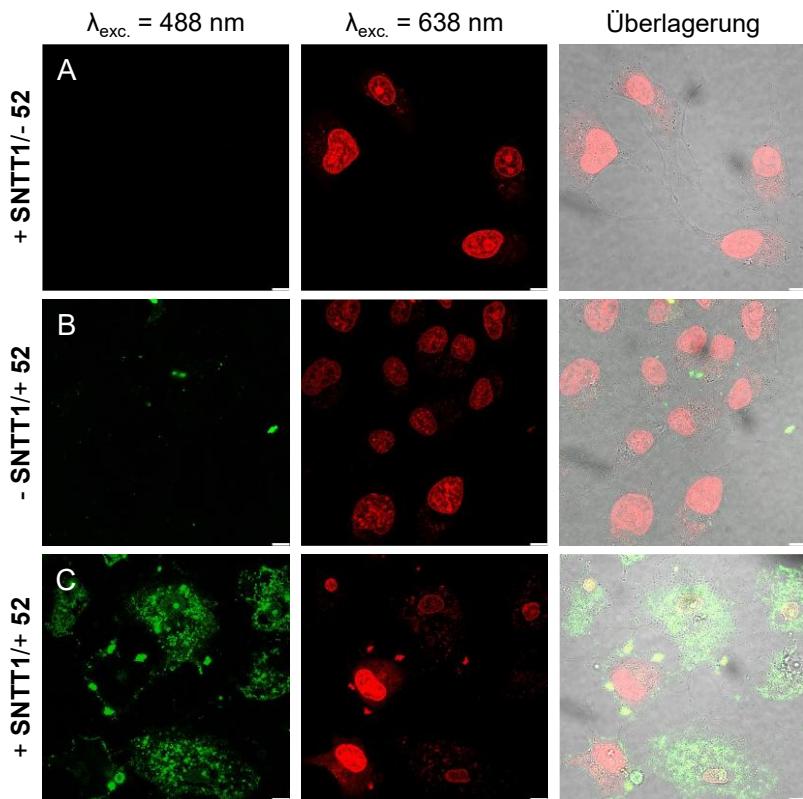


Abbildung 62: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. B) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit NTP 52 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP 52 und SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lebend mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegenfärbt (rot). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 - 550 \text{ nm}$. Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700 \text{ nm}$. Maßstab: 10 μm .

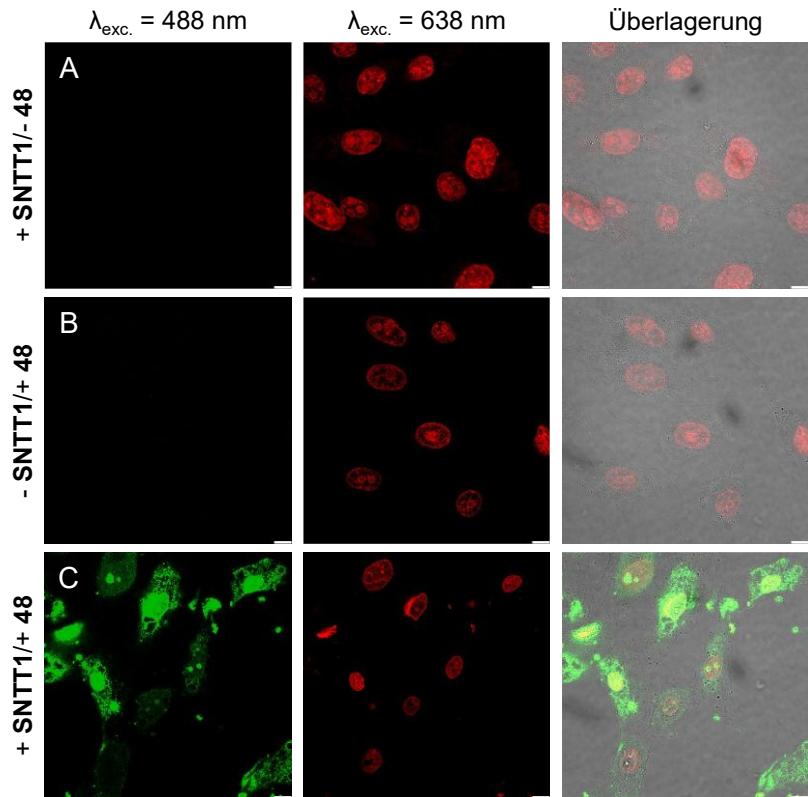


Abbildung 63: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. B) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit NTP 52 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP 52 und SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (inklusive Negativkontrollen) mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegengefärbt (rot). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 500 – 550 \text{ nm}$. Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 – 700 \text{ nm}$. Maßstab: 10 μm .

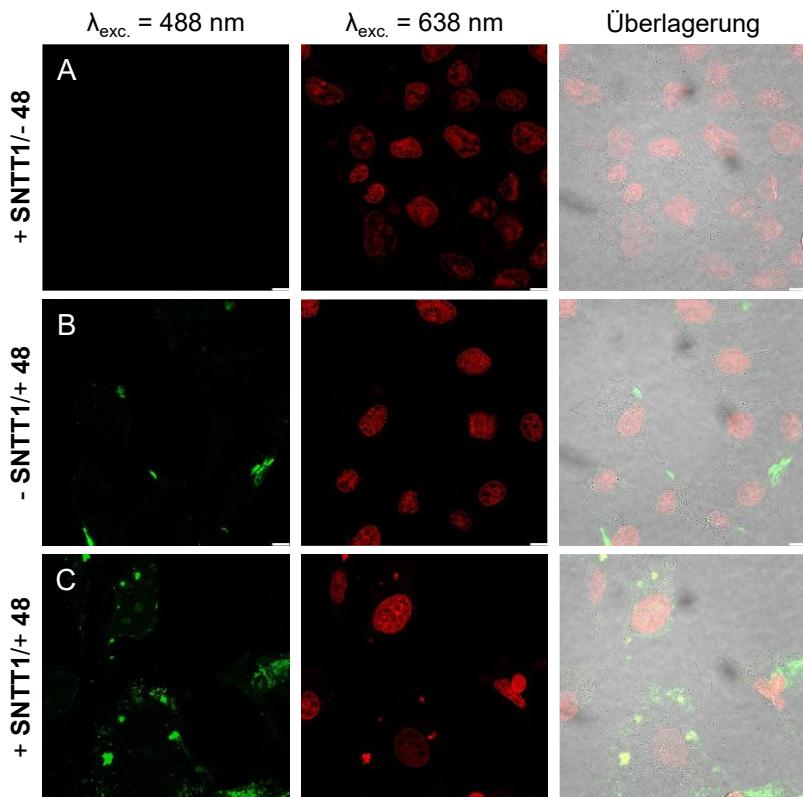


Abbildung 64: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit **SNTT1** (60 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. B) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit NTP **52** (60 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP **52** und **SNTT1** (60 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (inklusive Negativkontrollen) mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gegengefärbt (rot). Die Detektion markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{em} = 500 - 550$ nm. Die Detektion von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{em} = 650 - 700$ nm. Maßstab: 10 μ m.

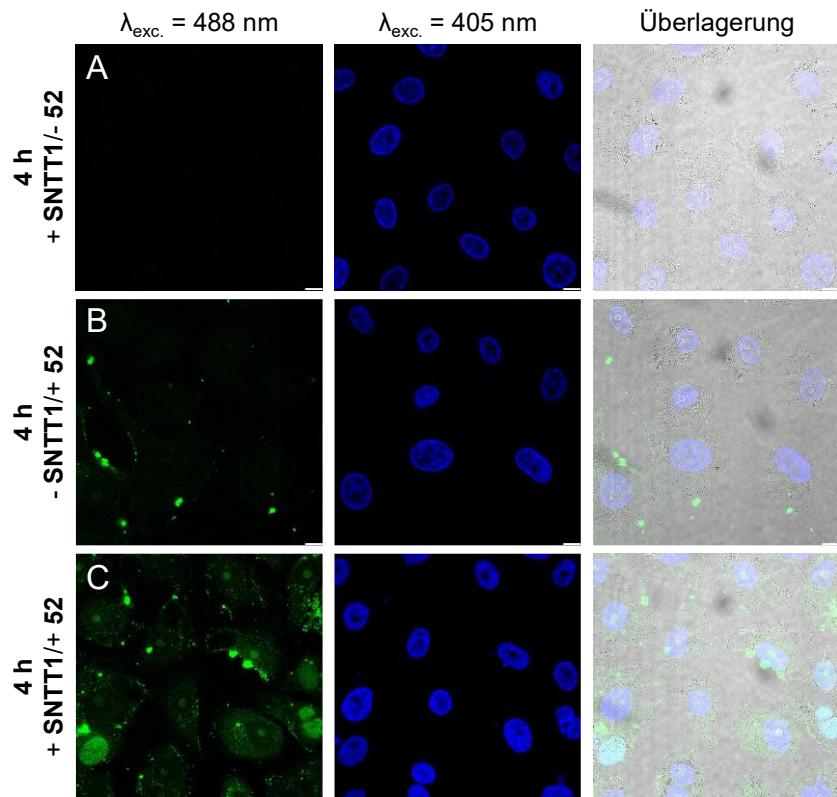


Abbildung 65: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit 35 μ M SNTT1 in Tricin Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. B) Vero-Zellen wurden mit 35 μ M NTP 52 in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP 52 und SNTT1 (35 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (inklusive Negativkontrollen) mit PFA fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DPBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Leica DMI8, TCS SP8 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv ausgestattet ist, mikroskopiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gegenfärbt (blau). Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion markierter RNA erfolgte zwischen $\lambda_{em} = 500 - 550$ nm. Die Anregung von Hoechst erfolgte mit einem 405 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von Hoechst erfolgte zwischen $\lambda_{em} = 400 - 550$ nm. Maßstab: 10 μ m.

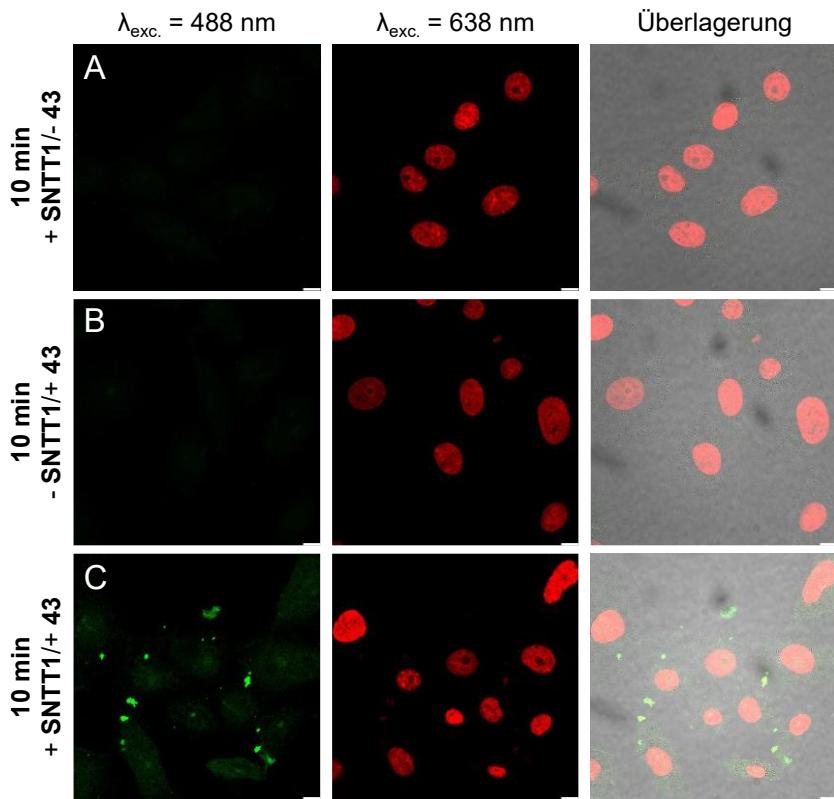


Abbildung 66: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit 60 μ M **SNTT1** in Tricin Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. B) Vero-Zellen wurden mit 60 μ M NTP **43** in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP **43** und SNTT1 (60 μ M) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 10 min in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (inklusive Negativkontrolle) mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit 5 μ M des Tetrazin-Fluorophor Konjugats **15** über Nacht in DMEM inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit DRAQ5 gegengefärbt (rot) und die Zellen mit einem Leica DMI8, TCS SP8 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv ausgestattet ist, mikroskopiert. Die Zellkerne Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 - 700$ nm. Maßstab: 10 μ m.

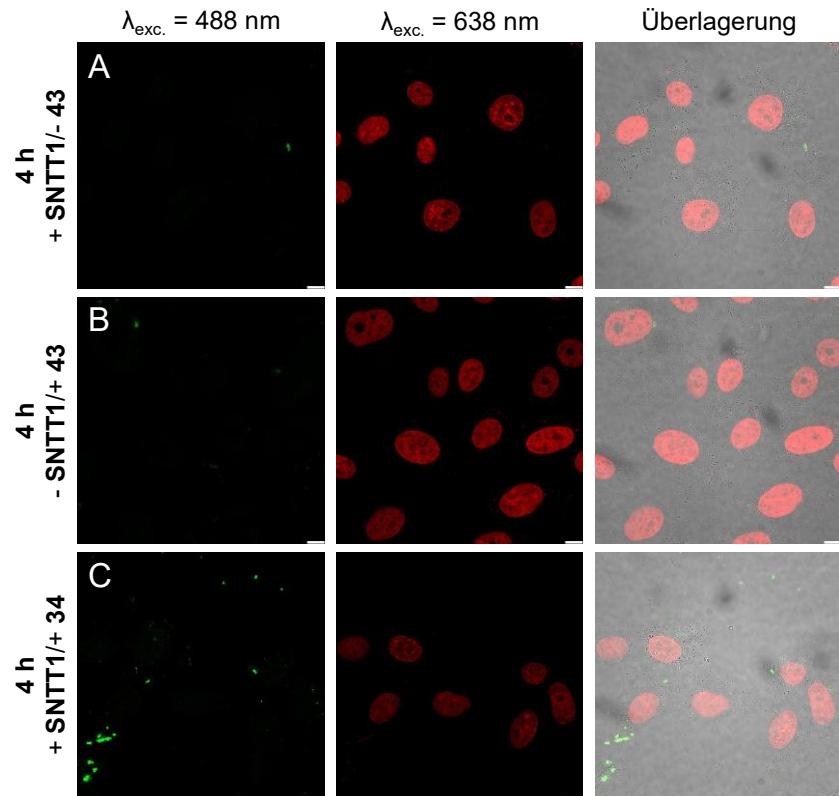


Abbildung 67: SNT-Transporter vermittelte Markierung von RNA in Vero-Zellen. A) Negativkontrolle: Vero-Zellen wurden mit 60 μM SNTT1 in Tricin Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. B) Vero-Zellen wurden mit 60 μM NTP 43 in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. C) Vero-Zellen wurden mit NTP 43 und SNTT1 (60 μM) in Tricin-Puffer für 10 min und anschließend für 4 h in DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen (inklusive Negativkontrolle) mit PFA fixiert, permeabilisiert und mit 5 μM des Tetrazin-Fluorophor Konjugats **15** über Nacht in DMEM inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit DRAQ5 gegenfärbt (rot) und die Zellen mit einem Leica DMI8, TCS SP8 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 Objektiv ausgestattet ist, mikroskopiert. Die Zellkerne Die Anregung markierter RNA erfolgte mit einem 488 nm Laser (10 % Intensität). Die Anregung von DRAQ5 erfolgte mit einem 638 nm Laser (10 % Intensität). Die Detektion von DRAQ5 erfolgte zwischen $\lambda_{\text{em}} = 650 – 700 \text{ nm}$. Maßstab: 10 μm .

3 Anhang zu Kapitel VII

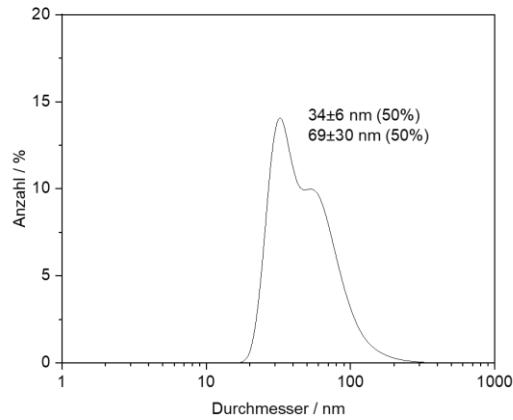


Abbildung 68: Charakterisierung der $[ZrO]_2[NTP43]$ IOH-NP. Partikelgrößenverteilung , bestimmt mittels DLS und SEM.

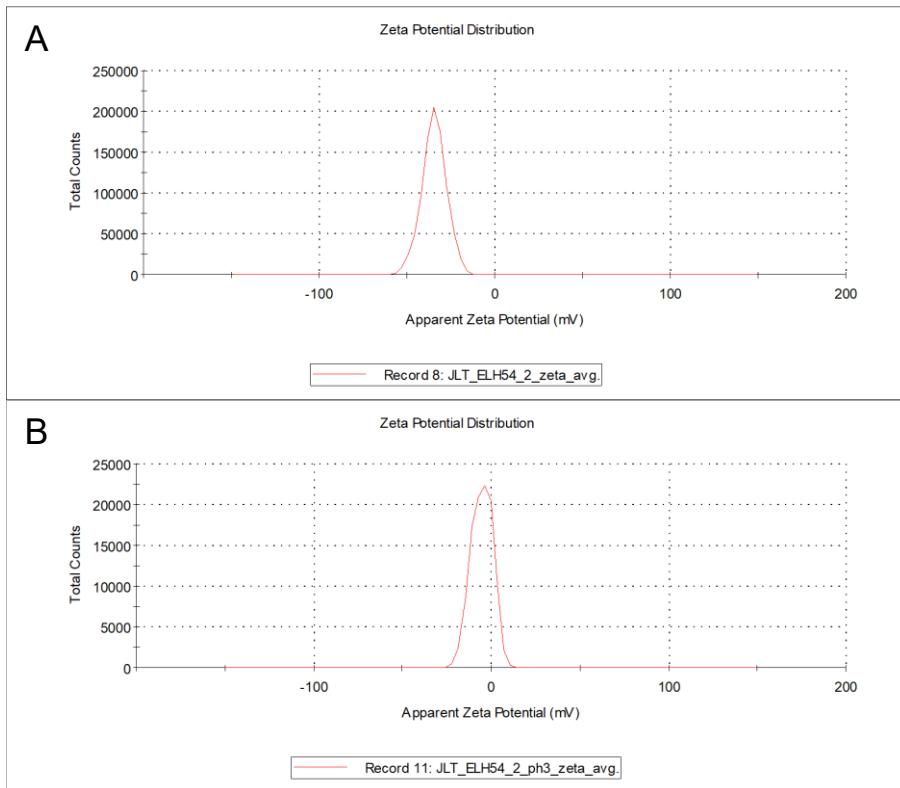


Abbildung 69: Zeta-Potenzial der synthetisierten IOH-NP $[ZrO]_2[NTP45]$ bei unterschiedlichen pH-Werten. A) Bei pH = 7 wird ein Zeta-Potenzial von -34.6 ± 6 mV erhalten. B) Bei pH = 3 wird ein Zeta-Potenzial von -5.2 ± 6 mV erhalten.

4 Anhang zu Kapitel VIII

Verbindung 10

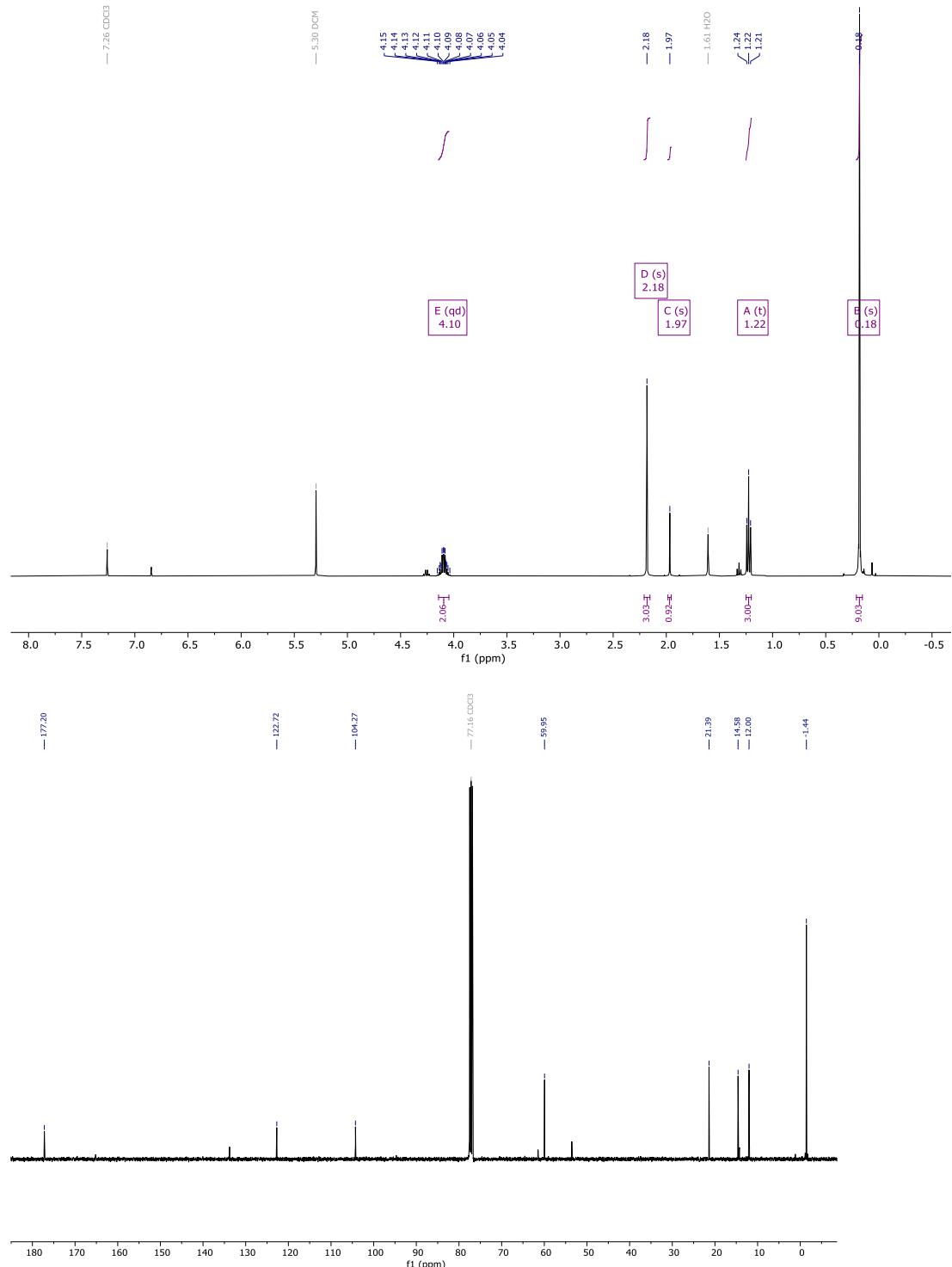


Abbildung 70: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 10.

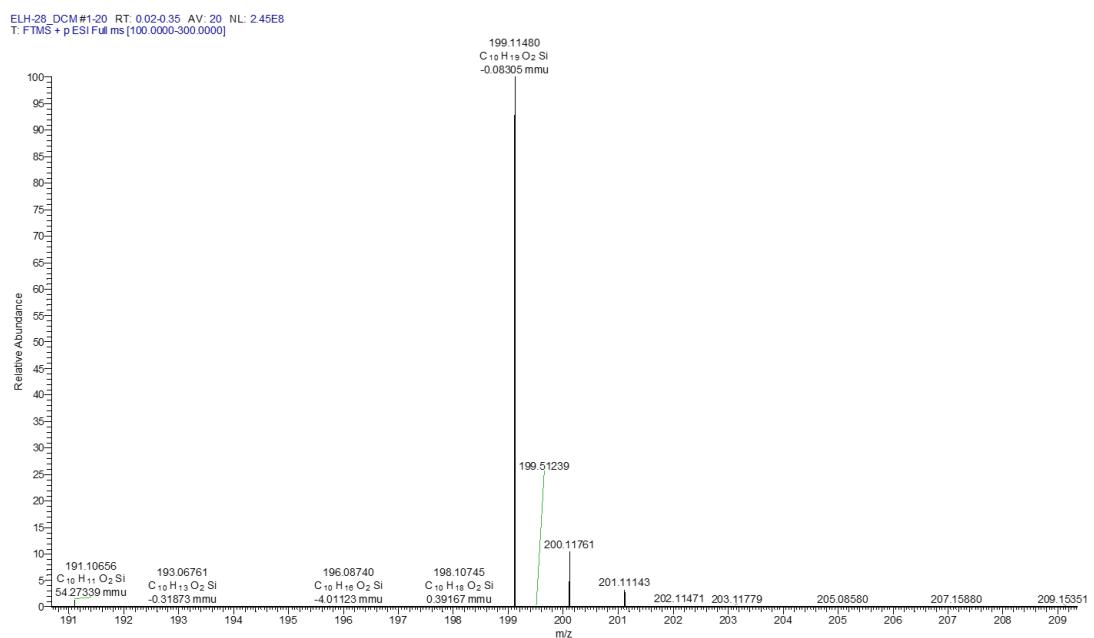


Abbildung 71: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 10.

Verbindung 11

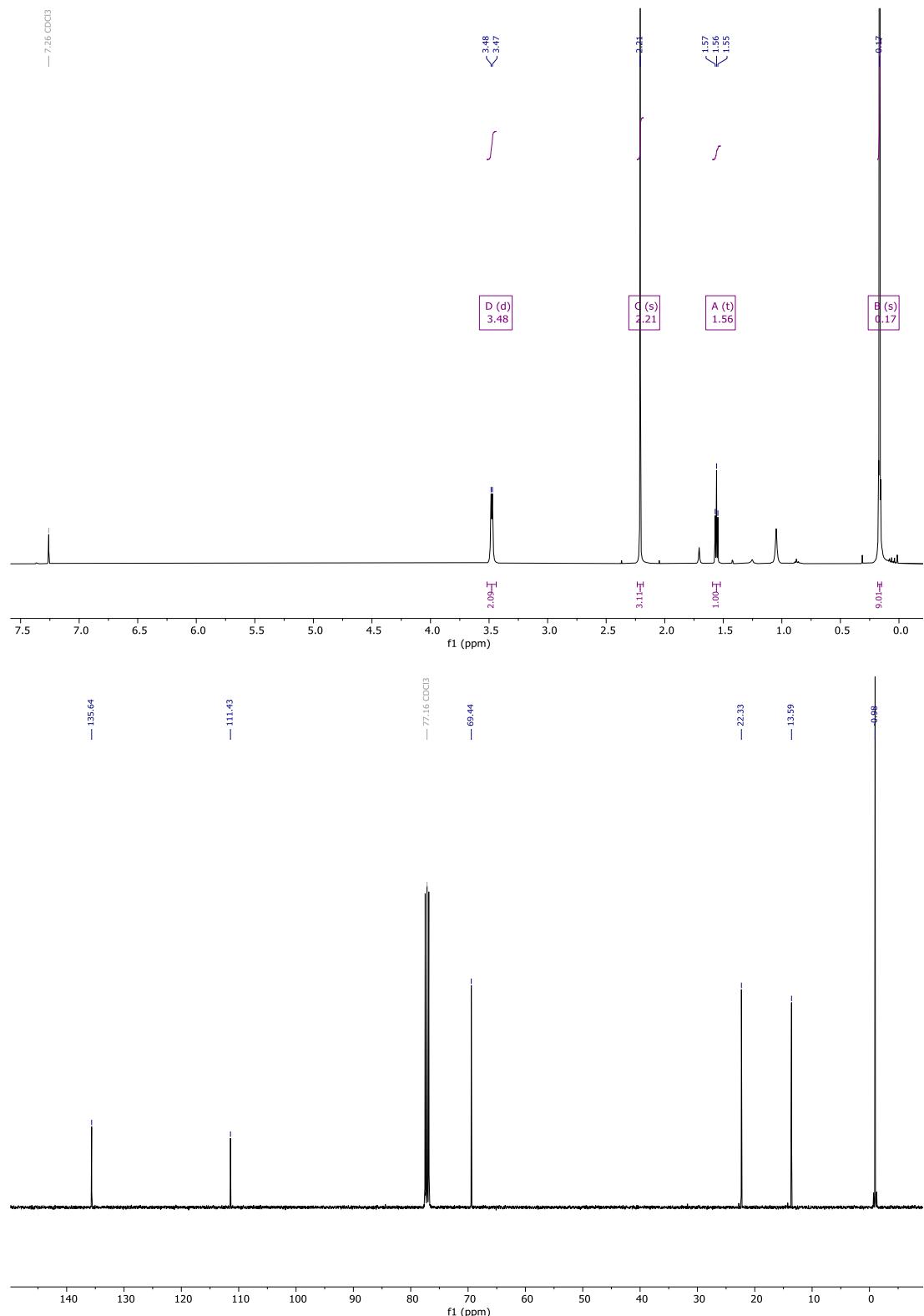


Abbildung 72: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 11.

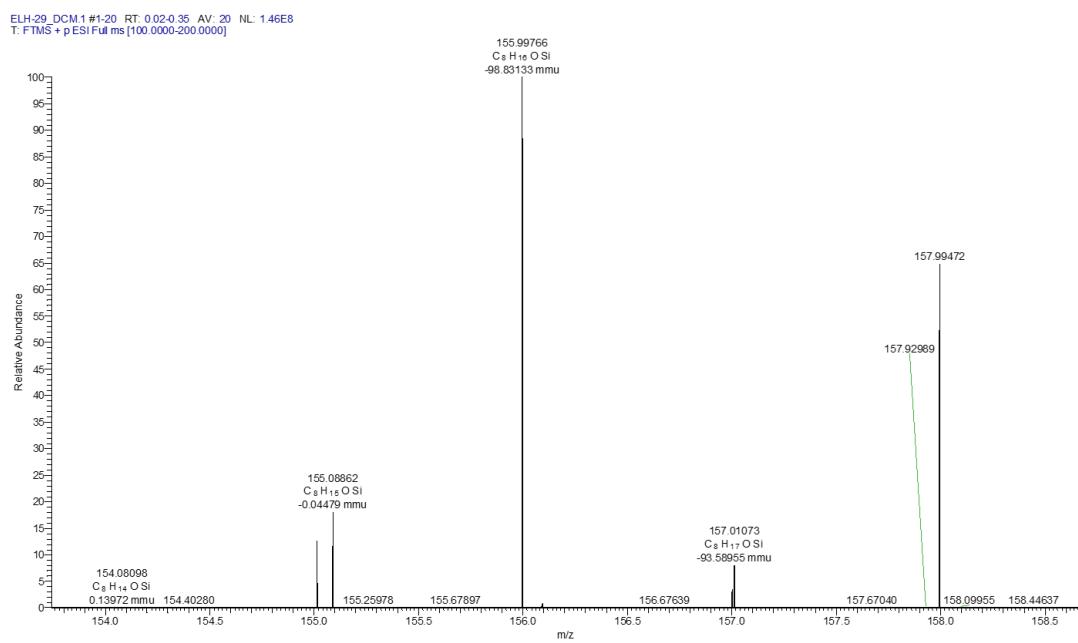


Abbildung 73: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 11.

Verbindung 3

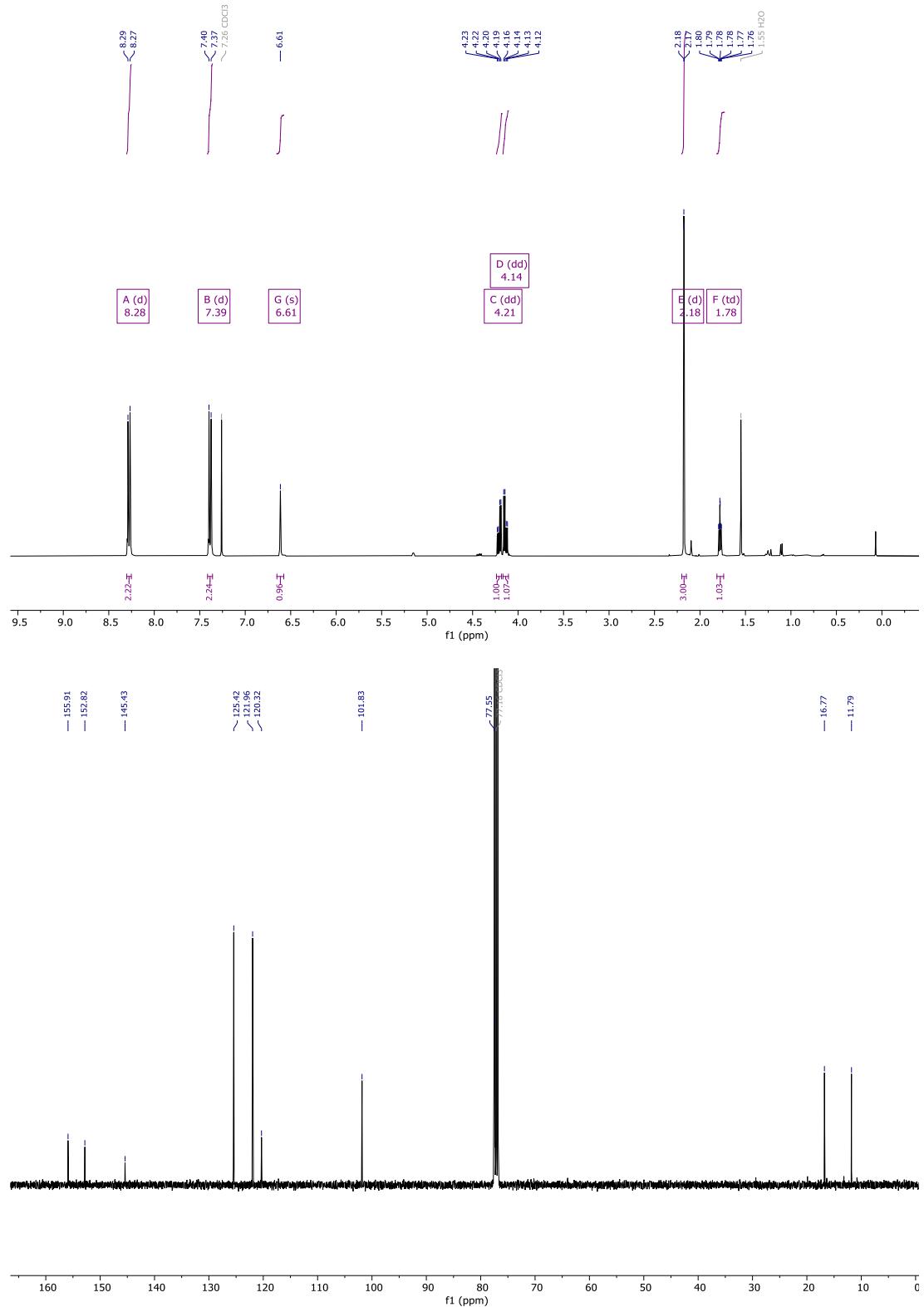


Abbildung 74: ¹H-NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ¹³C-Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 3.

Verbindung 5

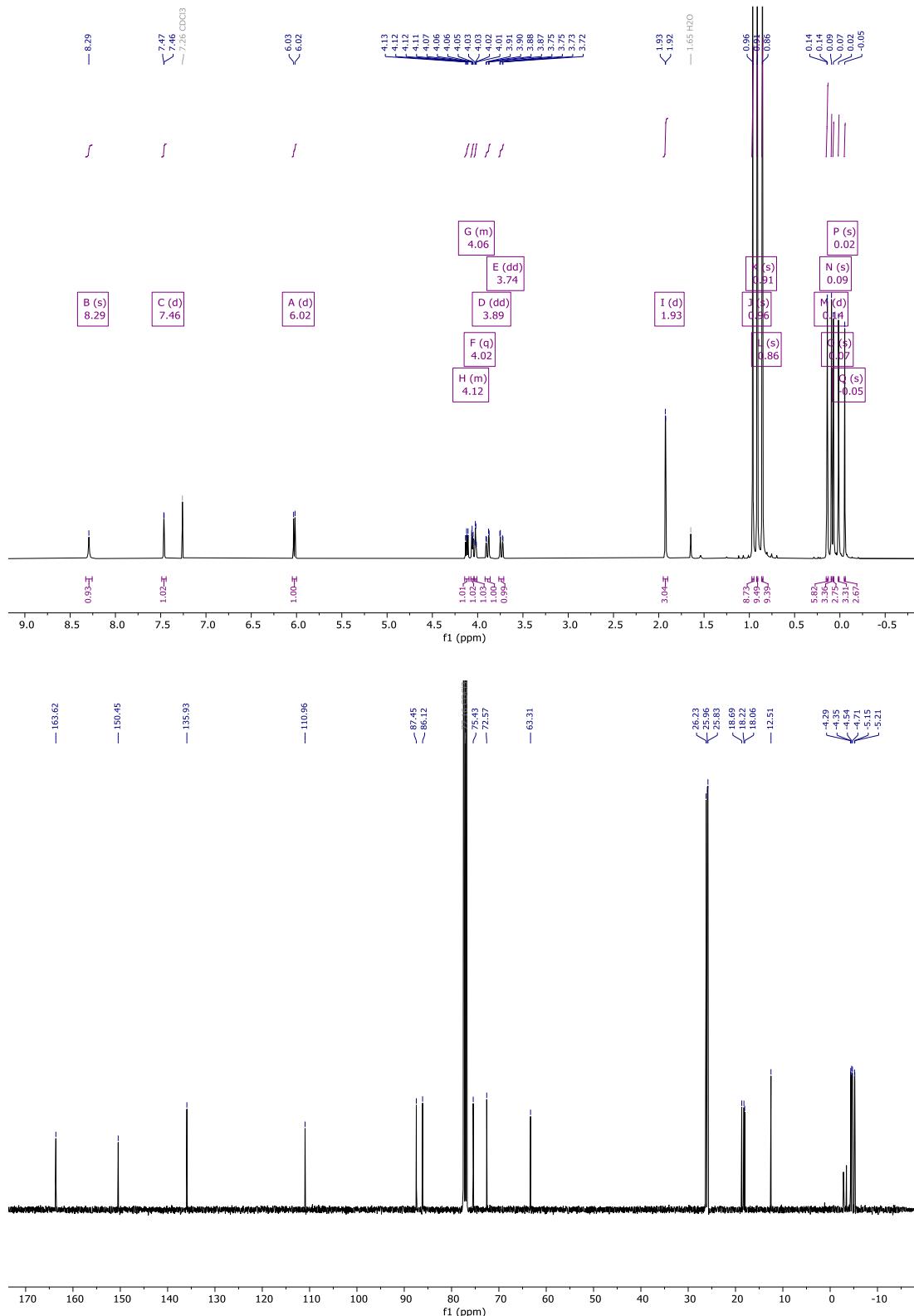


Abbildung 75: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 5.

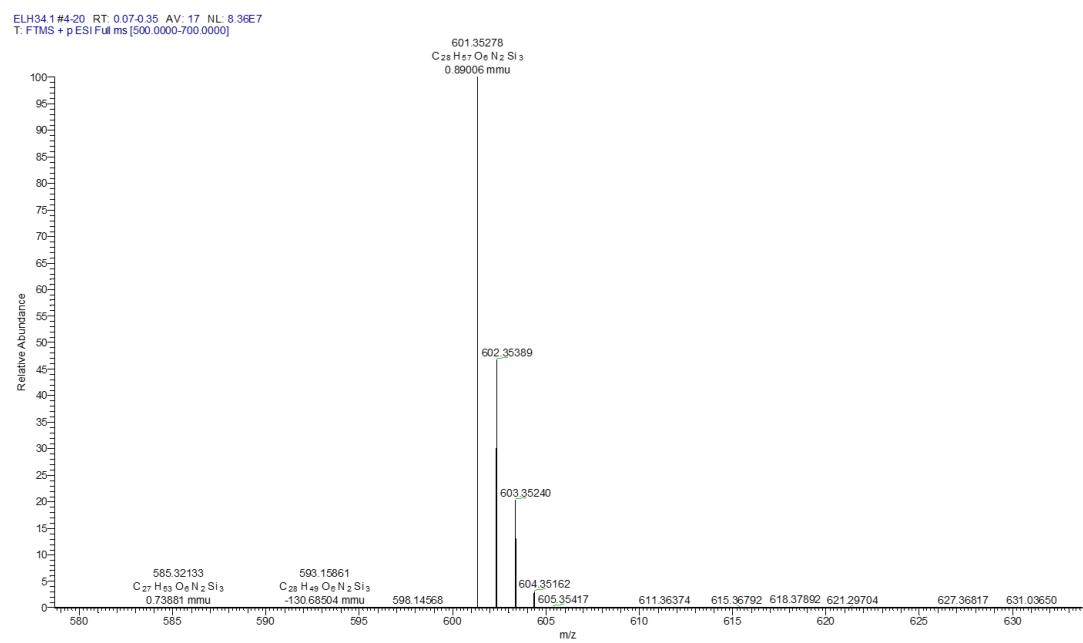


Abbildung 76: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 5.

Verbindung 7

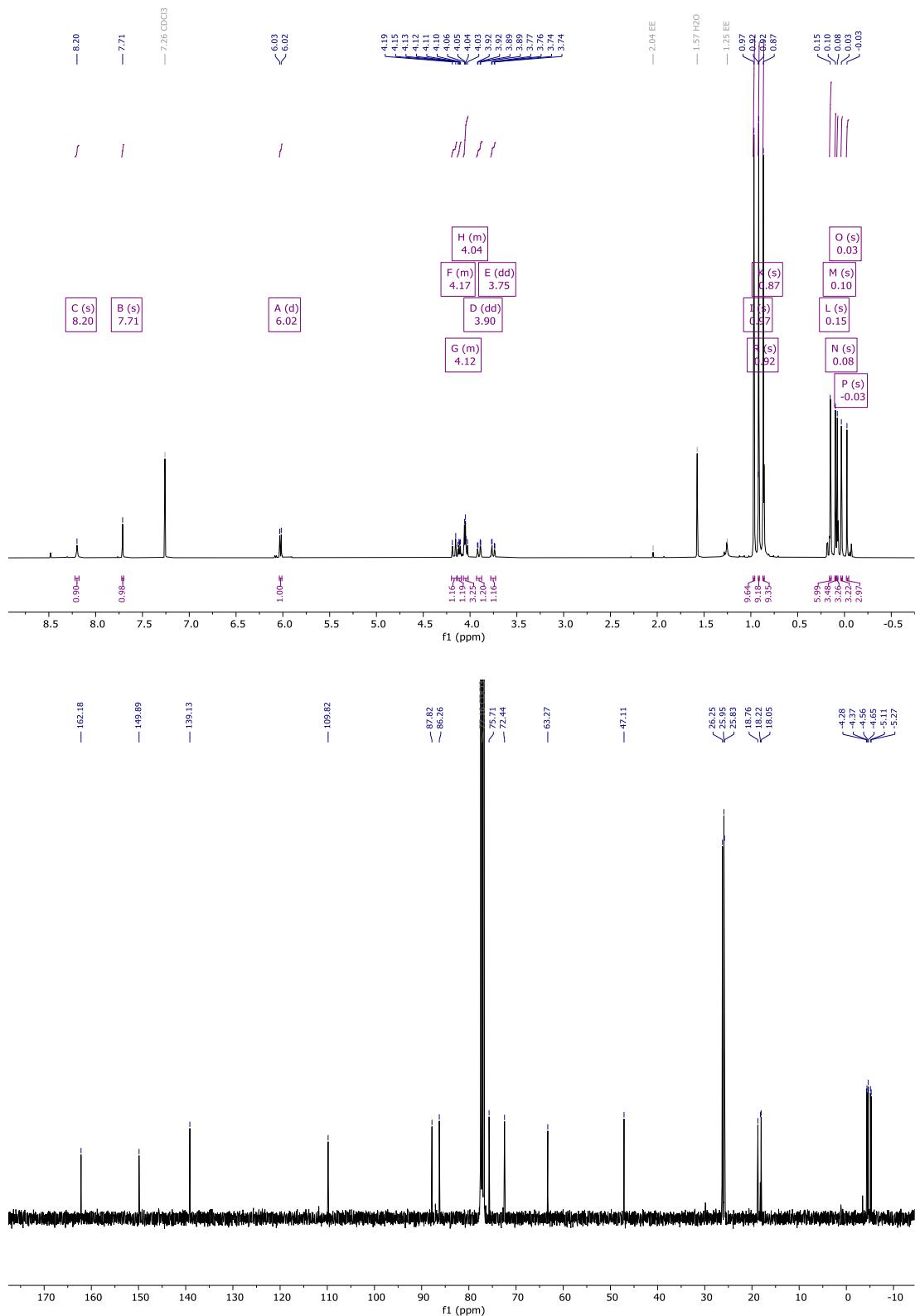


Abbildung 77: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 7.

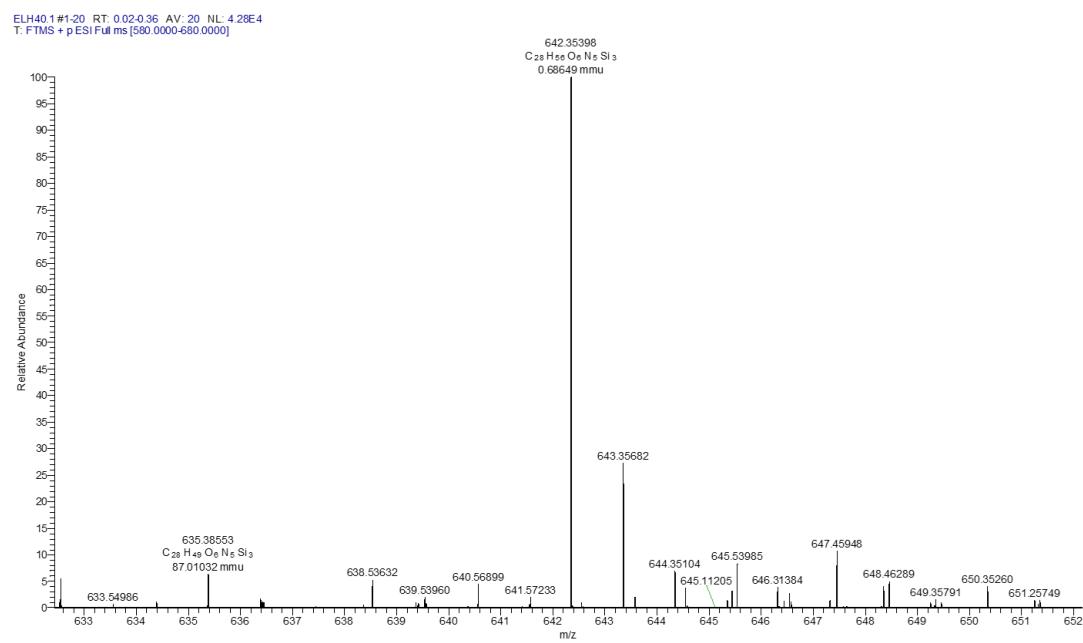


Abbildung 78: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 7.

Verbindung 2

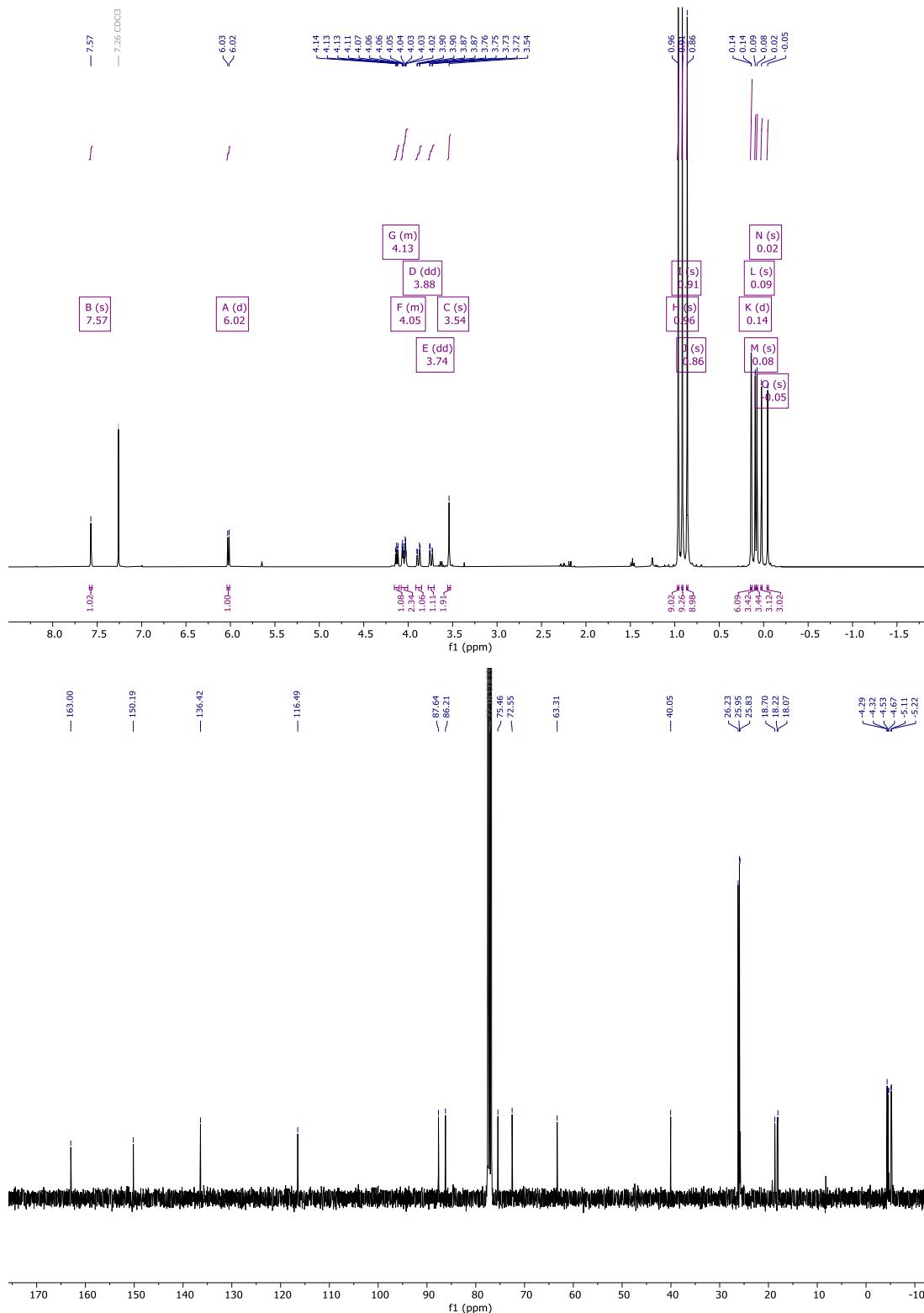


Abbildung 79: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl_3 , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl_3 , 101 MHz) von Verbindung 2.

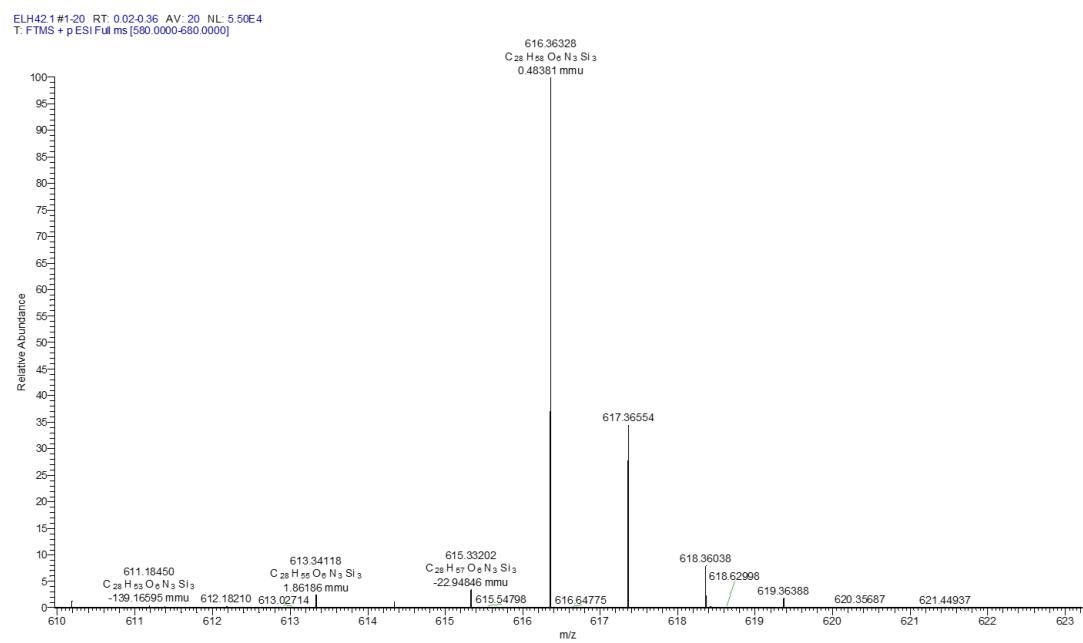


Abbildung 80: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 2.

Verbindung 1

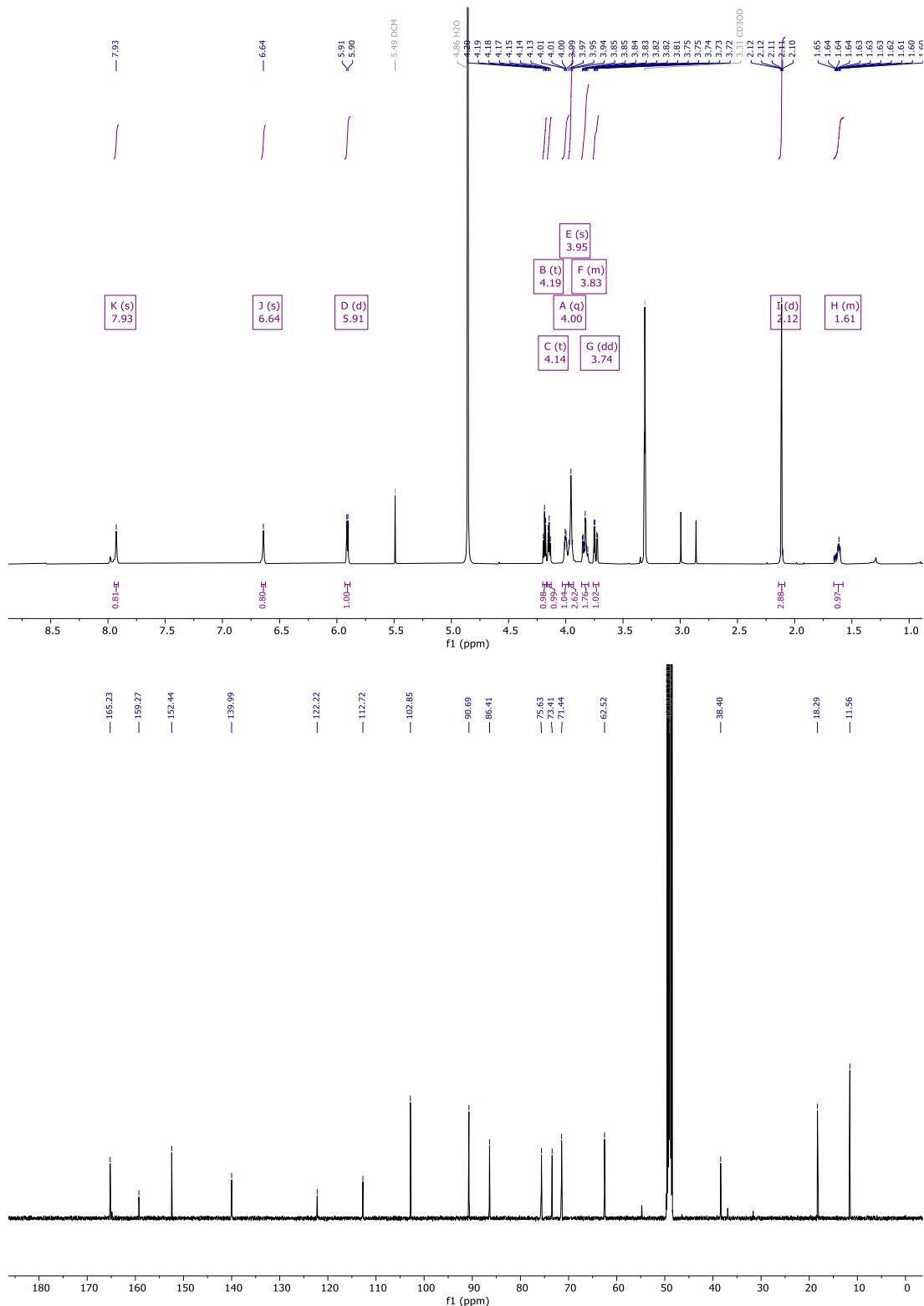


Abbildung 81: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 1-

ELH52_Edukt_Probe1#2013 RT: 20.49 AV: 1 NL: 290E6
T: FTMS + p ESI Full ms [105.0000-1000.0000]

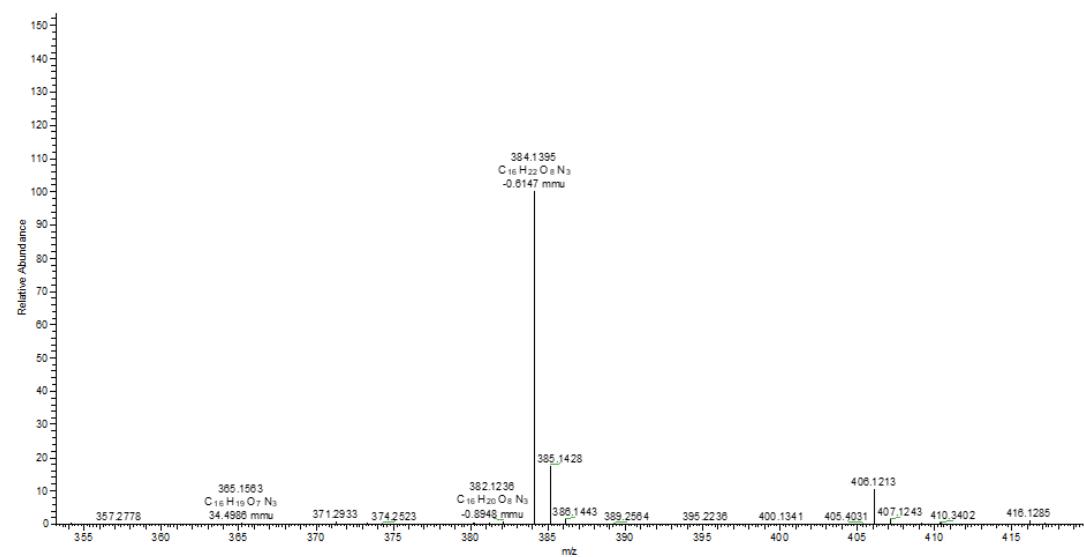


Abbildung 82: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 1.

Verbindung 22

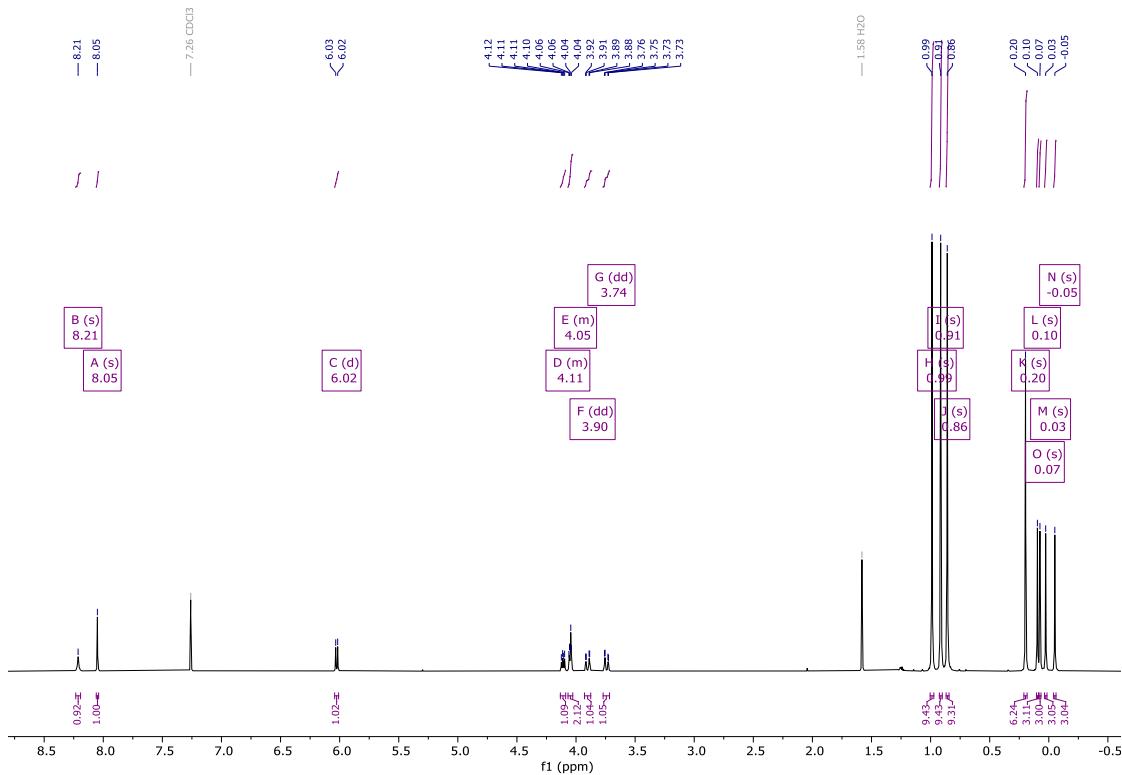
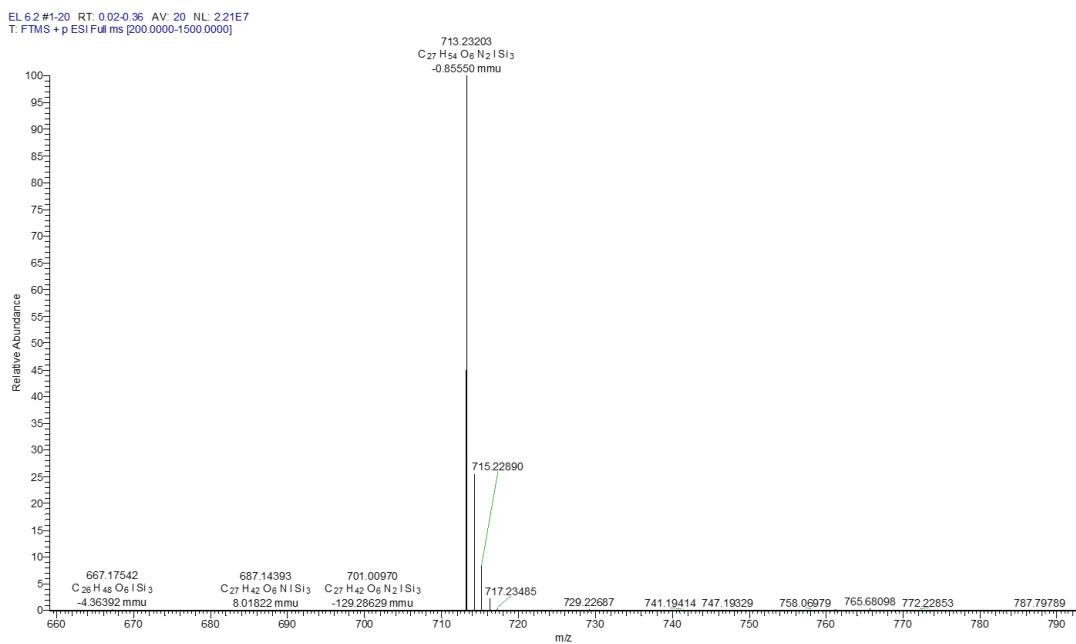
Abbildung 83: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von Verbindung 22.

Abbildung 84: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 22.

Verbindung 23

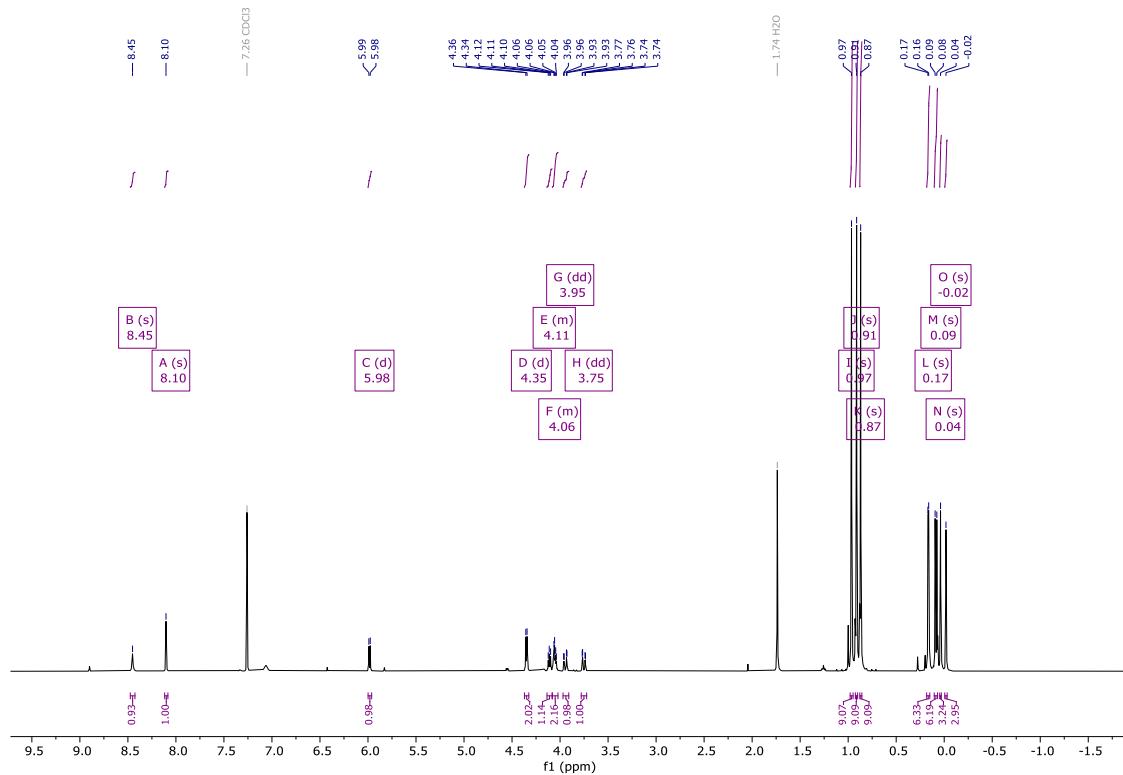


Abbildung 85: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von Verbindung 23.

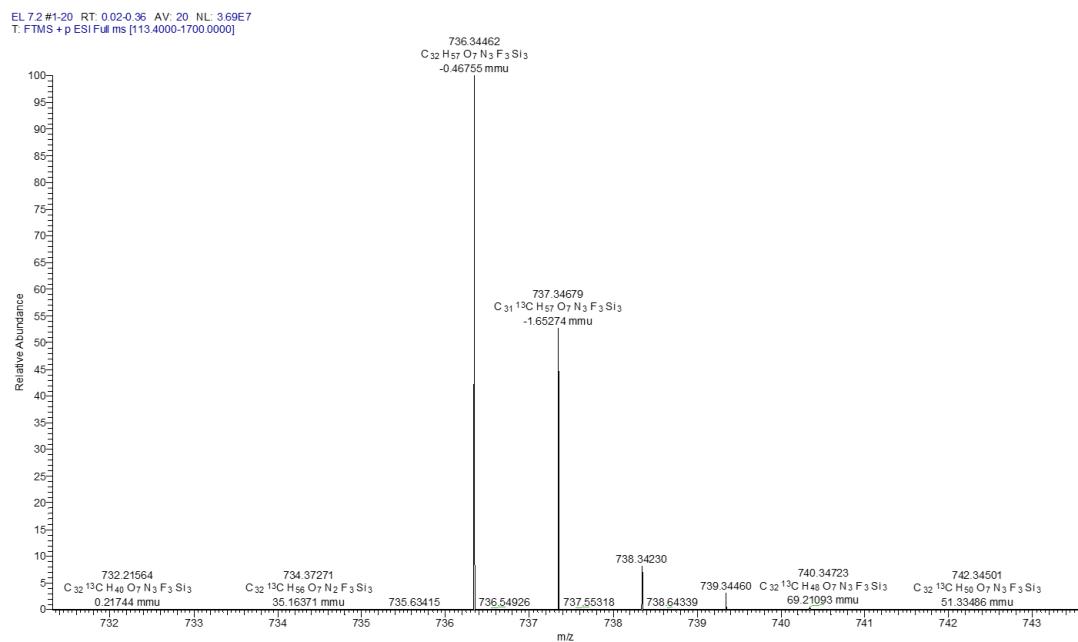


Abbildung 86: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 23.

Verbindung 24

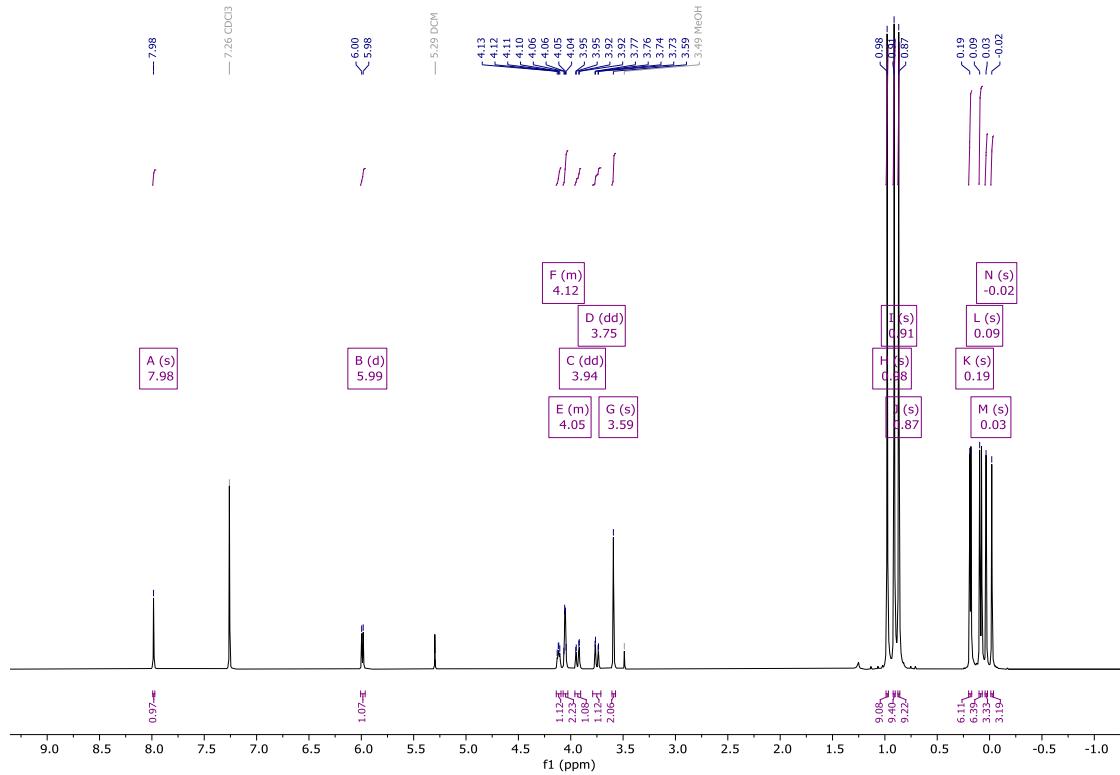
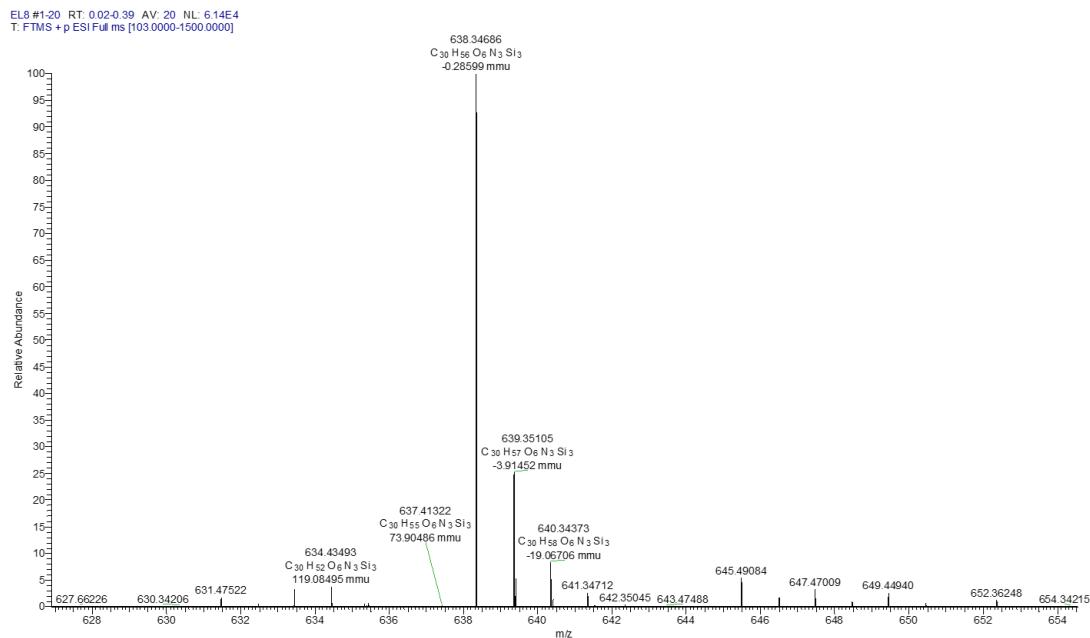
Abbildung 87: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) von Verbindung 24.

Abbildung 88: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 24.

Verbindung 19

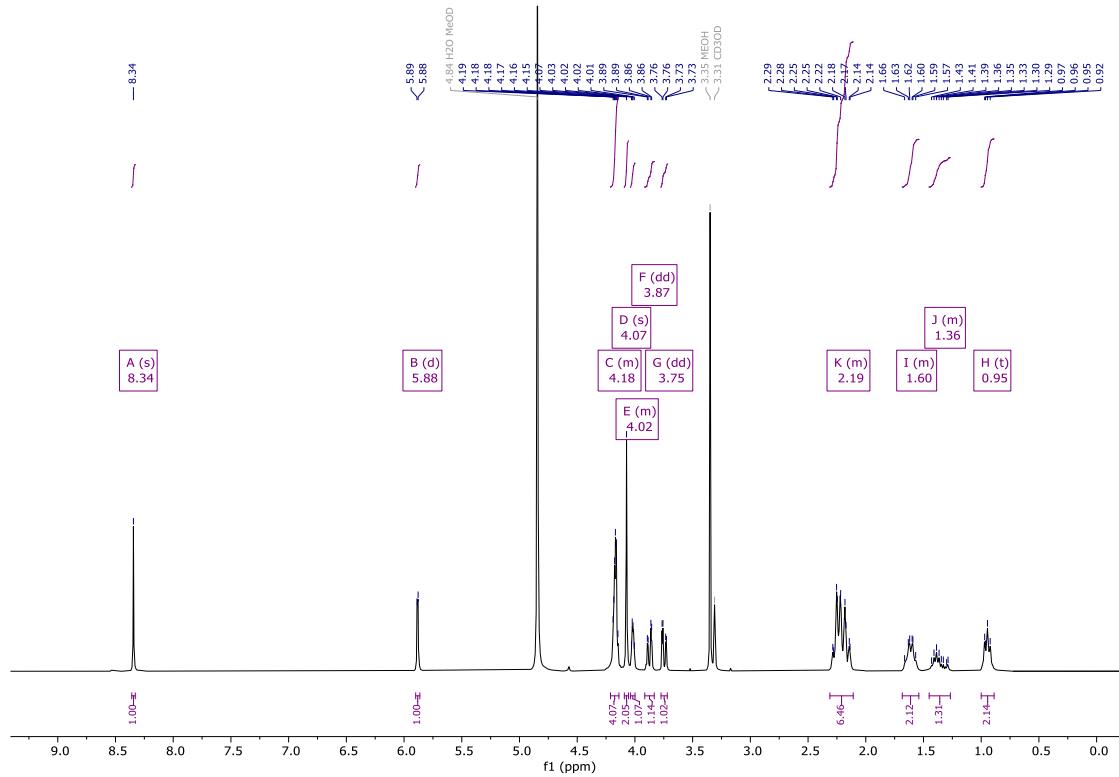


Abbildung 89: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 19.

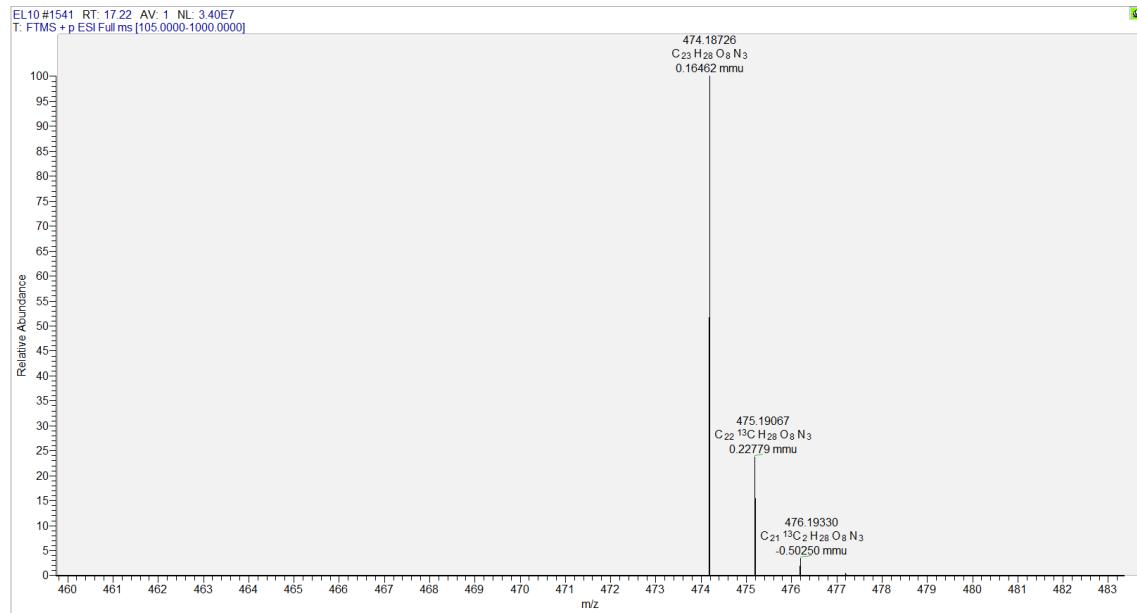


Abbildung 90: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 19.

Verbindung 25 / 48

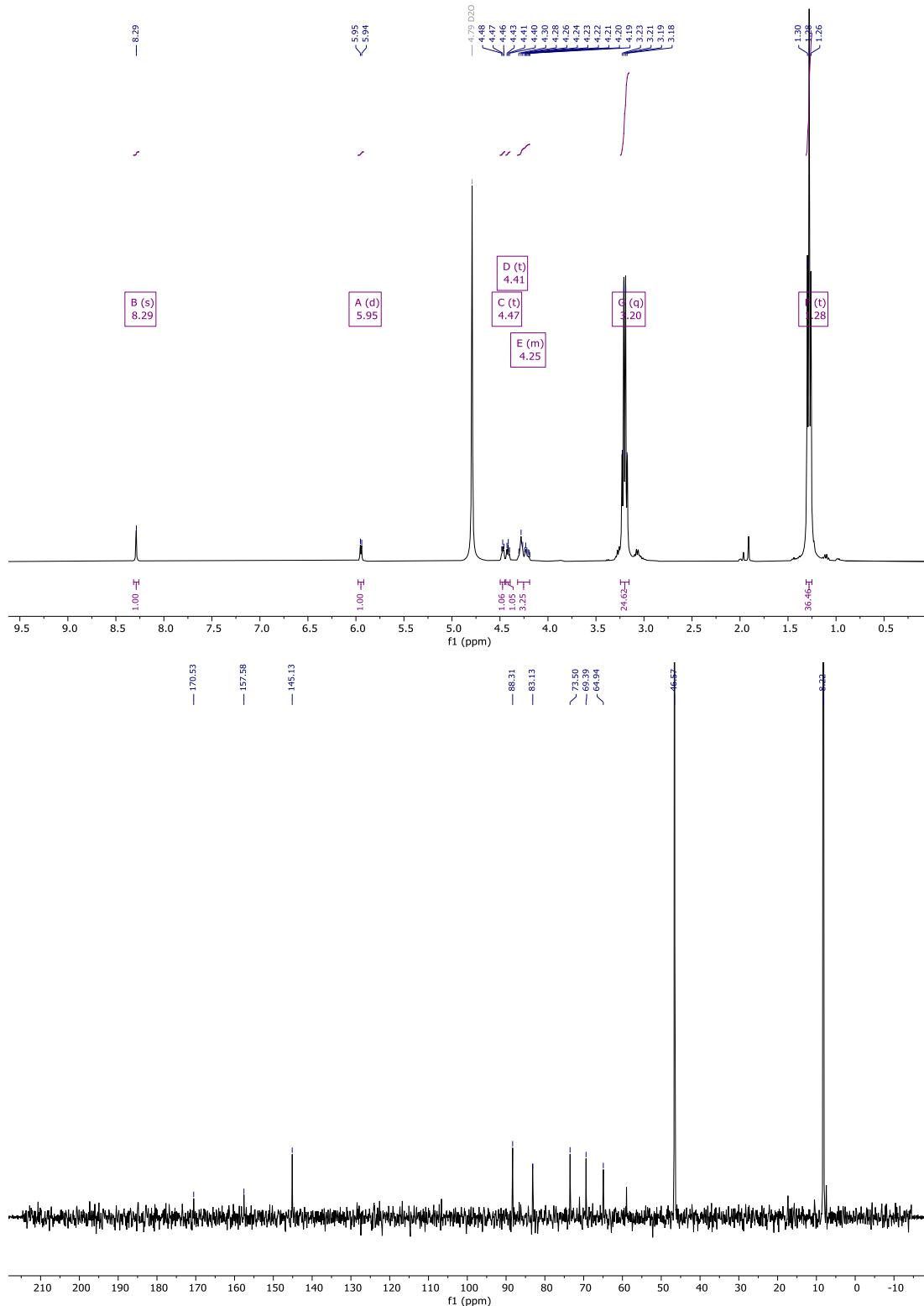


Abbildung 91: ^1H -NMR Spektrum (oben, D_2O , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, D_2O , 101 MHz) von Verbindung 25 / 48.

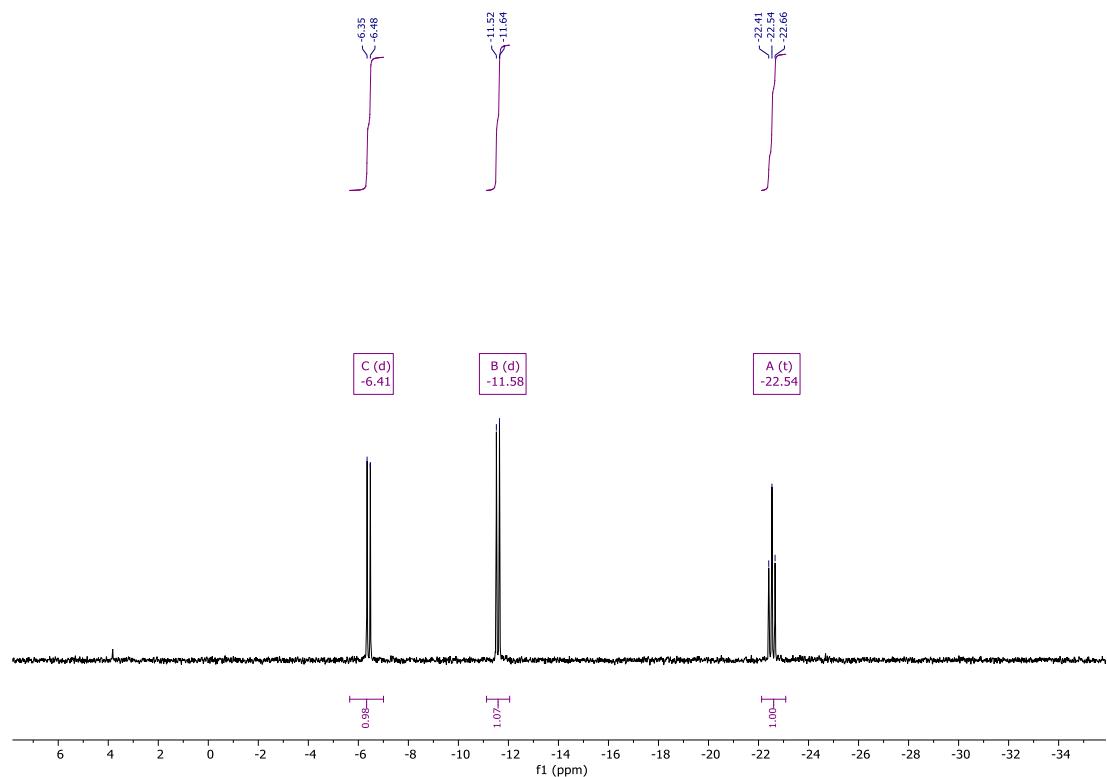


Abbildung 92: ^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O) von Verbindung 25 / 48.

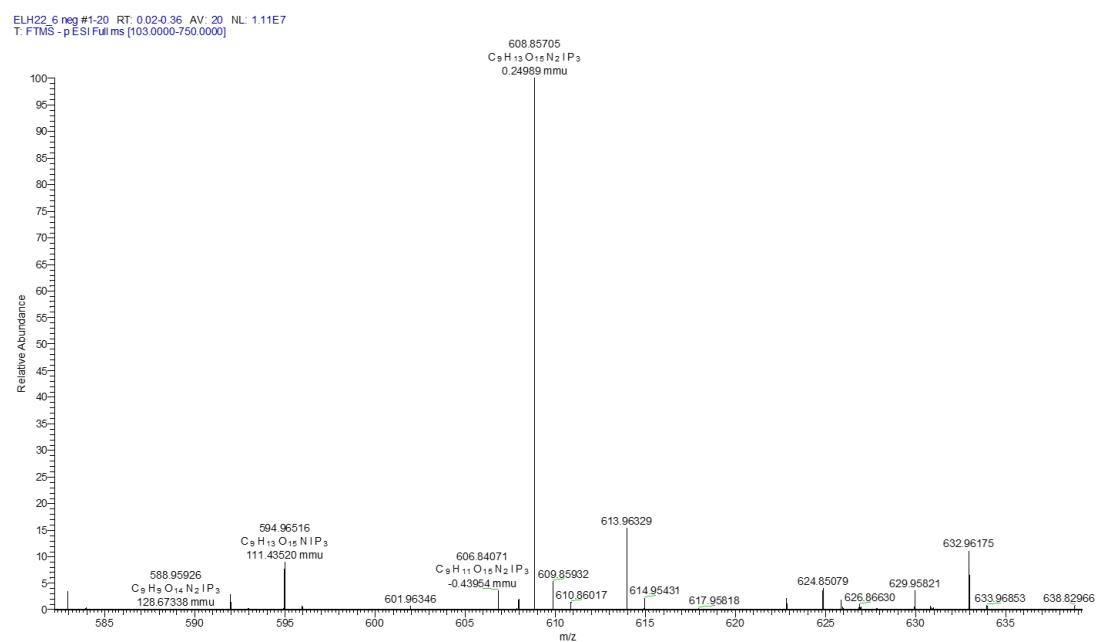


Abbildung 93: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 25 / 48.

Verbindung 26

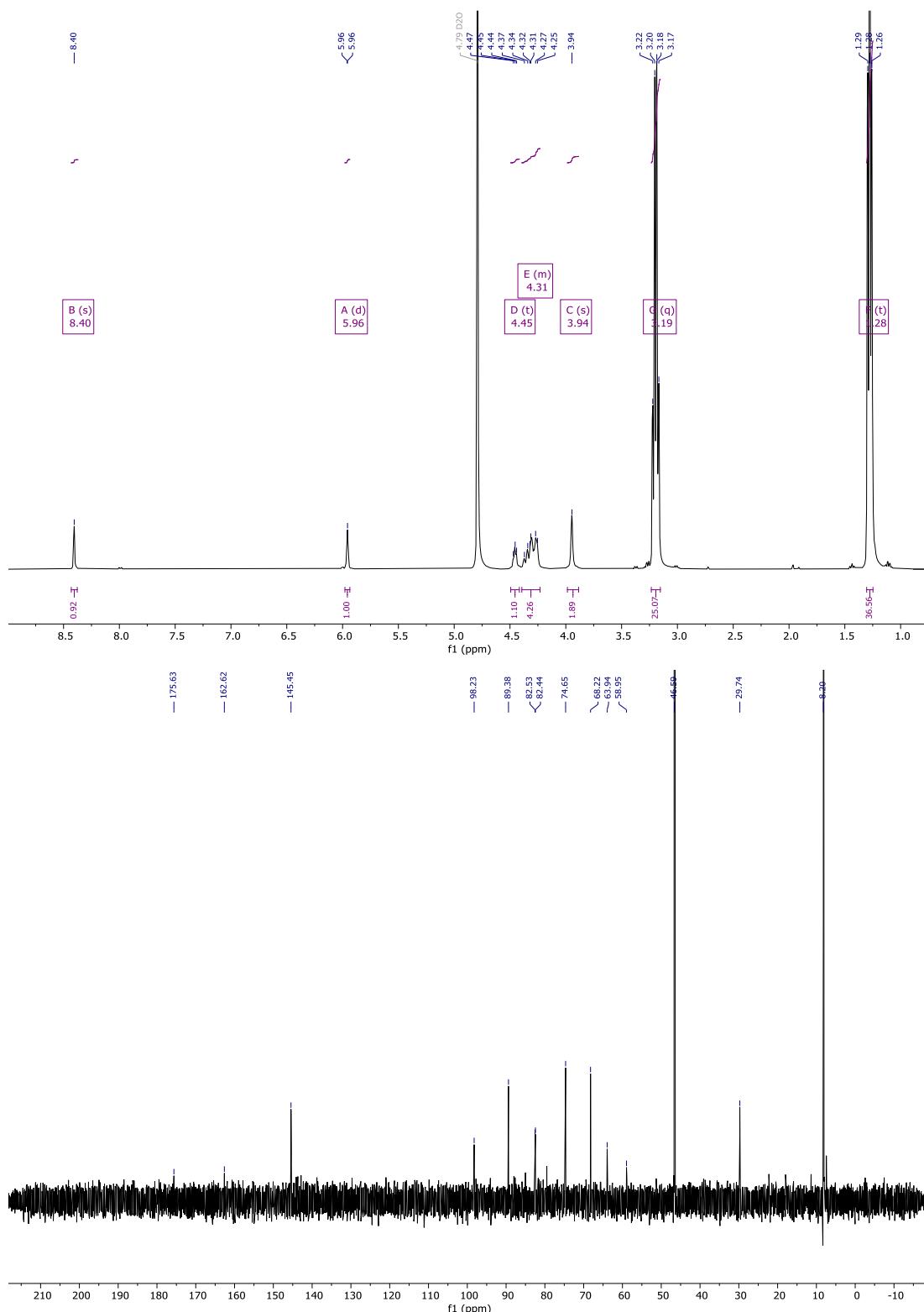


Abbildung 94: ^1H -NMR Spektrum (oben, D_2O , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, D_2O , 101 MHz) von Verbindung 26.

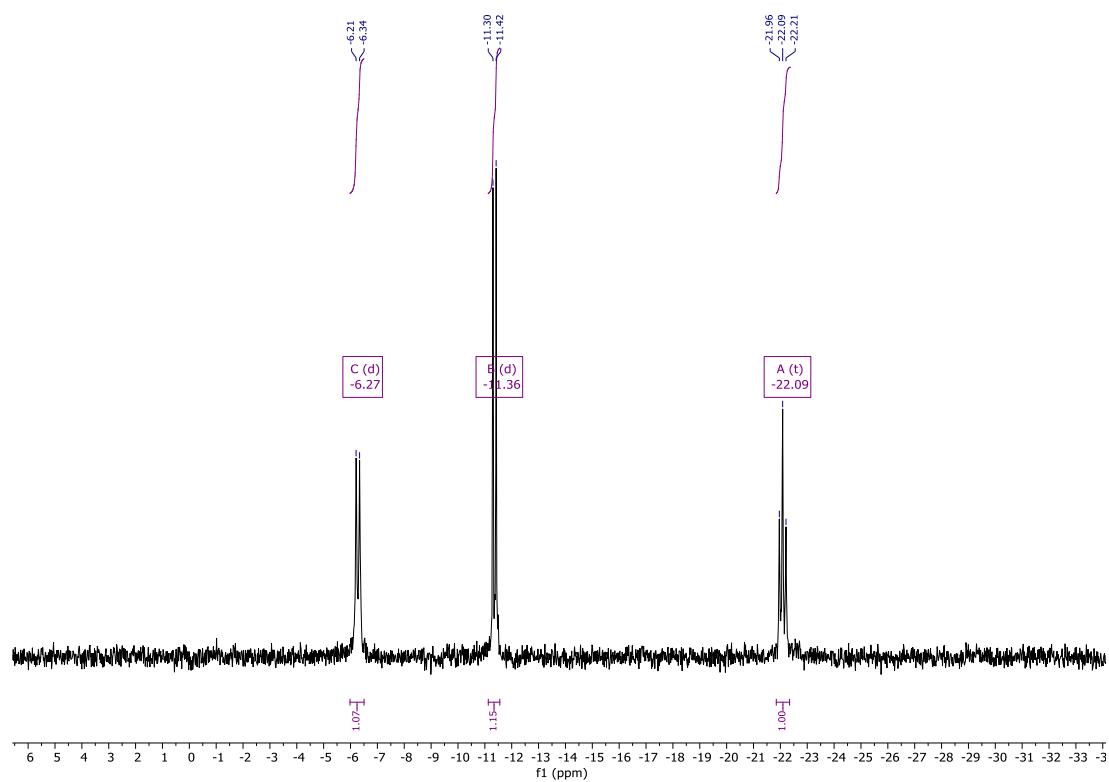


Abbildung 95: ^1H -NMR (162 MHz, D_2O) von Verbindung **26**.

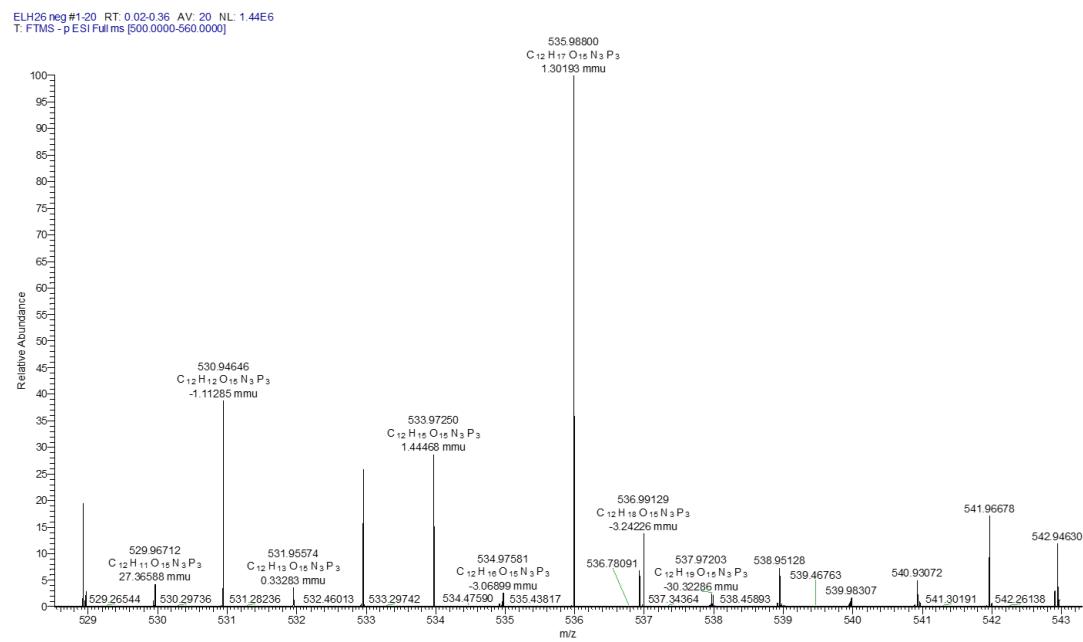


Abbildung 96: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **26**.

Verbindung 20

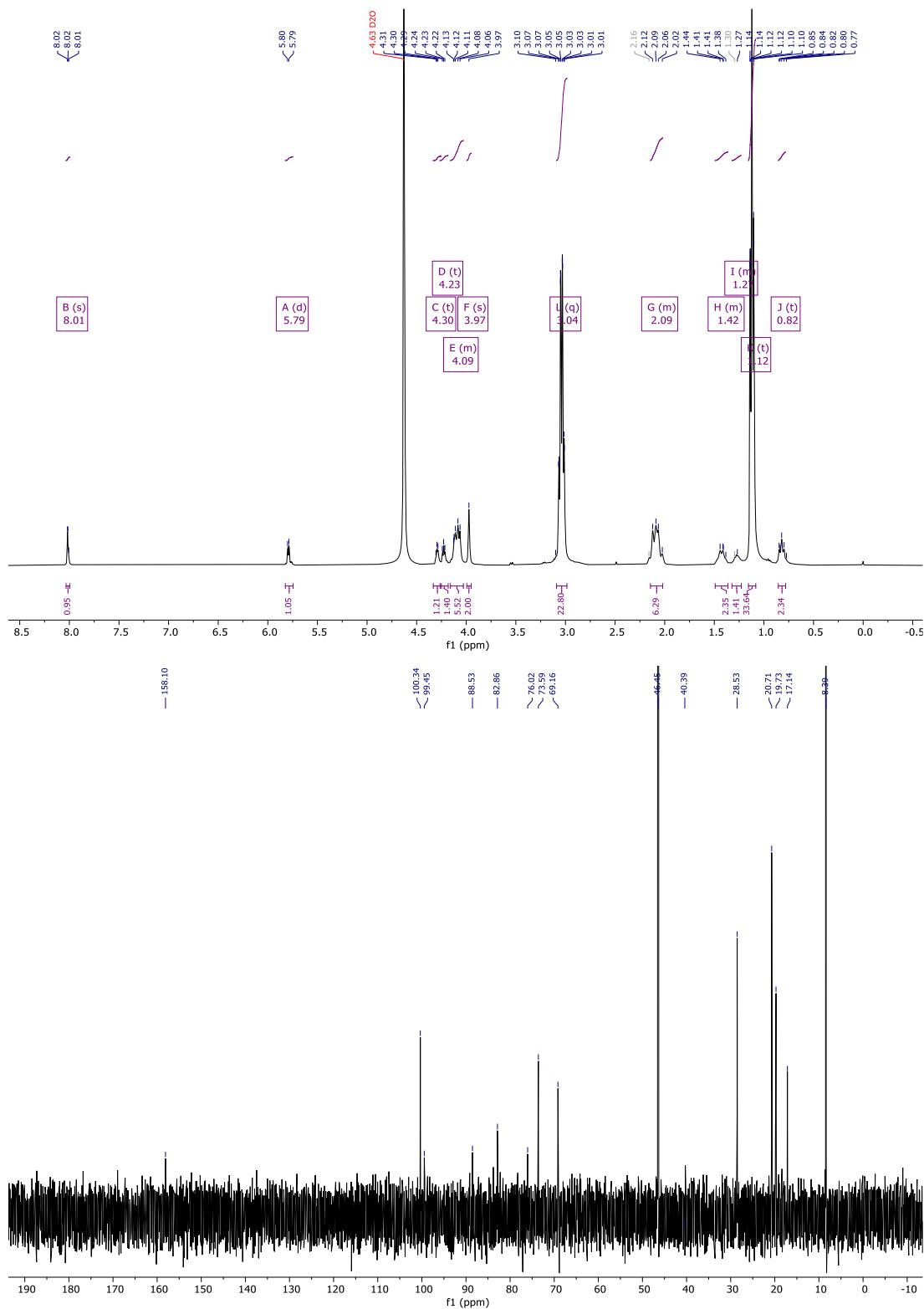


Abbildung 97: ^1H -NMR Spektrum (oben, D_2O , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, D_2O , 101 MHz) von Verbindung 20.

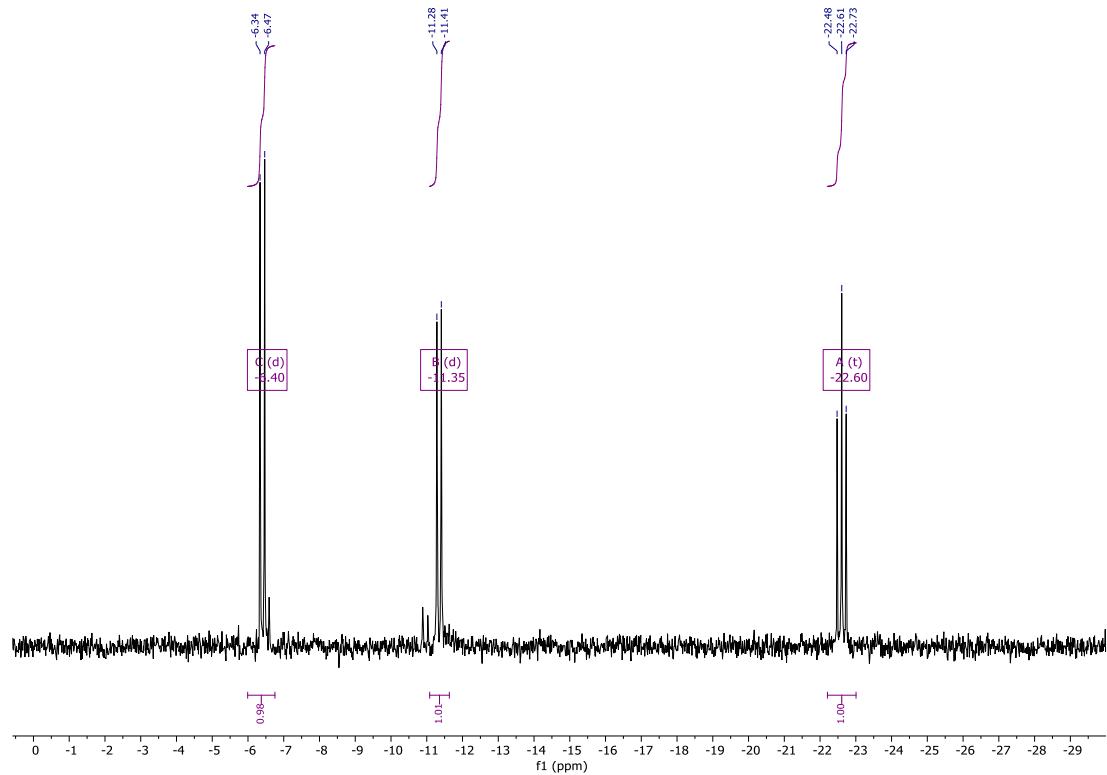


Abbildung 98: ^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O) von Verbindung **20**.

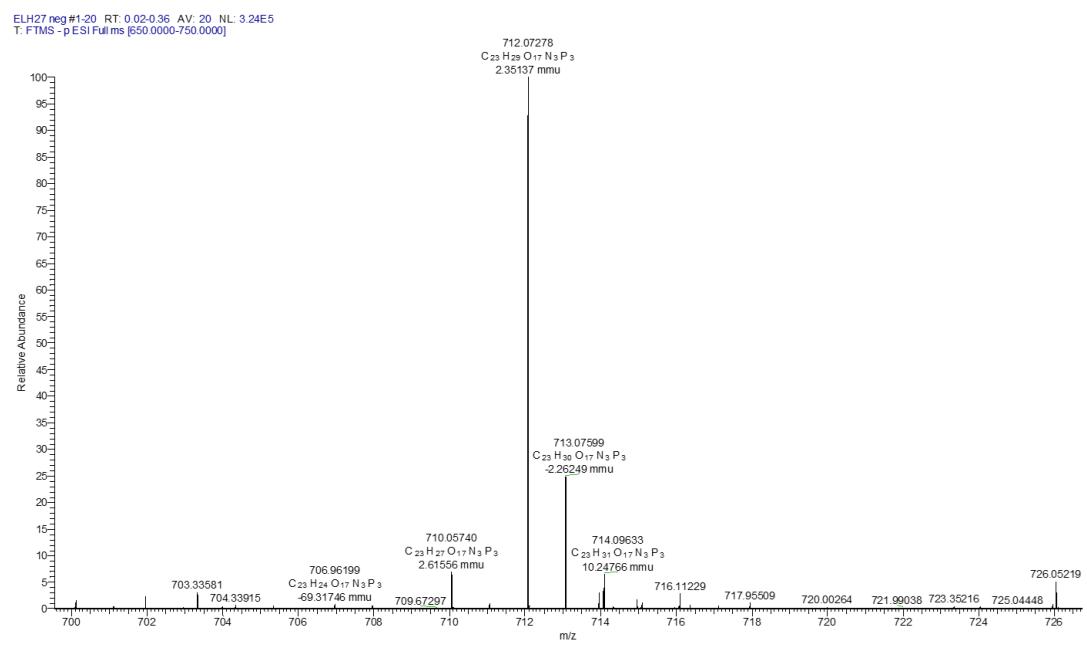


Abbildung 99: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **20**.

Verbindung 36

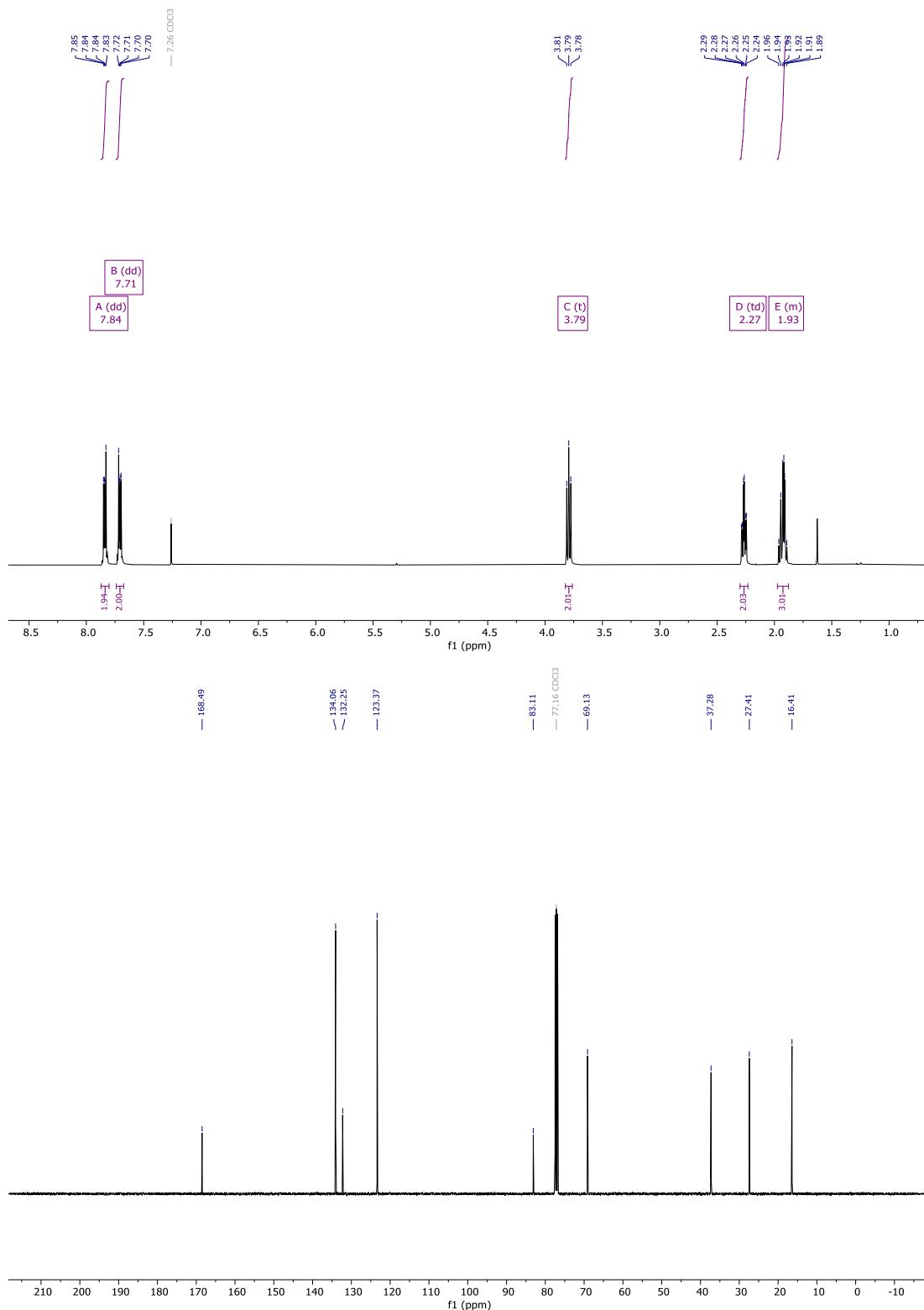


Abbildung 100: ^1H -NMR Spektrum (oben, D_2O , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, D_2O , 101 MHz) von Verbindung 36.

ELH-16 Gabriel 1_DCM.1 #1-20 RT: 0.02-0.35 AV: 20 NL: 1.73E5
T: FTMS + pESI Full ms [180.0000-250.0000]

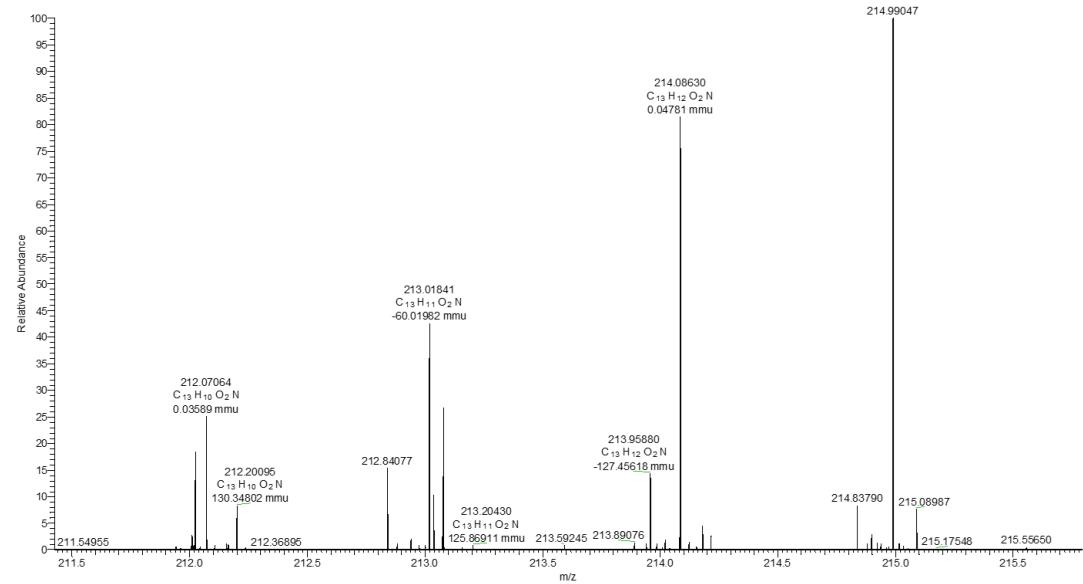


Abbildung 101: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 36.

Verbindung 37

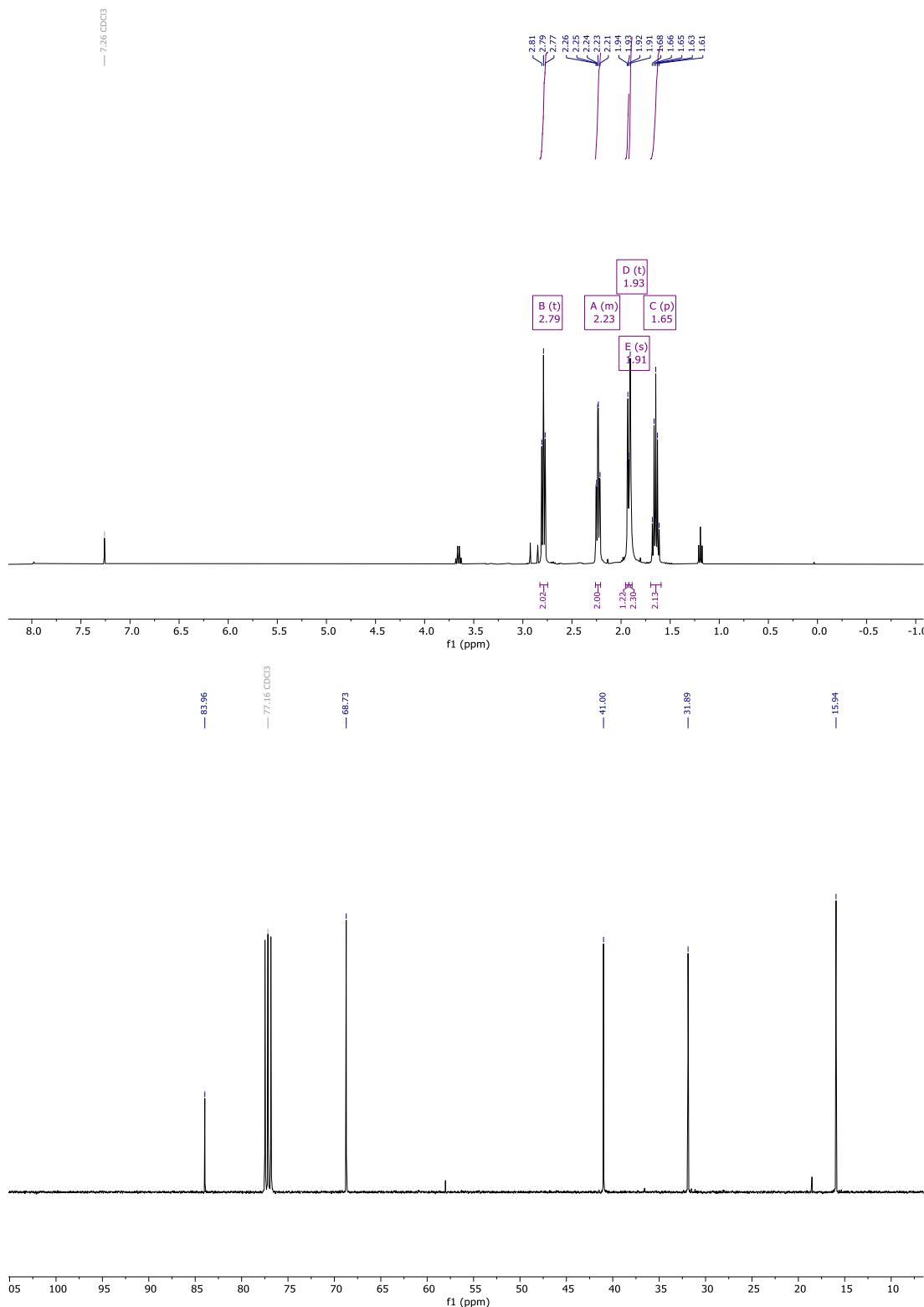


Abbildung 102: ^1H -NMR Spektrum (oben, D_2O , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, D_2O , 101 MHz) von Verbindung 37.

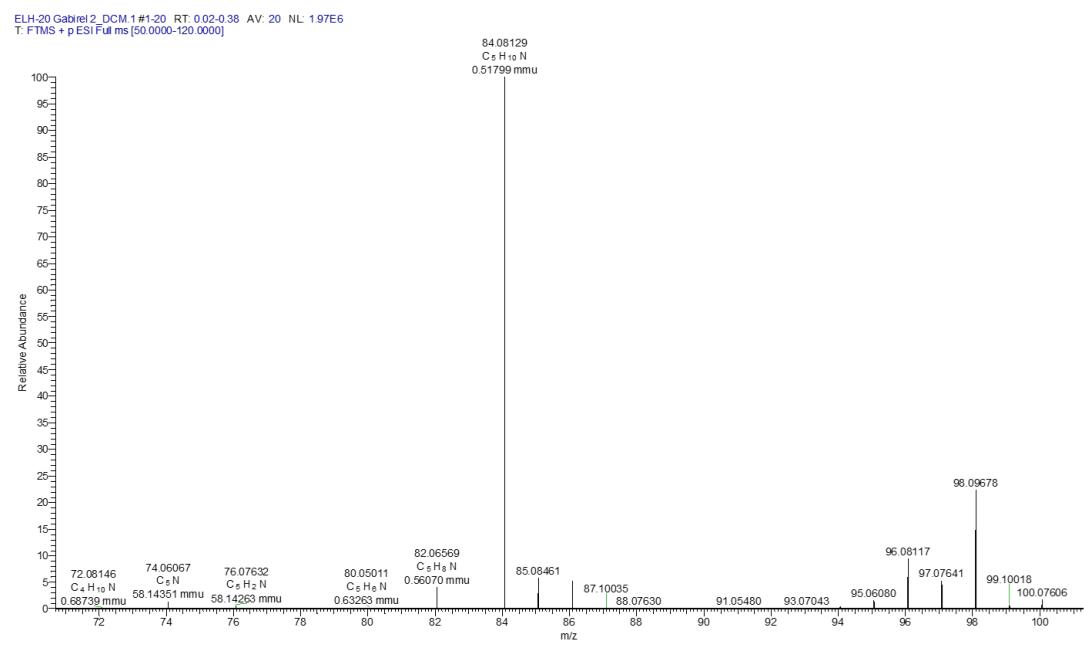


Abbildung 103: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 37.

Verbindung 32

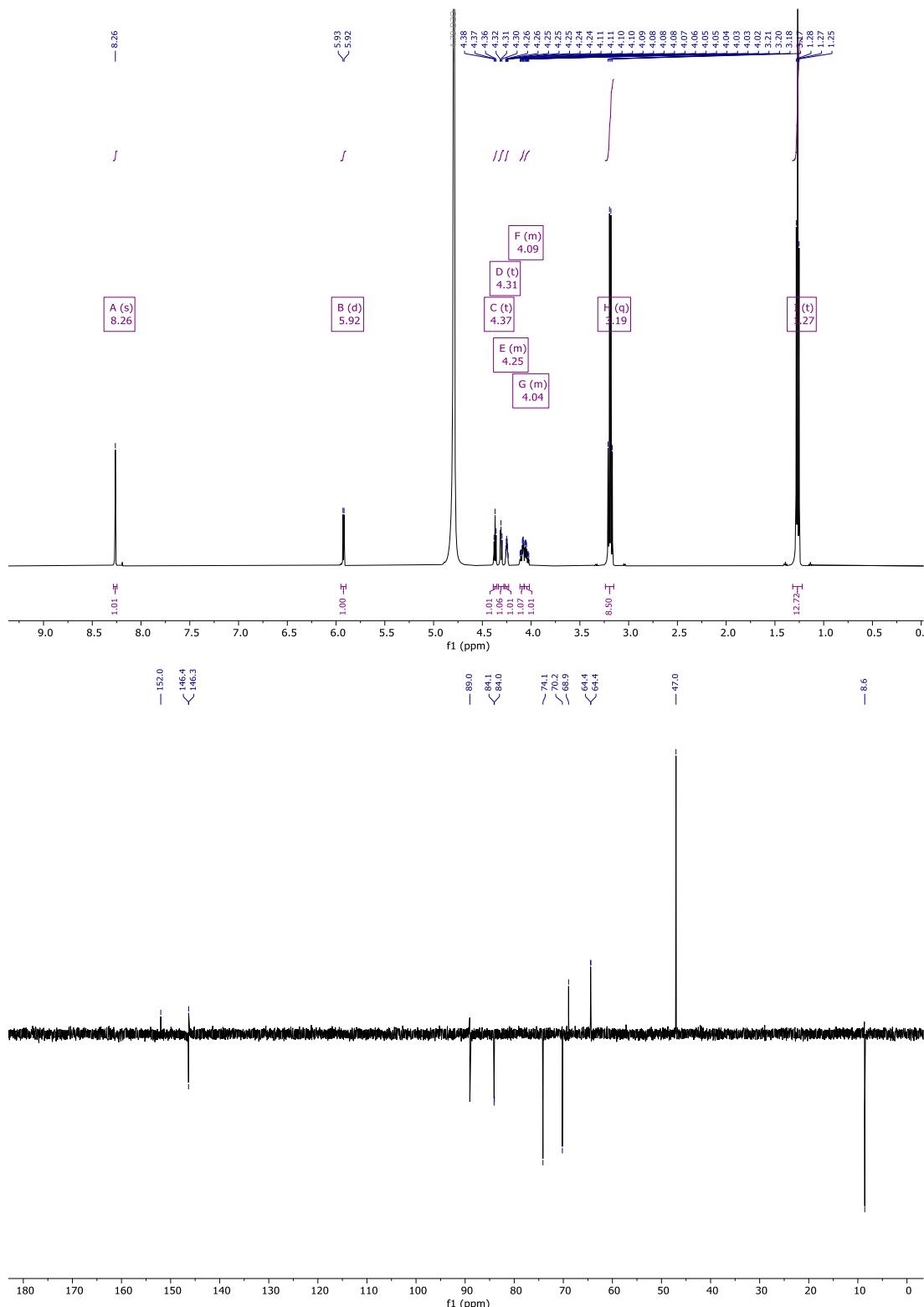


Abbildung 104: ^1H -NMR Spektrum (oben, D₂O, 500 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, D₂O, 126 MHz) von Verbindung 32.

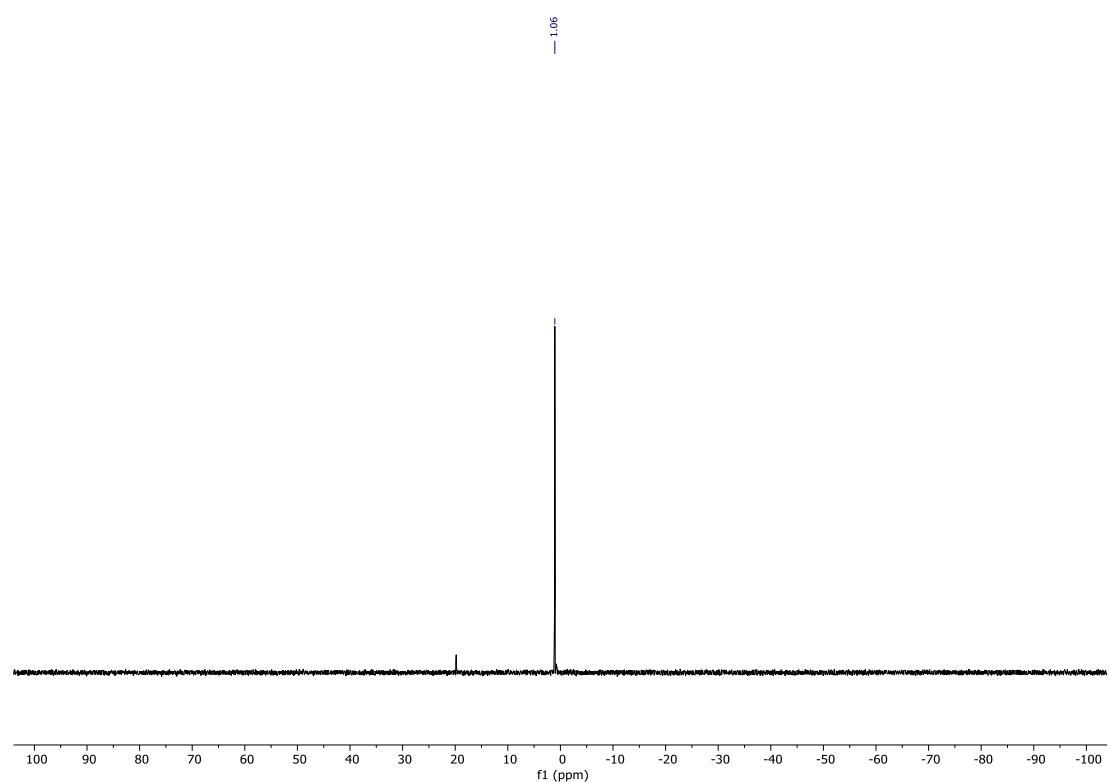
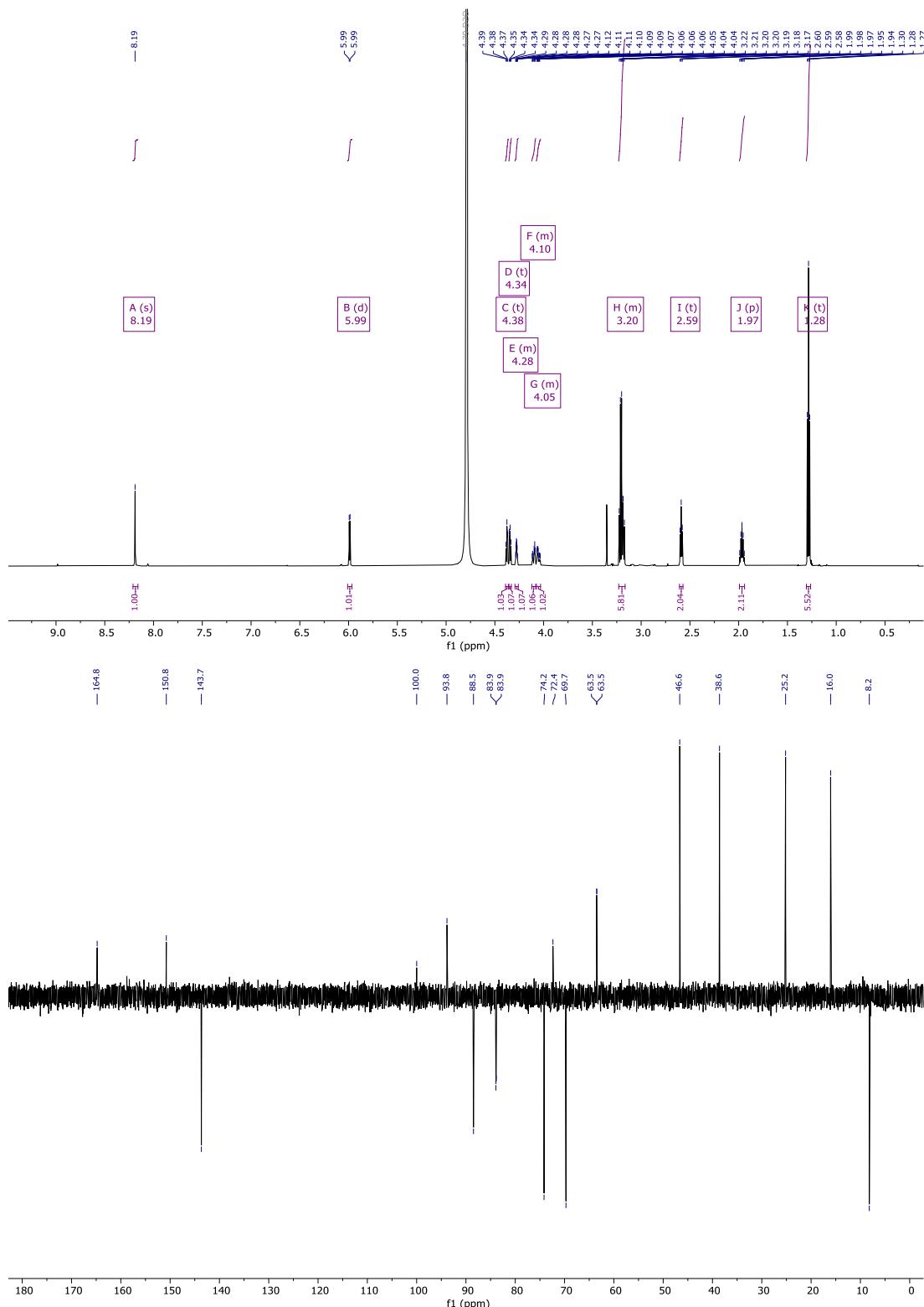


Abbildung 105: ³¹P-NMR (122 MHz, D₂O) von Verbindung 32.

Verbindung 33



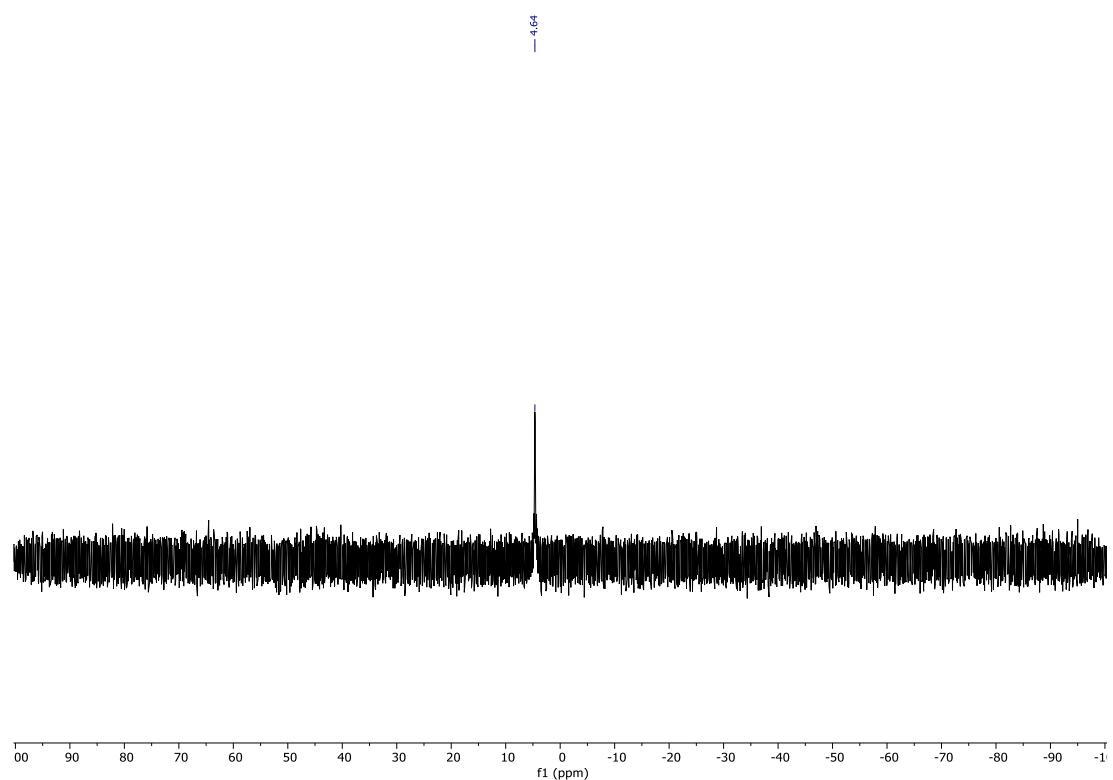


Abbildung 107: ^{31}P -NMR (243 MHz, D_2O) von Verbindung 33.

Verbindung 34

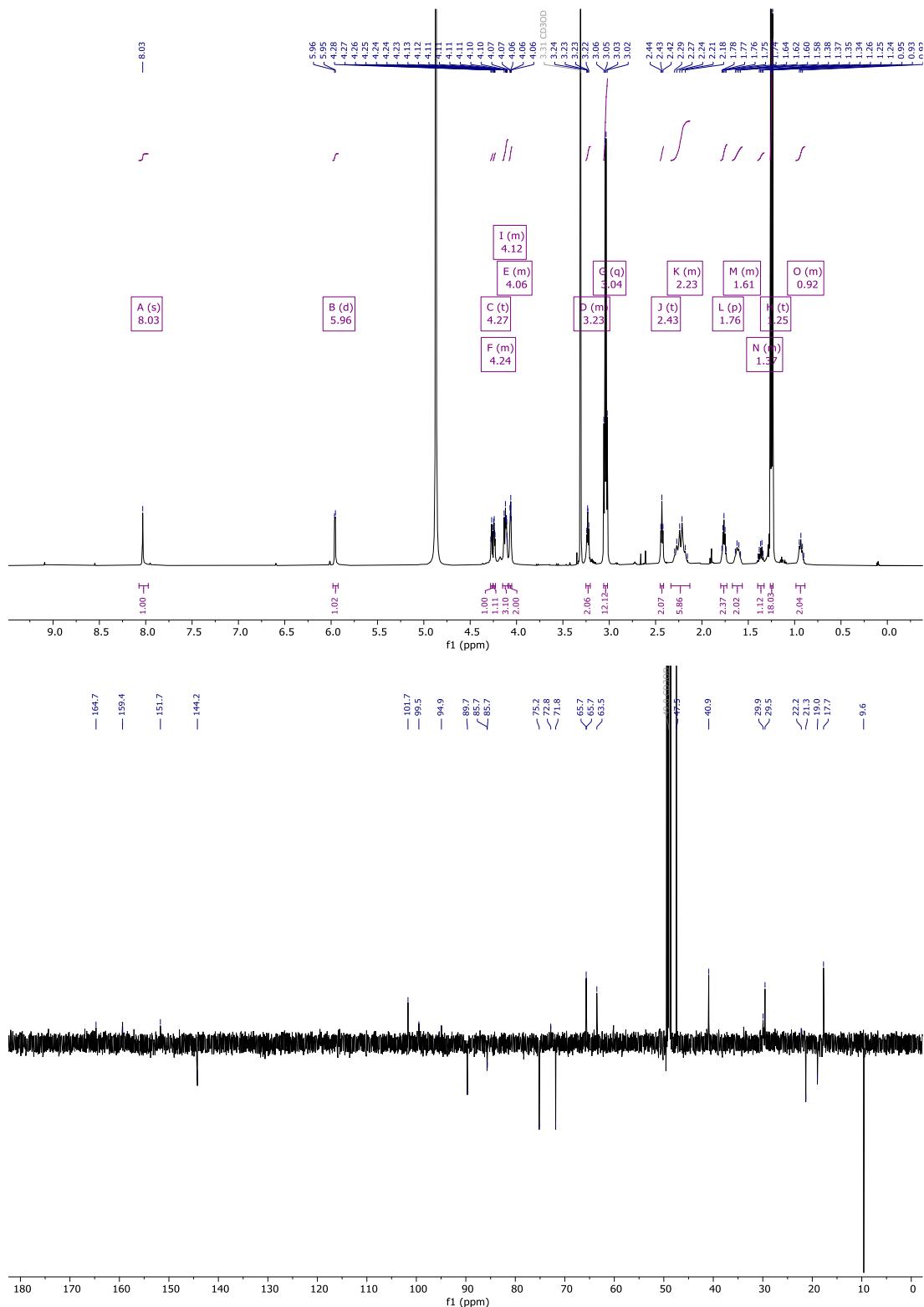


Abbildung 108: ¹H-NMR Spektrum (oben, D₂O, 600 MHz) und ¹³C-Spektrum (unten, D₂O, 151 MHz) von Verbindung 34.

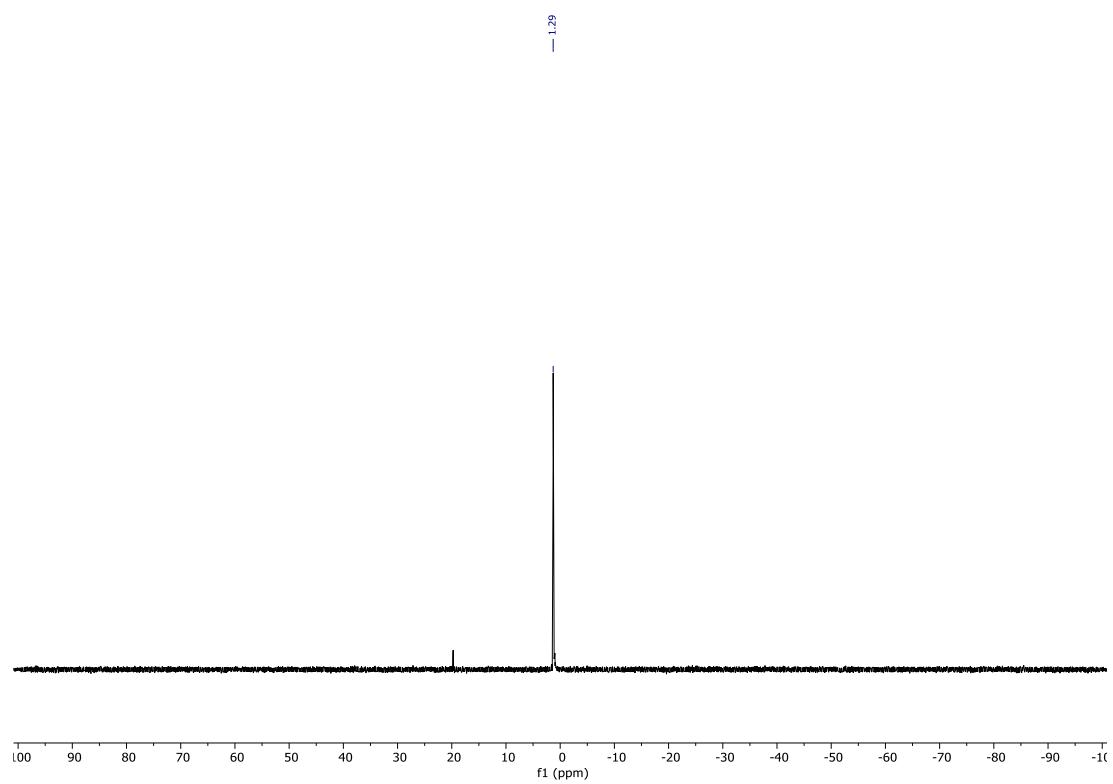


Abbildung 109: ^{31}P -NMR (243 MHz, D_2O) von Verbindung 34.

Verbindung 39

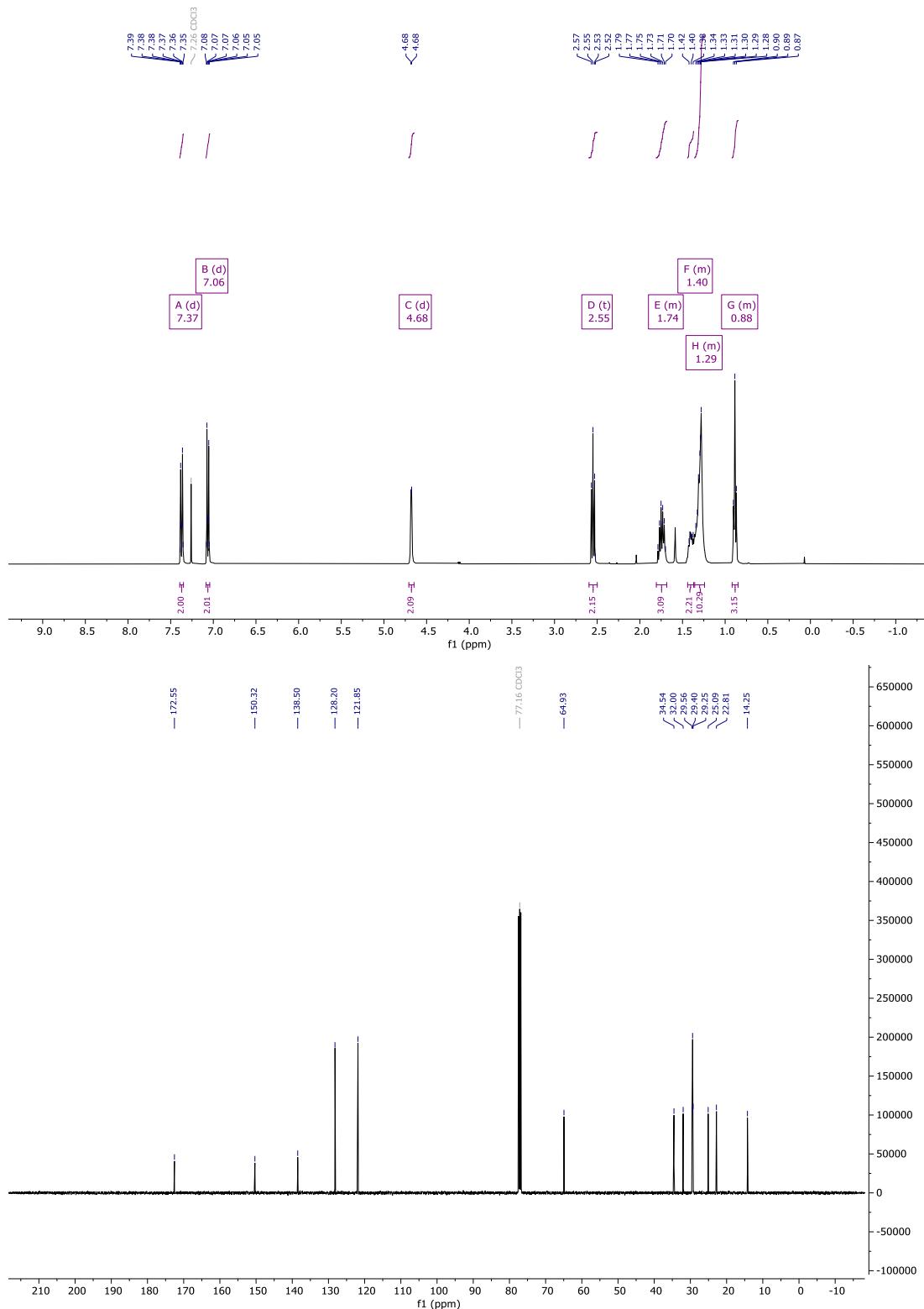


Abbildung 110: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl_3 , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl_3 , 101 MHz) von Verbindung 39.

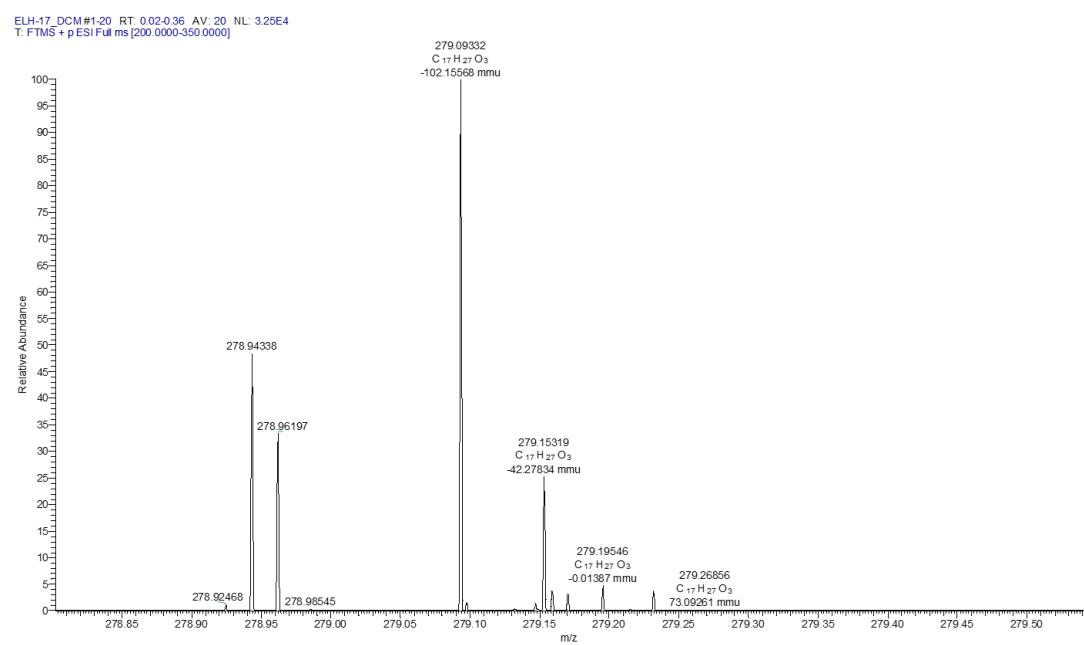


Abbildung 111: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 39.

Verbindung 40

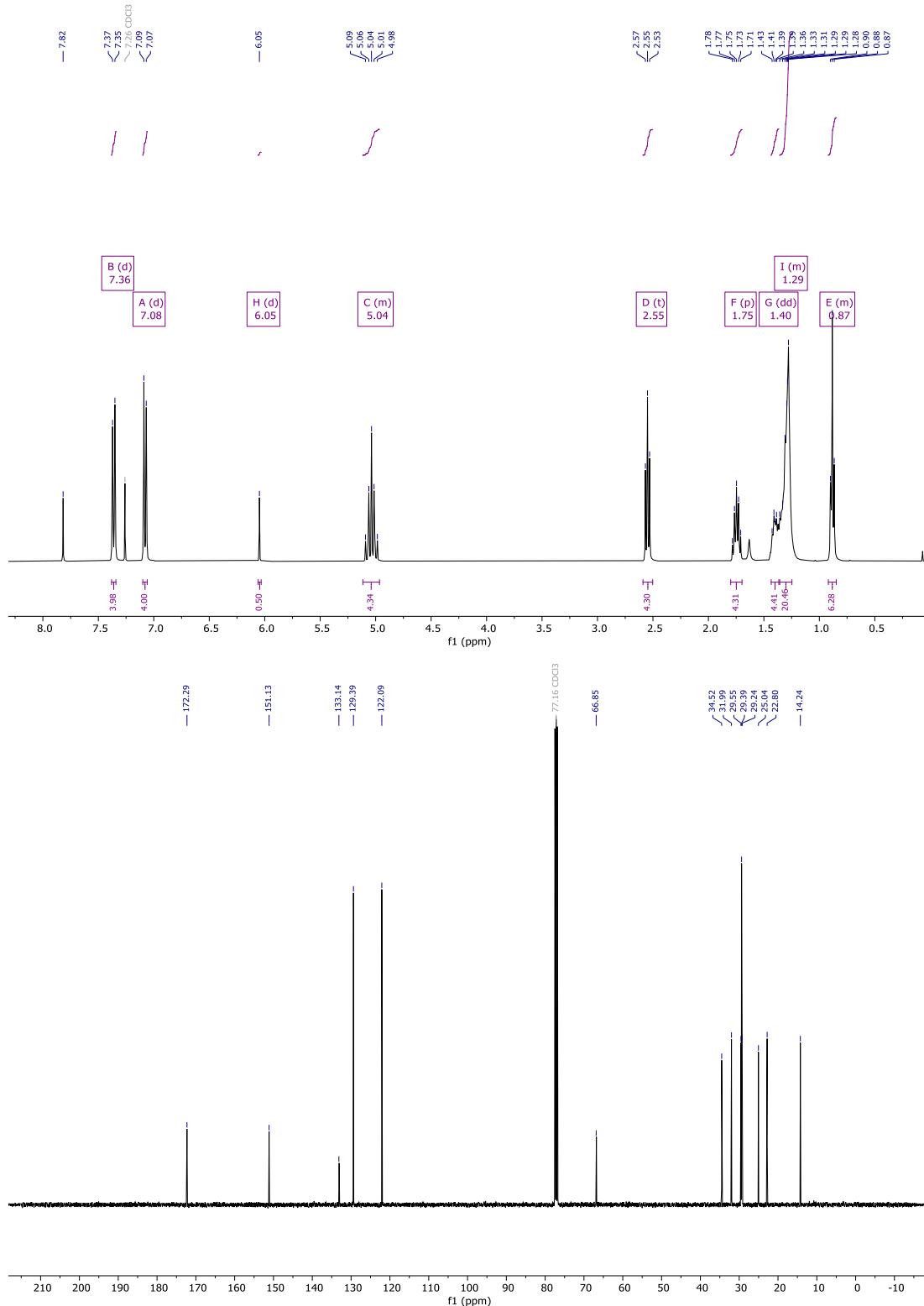


Abbildung 112: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 40.

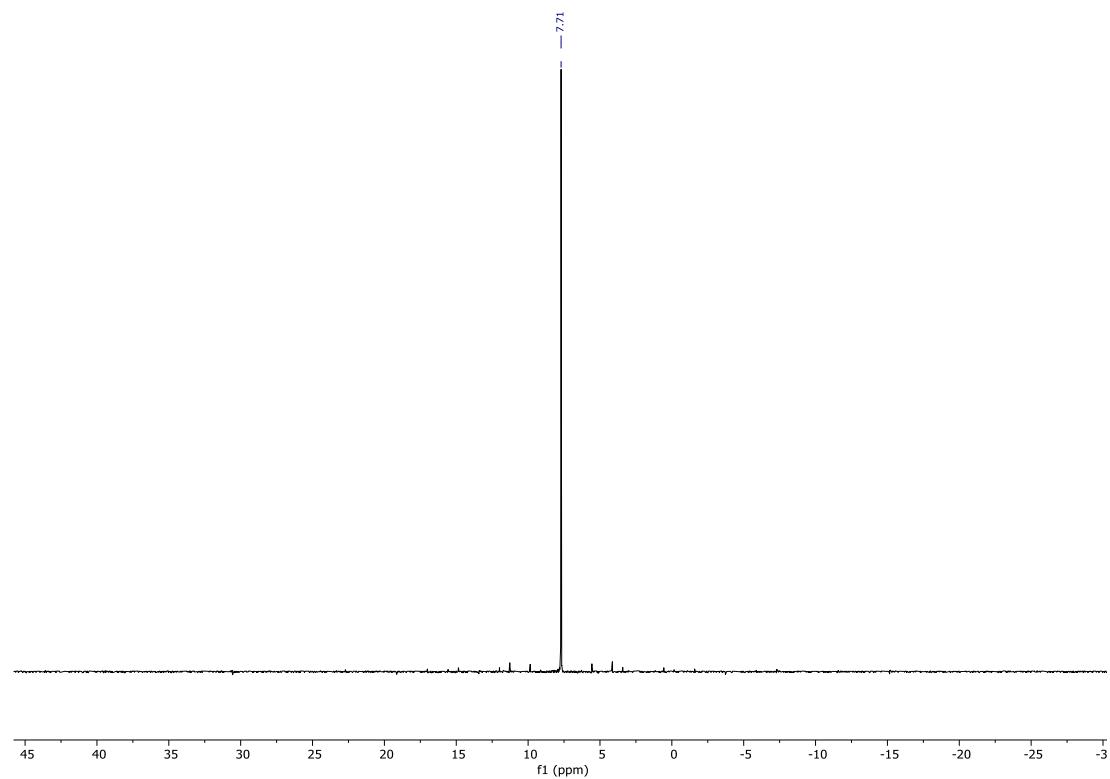


Abbildung 113: ¹H-NMR (243 MHz, D₂O) von Verbindung 40.

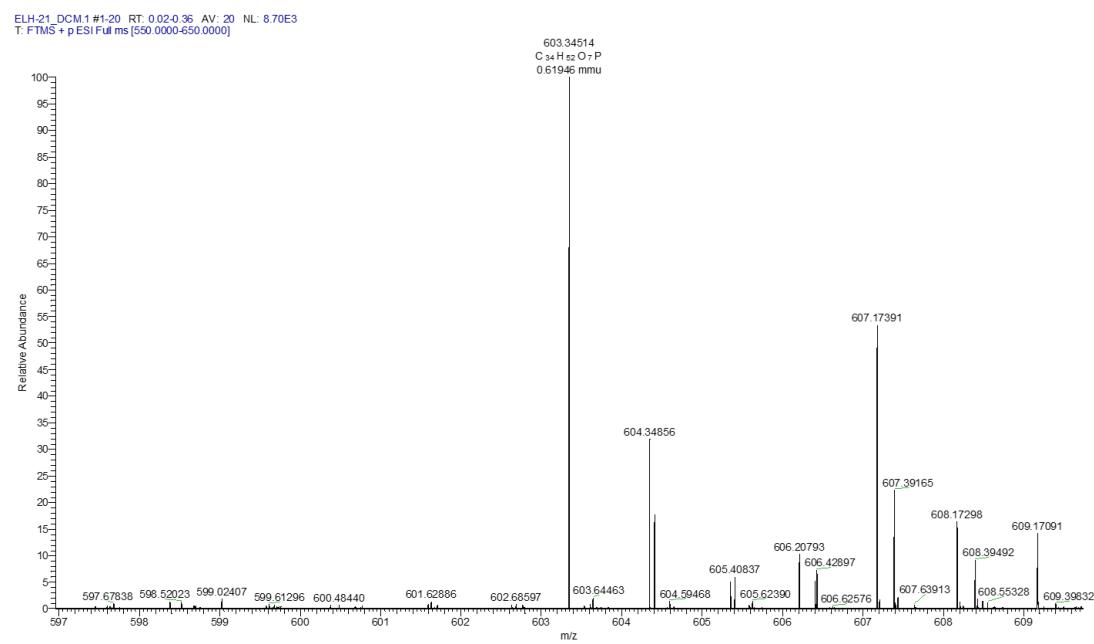


Abbildung 114: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 40.

Verbindung 28

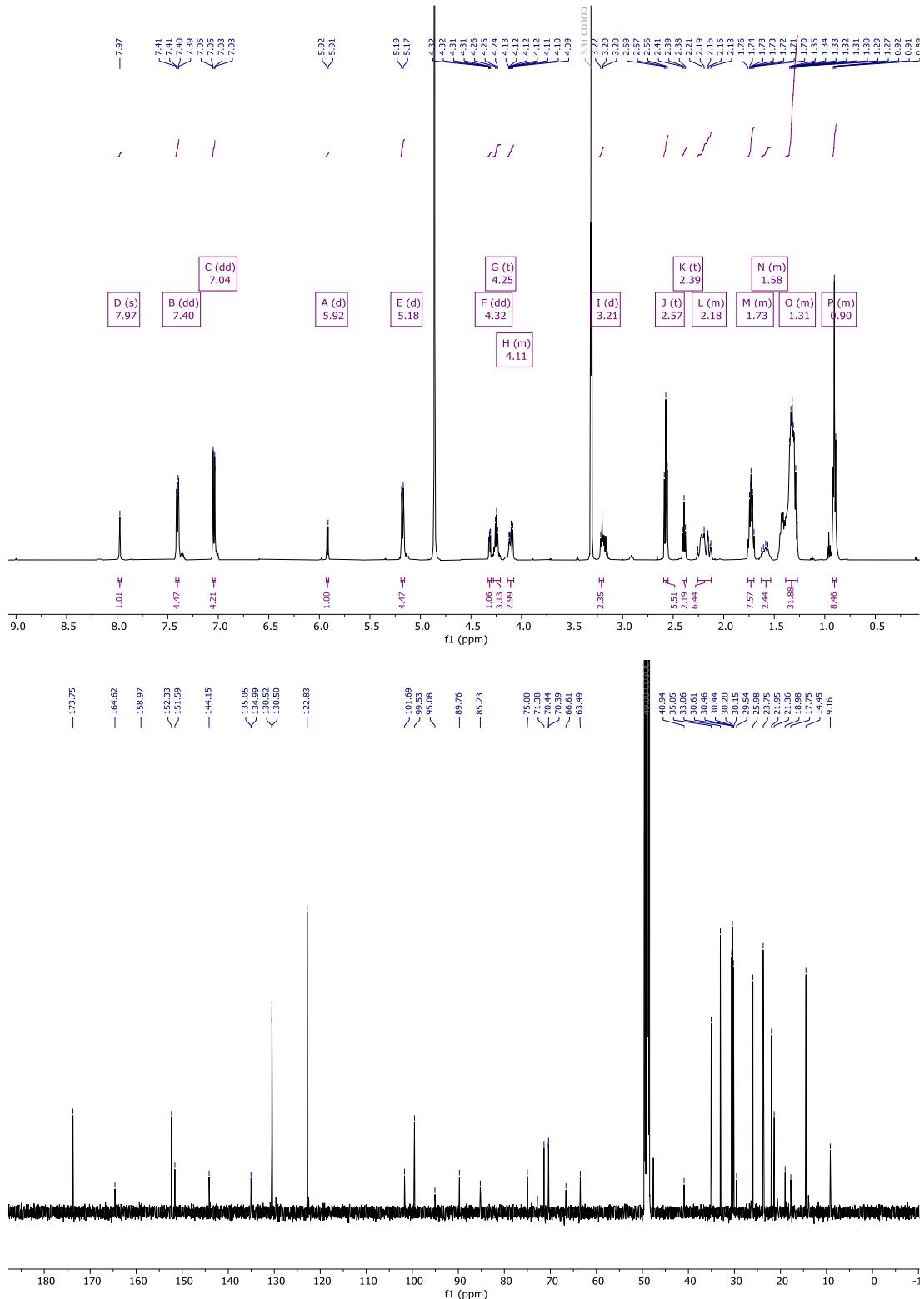


Abbildung 115: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 500 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 126 MHz) von Verbindung 28.

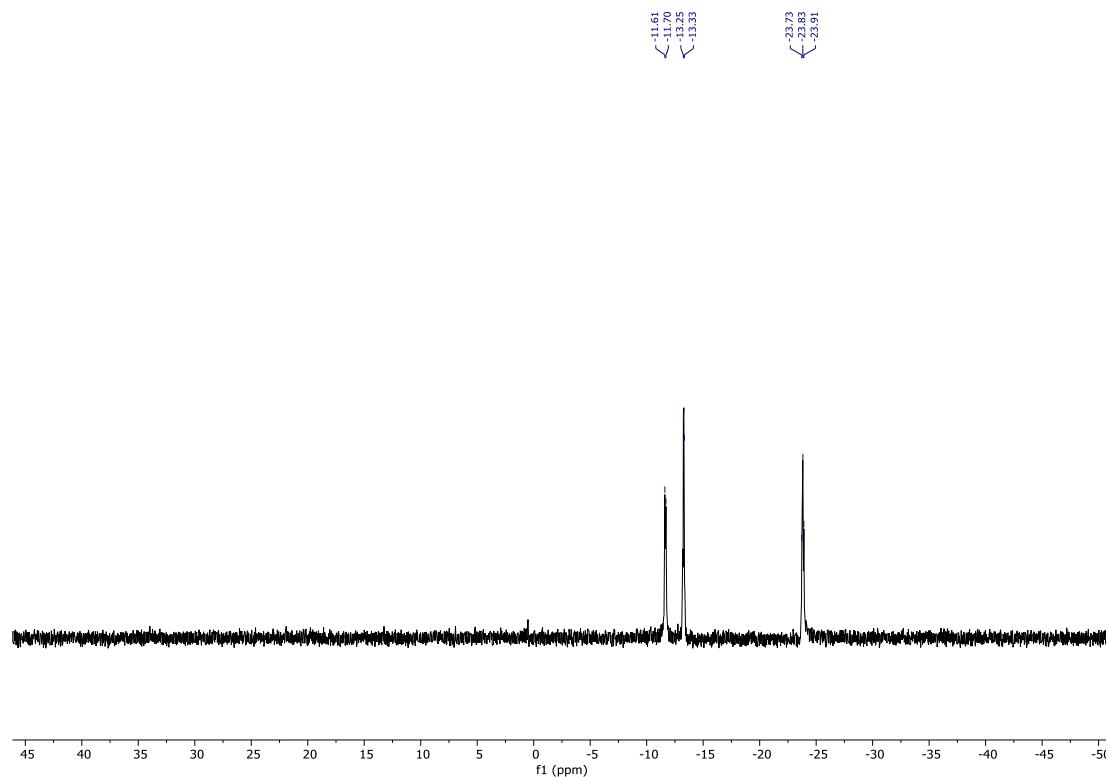


Abbildung 116: ¹H-NMR (202 MHz, D₂O) von Verbindung 28.

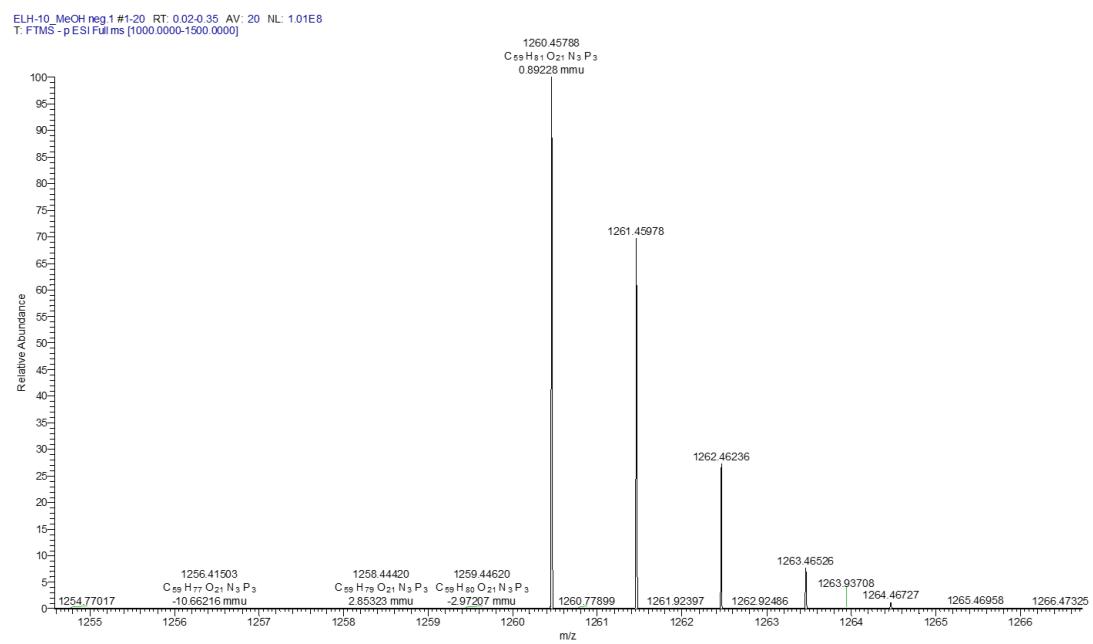


Abbildung 117: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 28.

Verbindung 50

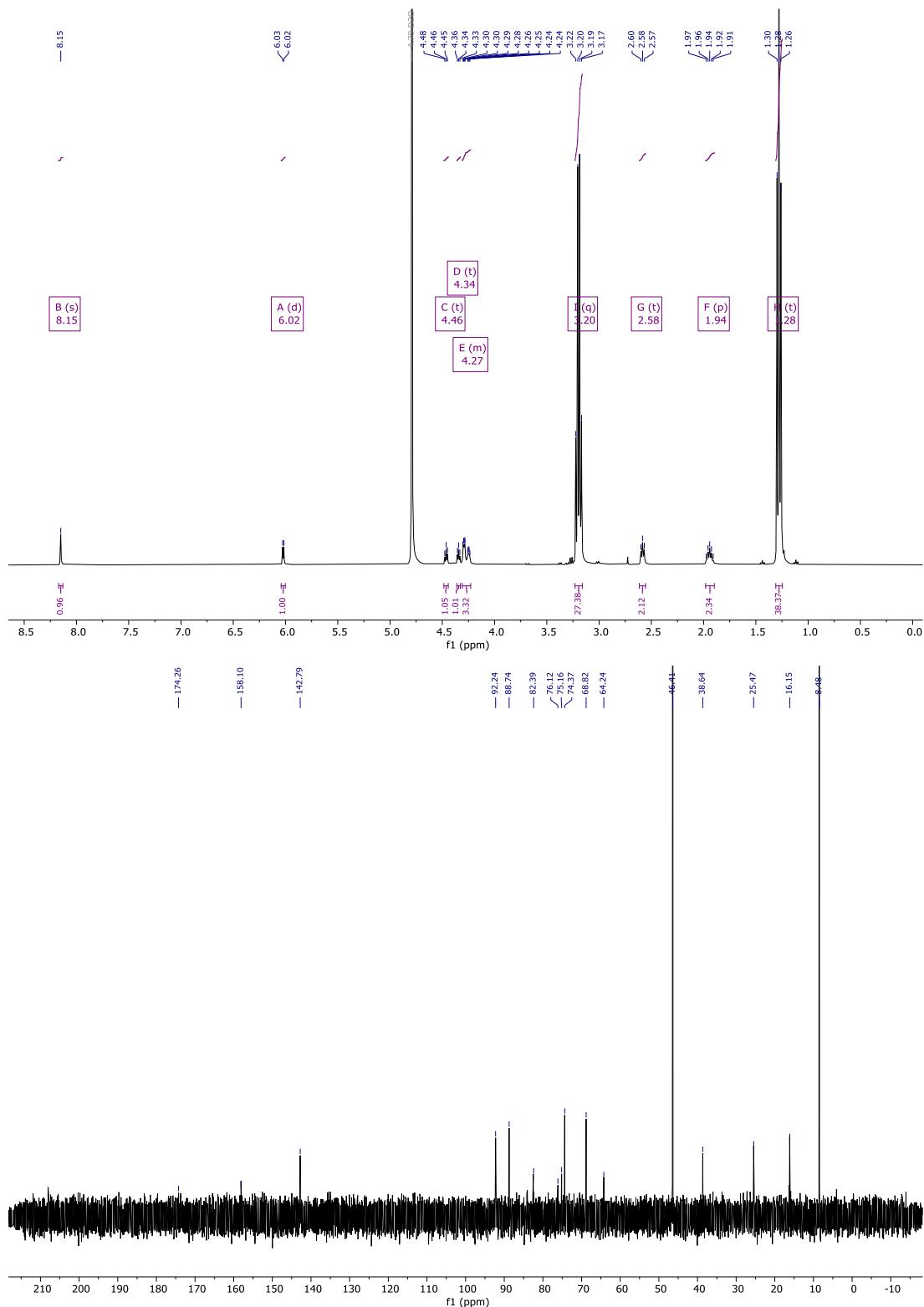


Abbildung 118: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl_3 , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl_3 , 101 MHz) von Verbindung 50.

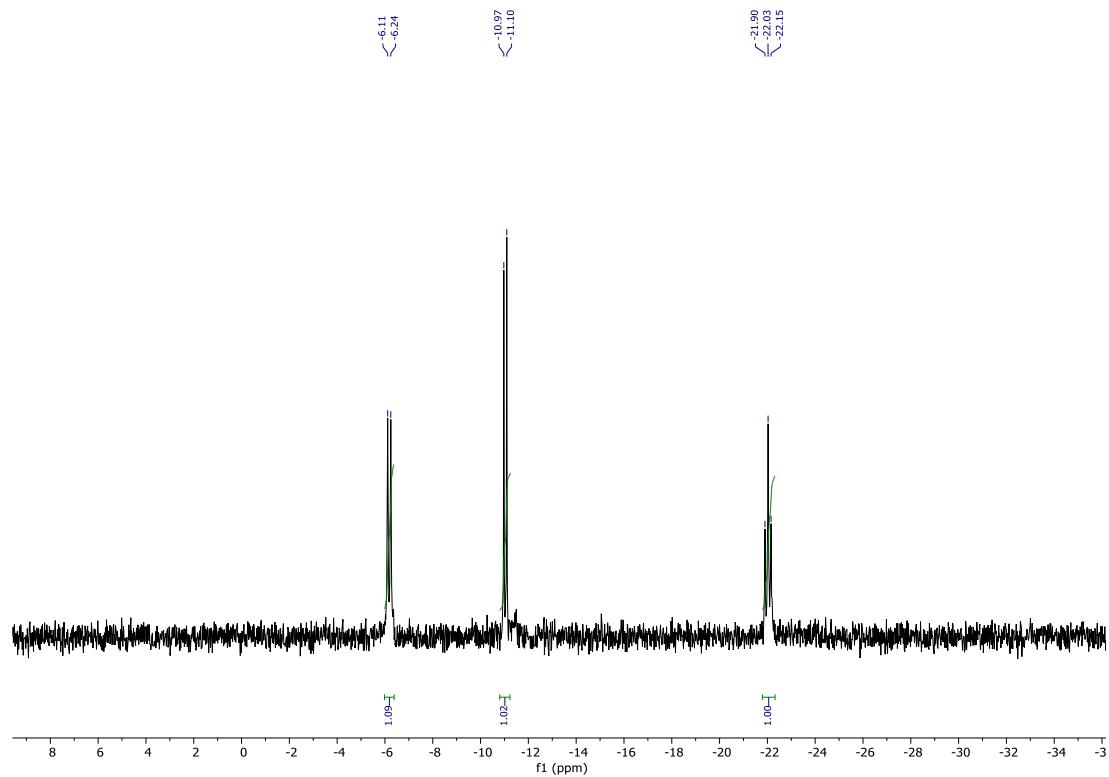


Abbildung 119: ^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O) von Verbindung **50**.

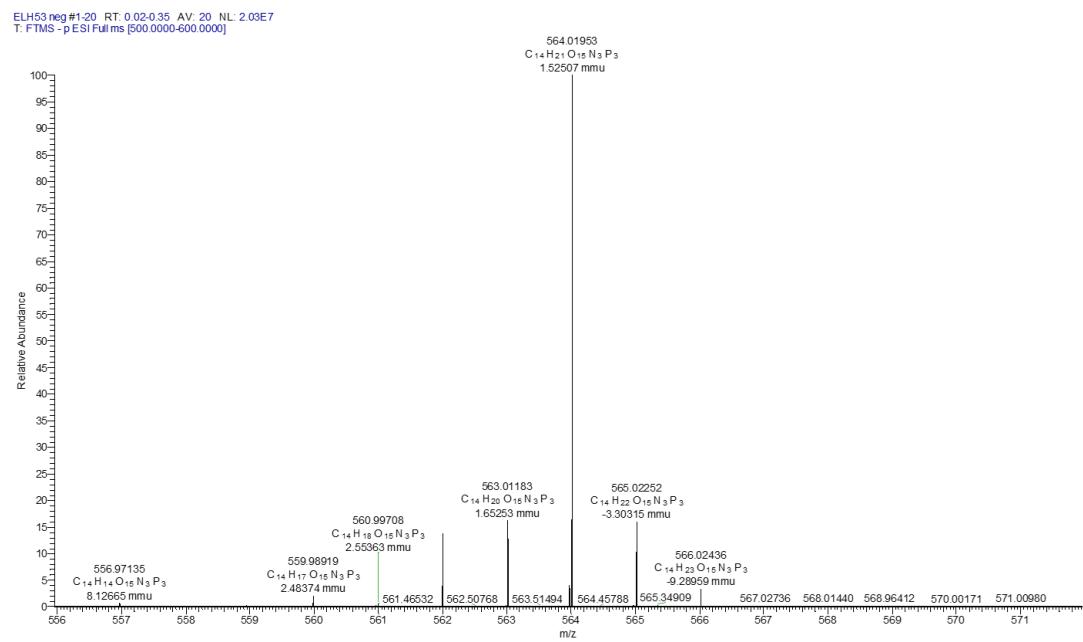


Abbildung 120: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung **50**.

Verbindung 45

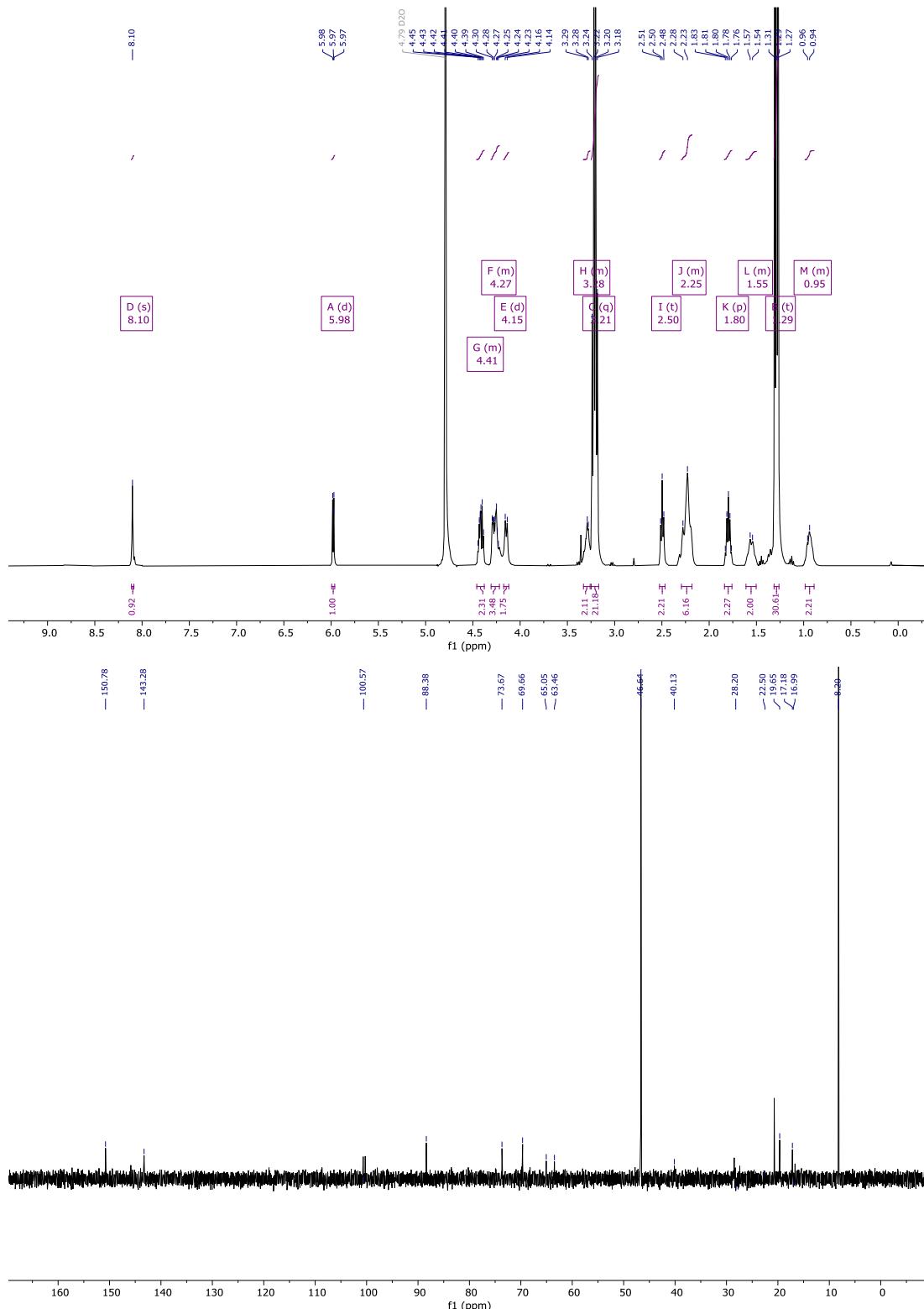


Abbildung 121: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 45.

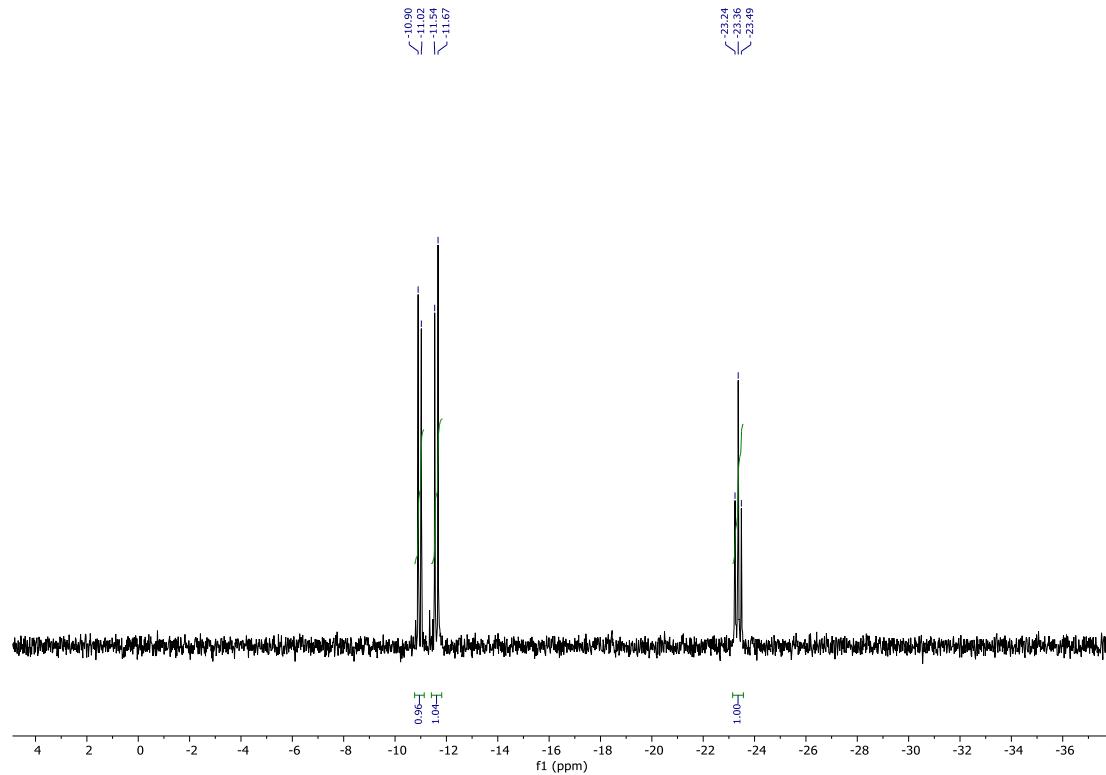


Abbildung 122: ^1H -NMR (202 MHz, D_2O) von Verbindung 45.

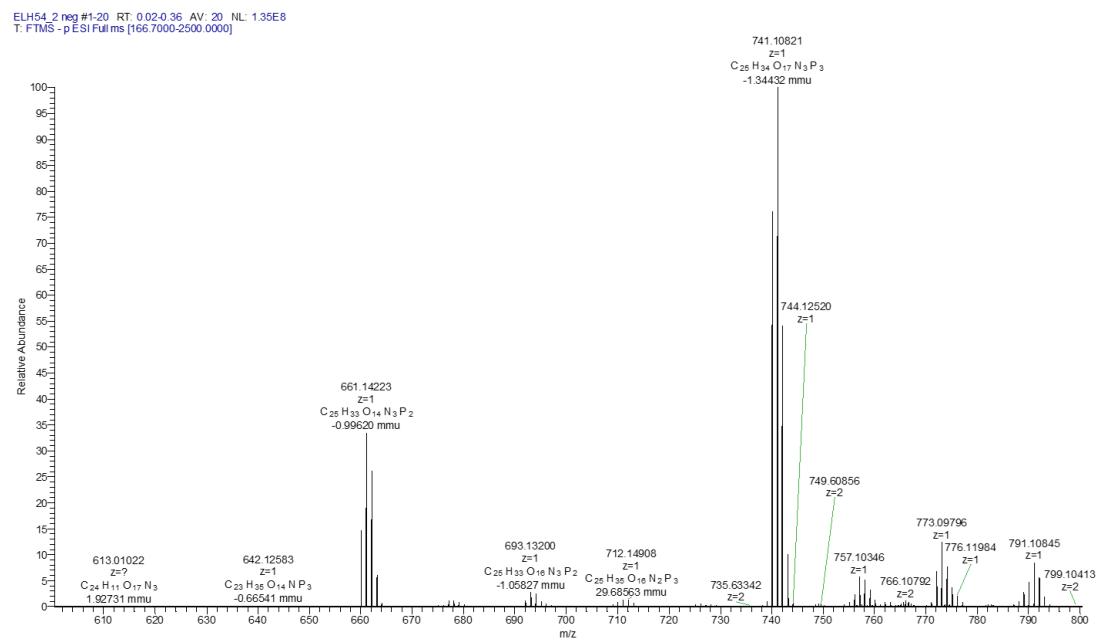


Abbildung 123: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 45.

Verbindung 44

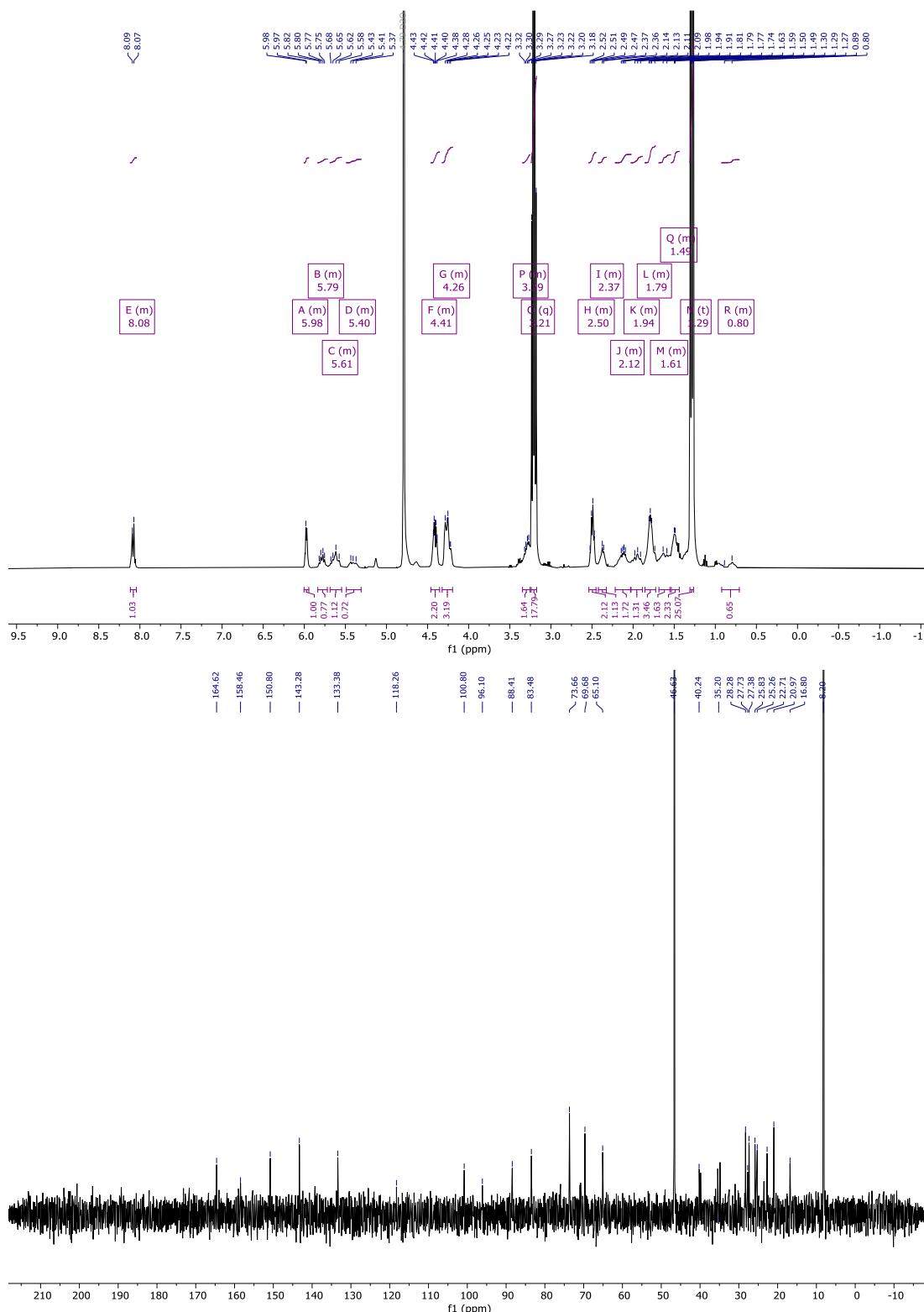


Abbildung 124: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl_3 , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl_3 , 101 MHz) von Verbindung 44.

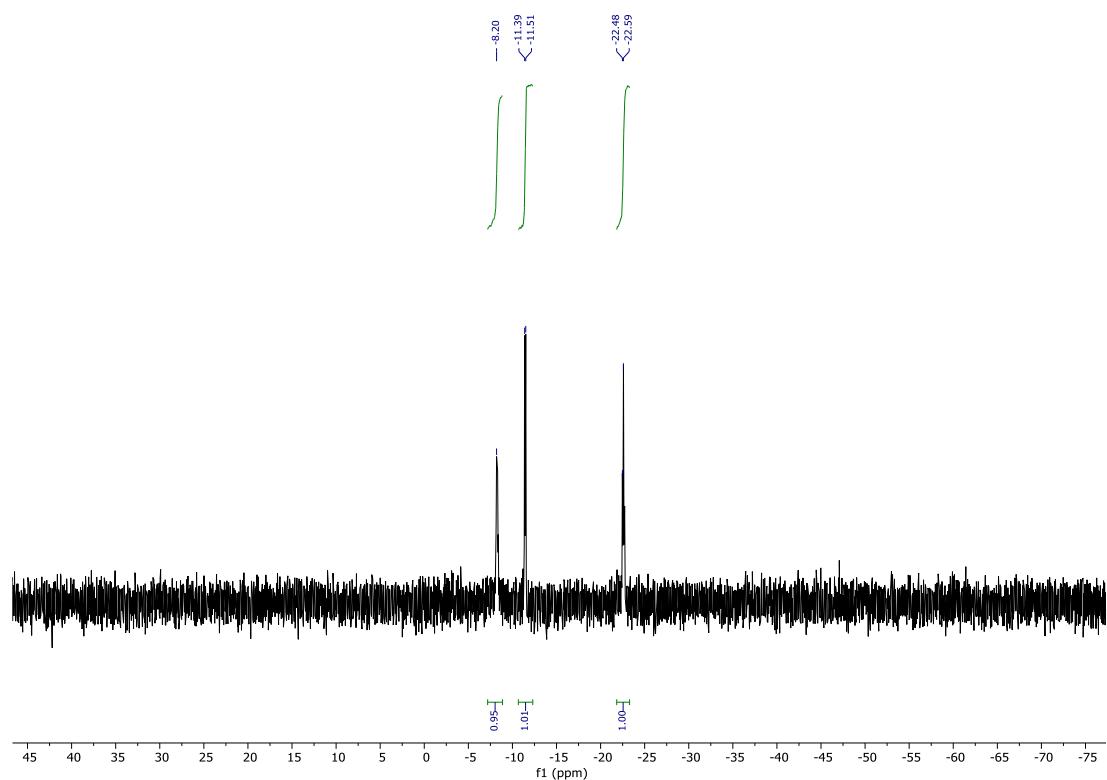


Abbildung 125: ³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) von Verbindung 44.

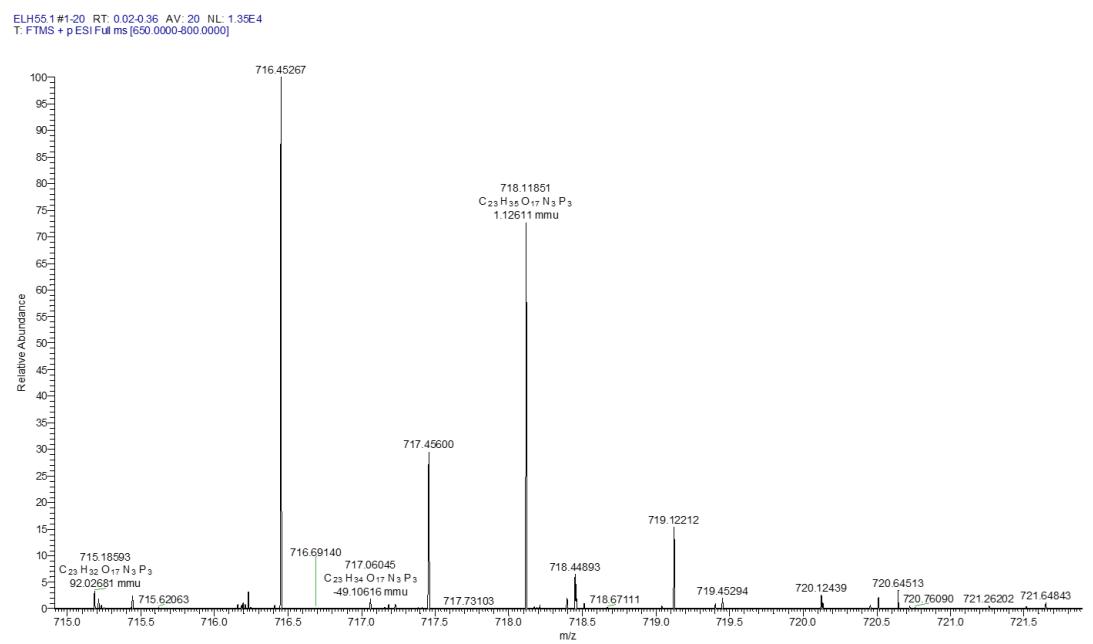


Abbildung 126: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 44.

Verbindung 47

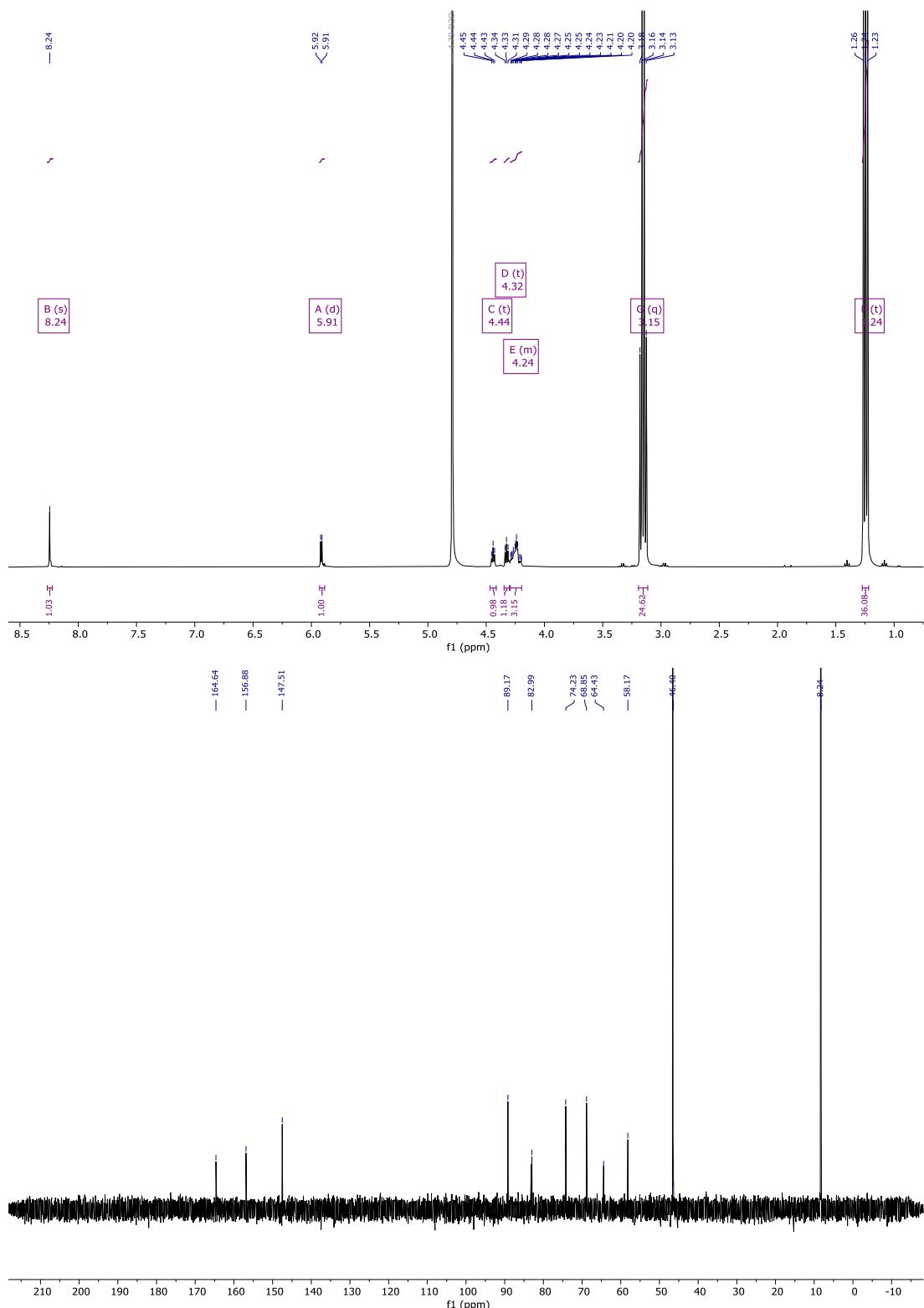


Abbildung 127: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 47.

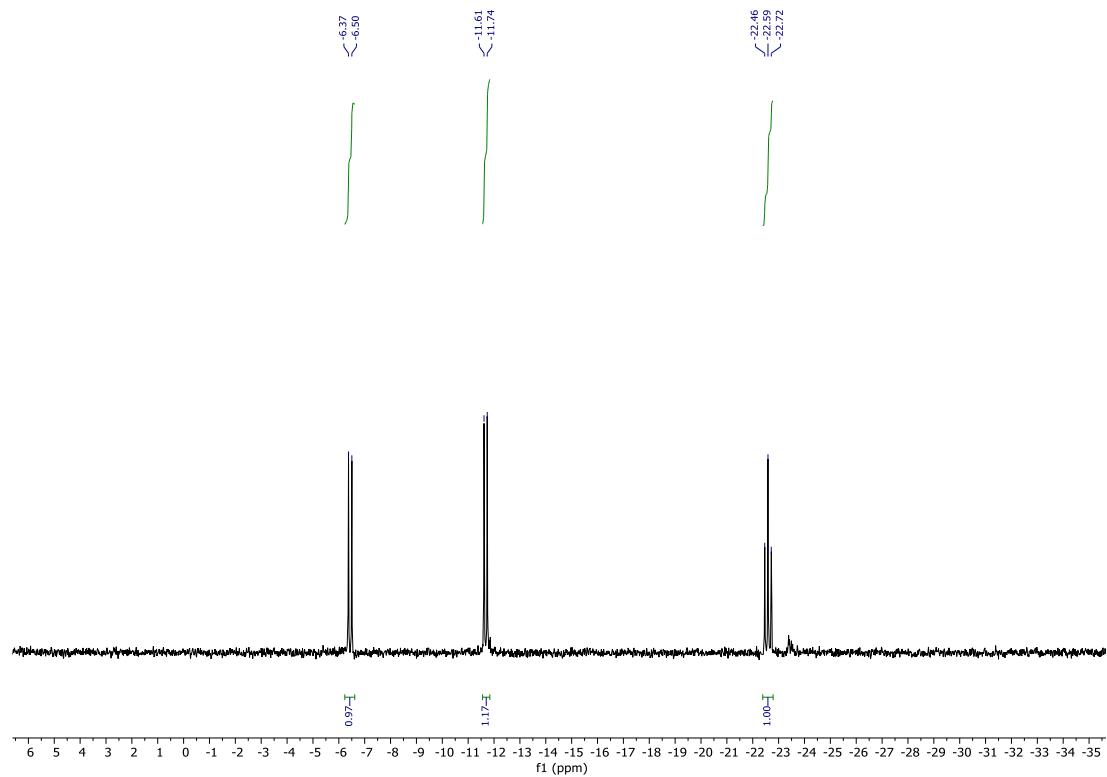


Abbildung 128: ^1H -NMR (202 MHz, D_2O) von Verbindung 47.

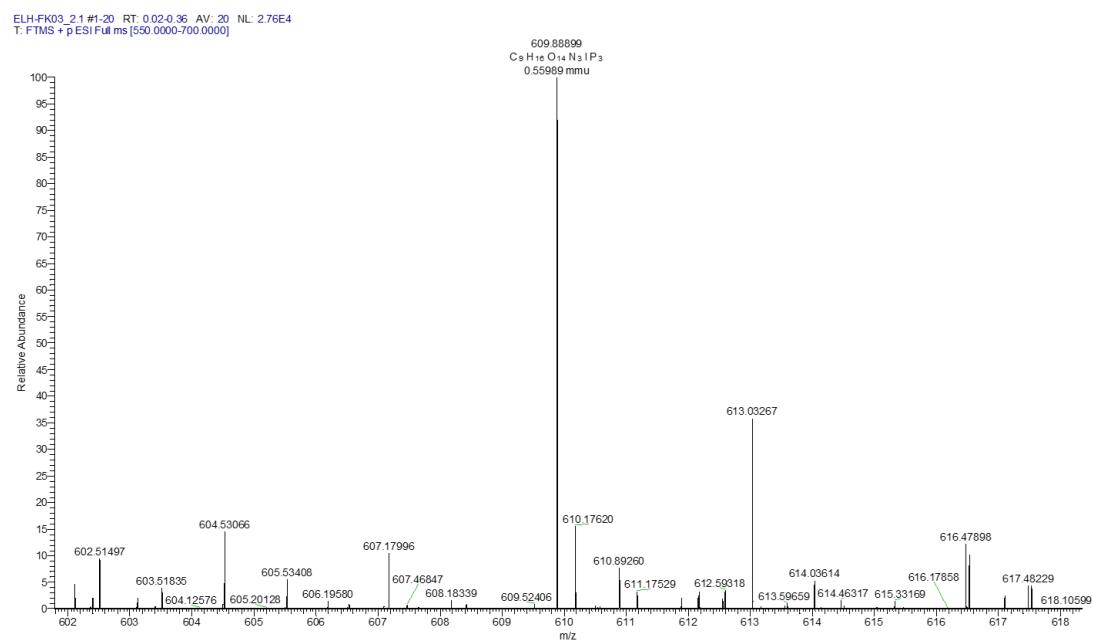


Abbildung 129: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 47.

Verbindung 49

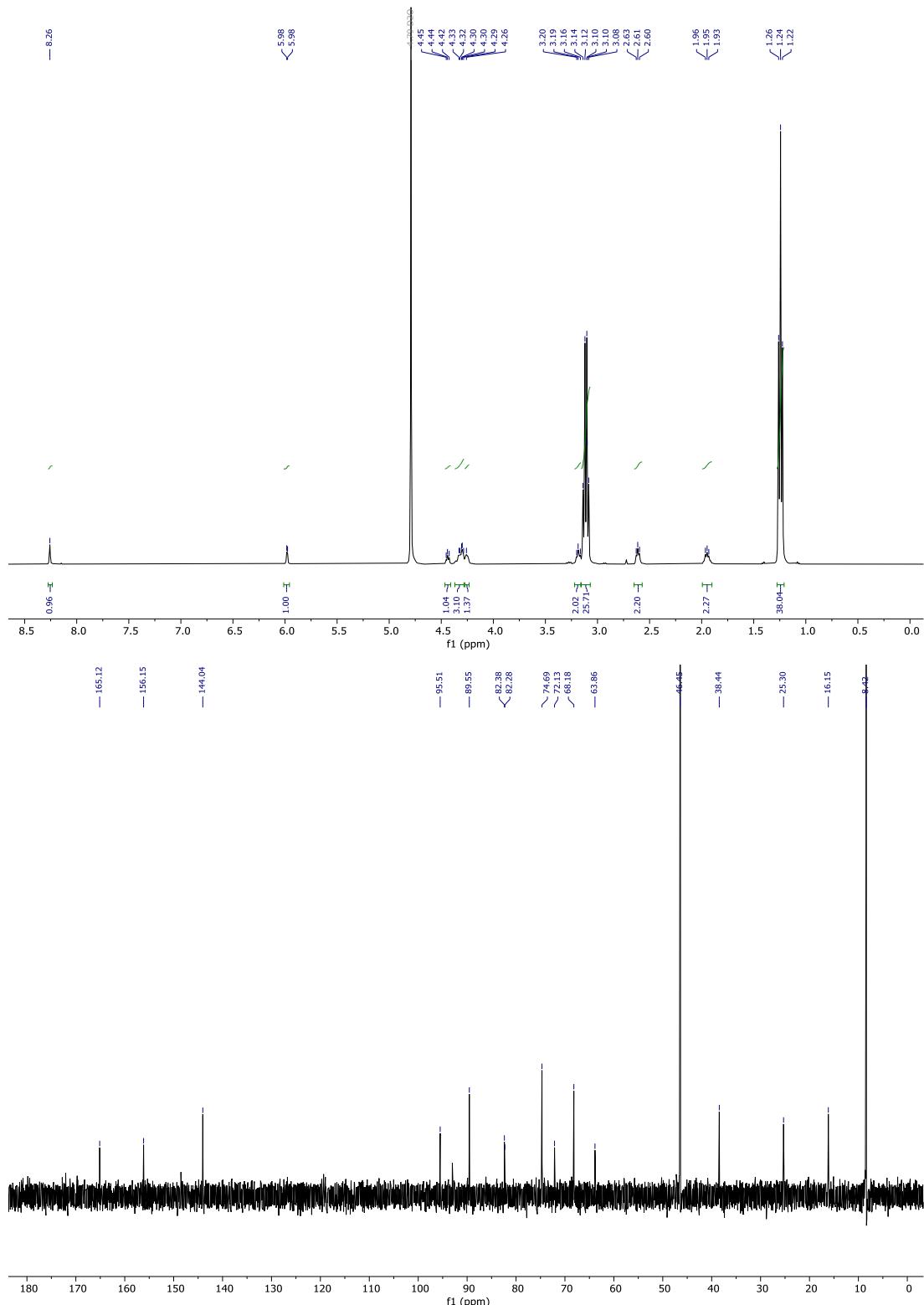


Abbildung 130: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl₃, 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl₃, 101 MHz) von Verbindung 49.

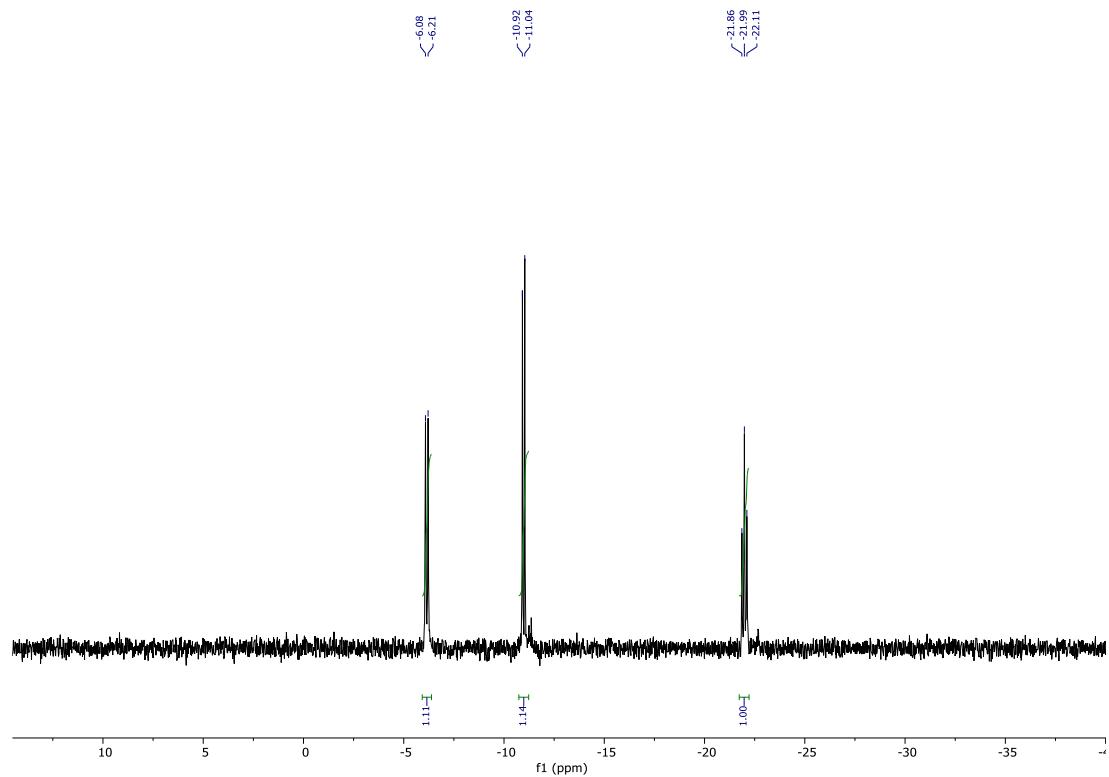


Abbildung 131: ³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) von Verbindung 49.

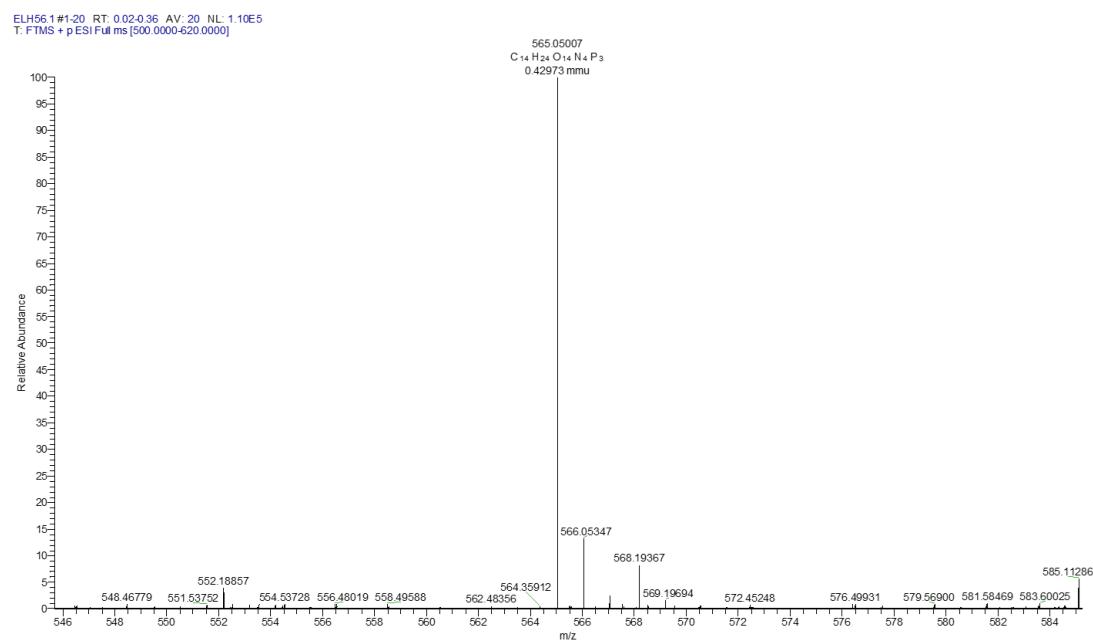


Abbildung 132: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 49.

Verbindung 43

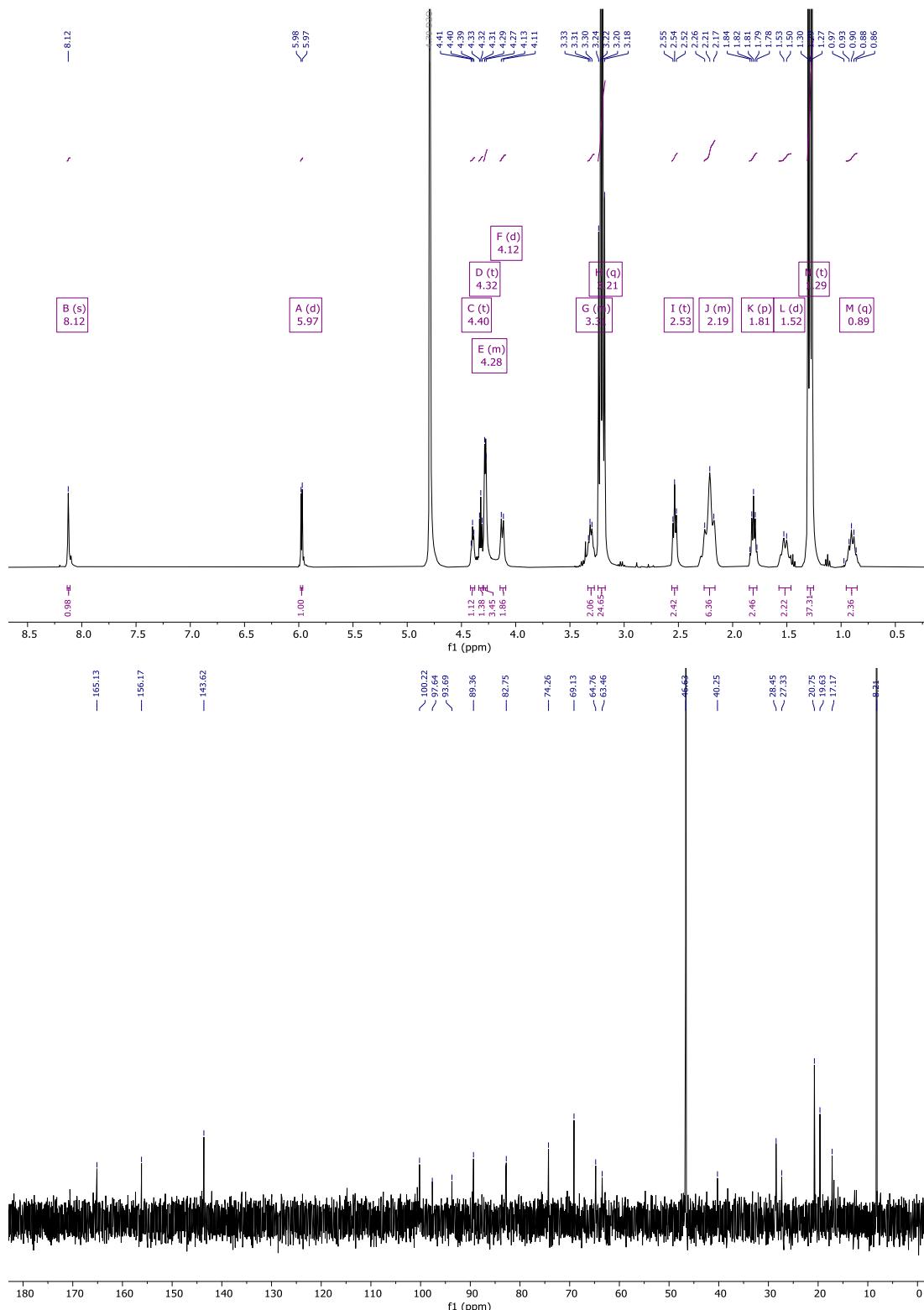


Abbildung 133: ^1H -NMR Spektrum (oben, CDCl_3 , 400 MHz) und ^{13}C -Spektrum (unten, CDCl_3 , 101 MHz) von Verbindung 43.

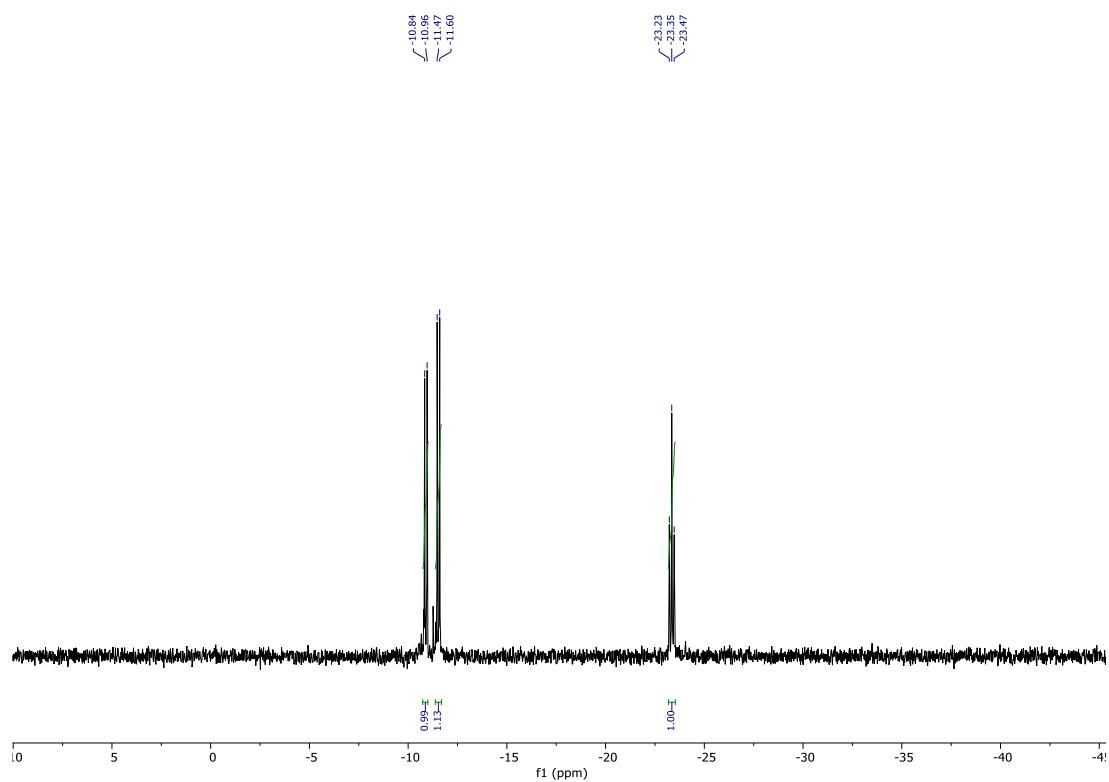


Abbildung 134: ^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O) von Verbindung 43.

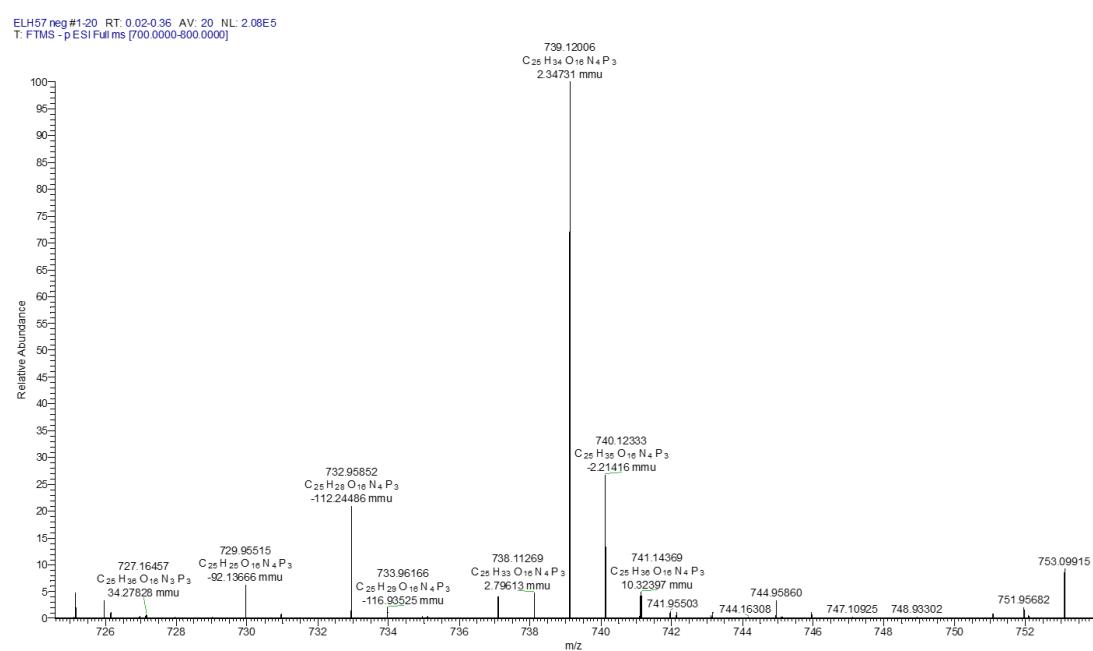


Abbildung 135: HR-ESI-Massenspektrum von Verbindung 43.

XII. Literaturverzeichnis

- (1) Crick, F. *Nature* **1970**, 227, 561-563.
- (2) Krause, M. Chapter 20 Transcription and Translation. In *Methods in Cell Biology*, Epstein, H. F., Shakes, D. C. Eds.; Vol. 48; Academic Press, 1995; 483-512.
- (3) Sharp, P. A. *Cell* **2009**, 136, 577-580.
- (4) Mortimer, S. A.; Kidwell, M. A.; Doudna, J. A. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, 15, 469-479.
- (5) Kleiner, R. E. *Mol. Omics* **2021**, 17, 833-841.
- (6) Nobel Prize lecture. (accessed 14.09.2025 (20:52 Uhr)).
- (7) Scinto, S. L.; Bilodeau, D. A.; Hincapie, R.; Lee, W.; Nguyen, S. S.; Xu, M.; Am Ende, C. W.; Finn, M.; Lang, K.; Lin, Q. *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, 1, 30.
- (8) Bird, R. E.; Lemmel, S. A.; Yu, X.; Zhou, Q. A. *Bioconjug. Chem.* **2021**, 32, 2457-2479.
- (9) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13-21.
- (10) Haun, R. S.; Quick, C. M.; Siegel, E. R.; Raju, I.; Mackintosh, S. G.; Tackett, A. J. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, 16, 1557-1565.
- (11) Yi, W.; Xiao, P.; Liu, X.; Zhao, Z.; Sun, X.; Wang, J.; Zhou, L.; Wang, G.; Cao, H.; Wang, D. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2022**, 7, 386.
- (12) Wang, Y.; Hu, Q. *Adv. Nanobiomed Res.* **2023**, 3, 2200128.
- (13) Chu, Y.; Corey, D. R. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, 22, 271-274.
- (14) Harwood, R.; Itzhaki, S. *Biochem. J.* **1972**, 128, 91P-92P.
- (15) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Chem. Rev.* **2021**, 121, 7122-7154.
- (16) Gratzner, H. G. *Science* **1982**, 218, 474-475.
- (17) Cmarko, D.; Verschure, P. J.; Martin, T. E.; Dahmus, M. E.; Krause, S.; Fu, X.-D.; van Driel, R.; Fakan, S. *Mol. Biol. Cell* **1999**, 10, 211-223.
- (18) Koberna, K.; Staněk, D.; Malínský, J.; Čtrnáctá, V.; Cermanová, Š.; Novotná, J.; Kopský, V.; Raška, I. *Acta Histochem.* **2000**, 102, 15-20.
- (19) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, 287, 2007-2010.
- (20) Knaack, J. I. H.; Meier, C. *ChemMedChem* **2024**, 19, e202400160.
- (21) Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635-646.
- (22) Saxon, E.; Luchansky, S. J.; Hang, H. C.; Yu, C.; Lee, S. C.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14893-14902.
- (23) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 19-24.
- (24) Chuh, K. N.; Pratt, M. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 24, 27-37.
- (25) Baccaro, A.; Weisbrod, S.; Marx, A. *Synthesis* **2007**, 2007, 1949-1954.
- (26) Weisbrod, S. H.; Marx, A. *Chem. Commun.* **2007**, 1828-1830.
- (27) van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8806-8827.
- (28) Nguyen, S. S.; Prescher, J. A. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, 4, 476-489.
- (29) Chang, P. V.; Prescher, J. A.; Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8400-8401.
- (30) Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.
- (31) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
- (32) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- (33) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- (34) Oliveira, B. L.; Guo, Z.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895-4950.
- (35) Lin, F. L.; Hoyt, H. M.; van Halbeek, H.; Bergman, R. G.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686-2695.
- (36) Lang, K.; Chin, J. W. *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 16-20.

- (37) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- (38) Klöcker, N.; Weissenboeck, F. P.; Rentmeister, A. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8749-8773.
- (39) Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869-2872.
- (40) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C.; Danielson, D. C.; Blake, J. A.; Pegoraro, A. F.; Stolow, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993-18001.
- (41) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644-648.
- (42) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- (43) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
- (44) Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1912-1921.
- (45) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.
- (46) Pinto-Pacheco, B.; Carbery, W. P.; Khan, S.; Turner, D. B.; Buccella, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 22140-22149.
- (47) Wieczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506-1510.
- (48) Eggert, F.; Kulikov, K.; Domnick, C.; Leifels, P.; Kath-Schorr, S. *Methods* **2017**, *120*, 17-27.
- (49) Geng, P.; List, E.; Rönneke, F.; Wagenknecht, H. A. *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*.
- (50) Eördög, Á.; Steinmeyer, J.; Peewasan, K.; Schepers, U.; Wagenknecht, H.-A.; Kele, P. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 457-464.
- (51) Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- (52) Schoch, J.; Staudt, M.; Samanta, A.; Wiessler, M.; Jäschke, A. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1382-1386.
- (53) Su, Y.-C.; Lo, Y.-L.; Hwang, C.-C.; Wang, L.-F.; Wu, M. H.; Wang, E.-C.; Wang, Y.-M.; Wang, T.-P. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6624-6633.
- (54) Holstein, J. M.; Anhäuser, L.; Rentmeister, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10899-10903.
- (55) George, J. T.; Srivatsan, S. G. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 12307-12318.
- (56) Pyka, A. M.; Domnick, C.; Braun, F.; Kath-Schorr, S. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1438-1443.
- (57) Ploschik, D.; Rönneke, F.; Beike, H.; Strasser, R.; Wagenknecht, H. A. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1949-1953.
- (58) Salic, A.; Mitchison, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2415-2420.
- (59) Hong, S.; Chen, T.; Zhu, Y.; Li, A.; Huang, Y.; Chen, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5827-5831.
- (60) Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Okada, M.; Ando, J.; Palonpon, A.; Fujita, K.; Kawata, S.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6102-6105.
- (61) Zhao, H.; Halicka, H. D.; Li, J.; Biela, E.; Berniak, K.; Dobrucki, J.; Darzynkiewicz, Z. *Cytometry Part A* **2013**, *83*, 979-988.
- (62) Kohlmeier, F.; Maya-Mendoza, A.; Jackson, D. A. *Chromosome Res.* **2013**, *21*, 87-100.
- (63) Neef, A. B.; Luedtke, N. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 20404-20409.
- (64) Guan, L.; Van Der Heijden, G. W.; Bortvin, A.; Greenberg, M. M. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2184-2190.
- (65) Neef, A. B.; Samain, F.; Luedtke, N. W. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1750-1753.
- (66) Neef, A. B.; Luedtke, N. W. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 789-793.
- (67) Ganz, D.; Harijan, D.; Wagenknecht, H.-A. *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1*, 86-97.
- (68) Jao, C. Y.; Salic, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15779-15784.
- (69) Grammel, M.; Hang, H.; Conrad, N. K. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1112.
- (70) Zheng, Y.; Beal, P. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1799-1802.

- (71) Dvořáčková, M.; Fajkus, J. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*.
- (72) Adam, S.; Sophie; Almouzni, G. *Cell* **2013**, *155*, 94-106.
- (73) Purba, T. S.; Marsh, J.; Ng'andu, K.; Kurinna, S.; Paus, R. *BioTechniques* **2018**, *65*, 97-100.
- (74) Hagemeijer, M. C.; Vonk, A. M.; Monastyrská, I.; Rottier, P. J.; de Haan, C. A. *J. Virol.* **2012**, *86*, 5808-5816.
- (75) Bao, X.; Guo, X.; Yin, M.; Tariq, M.; Lai, Y.; Kanwal, S.; Zhou, J.; Li, N.; Lv, Y.; Pulido-Quetglas, C.; Wang, X.; Ji, L.; Khan, M. J.; Zhu, X.; Luo, Z.; Shao, C.; Lim, D.-H.; Liu, X.; Li, N.; Wang, W.; He, M.; Liu, Y.-L.; Ward, C.; Wang, T.; Zhang, G.; Wang, D.; Yang, J.; Chen, Y.; Zhang, C.; Jauch, R.; Yang, Y.-G.; Wang, Y.; Qin, B.; Anko, M.-L.; Hutchins, A. P.; Sun, H.; Wang, H.; Fu, X.-D.; Zhang, B.; Esteban, M. A. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 213-220.
- (76) Abe, K.; Ishigami, T.; Shyu, A.-B.; Ohno, S.; Umemura, S.; Yamashita, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *428*, 44-49.
- (77) Battich, N.; Beumer, J.; De Barbanson, B.; Krenning, L.; Baron, C. S.; Tanenbaum, M. E.; Clevers, H.; Van Oudenaarden, A. *Science* **2020**, *367*, 1151-1156.
- (78) Kubota, M.; Nainar, S.; Parker, S. M.; England, W.; Furche, F.; Spitale, R. C. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 1698-1707.
- (79) Qu, D.; Zhou, L.; Wang, W.; Wang, Z.; Wang, G.; Chi, W.; Zhang, B. *Anal. Biochem.* **2013**, *434*, 128-135.
- (80) Curanovic, D.; Cohen, M.; Singh, I.; Slagle, C. E.; Leslie, C. S.; Jaffrey, S. R. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 671-673.
- (81) Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- (82) Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5872-5876.
- (83) Yu, T.-W.; Anderson, D. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* **1997**, *379*, 201-210.
- (84) Besanceney-Webler, C.; Jiang, H.; Zheng, T.; Feng, L.; Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Klivansky, L. M.; Marlow, F. L.; Liu, Y.; Wu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051-8056.
- (85) Samanta, A.; Krause, A.; Jäschke, A. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1313-1316.
- (86) Rao, H.; Tanpure, A. A.; Sawant, A. A.; Srivatsan, S. G. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1097-1112.
- (87) Gopalakrishna, S.; Gusti, V.; Nair, S.; Sahar, S.; Gaur, R. K. *RNA* **2004**, *10*, 1820-1830.
- (88) Sawant, A. A.; Tanpure, A. A.; Mukherjee, P. P.; Athavale, S.; Kelkar, A.; Galande, S.; Srivatsan, S. G. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *44*, e16-e16.
- (89) Mathews, I. I.; Erion, M. D.; Ealick, S. E. *Biochemistry* **1998**, *37*, 15607-15620.
- (90) Suzuki, N. N.; Koizumi, K.; Fukushima, M.; Matsuda, A.; Inagaki, F. *Structure* **2004**, *12*, 751-764.
- (91) Sawant, A. A.; Galande, S.; Srivatsan, S. G. Imaging Newly Transcribed RNA in Cells by Using a Clickable Azide-Modified UTP Analog. In *RNA Detection: Methods and Protocols*, Gaspar, I. Ed.; Springer New York, 2018; 359-371.
- (92) Zhang, Y.; Kleiner, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3347-3351.
- (93) Nainar, S.; Beasley, S.; Fazio, M.; Kubota, M.; Dai, N.; Corrêa, I. R.; Spitale, R. C. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2149-2152.
- (94) Nainar, S.; Cuthbert, B. J.; Lim, N. M.; England, W. E.; Ke, K.; Sophal, K.; Quechol, R.; Mobley, D. L.; Goulding, C. W.; Spitale, R. C. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 311-318.
- (95) Neef, A. B.; Pernot, L.; Schreier, V. N.; Scapozza, L.; Luedtke, N. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7911-7914.
- (96) Tera, M.; Glasauer, S. M. K.; Luedtke, N. W. *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1939-1943.
- (97) Gupta, M.; Levine, S. R.; Spitale, R. C. *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 2647-2659.
- (98) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. In *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry*, Vrabel, M., Carell, T. Eds.; Springer International Publishing, 2016; 57-76.

- (99) Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *29*, 686-701.
- (100) Upadhyay, R.; Rastogi, S.; Mishra, A. K.; Yadav, S.; Yadav, A. K.; Maurya, S. K. *Asian J. Org. Chem.* **2025**, e00505.
- (101) Rieder, U.; Luedtke, N. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9168-9172.
- (102) Bußkamp, H.; Batroff, E.; Niederwieser, A.; Abdel-Rahman, O. S.; Winter, R. F.; Wittmann, V.; Marx, A. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827-10829.
- (103) Liu, H.-s.; Ishizuka, T.; Kawaguchi, M.; Nishii, R.; Kataoka, H.; Xu, Y. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2958-2966.
- (104) George, J. T.; Srivatsan, S. G. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1529-1536.
- (105) Loehr, M. O.; Luedtke, N. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*.
- (106) Yu, A.; He, X.; Shen, T.; Yu, X.; Mao, W.; Chi, W.; Liu, X.; Wu, H. *Chem. Soc. Rev.* **2025**, *54*, 2984-3016.
- (107) Pfeuffer, B.; Geng, P.; Wagenknecht, H. A. *ChemBioChem* **2024**, *25*.
- (108) Deb, T.; Tu, J.; Franzini, R. M. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6850-6914.
- (109) Thalhammer, F.; Wallfahrer, U.; Sauer, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6851-6854.
- (110) Bickelhaupt, F. M.; Houk, K. N. *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 10204-10221.
- (111) Liu, F.; Liang, Y.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11483-11493.
- (112) Liu, F.; Paton, R. S.; Kim, S.; Liang, Y.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15642-15649.
- (113) Liu, F.; Liang, Y.; Houk, K. N. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2297-2308.
- (114) Barrows, S. E.; Eberlein, T. H. *J. Chem. Educ.* **2005**, *82*, 1334.
- (115) Royzen, M.; Yap, G. P. A.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3760-3761.
- (116) Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Dmitrenko, O.; Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646-9649.
- (117) Chen, W.; Wang, D.; Dai, C.; Hamelberg, D.; Wang, B. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1736-1738.
- (118) Darko, A.; Wallace, S.; Dmitrenko, O.; Machovina, M. M.; Mehl, R. A.; Chin, J. W.; Fox, J. M. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770-3776.
- (119) Lutz, S.; Liu, L.; Liu, Y. *CHIMIA* **2009**, *63*, 737.
- (120) Ganz, D.; Geng, P.; Wagenknecht, H.-A. *ACS Chem. Biol.* **2023**, *18*, 1054-1059.
- (121) Sterrenberg, V. T.; Stalling, D.; Knaack, J. I. H.; Soh, T. K.; Bosse, J. B.; Meier, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*.
- (122) Chapman, T. M.; McGavin, J. K.; Noble, S. *Drugs* **2003**, *63*, 1597-1608.
- (123) Lam, A. M.; Murakami, E.; Espiritu, C.; Steuer, H. M. M.; Niu, C.; Keilman, M.; Bao, H.; Zennou, V.; Bourne, N.; Julander, J. G.; Morrey, J. D.; Smee, D. F.; Frick, D. N.; Heck, J. A.; Wang, P.; Nagarathnam, D.; Ross, B. S.; Sofia, M. J.; Otto, M. J.; Furman, P. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3187-3196.
- (124) Scott, L. J.; Chan, H. L. *Drugs* **2017**, *77*, 1017-1028.
- (125) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.
- (126) Keating, G. M.; Vaidya, A. *Drugs* **2014**, *74*, 273-282.
- (127) Slusarczyk, M.; Serpi, M.; Pertusati, F. *Antiviral Chem. Chemother.* **2018**, *26*, 2040206618775243.
- (128) Sofia, M. J.; Furman, P. A. The discovery of sofosbuvir: a liver-targeted nucleotide prodrug for the treatment and cure of HCV. In *HCV: The Journey from Discovery to a Cure: Volume I*, Springer, 2019; 141-169.
- (129) Buti, M.; Riveiro-Barciela, M.; Esteban, R. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S792-S796.
- (130) Wu, K.; He, M.; Khan, I.; Okai, P. A.; Lin, Q.; Fuchs, G.; Royzen, M. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 10456-10459.
- (131) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99-104.

- (132) Meier, C. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 219-234.
- (133) Meier, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1081-1102.
- (134) Meier, C.; Balzarini, J. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 282-292.
- (135) Meier, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1081-1102.
- (136) Meier, C. *Antiviral Chem. Chemother.* **2017**, *25*, 69-82.
- (137) Balzarini, J.; Aquaro, S.; Knispel, T.; Rampazzo, C.; Bianchi, V.; Perno, C.-F.; De Clercq, E.; Meier, C. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 928-935.
- (138) Meier, C.; Lomp, A.; Meerbach, A.; Wutzler, P. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5157-5172.
- (139) Meier, C.; Meerbach, A.; Balzarini, J. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 873-890.
- (140) Jessen, H. J.; Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.
- (141) Meier, C.; Jessen, H.; Schulz, T.; Weinschenk, L.; Pertenbreiter, F.; Balzarini, J. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3933-3950.
- (142) Thomson, W.; Nicholls, D.; Irwin, W. J.; Al-Mushadani, J. S.; Freeman, S.; Karpas, A.; Petrik, J.; Mahmood, N.; Hay, A. *J. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1993**, 1239-1245.
- (143) Weinschenk, L.; Gollnest, T.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 891-900.
- (144) Pertenbreiter, F.; Balzarini, J.; Meier, C. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 94-106.
- (145) Zawada, Z.; Tatar, A.; Mocilac, P.; Buděšínský, M.; Kraus, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9891-9895.
- (146) Kuba, M.; Khoroshyy, P.; Lepšík, M.; Kužmová, E.; Kodr, D.; Kraus, T.; Hocek, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*.
- (147) Güixens-Gallardo, P.; Zawada, Z.; Matyašovský, J.; Dziuba, D.; Pohl, R.; Kraus, T.; Hocek, M. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 3906-3912.
- (148) Spampinato, A.; Kužmová, E.; Pohl, R.; Sýkorová, V.; Vrábel, M.; Kraus, T.; Hocek, M. *Bioconjug. Chem.* **2023**, *34*, 772-780.
- (149) Dowd, P.; Gold, A. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 85-86.
- (150) Carter, F. L.; Frampton, V. L. *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 497-525.
- (151) Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476-7479.
- (152) Kamber, D. N.; Nazarova, L. A.; Liang, Y.; Lopez, S. A.; Patterson, D. M.; Shih, H.-W.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13680-13683.
- (153) Seul, N.; Lamade, D.; Stoychev, P.; Mijic, M.; Michenfelder, R. T.; Rieger, L.; Geng, P.; Wagenknecht, H. A. *Angew. Chem.* **2024**, *136*.
- (154) Pallerla, M. K.; Fox, J. M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3593-3595.
- (155) Späte, A.-K.; Bußkamp, H.; Niederwieser, A.; Schart, V. F.; Marx, A.; Wittmann, V. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 147-154.
- (156) Carlson, J. C. T.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917-6920.
- (157) Dumas-Verdes, C.; Miomandre, F.; Lépicier, E.; Galangau, O.; Vu, T. T.; Clavier, G.; Méallet-Renault, R.; Audebert, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2525-2535.
- (158) Geng, P. Synthese und Charakterisierung tetrazinmodifizierter Cyanin-Styryl-Fluorophore für die Markierung von Oligonukleotiden in vivo über bioorthogonale iEDDA-Reaktionen. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2023.
- (159) Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10752-10756.
- (160) Li, Z.; Qian, L.; Li, L.; Bernhammer, J. C.; Huynh, H. V.; Lee, J. S.; Yao, S. Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2002-2006.
- (161) Li, J.; Kong, H.; Zhu, C.; Zhang, Y. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 3390-3396.
- (162) Simms, D.; Cizdziel, P. E.; Chomczynski, P. *Focus* **1993**, *15*, 532-535.
- (163) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592-605.

- (164) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Xie, B.; Kamber, D. N.; Prescher, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638-18643.
- (165) Bertheussen, K.; van de Plassche, M.; Bakum, T.; Gagestein, B.; Ttofi, I.; Sarris, A. J.; Overkleef, H. S.; van der Stelt, M.; van Kasteren, S. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202207640.
- (166) Cahová, H.; Panattoni, A.; Kielkowski, P.; Fanfrlík, J.; Hocek, M. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 3165-3171.
- (167) Blizzard, R. J.; Backus, D. R.; Brown, W.; Bazewicz, C. G.; Li, Y.; Mehl, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10044-10047.
- (168) Golitsina, N. L.; Danehy, F. T.; Fellows, R.; Cretton-Scott, E.; Standring, D. N. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 470-481.
- (169) Nguyen, K.; Fazio, M.; Kubota, M.; Nainar, S.; Feng, C.; Li, X.; Atwood, S. X.; Bredy, T. W.; Spitale, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2148-2151.
- (170) Rossin, R.; van den Bosch, S. M.; ten Hoeve, W.; Carvelli, M.; Versteegen, R. M.; Lub, J.; Robillard, M. S. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1210-1217.
- (171) Ludwig, J. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131-133.
- (172) Moffatt, J.; Khorana, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- (173) Hoard, D. E.; Ott, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785-1788.
- (174) Van Boom, J.; Crea, R.; Luyten, W.; Vink, A. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2779-2782.
- (175) Gillerman, I.; Fischer, B. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2010**, *29*, 245-256.
- (176) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065-5068.
- (177) Ikemoto, T.; Haze, A.; Hatano, H.; Kitamoto, Y.; Ishida, M.; Nara, K. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1995**, *43*, 210-215.
- (178) Zhu, C.; Tang, C.; Cao, Z.; He, W.; Chen, Y.; Chen, X.; Guo, K.; Ying, H. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 1575-1581.
- (179) Farquhar, D.; Srivastva, D. N.; Kuttesch, N. J.; Saunders, P. P. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 324-325.
- (180) Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
- (181) Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.-L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2521-2526.
- (182) Serpi, M.; Pertusati, F. *Expert Opin. Drug Discov.* **2021**, *16*, 1149-1161.
- (183) Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762-775.
- (184) Hottin, A.; Betz, K.; Diederichs, K.; Marx, A. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 2109-2118.
- (185) Hottin, A.; Marx, A. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418-427.
- (186) Hobbs Jr, F. W. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3420-3422.
- (187) Hoffmann, J. E.; Plass, T.; Nikić, I.; Aramburu, I. V.; Koehler, C.; Gillandt, H.; Lemke, E. A.; Schultz, C. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12266-12270.
- (188) Devaraj, N. K.; Weissleder, R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816-827.
- (189) Gollnest, T.; De Oliveira, T. D.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8716.
- (190) Jia, X.; Schols, D.; Meier, C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6003-6027.
- (191) Gollnest, T.; Dinis De Oliveira, T.; Rath, A.; Hauber, I.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5255-5258.
- (192) Kore, A. R.; Shanmugasundaram, M.; Senthilvelan, A.; Srinivasan, B. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2012**, *31*, 423-431.
- (193) Sowa, T.; Ouchi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *48*, 2084-2090.
- (194) Yu, T. B.; Bai, J. Z.; Guan, Z. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1117-1121.
- (195) Weising, S.; Sterrenberg, V.; Schols, D.; Meier, C. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1771-1778.
- (196) Sauer, J.; Heldmann, D. K.; Hetzenegger, J.; Krauthan, J.; Sichert, H.; Schuster, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2885-2896.

- (197) Versteegen, R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112-14116.
- (198) van Onzen, A. H. A. M.; Versteegen, R. M.; Hoeben, F. J. M.; Filot, I. A. W.; Rossin, R.; Zhu, T.; Wu, J.; Hudson, P. J.; Janssen, H. M.; ten Hoeve, W.; Robillard, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 10955-10963.
- (199) Tomarchio, E. G.; Turnaturi, R.; Saccullo, E.; Patamia, V.; Floresta, G.; Zagni, C.; Rescifina, A. *Bioorg. Chem.* **2024**, *150*, 107573.
- (200) Czuban, M.; Srinivasan, S.; Yee, N. A.; Agustin, E.; Koliszak, A.; Miller, E.; Khan, I.; Quinones, I.; Noory, H.; Motola, C.; Volkmer, R.; Di Luca, M.; Trampuz, A.; Royzen, M.; Mejia Oneto, J. M. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 1624-1632.
- (201) Sarrett, S. M.; Keinänen, O.; Dayts, E. J.; Dewaele-Le Roi, G.; Rodriguez, C.; Carnazza, K. E.; Zeglis, B. M. *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 3348-3381.
- (202) Rossin, R.; Versteegen, R. M.; Wu, J.; Khasanov, A.; Wessels, H. J.; Steenbergen, E. J.; Ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; van Onzen, A. H.; Hudson, P. J. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1484.
- (203) Perry, R. P.; Kelley, D. E. *J. Cell. Physiol.* **1970**, *76*, 127-139.
- (204) Reeder, R. H. *Trends Genet.* **1990**, *6*, 390-394.
- (205) Elela, S. A.; Nazar, R. N. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1788-1794.
- (206) Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 377-410.
- (207) Grodzinski, P.; Kircher, M.; Goldberg, M.; Gabizon, A. *ACS Nano* **2019**, *13*, 7370-7376.
- (208) Wolfram, J.; Ferrari, M. *Nano Today* **2019**, *25*, 85-98.
- (209) Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. *J. Control. Release* **2015**, *200*, 138-157.
- (210) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64*, 1020-1037.
- (211) Ischyropoulou, M.; Sabljo, K.; Schneider, L.; Niemeyer, C. M.; Napp, J.; Feldmann, C.; Alves, F. *Adv. Mater.* **2023**, *35*, 2305151.
- (212) Sabljo, K.; Ischyropoulou, M.; Napp, J.; Alves, F.; Feldmann, C. *Nanoscale* **2024**, *16*, 14853-14860.
- (213) Neumeier, B. L.; Khorenko, M.; Alves, F.; Goldmann, O.; Napp, J.; Schepers, U.; Reichardt, H. M.; Feldmann, C. *ChemNanoMat* **2019**, *5*, 24-45.
- (214) Günzler, H.; Gremlich, H.-U. Qualitative Spektreninterpretation. In *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003; 157-264.
- (215) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- (216) Rennick, J. J.; Johnston, A. P. R.; Parton, R. G. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 266-276.
- (217) Smith, S. A.; Selby, L. I.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 263-272.
- (218) Elkin, S. R.; Lakoduk, A. M.; Schmid, S. L. *Wien. Med. Wochenschr.* **2016**, *166*, 196-204.
- (219) Canton, I.; Battaglia, G. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2718-2739.
- (220) Qian, L.; Pan, S.; Lee, J.-S.; Ge, J.; Li, L.; Yao, S. Q. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1092-1095.
- (221) Hilko, D. H.; Bornaghi, L. F.; Poulsen, S.-A. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11944-11955.