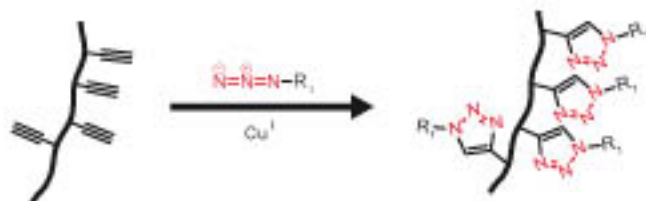


Johannes Gierlich

Selektive Modifikation von DNA durch kupferkatalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition



Cuvillier Verlag Göttingen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig–Maximilians–Universität München

**Selektive Modifikation von DNA durch
kupferkatalysierte
1,3-Dipolare Cycloaddition**

vorgelegt von
Johannes Gierlich
aus
Ludwigshafen/Rhein

2007

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2007
Zugl.: München, Univ., Diss., 2007

978-3-86727-313-8

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 1.3.2007



Dissertation eingereicht am 1.3.2007
Erstgutachter: Prof. Dr. T. Carell
Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Zipse
Tag der mündlichen Prüfung: 24.4.2007

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2007
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2007
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-313-8

*Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.*
Marie Curie

Gesetzt mit \TeX von D. E. Knuth und \LaTeX von L. Lamport
mit Hilfe von KOMA-Script von F. Neukam, M. Kohm und
A. Kielhorn.

Teile dieser Arbeit wurden bereits oder werden publiziert:

- G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. T. Shay, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(5), 1398-1399, *Directed DNA Metallization*.
- J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8(17), 3639-3642, *Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA*.
- A. Schwögler, T. Carell, G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid 2006-EP4017 **2006**, *Labeling strategies for the sensitive detection of nucleic acid analytes by metal deposition*.
- M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell *Small* **2007**, 3(6), 1049-1055 *Formation of Bimetallic Ag/Au-Nanowires by Metallization of Artificial DNA-Duplexes*.
- D. I. Rożkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt *eingereicht*, *Transfer Printing of DNA by Click Chemistry*.
- M. Fischler, U. Simon, G. A. Burley, J. Gierlich, G. Clever, T. Carell, A. Solugubenko, J. Mayer, *eingereicht*, *Site-Selective Binding of Gold Nanoparticles to Artificial DNA-Duplexes via Click Chemistry*.
- J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *eingereicht*, *Synthesis of Highly Modified DNA using a Combination of PCR with Alkyne-bearing Triphosphates and Click Chemistry*.

* * *

Während der Arbeit wurde auch an anderen Projekten mitgearbeitet:

- T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1(13) 2221-2228, *Electron transfer through DNA and metal-containing DNA.*
- M. Ober, U. Linne, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem.* **2003** 115(40) 5097-5101, *The two main DNA lesions 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties.*
- M. G. Friedel, J. Gierlich, T. Carell, *Cyclobutane pyrimidine dimers as UV-induced DNA lesions*, Vol. 2, Wiley, Chichester, **2005**.
- M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(51), 18143-18149, *Base Pairing and Replicative Processing of the Formamidopyrimidine-dG DNA Lesion.*
- D. M. Hammond, A. Manetto, J. Gierlich, V. A. Azov, P. M. E. Gramlich, G. A. Burley, M. Maul, T. Carell *Angew. Chem.* **2007**, 119(22), 4262-4265 *DNA Photography: An Ultra-Sensitive DNA Detection Method Based on the Chemistry of Photography.*

Inhaltsverzeichnis

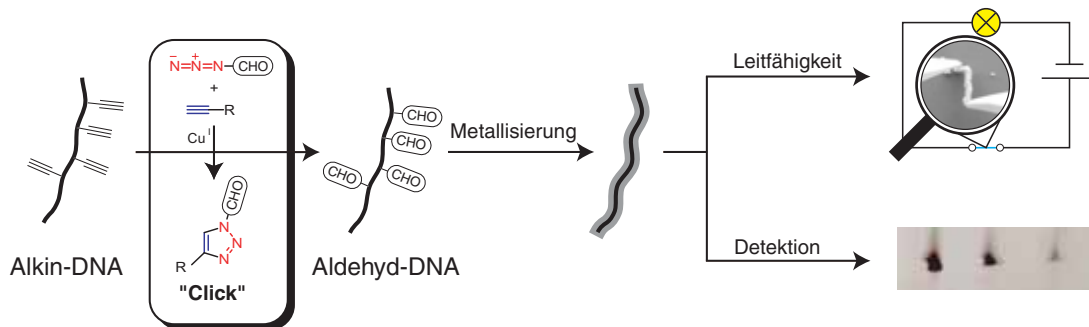
Zusammenfassung	xi
Summary	xiii
1. Einleitung	1
1.1. Festphasensynthese	3
1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	5
1.3. Postsynthetische Modifikation	6
2. Aufgabenstellung	8
3. Modifikationen an DNA	10
4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)	13
4.1. Einleitung	13
4.2. 1,3-Dipolare Cycloadditionen	14
4.2.1. „Click“-Cycloaddition	16
4.2.2. Mechanismus	17
4.2.3. Kupferquellen und Additive	19
4.2.4. Variationen	20
4.3. Anwendungen	23
4.4. „Click“-Chemie an DNA	26
4.5. Eingesetzte Alkine und Azide	27
4.5.1. Synthese der Alkinthymidine	27
4.5.2. Synthese der Triphosphate	30
4.5.3. Synthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxy- guanosin (26)	33
4.5.4. Verwendete Azide	37
4.6. Reaktion an Oligonukleotiden	39
4.6.1. Synthese von Oligonukleotiden mit Alkinen	39
4.6.2. Reaktion an DNA	40
4.7. Reaktion mit PCR-Produkten	42

4.7.1.	PCR-Produkte mit wenigen Alkinen	42
4.7.2.	PCR-Produkte aus Alkintriphosphaten	44
4.8.	Alkine in Zellen	49
4.9.	Andere Monomere für terminale Alkine	51
4.9.1.	<i>Microcontact Printing</i> (μ CP) mit Alkin-DNA	53
4.10.	Ausblick	55
5.	Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten	57
5.1.	Einleitung	57
5.1.1.	Thermophile Polymerasen	58
5.1.2.	Quantitative PCR (qPCR)	60
5.2.	Primerverlängerung (<i>primer extension</i>)	62
5.3.	Einbau modifizierter Basen	63
5.3.1.	Bisherige Arbeiten	63
5.4.	Primerverlängerung mit Alkin- und Azidtriphosphaten	69
5.5.	PCR mit modifizierten Triphosphaten	71
5.5.1.	Primer und Template	71
5.5.2.	Polymerasen	72
5.5.3.	Herstellung eines PCR-Produkts mit 300 Basenpaaren	72
5.5.4.	Herstellung eines PCR-Produkts mit 900 Basenpaaren	78
5.5.5.	Herstellung eines PCR-Produkts mit 2000 Basenpaaren	81
5.6.	Ausblick	83
6.	Detektion von DNA	84
6.1.	Einleitung	84
6.2.	Abscheidung von Silber durch Aldehyde	90
6.2.1.	Silberfärbung von Gelen	90
6.2.2.	Silberfärbung von Gelen mit Tollens-Reagenz	93
6.2.3.	Anfärbung von Membranen	94
6.3.	Funktionalisierung von DNA mit Aldehyden	95
6.4.	Direkter Einbau von Aldehydfunktionen in DNA	96
6.4.1.	Schutzgruppen für Aldehyde	96
6.4.2.	Synthese der Monomere	97
6.4.3.	Einbau in DNA	100
6.5.	Postsynthetische Funktionalisierung mit Aldehyden	107
6.6.	Ausblick	109

7. DNA als Templat zur Abscheidung von Metallen	110
7.1. Einleitung	110
7.2. Metallisierung von DNA	113
7.3. Herstellung von partiell modifizierter DNA	116
7.4. Ausblick	117
 8. Experimenteller Teil	 118
8.1. Material und Methoden	118
8.2. Synthese der Alkinmonomere	122
8.2.1. Synthese von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (6)	122
8.2.2. Synthese von 5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin (10)	126
8.2.3. Synthese von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin (12)	130
8.2.4. Synthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxy- guanosin (26)	134
8.2.5. Synthese von 5-((2-Cyanoethoxy)-diisopropylamino- phosphonoxy)-pent-1-in (51)	141
8.3. Synthese der Azide	142
8.4. Synthese der Aldehydbausteine	143
8.4.1. Synthese von 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-2'- desoxyuridin (55)	143
8.4.2. Synthese von 5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D- galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-des- oxyuridin (66) und 5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'- desoxyuridin (71)	148
8.5. Sonstige Substanzen	156
8.5.1. 1- α / β -Chlor-2-desoxy-3,5-p-toluoyl-D-ribofuranose (29)	156
8.5.2. 2-Chloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on	158
8.6. Synthese der DNA Oligomere	159
8.7. „Click“-Protokolle	162
8.7.1. Für DNA-Oligomere	162
8.7.2. Für PCR-Produkte	162
8.7.3. Aufreinigung durch Fällung mit Ethanol	163
8.8. Metallisierung	163
8.8.1. Lösungen	163
8.8.2. Protokolle	163
8.9. Biochemische Arbeiten	164
8.9.1. Material und Methoden	164
8.9.2. Enzymatischer Abbau von DNA	165

8.9.3. Gele	166
8.9.4. Präparation der Plasmide	166
8.9.5. Primerverlängerung	168
8.9.6. PCR-Primer und -Produkte	169
8.9.7. PCR-Bedingungen	170
8.9.8. PCR-Produkt mit 300 Basenpaaren	172
8.9.9. PCR-Produkt mit 900 Basenpaaren	173
8.9.10. Aufreinigung der PCR-Produkte	174
8.9.11. Sequenzierung	174
8.9.12. HPLC-MS-MS-Experimente von enzymatisch abgebauten PCR-Produkten	175
8.9.13. Restriktion der PCR-Produkte	178
8.9.14. Inkorporation der Alkine in Zellen	178
A. Anhang	179
A.1. Syntheseprotokolle für modifizierte Oligonukleotide	179
A.1.1. Protokoll „Glenn_110804_long“	179
A.2. PCR-Programme	182
A.3. Daten der DNA-Sequenzierung	185
B. Nummerierung der Verbindungen	189
B.1. Kleine Moleküle	189
B.2. Oligonukleotide	192
Abkürzungsverzeichnis	193
Literaturverzeichnis	196
Danksagung	231
Lebenslauf	233

Zusammenfassung



Die Einführung von funktionellen Gruppen in DNA unter Erhaltung der Basenpaarung und enzymatischen Prozessierbarkeit ist eine wichtige Möglichkeit DNA mit neuen Eigenschaften für neue Anwendungen zu erzeugen. Ziel der Arbeit war die Funktionalisierung von DNA mit Aldehyden zur Abscheidung von Silber mit Hilfe der Tollens-Reaktion. Dabei wurde nicht nur der direkte Einbau von aldehydmodifizierten Monomeren, sondern auch die Funktionalisierung von DNA mit Hilfe der Kupfer(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden und Alkinen („Click“-Chemie) untersucht. Diese erst vor kurzem entdeckte Reaktion zeichnet sich durch hohe Geschwindigkeit, hohe Ausbeute, hohe Toleranz funktioneller Gruppen und einfache Durchführung aus. Die Reaktion wurde schon in vielen Bereichen der Chemie und Biochemie erfolgreich eingesetzt.

Um die Kompatibilität der Reaktion mit DNA zu untersuchen, wurden mit Alkinen modifizierte Thymidine über Festphasensynthese in kurze DNA-Stränge eingebaut. Bei der Untersuchung der Produkte der Cycloaddition unter verschiedenen Bedingungen zeigte sich, dass die Stabilisierung der Cu(I)-Ionen durch spezielle Liganden, wie Tribenzyltriazolamin (TBTA), nötig war. Die direkte Zugabe von CuBr als Kupfer(I)-Quelle ohne Reduktionsmittel ergab die besten Ergebnisse. Mit diesen Bedingungen gelang es, sechs aufeinanderfolgende Alkine quantitativ mit verschiedenen Aziden umzusetzen. Die Bandbreite der eingeführten Funktionen reichte von Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluoreszein bis hin zu metallreduzierenden Gruppen, wie Zucker. Ein gewisser Abstand des Alkins zur Base war bei den Einzelsträngen für eine quantitati-

ve Umsetzung essentiell. Selbst die Reaktion an bis zu 2000 Basenpaare langen DNA-Strängen mit nur jeweils zwei Alkinen konnte ohne Schädigung der DNA durchgeführt werden.

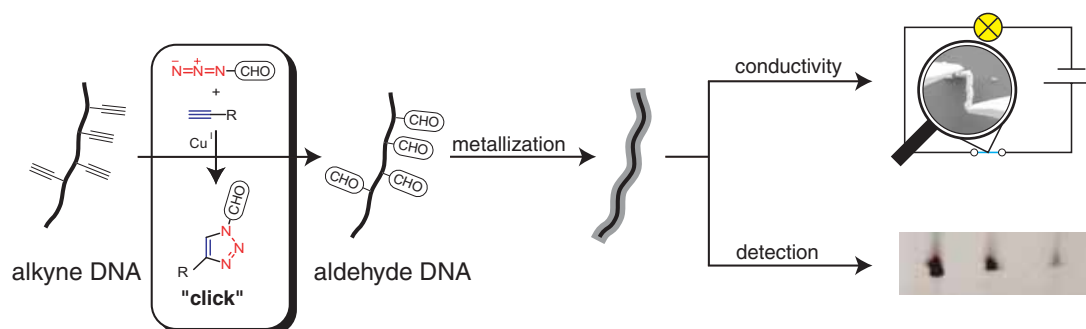
In Kooperation mit Prof. *Reinhoudt* an der Universität Twente wurde Alkin-DNA erfolgreich im *microcontact printing* (μ CP) auf azidmodifizierten Glasoberflächen verwendet. Um die DNA ohne Störung ihrer Struktur zu immobilisieren, wurden neue Festphasenmonomere für terminale Alkine synthetisiert. Diese Alkin-DNA wurde danach auf der Oberfläche erfolgreich mit einem fluoreszenzmarkierten Gegenstrang hybridisiert.

Zur Herstellung von langen DNA-Strängen (2000 Basenpaare) mit einer hohen Dichte an Aldehyden wurden Triphosphate mit Aldehyden oder Alkinen synthetisiert. Diese substituierten das entsprechende natürliche Triphosphat in der PCR. Bei den Aldehyd-Triphosphaten war die Freisetzung der Aldehyde, welche als Acetale geschützt waren, nicht ohne Schädigung der DNA möglich. Ein Baustein mit einem acetylgeschützten Zucker als Aldehydkomponente zeigte selektive Metallabscheidung. Diese sterisch anspruchsvollen Substrate erwiesen sich allerdings als schlechte Substrate für die Polymerasen in der PCR.

Triphosphate mit Alkinen wurden deutlich besser von den Polymerasen akzeptiert. So wurden mit 5-(1,7-Oktadiinyl)-2'-desoxyuridin- oder 5-(1,7-Oktadiinyl)-2'-desoxycytidintriphosphat PCR-Produkte mit bis zu 2000 Basenpaare Länge mit fast 900 Alkinen hergestellt. Die Alkin-Basen führten zu einer deutlichen Stabilisierung der DNA. Funktionalisierung der PCR-Produkte mit einem Galaktoseazid und anschließender enzymatischer Abbau zu den Monomeren zeigte für das Alkinocytidin quantitativen Umsatz. Bei PCR-Produkten mit Alkinuridinen reagierten mindestens 95 % der Alkine. Die Aldehyd-DNA konnte durch Silberfärbung auf Polyacrylamidgelen oder Membranen selektiv und sehr empfindlich nachgewiesen werden.

In einer Kooperation mit Prof. *Eichen* (Technion, Haifa) und Prof. *Simon* an der RWTH Aachen wurden die aldehydmodifizierten PCR-Produkte mit Silber oder Gold beschichtet. Mit AFM oder STM wurde die Selektivität und die Qualität der Metallabscheidung untersucht.

Summary



The introduction of new functional groups into DNA without disturbing the natural base pairing and the enzymatic processability is an important technique to broaden the usability of DNA for many applications. The aim of this thesis was the functionalization of DNA with aldehyde groups for the selective deposition of silver. This was reached not only by introducing these groups directly attached to nucleobases, but also by using the copper(I) catalyzed cycloaddition of alkynes and azides („Click“-chemistry). This reaction was discovered only very recently and combines high conversion rates, high yields, high tolerance of functional groups together with easy procedures.

In order to verify the compatibility of the reaction with DNA, modified thymidines with alkynes on alkyl chains of different lengths were synthesized and incorporated into short oligomers using solid phase synthesis. The use of the copper(I) stabilizing ligand trisbenzyltriazoleamine (TBTA) was needed to reduce the DNA damage caused by copper generated radicals. As a copper source CuBr gave best results. Using these conditions the quantitative conversion of six consecutive alkynes with different azides was accomplished. The azides used to modify DNA are wide-ranging, from fluorescent dyes like fluorescein to metal-reducing groups like sugars. A certain distance between the alkyne and the base was essential to obtain high conversion in these single strands. Even DNA strands with up to 2000 base pairs in length comprising only two alkyne functionalities were fluorescently labeled. Product analysis showed no damage of the DNA.

In a cooperation with the group of Prof. *Reinhoudt* (University of Twente) alkyne DNA was successfully used in *microcontact printing* (μ CP) on azide modified glass slides. In order to retain the structure of the DNA after immobilization new alkyne building blocks for introduction of terminal alkynes were synthesized. These strands were printed and hybridized with a fluorescent counter strand.

To obtain long DNA with a high density of modifications, nucleobase triphosphates containing aldehydes and alkynes were prepared. Substitution of a natural triphosphate with the modified one in PCR reactions allowed the production of long DNA strands. The release of the protected aldehyde functions turned out to be difficult in the case of acetals, since the used acids introduced DNA damage. Only a triphosphate comprising an acetyl-protected galactose showed selective metallization. Because of steric reasons it was not accepted very well by the DNA Polymerases in the PCR. The alkyne triphosphates were much better substrates. With 5-(1,7-octadiynyl)-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate or 5-(1,7-octadiynyl)-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate PCR products with a length of up to 2000 base pairs containing almost 900 alkynes were obtained. The introduction of alkyne bases lead to a significant stabilization of DNA. Reaction of PCR products using „Click“-chemistry with a galactoseazide yielded quantitative conversion of the cytidine. In case of the thymidines over 95 % of all alkynes reacted. Using silver staining the aldehyde modified DNA could be detected with high selectivity and sensitivity on gels or membranes.

In a cooperation with Prof. *Eichen* (Technion, Haifa) and Prof. *Simon* (RWTH Aachen) aldehyde modified PCR-products were coated with silver or gold. The selectivity and the quality of the metal deposition was examined by AFM and STM.

1. Einleitung

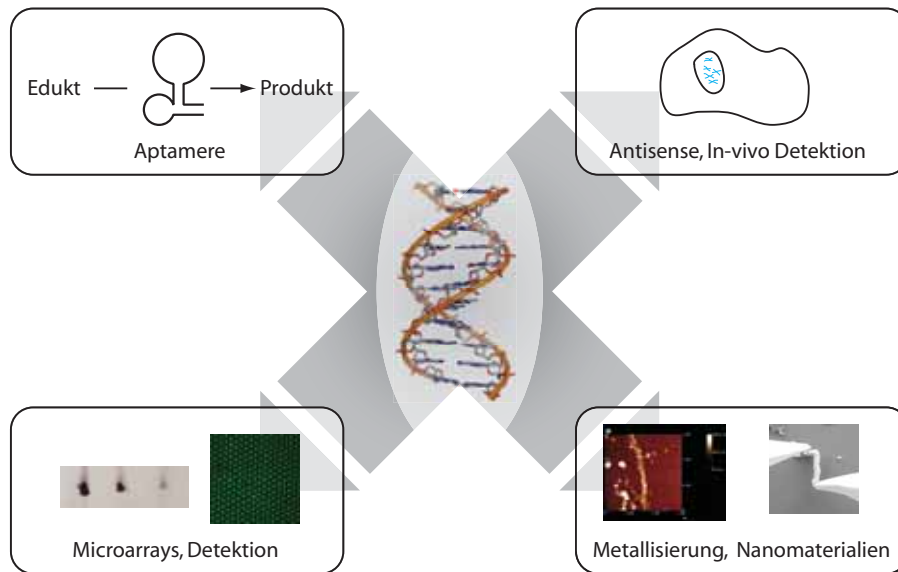


Abbildung 1.1: Verschiedene Anwendungen von DNA von Diagnostik bis hin zu Nanomaterialien (Bilder: D. Rożkiewicz, M. Fischler, Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, © 1998).

Desoxyribonukleinsäure (DNA), das Baumaterial des genetischen Codes, kann nicht nur zur Speicherung der genetischen Information genutzt werden. Ihre einzigartige Doppelstrangstruktur aus zwei Einzelsträngen, welche durch die komplementäre Basenpaarung von Adenin und Thymin, bzw. Cytosin und Guanin gebildet wird, ist die Grundlage für die Weitergabe der genetischen Information bei der Zellteilung und der Amplifikation von DNA durch biochemische Methoden. Die hohe Spezifität der Basenpaarung erlaubt aber auch die Konstruktion selbstorganisierender Strukturen jenseits des Doppelstranges. Die „eingebaute“ Biokompatibilität von DNA ermöglicht die Anwendung in biologischen Systemen. Abbildung 1.1 zeigt einige Anwendungen von DNA in verschiedenen Bereichen. Allerdings ist das Repertoire an funktionellen Gruppen in natürlicher DNA limitiert. Neben den negativ geladenen Phosphatgruppen des Rückgrats besitzen die Basen vor allem Amino- und Ketogruppen, welche zum Aufbau und zur Stabilisierung der Struktur benötigt werden. Eine Erwei-

1. Einleitung

terung des funktionellen Spektrums von DNA unter Erhaltung ihrer besonderen selbstpaarenden Eigenschaften wäre ein großer Fortschritt für viele Anwendungen von DNA. Einige in der Abbildung 1.1 gezeigten Anwendungen können von einer solchen Erweiterung der chemischen Diversität profitieren.

Aptamere sind spezielle DNA-Sequenzen, welche aufgrund ihrer Struktur bestimmte Substanzen binden oder Übergangszustände stabilisieren, und daher zur Katalyse von Reaktionen und zur Detektion eingesetzt werden.^[1] Durch neue Funktionen kann das Spektrum der molekularen Erkennung und Katalyse erweitert werden. Bei der Anwendung in Zellen können Modifikationen die Zellgängigkeit von DNA und die Stabilität in der Zelle erhöhen, um zum Beispiel bessere Antisense-Eigenschaften zu ermöglichen.^[2] Bei der Detektion von DNA spielt die selektive Markierung mit Farbstoffen oder anderen detektierbaren Funktionen eine große Rolle. Neue Möglichkeiten der Funktionalisierung können eine höhere Dichte und damit eine bessere Detektion ermöglichen. Im Bereich der Nanomaterialien wird DNA bereits erfolgreich zum Aufbau komplizierter Strukturen verwendet.^[3] Eine Erweiterung um metallbindende oder -reduzierende Gruppen könnte diese Strukturen leitfähig machen.^[4] Diese Techniken stehen erst am Beginn ihrer Entwicklung und es gibt bisher noch nicht viele Untersuchungen zur Herstellung und Verwendung von modifizierter DNA. Allerdings ist das Potential solcher Methoden enorm, da sie vom Bereich der Nanomaterialien bis hin zur klinischen Diagnostik von Krankheiten eine große Rolle spielen können.

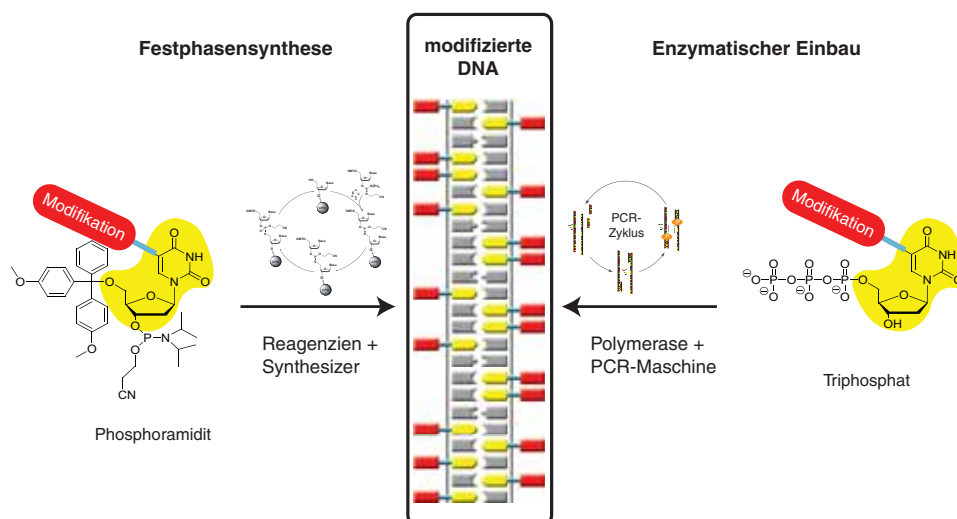


Abbildung 1.2: Verschiedene Methoden für die Herstellung von DNA durch Festphasensynthese mit Hilfe von Phosphoramiditchemie (links) oder durch enzymatischen Einbau des Triphosphats (rechts).

Um Modifikationen in DNA einzuführen, müssen die verschiedenen Arten der Herstellung von DNA berücksichtigt werden (s. Abb. 1.2). Kurze Oligomere werden an der festen Phase synthetisiert. Daher müssen die verwendeten Modifikationen mit den eingesetzten Reagenzien kompatibel sein. Im Gegensatz dazu können sehr lange DNA-Stränge nur über den enzymatischen Einbau mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) hergestellt werden. Beide Methoden sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.1. Festphasensynthese

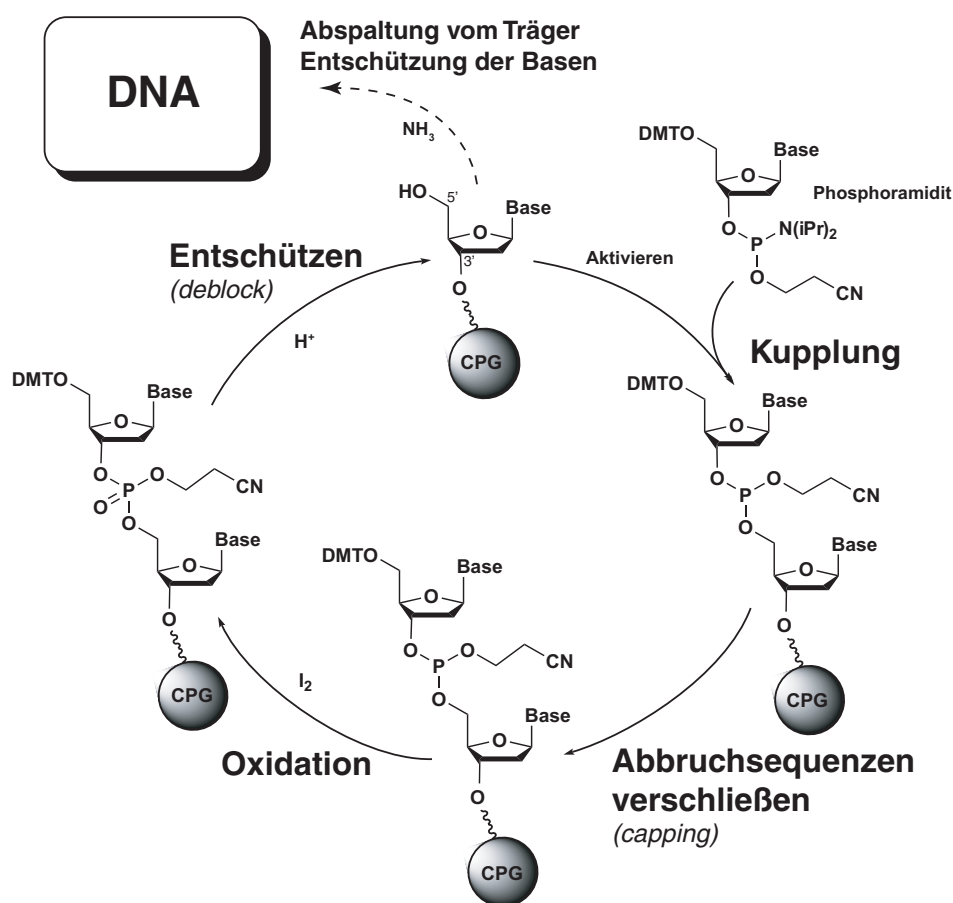


Abbildung 1.3: Prinzip der Festphasensynthese von DNA mit DMT-Phosphoramiditchemie.

Die Synthese an der festen Phase wird meistens mit Hilfe von DMT-Phosphoramiditchemie (DMT: 4,4'-Dimethoxytrityl) durchgeführt (s. Abb. 1.3).

1. Einleitung

Das Oligomer wird durch aufeinanderfolgende Kupplungen an der festen Phase von 3' in 5'-Richtung aufgebaut. Die zu kuppelnden Monomere werden als 5'-DMT-3'-Phosphoramidite eingesetzt. Zu Beginn eines Kupplungszyklus wird mit Hilfe von Säure die Dimethoxytritylgruppe abgespalten (*Entschützen*). Im nächsten Schritt werden die nun freien Hydroxylgruppen mit dem Phosphoramidit der nächsten Base gekuppelt. (*Kupplung*). Dazu wird das Phosphoramidit mit einem Aktivator aktiviert. Nach der Kupplung werden nicht umgesetzte freie 5'-OH-Gruppen im basischen Milieu durch Reaktion mit einem Anhydrid verestert, damit sie im nächsten Kupplungsschritt nicht reagieren (*Abbruchsequenzen verschließen*). Um eine Hydrolyse der Phosphorbindung während der weiteren Synthese zu verhindern wird der Phosphor mit einer Iod-Lösung zum Phosphat oxidiert (*Oxidation*). Die Cyanoethoxy-Gruppe bleibt dabei als Schutzgruppe des Phosphates erhalten. Danach kann der Zyklus mit einer neuen Entschützung des gerade gekuppelten Bausteins wieder beginnen.

In der Synthese werden für die reaktiven Gruppen der Basen säure- und oxidationsstabile Schutzgruppen eingesetzt. So sind die Aminogruppen der Nucleobasen mit basenlabilen Schutzgruppen, mit Acetyl oder Benzoyl-Gruppen geschützt. Durch Behandlung mit Base wird nach der Synthese das fertige Oligomer vom festen Träger abgespalten, die Basen entschützt und die Phosphate freigesetzt.

Die Bedingungen des Synthesesyklus zeigen die Anforderungen der Festphasensynthese an eine Modifikation. Sie wird im Laufe des Synthesesyklus und der Abspaltung sowohl stark sauren als auch basischen Bedingungen ausgesetzt. Allerdings lassen sich bestimmte Schritte durch spezielle Protokolle, z. B. bei der Abspaltung vom Träger oder bei der Entschützung, durch mildere Varianten ersetzen. Bei der Synthese sollte es außerdem zu keinerlei Zersetzung der Modifikation kommen, da sich Nebenprodukte bei langen Oligomeren kaum noch abtrennen lassen.

Mit Festphasensynthese lassen sich auch sehr große Mengen an DNA (bis zu mehreren Millimol) zuverlässig herstellen. Die Festphasensynthese ermöglicht die Einführung einer großen Anzahl an Modifikationen in einer Synthese. Im Extremfall könnte mit jeder Kupplung eine anders modifizierte Base eingebaut werden. Die Ausbeute im Kupplungsschritt begrenzt aber die maximale Länge der Oligomere auf ca. 50 Basen. Dies ist allerdings für Anwendungen, wie Antisense oder Microarrays ausreichend. Deutlich längere DNA lässt sich nur über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) herstellen.

1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

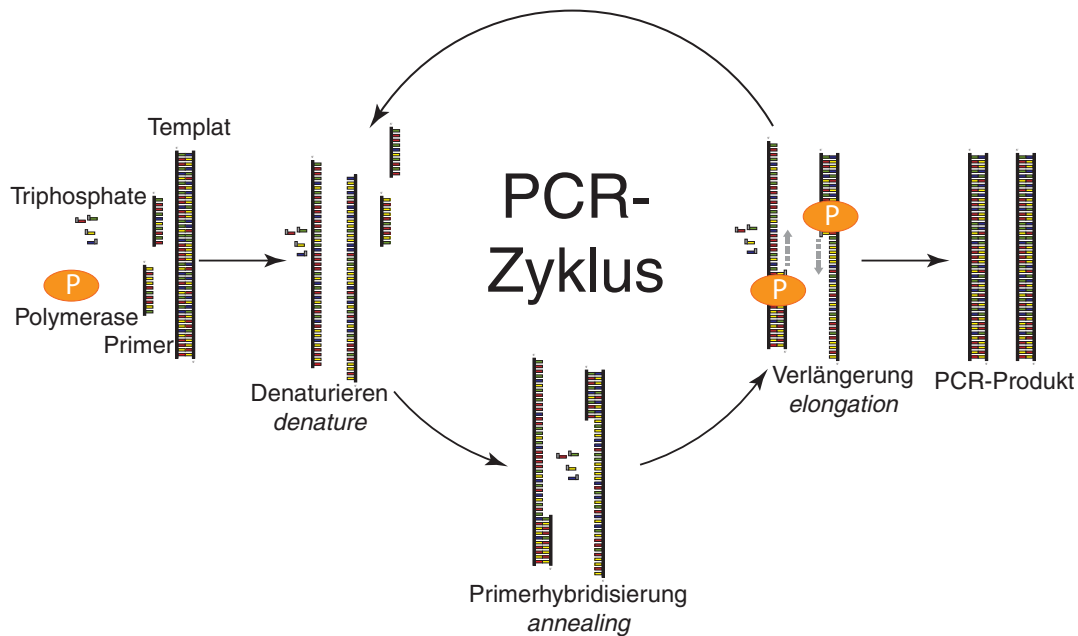


Abbildung 1.4: Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Die von *Kary B. Mullis* in den achtziger Jahren entwickelte Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR) revolutionierte die Biochemie.^[5-7] *Mullis* übertrug das Prinzip der natürlichen Vervielfältigung von DNA *in vivo* auf die Vervielfältigung von beliebigen DNA-Sequenzen *in vitro* (s. Abb. 1.4). Für die PCR werden die abzulesende Sequenz (Templat), die Triphosphate der vier Basen, die Polymerase und die Primer, welche zum Anfang und Ende der abzulesenden Sequenz komplementär sind, zusammengegeben. Dabei kann das Templat deutlich länger als das PCR-Produkt sein, z. B. ein komplettes Genom. Im ersten Schritt wird das Templat durch Erhitzen auf Temperaturen von über 90 °C in die Einzelstränge aufgetrennt (Denaturieren). Im nächsten Schritt werden bei niedrigerer Temperatur (ca. 50-60 °C) die Primer mit den entsprechenden Sequenzen am Templat hybridisiert (Primerhybridisierung). Dies wird dadurch begünstigt, dass die Primer in großem Überschuss eingesetzt werden. Im nächsten Schritt verlängert die Polymerase die Primer-Templat-Hybriden zu vollständigen Doppelsträngen (Verlängerung). Die gebildeten PCR-Produkte dienen nach erneuter Denaturierung als zusätzliches Templat im nächsten Zyklus. Dadurch wird unter idealen Bedingungen mit jedem Zyklus die Menge an DNA verdoppelt. In der ersten Zeit war die PCR noch ein mühseliger Pro-

1. Einleitung

zess, da die eingesetzten Polymerasen unter den hohen Temperaturen, die für die Denaturierung der DNA benötigt werden, nicht stabil waren, und daher bei jedem Zyklus erneut zugegeben werden mussten. Das änderte sich durch die Verwendung der Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium aus Geysiren.^[8]

Zur Einführung einer Modifikation über PCR muss das Monomer als Triphosphat synthetisiert werden. Außerdem sind bei Austausch der natürlichen Triphosphate nur maximal vier unterschiedliche funktionelle Gruppen pro DNA möglich. Die hohen Temperaturen bei der Denaturierung schränken für diese Methode die möglichen funktionellen Gruppen ein. Bis für ein bestimmtes Templat ein PCR-Produkt hergestellt werden kann, ist oft die Optimierung der PCR-Bedingungen (Temperaturen, Länge der Schritte, etc.) nötig. Dabei kann eine Polymerase ein Substrat auch überhaupt nicht akzeptieren, was dann entweder die Synthese eines anderen Monomers oder das Suchen nach einem geeigneten Enzym erfordert. Bisher ist leider noch keine Vorhersage möglich, ob und unter welchen PCR-Bedingungen ein Produkt erhalten werden kann.

1.3. Postsynthetische Modifikation

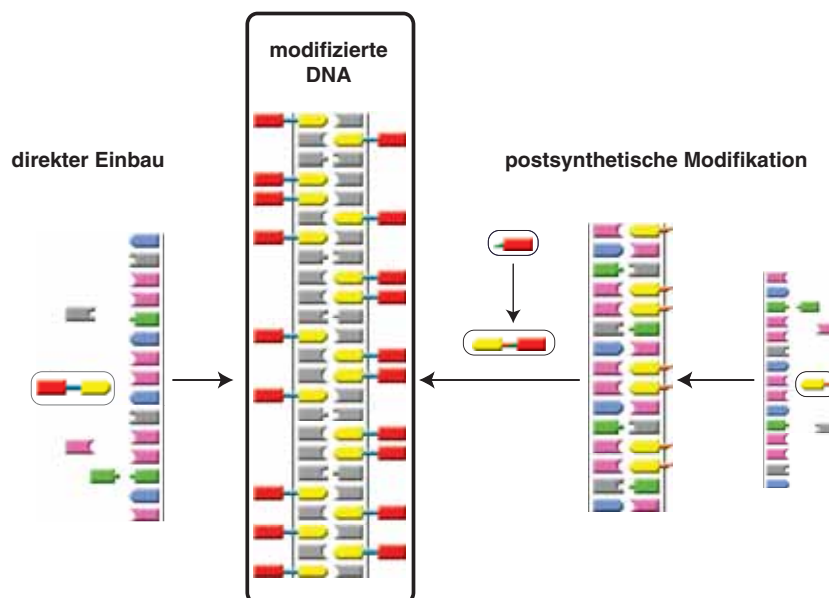


Abbildung 1.5: Verschiedene Wege zum Aufbau modifizierter DNA durch direkten Einbau einer modifizierten Base (links) oder durch Einbau einer Gruppe, welche nach der Synthese eine selektive Reaktion zulässt (rechts).

Unabhängig von der Art der Herstellung gibt es zwei Wege auf denen Funktionen in die DNA gebracht werden können (s. Abb. 1.5). Der direkte Weg ist der Einbau eines Nukleosids, welches die Funktionalität bereits trägt. Dieser Weg erfordert immer die Synthese des gesamten Bausteins. Eine schnelle Änderung, zum Beispiel der Flexibilität oder der Länge des „Linkers“ zwischen Base und funktionellen Gruppen sind nicht einfach möglich und die Untersuchung vieler verschiedener Funktionen ist sehr aufwändig. Der zweite Weg ist die Verwendung eines Monomers, welches selektive postsynthetische Modifikation in einem zweiten Schritt zulässt. Dies erfordert die Optimierung des Einbaus dieser Modifikationen. Außerdem können auch Funktionen eingeführt werden, welche die Bedingungen der DNA-Synthese, sei es an fester Phase oder enzymatisch, nicht überstehen würden. Allerdings muss die Reaktion, welche zur Markierung verwendet wird, mehrere Bedingungen erfüllen. Sie muss selektiv und quantitativ sein und sollte viele funktionelle Gruppen tolerieren. Die entstehenden Produkte sollten leicht aufzureinigen sein. Dies schränkt die Menge an möglichen Transformationen stark ein.

2. Aufgabenstellung

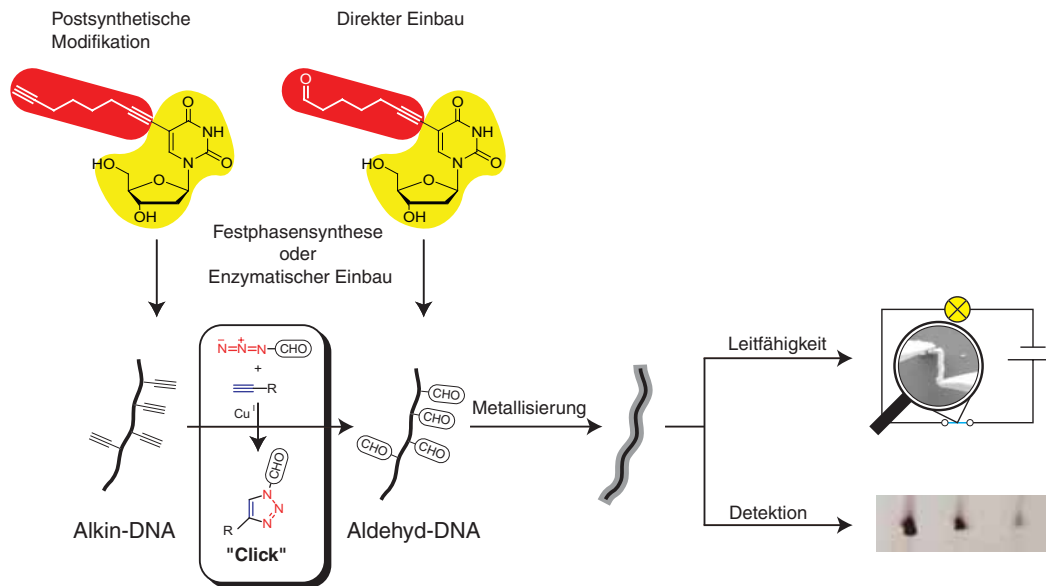


Abbildung 2.1: Funktionalisierung von Alkin-DNA mit Hilfe der 1,3-dipolaren Cycloaddition mit Aldehyden zur Abscheidung von Metallen.

Ziel der Arbeit war die Funktionalisierung von DNA mit Aldehyden zur Abscheidung von Silber mit Hilfe der Tollens-Reaktion. Diese funktionalisierte DNA sollte zur selektiven Detektion und zum Aufbau von leitfähigen Strukturen verwendet werden. Die Einführung der Aldehydfunktionen in DNA ist auf zwei unterschiedlichen Wegen möglich. Da Aldehydfunktionen als reaktive Gruppen während der DNA-Synthese geschützt werden müssen, sollte eine neue Möglichkeit zur postsynthetischen Modifikation von DNA untersucht werden. Im Gegensatz zur etablierten Reaktion von Aktivestern, wurde die erst vor wenigen Jahren entdeckte kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen („Click“-Reaktion) noch nicht an DNA mit mehreren Alkinen verwendet. Ihre Möglichkeiten zur Funktionalisierung von DNA und damit die Synthese von alkinmodifizierten Monomeren sollte ein Schwerpunkt der Arbeit sein. Als Zweites sollte aldehydmodifizierte DNA durch direkten Einbau von geschützten Aldehyden in DNA hergestellt werden.

Für beide Wege, postsynthetische Modifikation und direkter Einbau, sollte der Einbau über Festphasensynthese und der enzymatische Einbau untersucht werden. Kurze Oligomere erlauben eine genaue Untersuchung, welche Einflüsse oder Reaktionen von der Modifikation ausgehen. Dagegen ermöglicht der enzymatische Einbau durch Verwendung von modifizierten Triphosphaten die Herstellung von sehr langer DNA mit hoher Dichte an Aldehyden oder Alkinen. Dazu sollte in der Arbeit die Akzeptanz der Aldehyd- oder Alkintriphosphate durch unterschiedliche Polymerasen untersucht werden.

Für diese mit Aldehyden modifizierte DNA sollten dann Protokolle zur Detektion einer selektiven Abscheidung von Silber entwickelt werden. Dadurch sollte sich die DNA selektiv auf Gelen oder Membranen empfindlich nachweisen lassen. Außerdem sollten im Rahmen einer Kooperation mit Prof. *Simon* (RWTH Aachen) die durch PCR erhaltene sehr lange DNA mit AFM oder STM auf Metallisierung und Leitfähigkeit hin untersucht werden.

Die Entwicklung der Monomere und ihre Verwendung im Laufe der Untersuchungen wird in den nächsten Kapiteln dargestellt. Als erstes soll kurz auf die Positionierung von Modifikationen an den DNA-Basen und ihr Einfluss auf die Stabilität des Doppelstranges eingegangen werden. Im vierten Kapitel wird die Entwicklung der 1,3-dipolaren Cycloaddition und ihre Anwendung an kurzen und langen DNA-Strängen vorgestellt. Das fünfte Kapitel der Arbeit behandelt die Untersuchungen zum enzymatischen Einbau modifizierter Triphosphate über die PCR. In den beiden darauf folgenden Kapiteln wird der Einbau von Aldehydmonomeren und die postsynthetische Funktionalisierung mit Aldehyden zur Detektion von DNA und zur Metallisierung von DNA untersucht.

3. Modifikationen an DNA

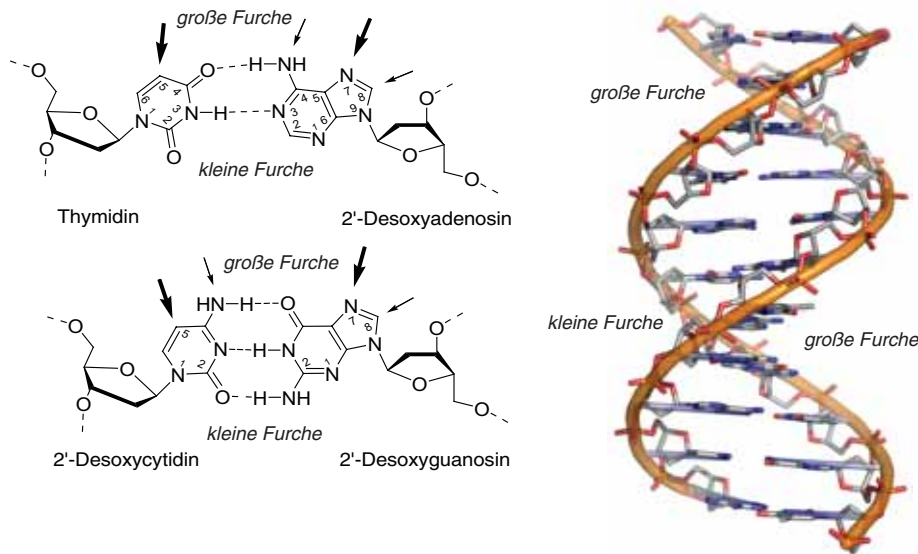


Abbildung 3.1: Basenpaarung in DNA (links); Die Struktur der B-DNA (rechts). Die Pfeile geben die Positionen zur Einführung von Modifikationen an DNA-Basen an (Die Nummerierung der Purine weicht von der IUPAC-Nummerierung ab).

Die wichtigste Struktur von doppelsträngiger DNA ist die B-Form (s. Abb. 3.1). In dieser Form liegt die DNA als rechtsgängige Doppelhelix mit einer Drehung von 10.4 Basen pro Windung und einem Abstand von 3.4 Å vor. Dabei bilden sich entlang der Doppelhelix zwei unterschiedliche Furchen aus. Durch die Verdrillung des Doppelstranges folgen sie der Drehung der DNA. Die Furchen stellen eine weitere Möglichkeit zur Sequenzerkennung dar, da die Basenpaare auch dort unterschiedliche Muster von Wasserstoffbrückendonoren, bzw. -akzeptoren aufweisen. Dies wird in der kleinen Furche (*minor groove*) zur Adressierung durch Polyamide genutzt.^[9]

Eine günstige Position zur Einführung von Modifikationen an DNA mit geringer Störung der Doppelhelix ist die Platzierung in der großen Furche. Abbildung 3.1 zeigt die am häufigsten genutzten Positionen an den Basen. Veränderungen, wie zum Beispiel Amide von Cytosin und Adenosin, welche das

Wasserstoffbrückenmuster beeinflussen, sind möglich, können sich aber negativ auf die Stabilität der DNA auswirken, wenn keine zusätzlichen stabilisierenden Bindungen ausgebildet werden.^[10]

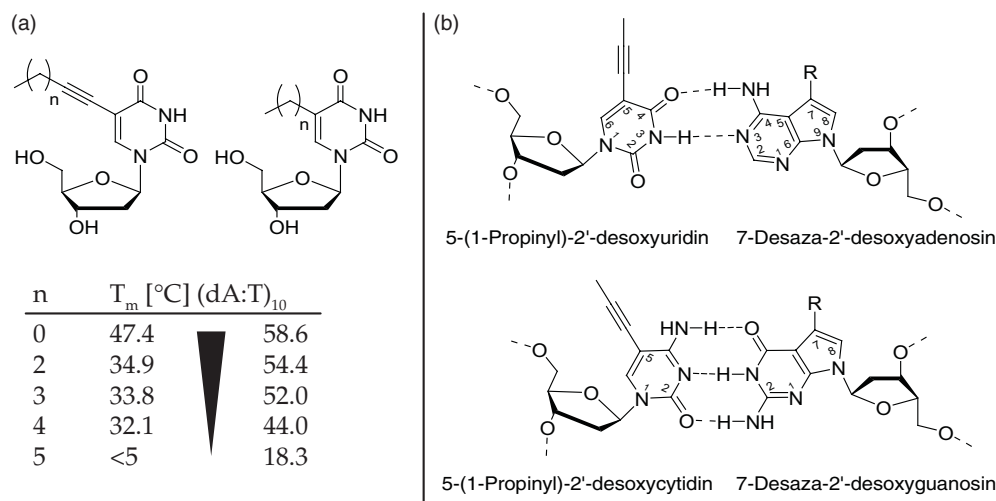


Abbildung 3.2: Links: Schmelzpunkte von modifizierten (dA:T)₁₀-Oligonukleotiden mit unterschiedlich langen Alkylketten (gemessen in 0.1 M NaCl, 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.2), 2 mM MgCl₂)^[11] Rechts: Basenpaarung von 5-Propinyl-Pyrimidinen und 7-Desazapurinen.

Bei den Pyrimidin-Nukleosiden Thymidin¹ und 2'-Desoxycytidin wird die Modifikation häufig an der 5-Position eingeführt. Die Tabelle in Abbildung 3.2a zeigt den Einfluss von Alkylketten auf die Stabilität eines (dA:T)₁₀-Doppelstranges. Mit zunehmender Länge nahm der Schmelzpunkt von 47.4 °C im unmodifizierten Strang fast linear ab. Erst ab einer Länge von 6 Kohlenstoffatomen war kein Schmelzpunkt mehr messbar.^[11] Dieser Trend ist beim 2'-Desoxycytidin schwächer ausgeprägt, 5-Methyl-2'-desoxycytidin ist sogar leicht stabilisierend. Es wird vermutet, dass die Verdrängung von Wasser und Ionen aus der großen Furche die DNA destabilisiert. Dieser Effekt kann abgeschwächt werden, wenn anstatt eines Alkyl-Substituenten ein 1-Alkin- oder 1-Alken-Substituent das π -System der Base erweitert (s. Abb. 3.2a).^[12] Der Austausch der Methylgruppe durch einen 1-Propin-Substituenten in einem (dA:T)₁₀-Doppelstrang erhöht den Schmelzpunkt um 11 °C.^[11,13] Eine zunehmende Destabilisierung des Strangs bei langen Alkylketten am Alkin tritt ebenso auf, aber erst bei längeren Alkylketten. Da diese Modifikation auch

¹In der Arbeit werden modifizierte 2'-Desoxyuridine wegen besserer Verständlichkeit als modifizierte Thymidine bezeichnet. Bei Benennung der Verbindungen wird 2'-Desoxyuridin als Stammname verwendet (Thymidin = 5-Methyl-2'-Desoxyuridin).

3. Modifikationen an DNA

DNA:RNA-Duplexe stabilisiert, wurde besonders der Propin-Substituent intensiv im Hinblick auf mögliche Antisense-Eigenschaften untersucht.^[10,14-17] Zwar weisen diese Oligonukleotide *in vivo* eine höhere Exonuklease-Stabilität als normale DNA auf, inzwischen haben sich aber Modifikationen des DNA-Rückgrats wie Phosphorthioester oder *locked nucleic acids* (LNA) durchgesetzt.^[2,10]

Die 8-Position bei Purinen ist zwar synthetisch einfach zugänglich, aber große Reste in dieser Position können die DNA destabilisieren.^[18] Aus diesem Grund werden zur Modifikation statt der Purin-Basen, 7-Desazapurine als Grundgerüst verwendet (s. Abb. 3.2b). Solche 7-Desazaderivate sind schon lange als Antibiotika bekannt.^[19,20] Sie kommen in der Natur zum Beispiel in t-RNA vor, wo sie zur Stabilisierung beitragen. Die Substitution des Stickstoffes an der 7-Position durch Kohlenstoff erfordert die Totalsynthese des Heterozyklus mit anschließender Glykosidierung. Wegen der Bedeutung als Antibiotika^[19] wurden schon in den sechziger Jahren Synthesemethoden entwickelt.^[21-24] Auch ihr Einfluss auf die Struktur von DNA wurde eingehend untersucht.^[25-29] Besonders die Gruppe um Seela hat intensive Untersuchungen zu Eigenschaften^[30,31] und Synthese^[20,32] dieser Verbindungen durchgeführt. Der Einbau von 7-Desaza-Basen von A oder G destabilisiert den Duplex im Vergleich zu unmodifizierter DNA.^[25,33] Analog zu den Pyrimidinen verursacht die Einführung eines Alkin-Substituenten eine starke Erhöhung der Schmelztemperatur.^[24,29,33,34]

Neben Alkylketten wurden schon viele andere Funktionalitäten in die DNA eingeführt und ihr Einfluss untersucht. So lässt sich durch die Einführung von positiv geladenen Gruppen die DNA noch weiter stabilisieren.^[35] Eine wichtige Rolle spielt die Einführung von Amino-Gruppen, da sie eine weitergehende Funktionalisierung der DNA durch Aktivesterkupplungen ermöglichen.

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

4.1. Einleitung

Im Jahre 2001 prägte *Sharpless* in einem wegweisenden Artikel den Begriff „Click“-Chemie als neue Klasse von Reaktionen.^[36] Demnach sind solche Reaktionen als „Click“-Reaktionen zu bezeichnen, welche folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Modularer Aufbau
2. Hohe Toleranz anderer chemischer Funktionen
3. Hohe Ausbeute
4. Ungefährliche Nebenprodukte
5. Stereospezifität
6. Einfache Reaktionsbedingungen
7. Einfach zugängliche Edukte
8. Kein oder einfach entfernbares Lösungsmittel
9. Einfache Isolation der Produkte

Schon die ersten drei Bedingungen schränken die Zahl möglicher Reaktionen stark ein. Reaktionen unter kinetischer Kontrolle oder mit einer negativen Reaktionsenthalpie größer als 20 kcal/mol, können einen Teil der Bedingungen erfüllen. Solche Reaktionen verlaufen oft sehr schnell und dabei auch sehr selektiv. Zum Beispiel können folgende Reaktionen als „Click“-Reaktion bezeichnet werden:

- Cycloadditionen, vor allem 1,3-dipolare Cycloadditionen, aber auch Diels-Alder-Reaktionen.
- S_N -Reaktionen, vor allem Öffnung von gespannten Ringsystemen wie Epoxiden, Aziridinen.
- „Nicht-Aldol“-Carbonyl-Chemie, wie Bildung von Hydrazonen, Harnstoffen, etc.
- Addition an Kohlenstoffmehrfachbindungen wie Epoxidierungen, Bishydroxylierungen.

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

Bei der ursprünglichen Entwicklung der „Click“-Chemie standen einfache Syntheserouten zu pharmakologisch interessanten Verbindungen im Vordergrund. Diese Reaktionen sollten dazu genutzt werden schnell und effizient eine hohe Anzahl von Variationen einer Leitstruktur herzustellen. Dies änderte sich durch die Entdeckung der Kupferkatalyse der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden. Seither wird der Begriff „Click“-Chemie immer mehr nur mit dieser Reaktion in Verbindung gebracht.

4.2. 1,3-Dipolare Cycloadditionen

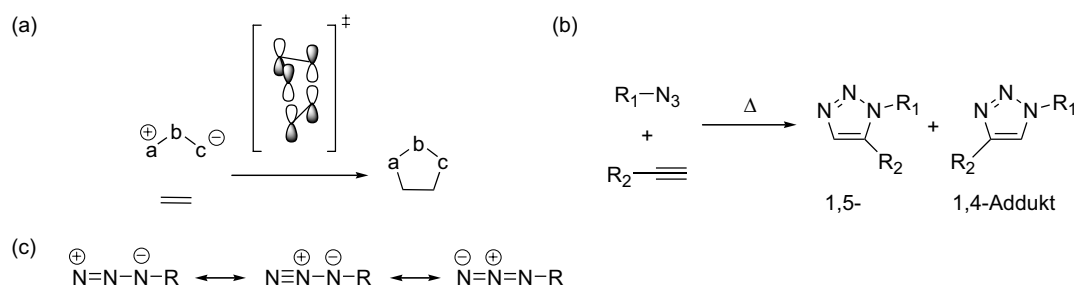


Abbildung 4.1: (a) Allgemeines Prinzip der 1,3-dipolaren Cycloaddition. (b) thermische Reaktion zwischen Aziden und Alkinen. (c) mesomere Grenzstrukturen für Azide.

Als 1,3-dipolare Cycloadditionen bezeichnet man die Addition eines 1,3-Dipols an eine Mehrfachbindung unter Bildung eines Fünfrings.^[37-39] Solche Reaktionen wurden schon Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben und stellen seither eine wichtige Methode zum Aufbau heteroatomhaltiger Fünfringe dar. 1,3-Dipole sind Verbindungen vom Typ a-b-c, in denen Atom a formal nur ein Elektronensextett und Atom c ein freies Elektronenpaar besitzt. Wenn das mittlere Atom freie Elektronenpaare aufweist, wie z.B. Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel, kann es den Elektronenmangel an Atom a durch Mesomerie stabilisieren. Es wird zwischen zwei verschiedene Typen von 1,3-Dipolen, dem Allyl-Anion-Typ und dem Propargyl/Allenyl-Typ, unterschieden. Der erstere ist analog zum Allyl-Anion gewinkelt und besitzt vier Elektronen in den drei parallelen p_z -Orbitalen senkrecht zur Dipolebene. Der Propargyl/Allenyl-Typ ist linear und besitzt ein zusätzliches π -System in der Ebene des Dipols, welches deswegen nicht an Reaktionen des Dipols beteiligt ist. Das mittlere Atom muss bei diesem Typ von Dipol ein Stickstoffatom sein. 1,3-Dipole reagieren mit Doppel- oder Dreifachbindungen gemäß den Woodward-Hoffmann-Regeln thermisch

erlaubt unter Beteiligung von 6 π -Elektronen nach $[\pi 4s + \pi 2s]$ (s. Abb. 4.1a). Die Reaktion wird durch die Grenzorbitale der Reaktionspartner kontrolliert. Da bei Reaktionen mit Alkenen zwei Stereozentren aufgebaut werden, wurde diese Reaktion ähnlich wie die Diels-Alder-Reaktion in der Naturstoffsynthese angewandt.^[38] Allerdings gibt es zwischen den verschiedenen Dipolen große Unterschiede. So reagieren stark polarisierte Dipole, wie z.B. Nitronen, mit hoher Regioselektivität. Azide hingegen reagieren zwar ebenfalls regioselektiv mit elektronenreichen oder elektronenarmen Alkenen, aber die Reaktion ist langsam und benötigt erhöhte Temperaturen. Die auftretenden Nebenreaktionen, wie die Abspaltung von Stickstoff, können durch die Mesomeriestrukturen des Azids erklärt werden (s. Abb. 4.1c).^[40] Die Reaktion mit Alkinen verläuft oft langsam und wegen der ähnlichen Orbitalkoeffizienten nicht regioselektiv (s. Abb. 4.1b). Bei normaler Reaktion entstehen immer Gemische des 1,4- und 1,5-Addukts. Durch Absenkung des LUMOs des Alkins durch elektronenziehende Substituenten lässt sich die Regioselektivität verbessern und die Reaktion beschleunigen.^[41] Gerade wegen der hohen Toleranz von Aziden und Alkinen gegenüber vielen funktionellen Gruppen wurde lange versucht die Regioselektivität der Reaktion zum Beispiel durch Präorganisation der Reaktionspartner durch Wasserstoffbrücken^[42] zu steuern. *Rebek* erreichte hohe Selektivität durch Einschluss der Reaktanden in eine molekulare Kapsel.^[43]

In letzter Zeit wurden zwei Ansätze zur Steuerung der Selektivität zum 1,5-Addukt verwendet (s. Abb. 4.2). So reagieren metallorganische Alkinverbindungen wie Grignards oder Lithiumorganyle selektiv zum 1,5-Produkt.^[44] Mit dieser Methode lassen sich durch Zugabe eines Elektrophils auch trisubstituierte Triazole herstellen. Der zweite Weg ist die Reaktion eines silylgeschützten, elektronenarmen Alkins. Wegen der Polarisierung durch die Silylschutzgruppe entsteht ausschließlich das 1,5-Addukt.^[45,46] Diese Reaktionen erfüllen zwar nicht die Kriterien von „Click“-Reaktionen, wurden aber in letzter Zeit zur Synthese von Phosphinliganden eingesetzt.^[47,48]

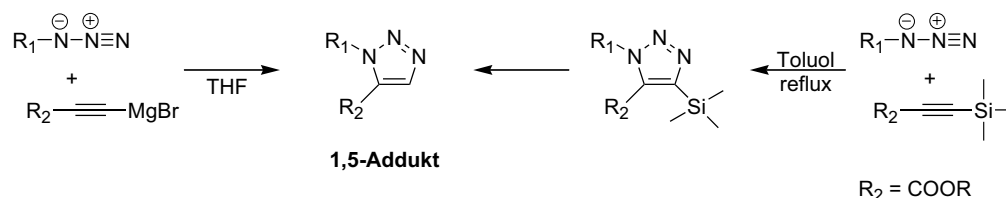


Abbildung 4.2: 1,3-dipolare Cycloaddition selektiv zum 1,5-Addukt durch metallorganische Alkinverbindungen (links)^[44] oder elektronenarme silylierte Alkine (rechts).^[45,46]

4.2.1. „Click“-Cycloaddition

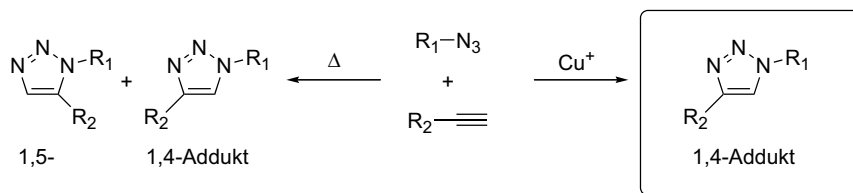


Abbildung 4.3: 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen thermisch und unter Katalyse von Kupfer(I)-Ionen.

Trotz der Regioselektivitätsprobleme erfüllt die Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen einige der Kriterien für „Click“-Reaktionen. Beide Edukte sind bereits energiereich. Die Reaktionsbedingungen sind orthogonal zu den meisten funktionalen Gruppen und die Reaktion lässt sich fast in allen Lösungsmitteln, wie z.B. auch Wasser, durchführen.

Die Bedeutung der Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen änderte sich drastisch als die Gruppen um *Meldal*^[49] und *Sharpless*^[50] entdeckten, dass katalytische Mengen an Cu(I)-Ionen die Reaktion nicht nur um den Faktor 10^5 beschleunigten, sondern auch als Produkt nur noch das 1,4-Addukt nachweisbar war (s. Abb. 4.3).

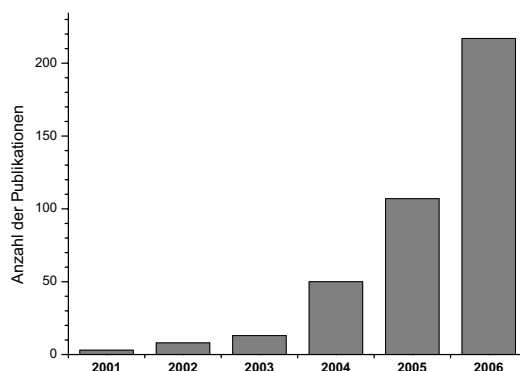


Abbildung 4.4: Anzahl der Publikationen zur „Click“-Chemie in den letzten Jahren (Scifinder 9.11.2006).

Die Abbildung 4.4 zeigt, dass nach der Einführung des Konzepts der „Click“-Chemie im Jahre 2001 und der Entdeckung der Kupferkatalyse ein Jahr später die Anzahl der Veröffentlichungen exponentiell angestiegen ist. Ein Großteil

der Publikationen behandelt die Anwendung dieser Cycloaddition in den verschiedensten Gebieten der Chemie und Biochemie. Ein ausführlicher Überblick würde über den Rahmen dieser Einleitung hinausgehen. Für eine weitergehende Übersicht in Mechanismus,^[51] Synthese,^[52] Inhibitoren,^[53] Markierung,^[54] oder Polymere und Materialien^[55] sei auf die zitierten Übersichtsartikel verwiesen. Im Folgenden soll auf den Mechanismus und wichtige Varianten und Anwendungen der Reaktion eingegangen werden.

4.2.2. Mechanismus

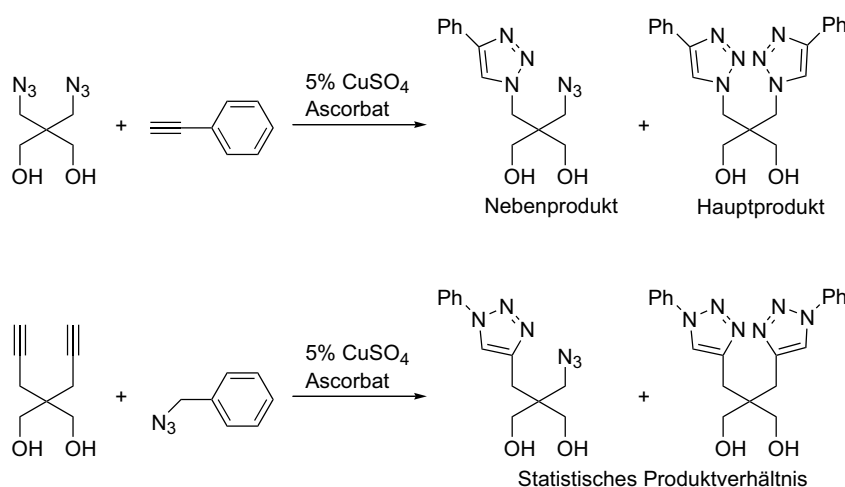


Abbildung 4.5: Untersuchungen mit Diaziden und Dialkinen.^[56]

Über den Mechanismus der kupferkatalysierten „Click“-Cycloaddition gibt es bisher nur wenige Untersuchungen.^[50,56,57] Ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel fasst die aktuellen Theorien zusammen.^[51] Unter katalytischen Bedingungen verläuft die Reaktion als Reaktion zweiter Ordnung in Bezug auf die Kupferionen.^[56] Hohe Konzentrationen an Azid oder Kupfer führen zur Inhibition. Interessante Einblicke in den Mechanismus ergaben Untersuchungen mit präorganisierten Dialkinen und Diaziden (s. Abb. 4.5). Die Reaktion mit dem 1,3-Diazid ergab selbst bei hohem Überschuss an Azid immer das Ditriazol als Hauptprodukt. Das analoge 1,3-Dialkin hingegen führte immer zu den statistisch erwarteten Produktmischungen. Zusammen mit theoretischen Rechnungen^[57] wurde der folgende Mechanismus postuliert (s. Abb. 4.6)

Zuerst bildet sich ein Kupferacetylid-Komplex.^[58] Die Komplexbildung des Alkins durch das Metall-Ion kann den pK_a-Wert des Alkins so weit senken,

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

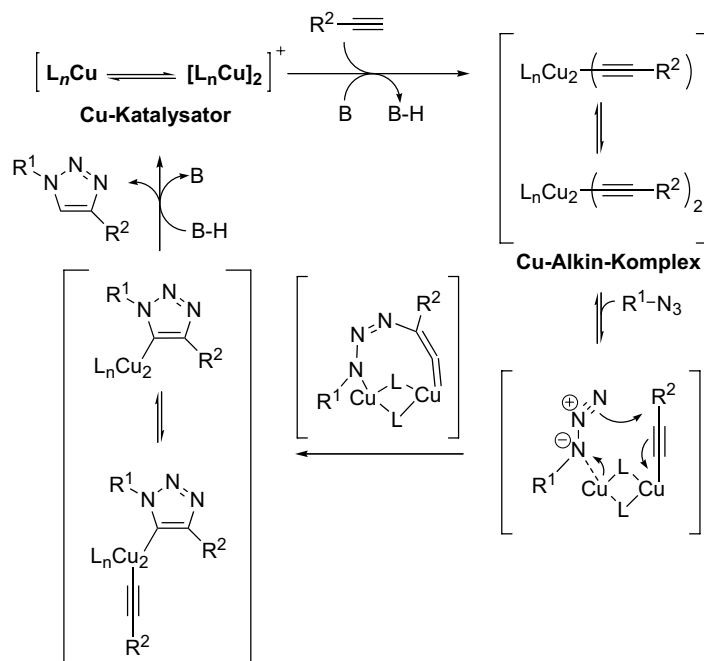


Abbildung 4.6: Vorgeschlagener Mechanismus der kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition.^[51,57]

dass es durch eine Base oder schon in wässriger Lösung deprotoniert wird.^[51] Obwohl die Struktur des aktiven Komplexes nicht bekannt ist, wird angenommen, dass er zwischen einem und zwei Alkin-Liganden und mehrere labile Liganden enthält.^[56] Im nächsten Schritt lagert sich das Azid in der gezeigten Orientierung an den Komplex an. Als nächste Zwischenstufe wird die Ausbildung eines Kupfer-Metallozyklus durch nukleophilen Angriff des zweiten Kohlenstoffs der Dreifachbindung auf das Azid postuliert. Für einen Komplex mit einem Kupferatom wurde berechnet, dass die Ausbildung eines solchen Zyklus die Aktivierungsenthalpie im Vergleich mit der thermischen Reaktion um 11 kcal/mol absenkt.^[57] Diese Absenkung könnte die enorme Beschleunigung durch Kupfer(I)-Ionen erklären. Im letzten Schritt wird das Triazol unter Ringkontraktion abgespalten. Die Reaktion ist daher keine grenzorbitalkontrollierte Cycloaddition, auch wenn das gleiche Produkt gebildet wird.

Der Mechanismus erklärt nicht nur die beobachtete Inaktivität von internen Alkinen, welche keine Acetylidspezies ausbilden können, sondern auch die 1,4-Regioselektivität der Reaktion. Trotzdem bleiben noch einige Fragen offen. So werden inzwischen oft Kupfer(I)-Ionen stabilisierende Liganden verwendet. Ihr Einfluss ist noch ungeklärt. Auch ist die Struktur des aktiven Komplexes, zum Beispiel in Bezug auf die Menge an Kupferatomen, noch unklar. So zeigen viele

der kommerziell erhältlichen Kupferacetylide keine Reaktion mit Aziden. Bisher konnte nur ein aktiver Komplex nachgewiesen werden.^[56]

4.2.3. Kupferquellen und Additive

Interessanterweise lässt sich die Reaktion mit verschiedenen Kupfer(I)-Quellen durchführen. In den ersten Versuchen wurde CuSO_4 *in situ* mit Ascorbat reduziert.^[50,56,59–65] Als Alternative wurde in biologischer Umgebung TCEP (Tricarboxyethylphosphin) verwendet.^[66–70] Eine elegante Variante ist die Ausnutzung der Konproportionierung von elementarem Kupfer und Kupfer(II)-Ionen. Die Zugabe von Kupferspänen reichte aus, um ausreichend Kupfer(I)-Ionen für die Katalyse zur Verfügung zu stellen.^[57,71,72] Da die Reaktion ohne Reduktionsmittel langsamer verlief, konnte sie durch die Verwendung von Kupfer-Nanopartikeln, durch Vergrößerung der Oberfläche des Kupfers, beschleunigt werden.^[73,74] Auch die Zugabe von Kupfer(I)-Salzen wie CuI , CuBr oder $[\text{Cu}(\text{NCCH}_3)_4][\text{PF}_6]$ war möglich.^[49,75] Ohne Stabilisierung der Kupfer(I)-Ionen kann es immer zu Nebenreaktionen wie Alkin-Alkin-Kupplungen kommen.^[50]

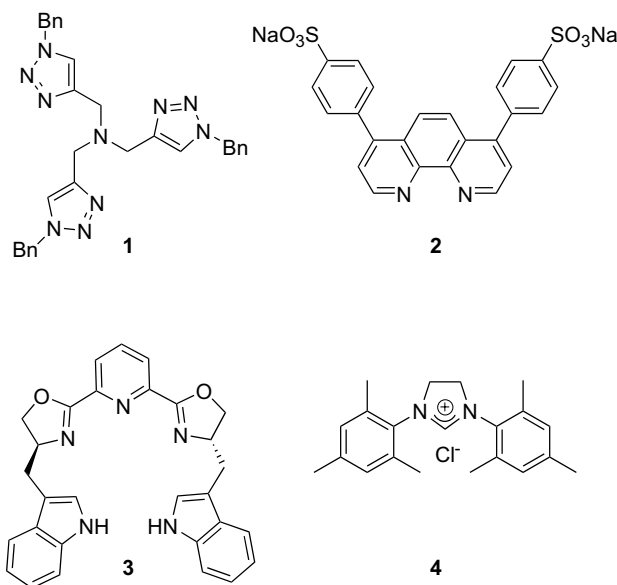


Abbildung 4.7: Verschiedene Liganden zur Stabilisierung von Cu(I).

Liganden, welche Kupfer(I)-Ionen stabilisieren, können Nebenreaktionen zurückdrängen und den Bedarf an Katalysator um den Faktor 10 herabsetzen.^[76] Abbildung 4.7 zeigt verschiedene Arten von eingesetzten Liganden. Schon län-

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

ger ist bekannt, dass ein erhöhter Zusatz einer Stickstoffbase die Nebenprodukte der Cycloaddition verringert.^[51] Als erstes wurde der Tribenzyltriazol-ligand (TBTA, **1**) gefunden.^[69,76] Er ist einfach durch „Click“-Chemie herzustellen und wurde schon in vielen Reaktionen, besonders bei Anwendungen im biologischen Bereich, sehr erfolgreich eingesetzt.^[69] *Lewis et al.* entdeckten den Bipyridin-Liganden **2** bei einem Katalysatorscreen, bei dem die Reaktion zwischen einem Fluorophor und einem Quencher beobachtet wurde.^[77] Für eine stereoselektive Reaktion, z.B. zur kinetischen Racematspaltung, wurde der chirale Ligand **3** synthetisiert. Leider waren die erreichten Selektivitäten zu niedrig.^[78] Als neue Klasse von Liganden wurde der Carben-Ligand **4** untersucht.^[79] Er zeigte selbst in reinem Wasser eine sehr hohe Aktivität. Als bisher einziger Ligand katalysierte er auch die Addition von Aziden an interne Alkine, wobei erhöhte Temperaturen nötig sind. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zur Regioselektivität dieser Reaktion.

Neue Entwicklungen gibt es auch im Bereich der Bereitstellung der Kupfer(I)-Ionen. *Girard et al.* konnten Amberlyst A-21, einen Dimethylamin-beladenen Träger, erfolgreich mit Kupfer(I)-Ionen beladen und sogar mehrmals nacheinander in „Click“-Reaktionen einsetzen.^[80]

4.2.4. Variationen

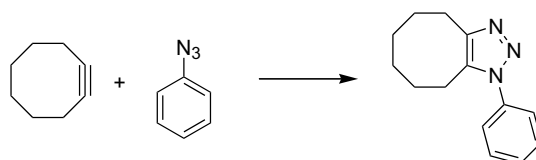


Abbildung 4.8: Kupferfreie 1,3-dipolare Cycloaddition an gespannten Alkinen am Beispiel von Cyclooctin mit Phenylazid.^[81]

Gerade im biologischen Bereich ist der Einsatz von Kupferionen problematisch, da die erforderlichen Kupferkonzentrationen zytotoxisch wirken.^[82,83] Um solche Proben über eine Azid-Alkin-Cycloaddition mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Biotin zu markieren, griff die Gruppe um *Bertozzi* auf die Aktivierung von Alkinen durch Ringspannung zurück.^[84,85] So hatten *Wittig et al.* bereits 1961 die bei Raumtemperatur explosionsartig verlaufende Reaktion von Cyclooctin und Phenylazid zum Triazol beobachtet (s. Abb. 4.8).^[81] Die Reaktion verläuft zwar nicht regioselektiv und langsamer als die kupferkatalysierte, kommt aber ohne das zytotoxische Kupfer aus.

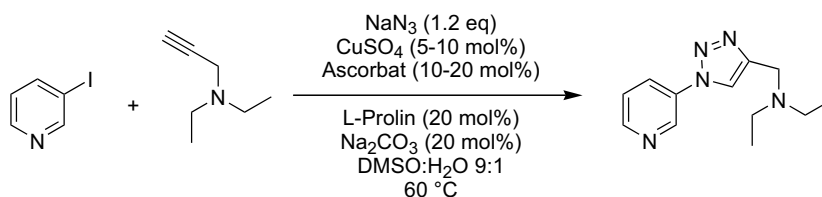


Abbildung 4.9: Prolinkatalysierte Umwandlung von Arylioden in Azide mit nachfolgender „Click“-Reaktion *in situ*.^[86,87]

Die hohe Geschwindigkeit und Selektivität der Cycloaddition begünstigt auch den Einsatz in Mehrkomponentenreaktionen. So reagieren Benzylhalogenide,^[88,89] aktivierte Zucker^[90] oder Baylis-Hillman-Addukte^[91,92] mit Natriumazid und verschiedenen Alkinen *in situ* mit hohen Ausbeuten zu den entsprechenden Triazolen. Ebenso lassen sich Alkyl-, Vinyl- und aromatische Halogenide unter Prolinkatalyse *in situ* zu den entsprechenden Aziden umsetzen und direkt „verclicken“ (s. Abb. 4.9).^[86,87] Auch in Kombination mit Wittig- und Knoevenagelreaktionen^[93] lässt sich die Reaktion in einem Reaktionsgefäß durchführen. Weitere Beispiele sind die Synthesen von 1,4,5-substituierten Triazolen durch Kupplung der Vinyl-Kupfer-Zwischenstufe mit einem weiteren Äquivalent des Alkins^[94] oder mit Vinylpalladium.^[95]

Mit dem zunehmenden Interesse an der kupferkatalysierten Reaktion gibt es neue Untersuchungen mit dem Ziel auch das 1,5-Addukt katalysiert herzustellen. Es ist nur ein Fall bekannt, bei dem die Zyklisierung eines kleinen Rings unter Kupferkatalyse zum 1,5-Addukt geführt hat.^[97] Zwar lassen sich diese auch über die Cycloaddition mit Alkin-Grignards herstellen (siehe Abschnitt 4.2), aber diese Reaktion erfüllt nicht die Kriterien einer „Click“-Reaktion. Erst vor kurzem wurden Rutheniumkomplexe gefunden, welche abhängig von den verwendeten Liganden selektiv die Reaktion zu dem 1,5-Isomer mit einer relativen großen Bandbreite an funktionellen Gruppen katalysierten

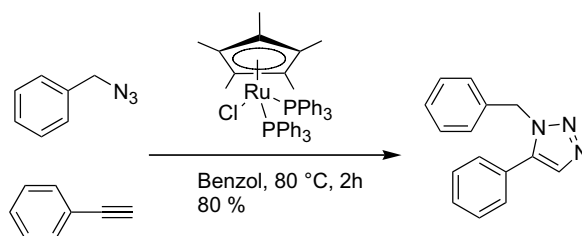


Abbildung 4.10: Spezielle Rutheniumkomplexe katalysieren selektiv die Bildung des 1,5-Addukts.^[96]

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

(s. Abb. 4.10).^[96,98,99] Außerdem konnten mit diesen Komplexen auch regio-selektive Cycloadditionen an internen Alkinen durchgeführt werden. Für die Synthese von terminalen Triazolen entwickelten *Yap et al.* das „geschützte“ Azid (β -Tosylethylazid), welches sich nach der Reaktion mild abspalten lässt.^[98]

Die Abhängigkeit der kupferkatalysierten Cycloaddition von der Anwesenheit eines terminalen Alkins machten sich Arbeiten zur „Click-Click“-Chemie zu Nutze (s. Abb. 4.11). So reagieren silylgeschützte Alkine unter den „Click“-Bedingungen nicht. Sie lassen sich in einem zweiten Schritt durch Zugabe von Silberionen *in situ* entschützen und mit Aziden umsetzen. Das ermöglichte die sequentielle Anwendung zur Verknüpfung mehrerer Bausteine in einem Reaktionsgefäß mit hoher Ausbeute.^[100,101]

Dass die Möglichkeiten noch lange nicht ausgeschöpft sind, zeigt eine neue Arbeit über die Verknüpfung von Polymeren. *Golas et al.* konnten mit neuen Amin-Liganden auch Pt(II), Ni(II) oder Pd(II) als Katalysatoren für die Cycloaddition einsetzen.^[102] Das vollständige Potential der Reaktion ist noch lange nicht erschlossen.

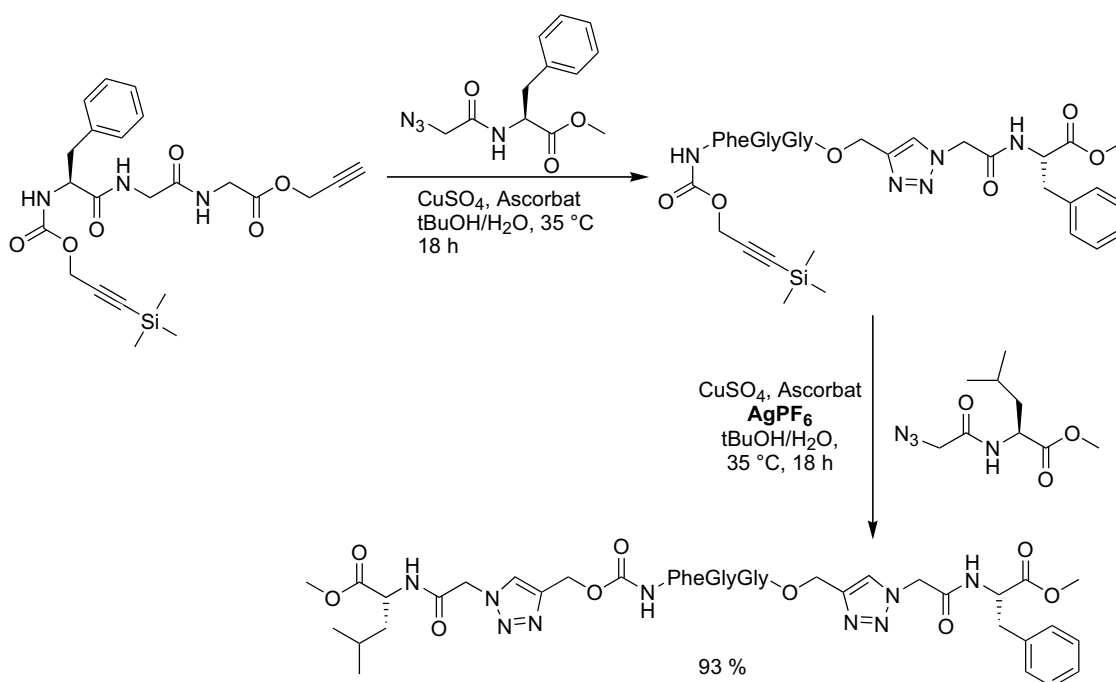


Abbildung 4.11: Sequentielle Reaktion durch *in situ*-Entschützung des Alkins mit AgPF_6 („Click-Click“-Reaktion).^[100]

4.3. Anwendungen

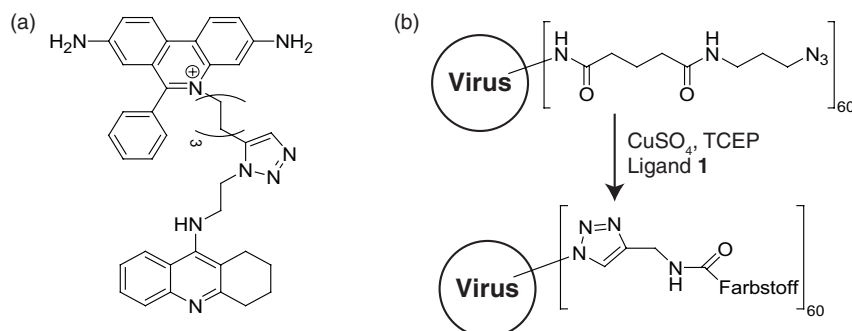


Abbildung 4.12: Mit Hilfe der „Click“-Chemie gefundener Inhibitor für Acetylcholinesterase (links);^[103] Quantitative Fluoreszenzmarkierung an einem Tabak-Mosaik-Virus durch kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (rechts).^[69]

Mit die erste Anwendung fand die „Click“-Reaktion in ihrer eigentlichen Zielsetzung, der Vereinfachung der Optimierung von pharmakologisch bedeutsamen Leitstrukturen. *Lewis et al.* nutzten die Selektivität der Cycloaddition, indem sie Acetylcholinesterase mit Azid- und Alkinderivaten von bekannten Inhibitoren inkubierten.^[103,104] Nur bei Annäherung von Azid und Alkin bei erfolgreicher Bindung beider Inhibitoren kam es zur Cycloaddition. Das Enzym selektierte von selbst den besten bifunktionellen Bindungspartner. Auf diese Weise konnte ein neuer Inhibitor für Acetylcholinesterasen gefunden werden (s. Abb. 4.12a). Später wurden auf ähnliche Weise Inhibitoren für Carbonic Anhydrase II^[105] und HIV-1 Protease^[106] entdeckt.

In der pharmazeutischen Industrie wurden „Click“-Reaktionen erfolgreich zum Aufbau von Bibliotheken, sowohl in Lösung, als auch an der festen Phase, verwendet.^[52,59,107,108]

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Verwendung der Reaktion zum Markieren von biologischen Systemen. Die Untersuchungen wurden dadurch erleichtert, dass es seit einigen Jahren Systeme für den Einbau von Aziden in Proteine und Oligosaccharide gab, um lebende Zellen mit Hilfe der ebenfalls biokompatiblen Staudinger-Reaktion zu markieren.^[109–111] Als erstes biologisches Objekt wurde ein mit Aziden oder Alkinen markiertes Tabak-Mosaik-Virus in hoher Ausbeute derivatisiert (s. Abb. 4.12b).^[69,70,112,113] In Bakterien ließen sich durch Austausch der Aminosäure Methionin gegen eine Azidaminosäure die neu synthetisierten Oberflächenproteine selektiv markieren.^[82–84,114] Zum gezielten Einbau von solchen Aminosäuren in Proteine wur-

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

den tRNA-Synthetasen der Bakterien dahingehend mutiert, dass sie die modifizierten Aminosäuren entweder anstelle einer natürlichen oder an Stelle eines Stopcodons einbauen. Die Gruppe um *Schultz* entwickelte eine Tyrosin-tRNA für Azide oder Alkine,^[72,115] die Gruppe um *Tirell* eine Methionin-tRNA für Azide.^[85]

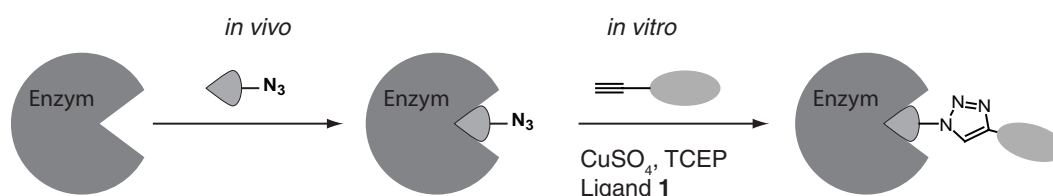


Abbildung 4.13: Activity-Based Protein Profiling mit Hilfe einer Azid-tragenden Reaktivprobe.^[67]

Die Selektivität der „Click“-Reaktion wird auch bei dem *Activity-Based Protein Profiling* ausgenutzt (s. Abb. 4.13).^[66–68,116,117] Dabei werden Zellen oder ein Zellextrakt mit einer Alkin- oder Azid-markierten Reaktivprobe, welche mit der aktiven Tasche der zu untersuchenden Proteinklasse eine kovalente Bindung eingeht, inkubiert. Die so markierten Proteine können danach durch Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff selektiv nachgewiesen und durch Trypsinabbau identifiziert werden. Dadurch lassen sich in Zellen die aktiven Proteine für eine Substanzklasse selektiv bestimmen. Durch Vergleich von gesunden und kranken Zellen lassen sich Unterschiede in den Aktivitäten der verschiedenen Proteine bestimmen. Ähnliche Systeme wurden auch für Zucker bindende Proteine entwickelt.^[118]

Wegen ihrer Geschwindigkeit und ihrer hohen Ausbeute bietet sich die „Click“-Cycloaddition auch zur Modifikation von Oberflächen an. Die Gruppen um *Collman* und *Chidsey* funktionalisierten Oberflächen mit Ferrocenen, um den Einfluss auf das Redoxpotential zu untersuchen.^[120,121] Auch andere

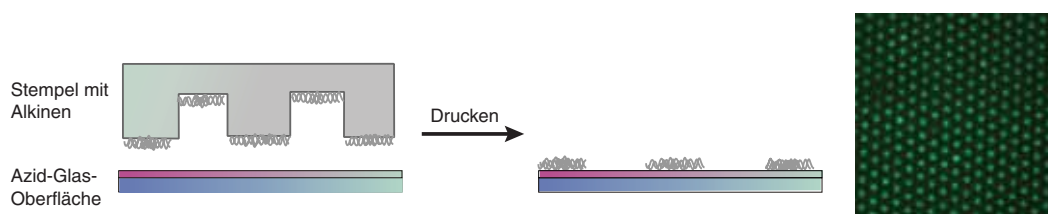


Abbildung 4.14: Das Prinzip von *microcontact printing* (μ CP) mit Aziden und Alkinen. Das Fluoreszenzbild zeigt ein Fluoreszenzmarkierter DNA gedrucktes Muster, Abbildung von *D. I. Rozkiewicz*.^[119]

Gruppen stellten die hohe Zuverlässigkeit der Reaktion auf Oberflächen unter Beweis.^[122–124] Eine neuere Variante ist die Anwendung im *microcontact printing* (μ CP, s. Abb. 4.14).^[119] Dabei wurden mit einem mit Alkinen beladenen „Stempel“ verschiedene Muster auf eine mit Aziden funktionalisierte Oberfläche gedruckt. Wegen des hohen lokalen Drucks und der dadurch hohen Konzentrationen ist dafür keine Kupferkatalyse nötig (siehe auch Abschnitt 4.9.1).

Die hohe Selektivität der Reaktion macht sie für eine Anwendung in der Oligosaccharid-Chemie interessant, in der oft sehr viele verschiedene Funktionalitäten toleriert werden müssen. So wurden Oligosaccharide zur Herstellung von Microarrays an Oberflächen verankert.^[75] Auch bei der Synthese von Glycoproteinen und -peptiden lässt sich die Verknüpfung mit Hilfe der Cycloaddition sogar mehrfach in guten Ausbeuten durchführen.^[65,125] Die „Click“-Reaktion wurde ebenso zur Verknüpfung von Peptiden, sowohl zu linearen als auch zu zyklischen Konstrukten, eingesetzt.^[49,126–128]

Die hohe Effizienz der Reaktion ermöglichte sowohl die sehr erfolgreiche Synthese von Dendrimeren aus „Click“-Bausteinen^[60,129] als auch die Verknüpfung von verschiedenen Dendrimeren und Polymeren, wie Polyvinylacetylen, miteinander.^[63,130–132] Da die Reaktion orthogonal zu den anderen Techniken wie Veresterungen ist, kann man sie mit diesen auch *in situ* kombinieren um Blockpolymere selektiv in einem Schritt zu funktionalisieren.^[133] *Díaz et al.* verwendeten Polyazide und Polyalkine als „Zweikomponentenkleber“ von Kupfer- und Zinkoberflächen. Einige Kombinationen waren sogar besser als kommerzielle Produkte.

4.4. „Click“-Chemie an DNA

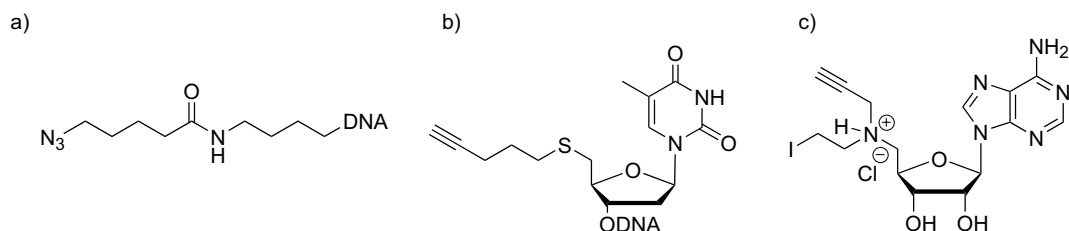


Abbildung 4.15: Alkine und Azide für „Click“-Reaktionen an DNA; (a) 5'-Azid-DNA^[134] (b) 5'-Alkin-DNA für Immobilisierung an Oberflächen^[123] (c) Alkin-SAM-Analogon als Substrat für Methyltransferasen.^[135]

Die 1,3-dipolare Cycloaddition an DNA wurde zuerst von *Seo et al.* als Methode zur Synthese eines mit Fluoreszein markierten Primers zur Sequenzierung eingeführt (s. Abb. 4.15a).^[134] Anders als in späteren Veröffentlichungen wurde dort noch keine Kupferkatalyse verwendet. Die Reaktion verlief daher langsam und nicht regioselektiv. Später wurde die Azid-DNA kupferkatalysiert an Glasoberflächen zur Sequenzierung immobilisiert.^[136–139] Fast gleichzeitig berichtete *Liu* von der Anwendung in der DNA-Templat-gesteuerten Synthese.^[140] *Collman, Kool* und *Chidsey* verwendeten Alkin-markierte DNA zur Erzeugung von selbstorganisierenden Monoschichten von DNA auf Azid-beschichteten Oberflächen (s. Abb. 4.15b).^[123] Zur sequenzspezifischen Einführung von Alkinen an DNA entwickelten *Rajski et al.* S-Adenosylmethionin-Analoga (SAM) als Substrate für Methyltransferasen (s. Abb. 4.15c) zum Übertragen eines Alkins an eine spezifische DNA Sequenz.^[135,141]

In diesen Arbeiten wurde maximal ein Alkin in die DNA eingeführt. Vor dem Beginn der in dieser Arbeit durchgeführten Studien gab es keinerlei Untersuchungen über die Verwendung von Alkin-DNA-Basen und die Effizienz der Reaktion bei mehrfachem Einbau. In den folgenden Abschnitten werden die Untersuchungen zur „Click“-Reaktion an DNA vorgestellt.

4.5. Eingesetzte Alkine und Azide

4.5.1. Synthese der Alkinthymidine

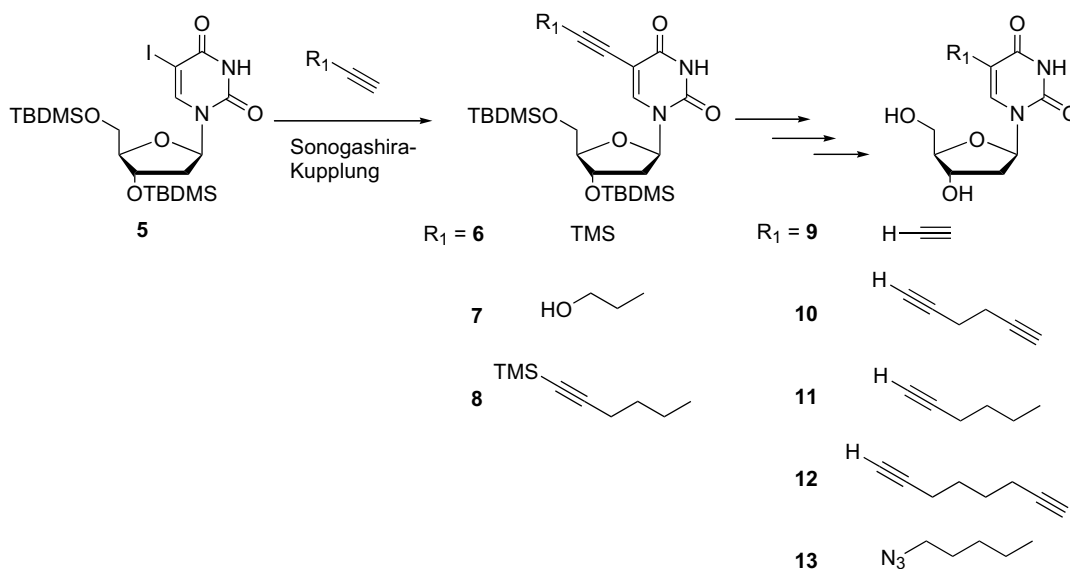


Abbildung 4.16: Syntheschema der verwendeten modifizierten Thymidine zur Einführung von Alkinen und Aziden in DNA.

Ein einfacher Weg zu einer modifizierten DNA-Base ist die Synthese eines modifizierten Thymidins. Abbildung 4.16 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Thymidine mit Alkin, bzw. Azid-Funktionalität. Im Folgenden soll auf die Synthese einiger Bausteine eingegangen werden. Wegen der Weiterentwicklungen und Änderungen im Laufe der Arbeit wurde nicht von allen Monomeren das 5'-Dimethoxytrityl-3'-phosphoramidit für die Festphasensynthese und das 5'-Triphosphat für den enzymatischen Einbau hergestellt. Monomer **10** wurde nur als Triphosphat synthetisiert.

Der Schlüsselschritt aller Synthesen ist die Sonogashira-Kupplung zwischen dem entsprechenden Alkin und 5-Iod-2'-desoxyuridin.^[142] Dabei kann die Kupplung sowohl an dem ungeschützten, als auch am TBDMS-geschützten Baustein durchgeführt werden. Allerdings erwies sich die Kupplung am ungeschützten Baustein als weniger zuverlässig und die Produkte waren schwieriger aufzureinigen.

Synthese von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (9)

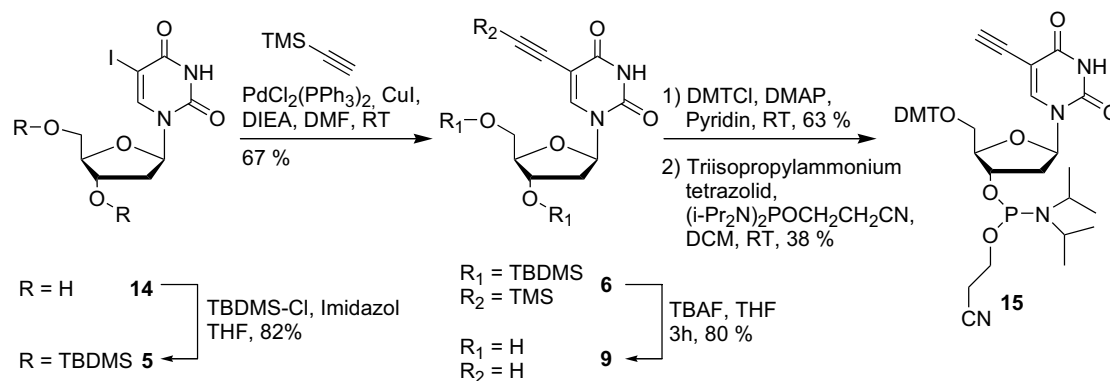


Abbildung 4.17: Synthese des Festphasensynthesebausteins von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (9).

In der Literatur gibt es zahlreiche Synthesen von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin-Bausteinen für die Festphasensynthese. Die Synthesen unterscheiden sich im Zeitpunkt der Sonogashira-Kupplung, d. h. in den Resten an den Hydroxylgruppen an 5'- und 3'-Position. *Robin et al.* kuppelten mit Acetyl-, bzw. Toluoyl-geschütztem 5-Iod-2'-desoxyuridin,^[143] während *Hurley et al.* am ungeschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin arbeiteten.^[144] *Graham et al.* setzten die 5'-Dimethoxytritylgeschützte Verbindung mit dem Alkin um.^[145]

Für die hier durchgeführte Synthese wurde TBDMS-geschütztes 5-Iod-2'-desoxyuridin 5 mit Trimethylsilylethin gekuppelt und nachfolgend alle Silylschutzgruppen mit TBAF abgespalten. Anschließend wurde das freie Nucleosid 9 für die DNA-Festphasensynthese vorbereitet. Dazu wurde an 5'-Position die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe unter Standardbedingungen eingeführt. Für die Reaktion zum Phosphoramidit wurde 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit^[146] mit Triisopropylamintetrazolid^[147] verwendet. Dadurch lässt sich die Phosphitylierung an der Ketofunktion der Base erfolgreich unterdrücken.

Synthese von 5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin (10)

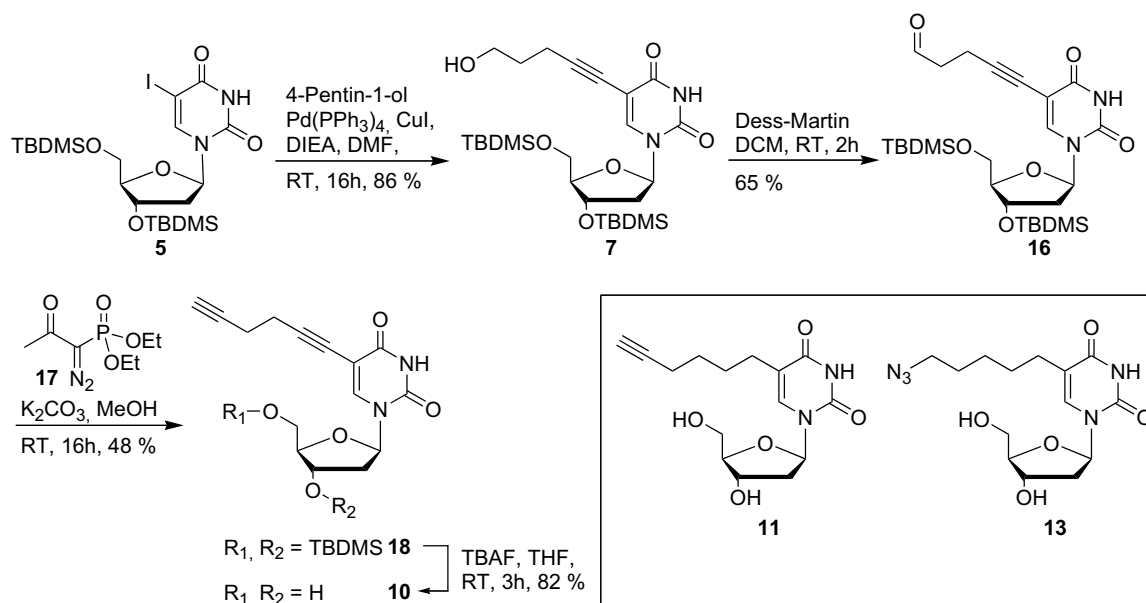


Abbildung 4.18: Synthese von 5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin (10) sowie Darstellung der Strukturen von 5-(Hexa-5-inyl)-2'-desoxyuridin (11) und 5-(5-Azidohexyl)-2'-desoxyuridin (13).

Erste Versuche der „Click“-Reaktion mit dem „kurzen“ Alkin 9 ergaben, dass ein nicht zum π -System der Base konjugiertes Alkin vorteilhafter sein könnte. Die sterische Behinderung bei der Reaktion mehrerer Basen nebeneinander im DNA-Strang sollte nicht so groß sein. Daher wurde die Synthese eines terminalen Alkins mit einer Alkylkette zwischen Alkin und Base entwickelt. Die Sonogashira-Kupplung von TBDMS-geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin 5 mit 4-Pentin-1-ol zu 7 verlief in sehr guter Ausbeute. Bei dieser Reaktion war ein Überschuss an Base (5 Äquivalente) von entscheidender Bedeutung. Der erhaltene primäre Alkohol wurde im nächsten Schritt mit *Dess-Martin*-Periodinan zum Aldehyd 16 oxidiert. Dieser wurde möglichst sofort nach Aufreinigung mit dem *Ohira-Bestmann*-Reagenz (1-Diazo-2-oxo-propylphosphonsäurediethylester) zum Alkin umgesetzt.^[148,149] Diese Alternative zum *Gilbert-Seyferth*-Reagenz^[150–152] hat den Vorteil, dass der Aldehyd bereits unter mild basischen Bedingungen zum Alkin reagiert. Außerdem ist das Reagenz einfach herzustellen.^[153]

Auf analogem Weg wurde von G. A. Burley 5-(Hexa-1-inyl)-2'-desoxyuridin 11 synthetisiert. Bei dieser Synthese wurde die Dreifachbindung nach der

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

Sonogashira-Kupplung selektiv mit Palladium auf Kohle hydriert. Die weiteren Schritte erfolgten analog. Ebenso wurde über Mesylierung des freien Alkohols und nukleophile Substitution das Azid **13** hergestellt.

Synthese von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin (**12**)

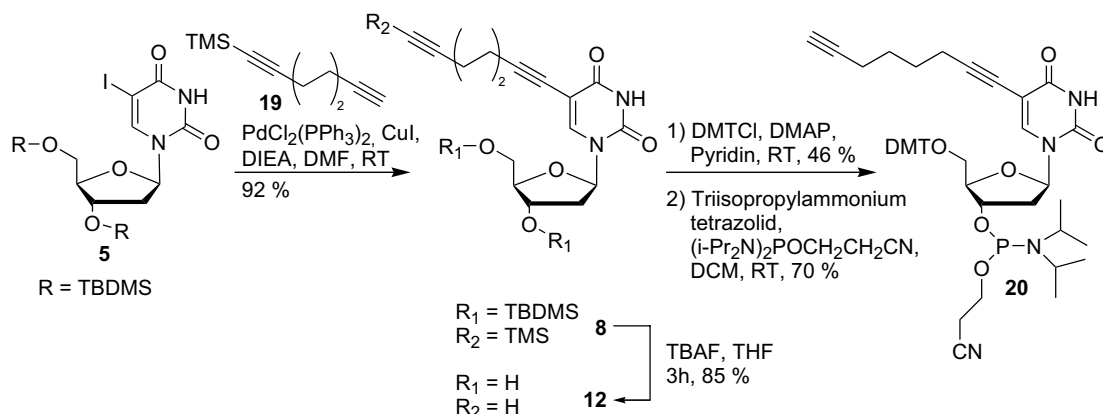


Abbildung 4.19: Synthese des Festphasensynthesebausteins von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxy-uridin (**12**).

Die Synthese eines Alkinbausteins ließ sich deutlich verkürzen, indem das einseitig geschützte Bisalkin 1-Trimethylsilyl-1,7-oktadiin **19** direkt in der Sonogashira-Kupplung eingesetzt wurde (s. Abb. 4.19). Es ist in nur einer Stufe zugänglich.¹ Dadurch wurde die Synthese vom 5-Iod-2'-desoxyuridin bis zum freien Nukleosid um zwei Stufen verkürzt. Zwar ist die Aufreinigung der Sonogashira-Kupplung etwas komplizierter, da sich Produkt und Edukt nicht so leicht voneinander trennen lassen, aber über diese „Abkürzung“ war die Herstellung der benötigten Mengen für die Festphasen-, bzw. Triphosphatsynthese deutlich einfacher, da der mit schlechter Ausbeute verlaufende Aufbau des terminalen Alkins umgangen werden konnte.

4.5.2. Synthese der Triphosphate

Verschiedene Methoden zur Synthese von Triphosphaten wurden erst vor kurzem von Burgess und Cook zusammengefasst.^[154] Zur Synthese der Triphosphate in dieser Arbeit wurden im wesentlichen zwei Wege verwendet. Die

¹hergestellt von P. Gramlich

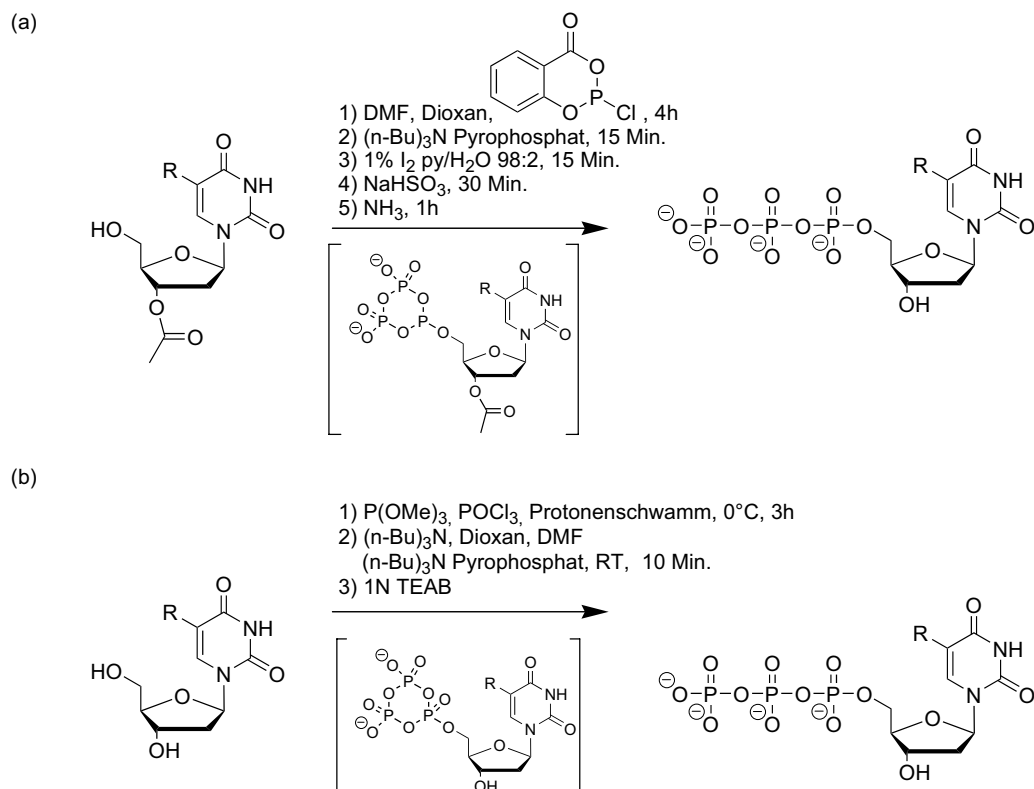


Abbildung 4.20: Synthese von Triphosphaten nach der (a) „geschützten“ Methode oder (b) „selektiven“ Methode.

„geschützte“ Methode wurde analog zu der Vorschrift von *Eckstein* durchgeführt (s. Abb. 4.20a).^[155] Dabei wird ein 3'-acetylgeschütztes Nucleosid mit dem Salicylsäure-Phosphor-(III)-Reagenz **74**^[156] umgesetzt. Nach Zugabe von Pyrophosphat wird als Zwischenstufe das in der Abbildung gezeigte zyklische Phosphat postuliert. Da der Phosphor aus dem Reagenz noch nicht oxidiert ist, muss er mit Iod-Lösung oxidiert werden. Nach Reduktion des Iods mit Natriumhydrogensulfit wird mit konzentrierter Ammoniaklösung nicht nur die Acetylgruppe abgespalten, sondern auch das zyklische Phosphat hydrolysiert. Durch Zugabe von Schwefel lassen sich über diese Methode auch α -Thiotriphosphate herstellen. Die mit dieser Methode erhaltenen Triphosphate sind einfacher aufzureinigen. Allerdings ist die Synthese der Monomere wegen der Einführung der Schutzgruppe an der 3'-Position etwas länger. Sie lässt sich allerdings auch enzymatisch in einem Schritt einführen.^[157] Außerdem wird bei der ersten Phosphorylierung HCl frei, was zu sauren Reaktionsbedingungen führt. Dies kann säurelabile Modifikationen wie Acetale spalten.

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

Die meisten Triphosphate wurden mit der „selektiven“ Methode nach Kovács *et al.*^[158] synthetisiert (s. Abb. 4.20b). Dabei wurde als Phosphorylierungsreagenz POCl_3 verwendet. Um die erste Phosphorylierung zu beschleunigen und das freiwerdende HCl zu neutralisieren wurde als Stickstoffbase ein Protonenschwamm verwendet. Es stellte sich heraus, dass die erste Phosphorylierung entscheidender ist, als die Bildung des Triphosphates im zweiten Schritt. Bei den meisten Fehlschlägen konnte vor allem unreaktiertes Monomer wiedergewonnen werden, nur selten ein Di- oder Tetraphosphat. Auch bei dieser Methode wird als Zwischenstufe ein zyklisches Phosphat postuliert, welches hydrolysiert wird. Dieser Weg ist einfacher durchzuführen, da das freie Monomer, welches auch für den Festphasensynthesebaustein benötigt wird, direkt eingesetzt werden kann. Allerdings kann sich die Aufreinigung der Triphosphate schwierig gestalten, da als Nebenprodukte Di- oder Tetraphosphate auftreten können.

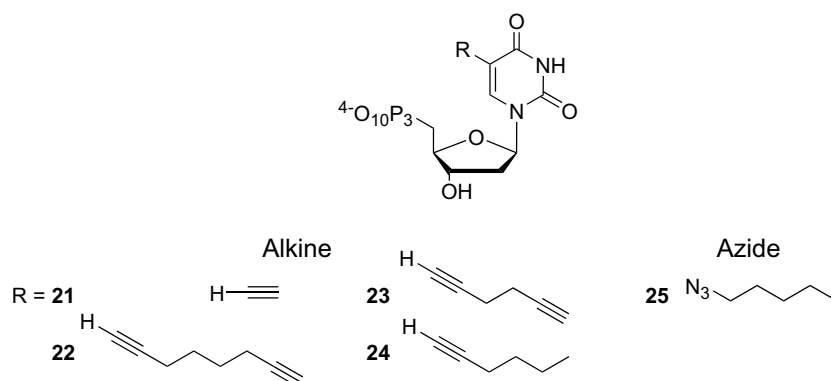


Abbildung 4.21: Hergestellte Triphosphate mit Alkinen und Aziden.

In der Abbildung 4.21 sind noch einmal alle in der Arbeit eingesetzten Triphosphate aufgeführt. Triphosphat **21** wurde mit beiden Methoden hergestellt. Die restlichen mit der „selektiven“ Methode. Es wurden nie mehr als 100 mg Nukleosid in der Reaktion eingesetzt.

Die Aufreinigung der Triphosphate wurde mit Hilfe von HPLC durchgeführt. In einigen Fällen wurden Nebenprodukte durch eine Ionenaustauschersäule (DEAE-Sephadex, Triethylamin/Natriumbicarbonat (TEAB) 0.1 M \rightarrow 1 M, Produkt bei 0.5-0.6 M) vor der HPLC abgetrennt. Gerade der Protonenschwamm, erkennbar am UV-Spektrum mit einem Maximum bei 285 nm, kann das Triphosphat überlagern. In solchen Fällen war es hilfreich die Konzentration des HPLC-Puffers von 0.1 M auf 0.01 M oder 2 mM zu senken. Leider lässt sich kein idealer Puffer für alle Triphosphate empfehlen. Jedes Triphosphat erforderte ei-

ne eigene Optimierung seiner Aufreinigung. In der Regel kommt das als Nebenprodukt gebildete Monophosphat vor dem Triphosphat von der Säule.

Die aufgereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert und in Wasser aufgenommen. Ein Austausch des Gegenions von Triethylamin gegen Natrium oder Lithium wurde nicht durchgeführt. Die Konzentration wurde mit Hilfe von UV-Spektrometrie bestimmt und die Lösungen wenn möglich aliquotiert und bei -20°C gelagert. Dabei waren die Lösungen erstaunlich stabil. Erst nach einem halben Jahr war bei einigen (oft verwendeten) Triphosphaten eine Abnahme der Aktivität feststellbar.

4.5.3. Synthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyguanosin (26)

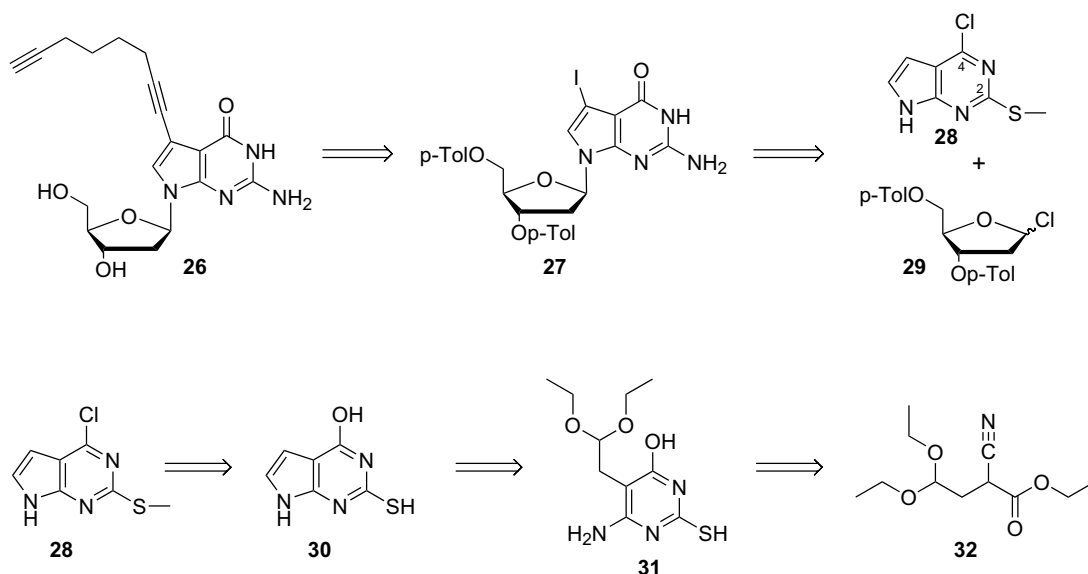


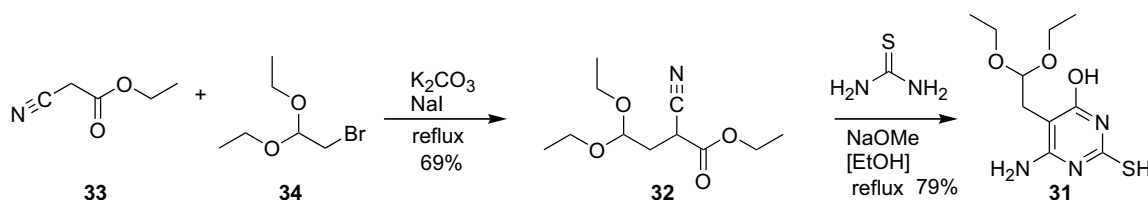
Abbildung 4.22: Retrosynthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyguanosin **26**.

7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyguanosin **26** lässt sich analog zu den Thyminen durch Sonogashira-Kupplung aus 7-Desaza-7-iod-5',3'-O-p-toluoyl-2'-desoxyguanosin **27** herstellen. Dieses Nukleosid kann durch Glykosidierung mit 4-Chloro-2-methylsulfanyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin **28** mit anschließender Umwandlung des Chlorids in die Ketofunktion und des Methylthiols in die Aminogruppe des 7-Desazaguanins erhalten werden. Das für die Glykosidierung benötigte 4-Chloro-Purin **28** ist durch Chlorierung

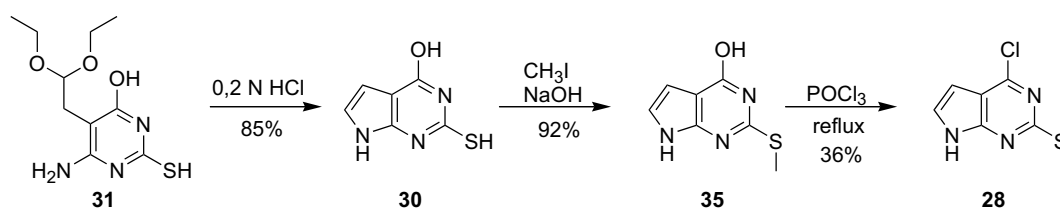
4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

von **30** erhältlich. **30** wird über zwei aufeinanderfolgende Kondensationsreaktionen aufgebaut: Der Fünfring wird durch die intramolekulare Reaktion des entschützten Aldehyds von **31** mit der Aminogruppe aufgebaut. Das entsprechend substituierte Pyrimidin-System **31** kann durch Kondensation α -Cyanoesters **32** mit Thioharnstoff hergestellt werden. Auf ähnlichem Weg kann nach Desulfurierung von **28** auch 7-Desaza-2'-desoxyadenosin hergestellt werden.^[159]

Die Synthese des 7-Desaza-2'-desoxyguanosins (7dN-2'-desoxyguanosins) ist bereits literaturbekannt.^[33] Allerdings ist gerade die Synthese des Puringerüsts in der Literatur nur schlecht beschrieben. Die nachfolgend vorgestellte Synthese kombiniert verschiedene bereits publizierte Wege.

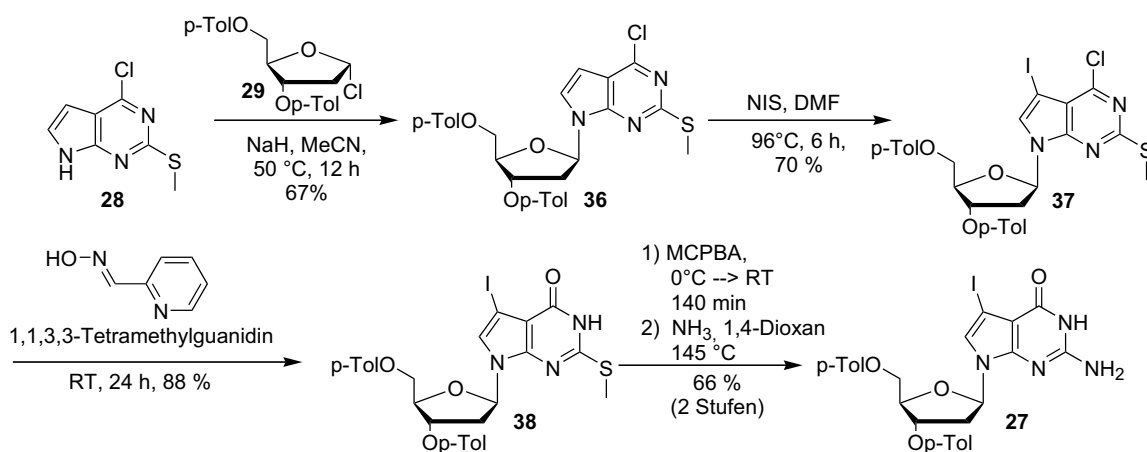


Die Synthese beginnt mit dem Aufbau des α -Cyanoesters **32** durch Alkylierung von Cyanoessigsäureethylester **33** mit Bromacetaldehyddiethylacetal **34**.^[21] Zur Vermeidung von Doppelalkylierung wurde der Ester in fünffachem Überschuss eingesetzt und die Reaktion ohne Lösungsmittel zum Sieden erhitzt. Das Produkt **32** wurde durch Vakuumdestillation gereinigt. Der Aufbau des Pyrimidinrings erfolgte über die Umsetzung von **32** mit Thioharnstoff in Ethanol mit Natriummethoxid als Base. Nach vier Stunden wurde das Produkt **31** durch Zugabe von Essigsäure bis zum Neutralpunkt ausgefällt.



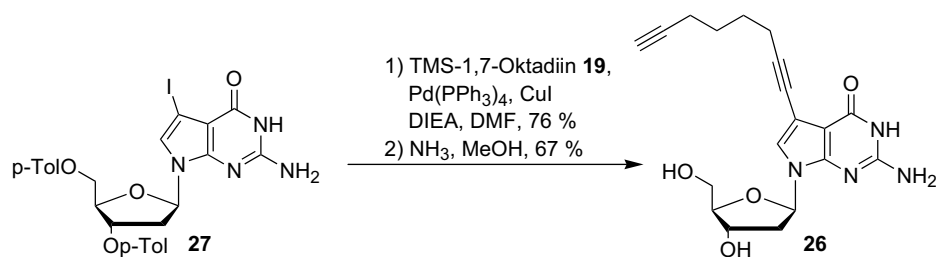
Zum Schließen des Pyrrol-Rings wurde der Aldehyd durch Spaltung des Acetals in **31** freigesetzt. Er reagiert intramolekular mit der Aminofunktion zu **30**. Zur Methylierung der Thiolfunktion wurde Methyljodid verwendet. Die Versuche mit Dimethylsulfat schlugen fehl.^[21] Unter Kühlung und mit genau einem Äquivalent Methyljodid verlief die Reaktion mit sehr guter Ausbeute. Erneut fiel das Produkt **35** bei der Aufarbeitung sauber aus. Die Reihenfolge der Methylierung und des Ringschlusses war auch umkehrbar. In

diesem Fall wurde die Methylierung allerdings in DMF durchgeführt. Versuche, die Glykosidierung mit **35** mit Trimethylsilyltriflat (TMSOTf) und *N,O*-Bistrimethylsilylacetamid (BSA) durchzuführen schlugen fehl. Daher wurde die Hydroxylgruppe in einen elektronegativeren Substituenten umgewandelt. Dies diente zur Aktivierung des Stickstoffs an der 9-Position für die Glykosidierung. So wurde 4-Chloro-2-methylsulfanyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin **28** durch Refluxieren in POCl₃ hergestellt. Leider war die Ausbeute von 36 % auch durch Verlängerung der Reaktionszeit nicht zu verbessern. Andere Chlorierungsmittel wie Oxalylchlorid oder Thionylchlorid reagierten überhaupt nicht.



Die für die Glykosidierung benötigte 1'- α/β -Chlor-2'-desoxy-3',5'-*p*-toluoyl-D-ribofuranose **29** ist aus 2'-Desoxyribose in drei Stufen zugänglich.^[160] Dazu wurde zuerst in Methanol die 1'-Methoxy-2'-desoxyribofuranose hergestellt und die freien Hydroxylgruppen mit *para*-Toluoylchlorid geschützt. Bei Einleitung von HCl_(g) in Eisessig fiel der 1'-Chlorozucker **29** sauber aus. Die Glykosidierung von **28** wurde mit Natriumhydrid als Base in Acetonitril durchgeführt und ergab ausschließlich das gewünschte β -Anomer **36**.^[23] Selektive Iodierung mit *N*-Iodsuccinimid in 7-Position führte zu Verbindung **37**.^[33] Das Chlorid in 4-Position wurde unter Einwirkung von *syn*-2-Pyridinaldoxim unter sehr milden Bedingungen hydrolysiert. Für die Einführung der Amino-Funktion wurde der Schwefel erst durch Oxidation in ein Sulfon überführt und dieses dann unter Druck mit Ammoniak substituiert. Wird die Reaktion in trockenem 1,4-Dioxan durchgeführt, kann die Spaltung der *para*-Toluoylgruppen verhindert werden.

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)



Die Sonogashira-Kupplung von **27** mit 1-Trimethylsilyl-1,7-oktadiin **19** verlief unter Standardbedingungen in guten Ausbeuten. Bei der Entschützung zum freien Nucleosid 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyguanosin **26** erwies sich Ammoniak in Methanol als das wirkungsvollste Reagenz. Die Synthese des Triphosphats oder des Festphasensynthesebausteins wurde nicht mehr durchgeführt.

Kurz nach Abschluss der Synthese wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein neuer Weg zur Base entwickelt. So gelang es 7-Desazaguanin direkt durch Reaktion von Bromacetyldehyddiethylacetal mit 2,6-Diamino-4-pyrimidon aufzubauen. Dadurch verkürzt sich die Synthese um drei Stufen.

4.5.4. Verwendete Azide

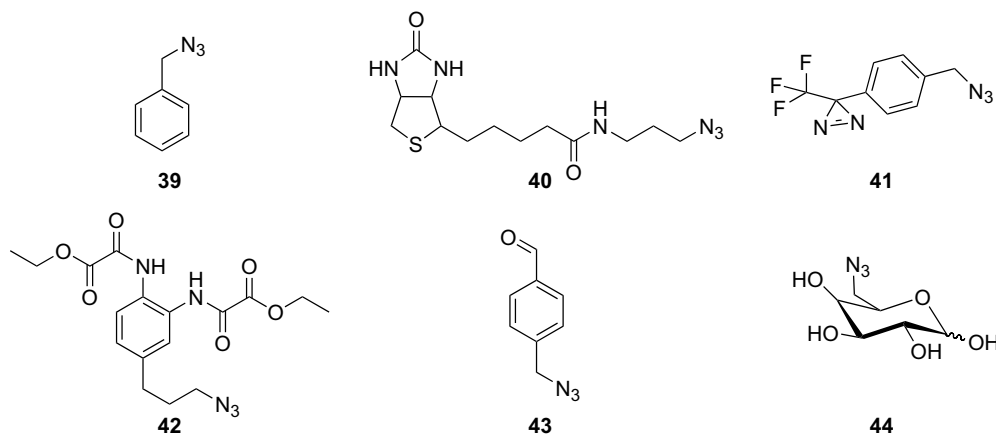


Abbildung 4.23: Hergestellte Azide für verschiedene Anwendungen.

Die wesentliche Stärke der „Click“-Reaktion ist die hohe Bandbreite an Funktionen, welche eingeführt werden können. Abbildung 4.23 zeigt einige in der Gruppe eingesetzte Azide. Benzylazid **39**^[161] diente als erstes und einfachstes Azid für die ersten Versuchsreihen. Biotin-Azid **40** ist ein Beispiel für eine Affinitätsmarkierung die mit der Reaktion eingeführt werden kann. Das Aziridin-Azid **41** enthält ein photoaktivierbares Carben, welches von *S. Breeger* zum „Fangen“ von DNA-bindenden Reparaturproteinen eingesetzt wurde. Der Ligand **42** wurde von *K. Gutschmiedl* zum Aufbau von Metall-Komplexen an DNA verwendet. Für die Einführung von Aldehyd-Gruppen an DNA wurden das Benzaldehydazid **43** und das Galaktoseazid **44**^[162,163] synthetisiert.

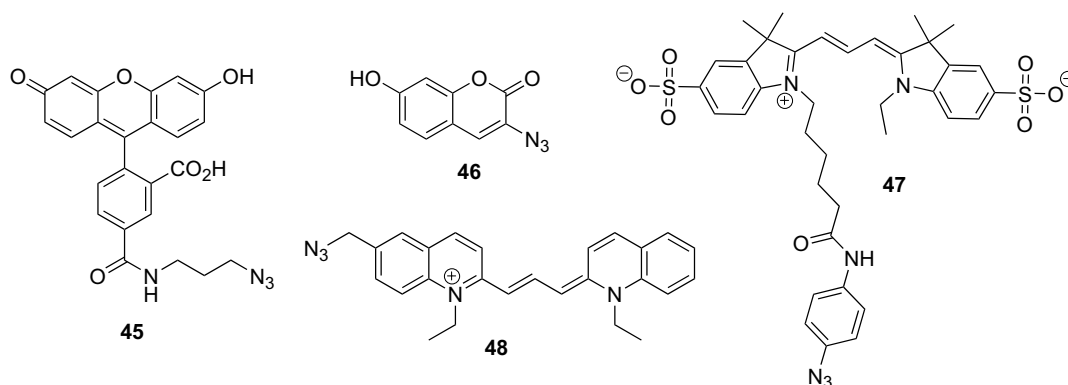


Abbildung 4.24: Verschiedene verwendete Azid-Derivate von Farbstoffen.

Neben den Affinitäts- und Funktionsmarkierung sind Fluoreszenzfarbstoffe sehr wichtig. Abbildung 4.24 zeigt einige synthetisierte Azide. So wurden neben dem Fluoreszeinazid **45** noch weitere Farbstoffe verwendet. Das Cumarinazid **46** (synthetisiert von *D. Kuch*) beginnt erst durch Bildung des Triazols zu fluoreszieren.^[62,164] Als Farbstoff mit Anregung im längerwelligen Bereich wurde der Cyaninfarbstoff **47** (Cy3) als Azid hergestellt (synthetisiert von *S. Warncke*). Zur photographischen Detektion von DNA diente der tiefblaue Photosensibilisator **48** (Synthese entwickelt von *V. Azov*).

Synthese der Azide

Die Einführung eines Azids erfolgt meistens über eine nukleophile Substitutionsreaktion.^[40,165] Sehr zuverlässig lassen sich unpolare Azide durch Substitution von Bromid oder Mesylat in DMF mit einem Überschuss Natriumazid herstellen. Bromide haben den Vorteil, dass das während der Reaktion entstehende Natriumbromid aus DMF ausfällt. Nach Extraktion mit Essigester erhält man das Azid quantitativ. Auf diese Art und Weise wurde das Benzylazid **39** und andere Azide hergestellt (**41, 42, 43, 48**). Das Azid des Biotins^[166] und des Fluoreszeins^[69,167] wurden über eine Veresterung mit 2-Azidopropylamin hergestellt. Dieses war aus 3-Bromopropylamin zugänglich und wurde über eine vorsichtige Vakuumdestillation gereinigt.^[168] Das Zuckerazid **44** wurde aus der Isopropyliden-geschützten Galaktose über eine Mitsunobu-Reaktion mit Natriumazid hergestellt.^[162,163] 4-Azidomethylbenzaldehyd **43** wurde durch Reduktion von α -Brom-*p*-toluolnitril^[169] mit anschließender nukleophiler Substitution des benzyli-schen Broms synthetisiert.

4.6. Reaktion an Oligonukleotiden

4.6.1. Synthese von Oligonukleotiden mit Alkinen

Für die Untersuchung der „Click“-Reaktion an DNA wurden 16 Basen lange DNA-Oligomere mit unterschiedlicher Anzahl und Anordnung der verschiedenen Alkine synthetisiert (s. Tabelle 4.1). Die Sequenz erlaubt die Platzierung der Modifikationen in unterschiedlichen Abständen, von direkt nebeneinander bis hin zu mehreren Basen Abstand. Wegen der Weiterentwicklung, z.B. der Kettenlänge und der Struktur des Monomers, wurden die gleichen Sequenzen mit verschiedenen Monomeren hergestellt. Die Experimente an DNA-Strängen mit Alkinen mit flexibler Alkylkette (**11** oder **12**) führten zu identischen Ergebnissen.

Die Synthese an der festen Phase stellte für alle Monomere kein besonderes Problem dar. Dabei kuppelte das „kurze“ Alkin **9** fast genau so gut wie ein normales Thymidin. Bei Strängen mit mehreren Modifikationen wurden die Modifikationen doppelt gekuppelt. Die Kupplungszeiten der folgenden Monomere wurden zusätzlich verlängert. Prinzipiell hängt der Erfolg der Synthese vor allem von der Qualität des eingesetzten Phosphoramidits ab. Der DNA-Strang mit sechs aufeinanderfolgenden Modifikationen wurde mit terminaler DMT-Schutzgruppe vom Träger abgespalten und zweimal aufgereinigt („DMT-on“) Für genaue Synthesebedingungen und Protokolle siehe Abschnitt 8.6.

Die verschiedenen Modifikationen haben auch einen Einfluss auf die Schmelztemperatur der Stränge. Wie ein Propinrest in 5-Position stabilisiert auch der Ethinrest die DNA (Schmelzpunkt **d1**: 69.1 °C ; normale DNA: 68.1 °C). Das Oktadiin ist leicht destabilisierend (Schmelzpunkt **d5**: 65.5 °C). Neue Studien mit Oktadiin-Thymidin bestätigen diese Beobachtungen.^[170] Allerdings hängt der Einfluss auf die Stabilität des Doppelstrangs stark von der Sequenzumgebung und der Dichte der Alkine ab.

Sequenz	X = 9	T _m [°C]	X = 12	T _m [°C]
5' -GCGCTGT X CATTCGCG	d1	69.1	d5	65.5
5' -GCGCTG XX CATTCGCG	d2	69.4	d6	
5' -GCGC XGTXCAX TCGCG	d3	69.9	d7	66.1
5' -GCGC XXXXXX GTCGCG	d4		d8	

Tabelle 4.1: Die mit den verschiedenen Alkinen hergestellten Stränge und die Schmelztemperaturen (natürliche DNA: 68.1 °C; 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl)

4.6.2. Reaktion an DNA

Das Hauptproblem der „Click“-Reaktion an DNA ist die Verwendung von Kupfer-Ionen. Kupfer(II)-Ionen können mit Sauerstoff Hydroxylradikale bilden, welche zu Oxidationen der Basen und daraus folgenden Strangbrüchen führen können.^[171] Diese Eigenschaft wird unter Verwendung von speziellen Liganden zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA genutzt.^[172,173]

Bei den ersten Versuchen DNA-Oligomere **d1** oder **d2** mit CuSO₄/TCEP mit Benzylazid **39** umzusetzen, wurde zwar das Produkt im MALDI nachgewiesen, aber auch kürzere Fragmente, die durch Strangbrüche entstehen. Dabei war es unerheblich, welches Reduktionsmittel verwendet wurde. Eine deutliche Verbesserung brachte die Verwendung des Kupfer(I)-stabilisierenden Liganden **1**.^[135] Der Kupfer-Ligand-Komplex wurde vor der Reaktion frisch hergestellt. Das Reduktionsmittel TCEP wurde immer als letztes zugegeben. Um Nebenreaktionen des Reduktionsmittels mit der DNA oder dem Azid auszuschließen, wurde später CuBr (99.99 %) verwendet. Mit dieser Kupferquelle wurden die besten Ergebnisse erzielt. Die Reaktion war in den meisten Fällen innerhalb einer halben Stunde beendet. Auch längere Reaktionszeiten führten nicht mehr zur Zersetzung der DNA. Die optimalen Bedingungen für die Reaktion mit DNA waren 50 Äquivalente des jeweiligen Azids und 20 Äquivalente Kupfer/Ligand-Komplex. Dabei wurde niemals eine zweifache Reaktion sowohl am terminalen als auch am internen Alkin der Base beobachtet.

Abbildung 4.25 vergleicht die Reaktion von Oligonukleotiden mit unterschiedlicher Anzahl und Abfolge der Alkine mit dem Zuckerazid **44**. Dabei treten Unterschiede zwischen Strängen mit dem „kurzen“ Alkin **9** (**d1**, **d2**, **d3** und **d4**) und Strängen mit **12**, welches ein Alkin mit flexibler Kette besitzt, auf (**d5**, **d7** und **d8**). So kam es bei einfacher Reaktion in beiden Fällen zu vollständigem Umsatz (**d1**: [M+Na⁺]⁺: 5082). Bei zwei aufeinanderfolgenden Aziden wie in **d2** wurde neben dem Hauptprodukt ([M]⁺: 5297) noch eine kleinere Menge des nur einfach abreagierten Produkts beobachtet ([M+Na⁺]⁺: 5110). Aber auch bei zwei Basenpaaren Abstand zwischen den Alkinen in **d3** mit drei Alkinen entsprach das Hauptprodukt zwar dem dreifachen Addukt ([M]⁺: 5508), aber es wurde immer auch das zweifache Addukt nachgewiesen ([M+Na⁺]⁺: 5320). Noch deutlicher ist der Effekt bei dem anspruchvollsten Substrat **d4** mit sechs aufeinanderfolgenden Alkinen. Dort ist das fünffache Addukt ([M+2 Na⁺]⁺: 5970) sogar das Hauptprodukt, während als Nebenprodukte das vierfache ([M+3 Na⁺]⁺: 5784) und das sechsfache ([M+Na⁺]⁺: 6158) auftreten. Die entsprechenden Reaktionen mit dem Alkin **12** zeigten dagegen vollständigen

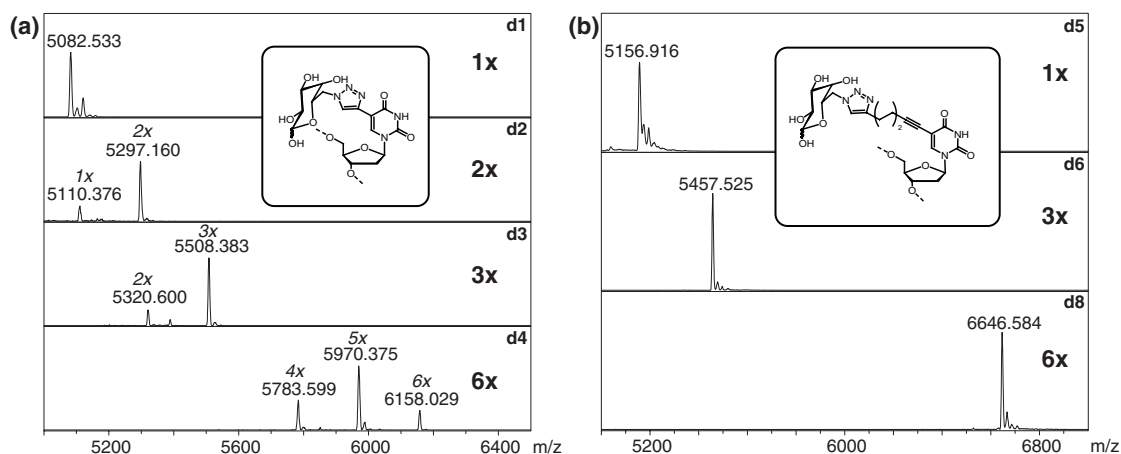


Abbildung 4.25: Vergleich der „Click“-Reaktion von Zuckerazid **44** an DNA mit (a) dem Alkin **9** (b) dem Alkin **12**.

Umsatz in allen Fällen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem Cumarinazid **46** und dem Fluoreszeinazid **45** erhalten.

Das Cumarinazid fluoresziert nach der Reaktion (s. Abb. 4.26a). Im Fall des Fluoreszeinazids verursacht die Addition von so großen und unpolaren Resten an die DNA eine deutlich geringere Mobilität bei elektrophoretischer Auftrennung. Wie in Abbildung 4.26b deutlich zu sehen, entstehen bei den Oligonukleotiden mit dem „kurzen“ Alkin **9** immer nur Verteilungen der Produkte. Bei Verwendung von Oligonukleotiden mit Alkin **12** sind keine Nebenprodukte mehr zu erkennen.

Neben dem rein qualitativen Nachweis der Reaktion durch MALDI oder Gelelektrophorese wurde auch die Eignung der Reaktion zur Herstellung größerer

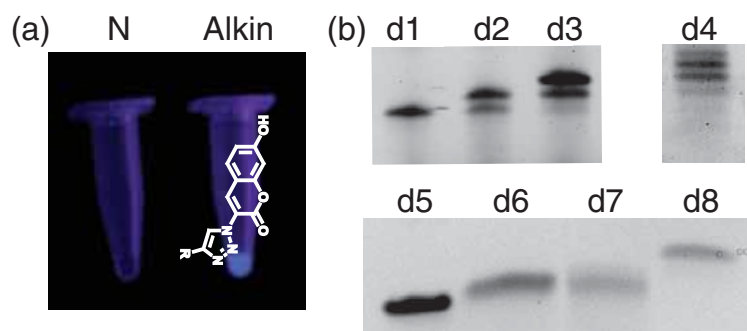


Abbildung 4.26: (a) Leuchtende Alkin-DNA nach Reaktion mit Cumarin **46**. (b) Gele der Reaktion von Fluoreszeinazid **45** mit verschiedenen DNA-Oligomeren.

Mengen an DNA untersucht. Während sich die Reaktionen von Strängen mit nur einem Alkin mit Hilfe von HPLC aufreinigen ließen, gab es bei der HPLC-Aufreinigung der höher modifizierten Stränge oft Probleme. Die Fällung der DNA mit Ethanol erwies sich als die beste Aufarbeitung der Reaktion. Danach war die DNA bereits sauber oder ließ sich per HPLC reinigen.

Die Versuche zeigten, dass die Kombination von sehr reinem CuBr (99.99 %) mit Ligand **1** die besten Ergebnisse bei der „Click“-Reaktion an DNA ergibt. Der Kupfer(I)-stabilisierende Ligand war auch bei der Verwendung von Kupfer(II)sulfat mit TCEP oder Ascorbat essentiell. Die flexiblen Alkine zeigten in allen Fällen eine deutlich höheren Umsatz, als das ein direkt konjugiertes Alkine.

4.7. Reaktion mit PCR-Produkten

4.7.1. PCR-Produkte mit wenigen Alkinen



Abbildung 4.27: Herstellung von DNA mit wenigen Alkinen durch PCR mit Alkinprimern.

Nach den Versuchen an den kurzen Oligomeren stellte sich die Frage, ob die „Click“-Reaktion auch mit sehr langen DNA-Strängen kompatibel ist oder anders ausgedrückt, wie effizient die Unterdrückung der DNA-Spaltungsreaktionen wirklich ist. Dazu wurden zwei unterschiedliche Primer mit je zwei Alkinen **12** zur Anwendung in der Polymerase Kettenreaktion synthetisiert (Primersequenzen und PCR-Produkte siehe Abschnitt 8.9.6). Der Primer **d9** bindet an einen Bereich des Polymerase η -Gens aus Hefe. Für diesen Primer wurden verschiedene Gegenprimer für Produkte von unterschiedlicher Länge gewählt. Der Primer **d10** gehört zum 800 Basenpaare langen Gen einer

Sequenz	X = 12
5' -TTAATTGAATTCGATT X GGGCCGGAXTTGTTTC	d9
5' -GCAGGC X TCAXGCCAGAATTACCAGAAG	d10

Tabelle 4.2: Hergestellte PCR-Primer mit Alkinen.

FPG-Glykosidase (Sequenzen und Templat von *R. Strasser*). Mit diesen beiden Primern hergestellte PCR-Produkte enthalten unabhängig von der Länge des PCR-Produkts genau 2 Alkine pro PCR-Produkt. Für die gezeigten Kontrollen mit natürlicher DNA wurden analog PCR-Produkte mit unmodifizierten Primern hergestellt.

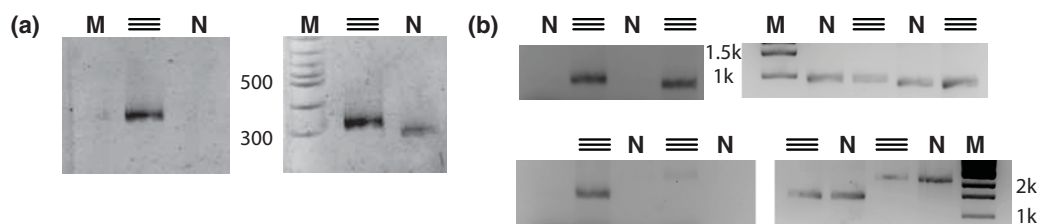


Abbildung 4.28: „Click“-Reaktionen an PCR-Produkten unterschiedlicher Länge mit Fluoreszeinazid **45**; **M**: Marker (Größe der Banden ist neben dem Gel angegeben); **N**: normale DNA \equiv : Alkin-DNA; die rechten Gele wurden mit SYBR Green, bzw. Ethidiumbromid gefärbt. (a) 300 Basenpaare langes PCR-Produkt mit Alkin-Primer **d9**; (b) 800 Basenpaare langes PCR-Produkt mit Alkin-Primer **d10** und 900, 1300 und 2100 Basenpaare langes PCR-Produkt mit Alkin-Primer **d9**.

Die PCR-Produkte mit und ohne Alkine wurden unter „Click“-Bedingungen mit CuBr/Ligand **1** und Fluoreszeinazid umgesetzt und die Produkte mit Hilfe von Elektrophorese untersucht. Wie schon bei den kurzen Oligomeren wurde der Kupfer-Ligand-Komplex vor der Reaktion frisch hergestellt. Die Gele wurden zuerst ohne irgendeine Anfärbung betrachtet, um die Fluoreszenz des Fluoreszeins zu detektieren. Danach wurden die Gele mit einem DNA-Farbstoff wie SYBR Green II oder Ethidiumbromid angefärbt. Abbildung 4.28 zeigt, dass nur die PCR-Produkte mit Alkinen mit dem Fluoreszeinazid reagierten. Nach Anfärben mit SYBR Green II oder Ethidiumbromid (Abb. 4.28a,b rechts) war auch die normale DNA sichtbar. Die beiden Fluoreszeine bewirkten keine Veränderung der Mobilität im Gel (Im Fall des 300 Basenpaare langen Produkts war die normale Kontrolle mit Biotin markiert). Um ein deutliches Fluoreszenzsignal zu erhalten, wurden in der Reaktion 1-4 pmol DNA eingesetzt. Bei einem Molekulargewicht von über 150.000 g/mol musste eine große Menge DNA auf die Gele geladen werden. Trotzdem waren auf den Gelen keine Spaltungsprodukte der DNA zu erkennen. Bei 25 °C ist die Reaktion in weniger als einer halben Stunde beendet. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit PCR-Produkten von bis zu 2000 Basenpaaren Länge erhalten. Selbst bei nur 2 Alkinen an einem DNA-Molekül dieser Größe konnten weder Nebenprodukte noch DNA-Spaltung de-

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

tektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die „Click“-Reaktion zur selektiven Markierung von DNA sehr gut geeignet ist.

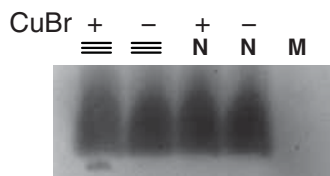


Abbildung 4.29: Reaktion des 300 Basenpaare langen PCR-Produkts mit Cy3-Azid 47. Gel ohne SYBR Green mit Kontrollen mit und ohne Zugabe von CuBr.

Neben Fluoreszein wurde das 300 Basenpaare lange PCR-Produkt auch mit dem Cy3-Azid 47 umgesetzt (s. Abb. 4.29). Im Gegensatz zum Fluoreszeinazid, welches auf dem Gel vor der DNA in der Lauffront läuft und leicht herausgewaschen werden kann, ist das Cy3-Azid langsamer als das PCR-Produkt. Dass wirklich eine kupferkatalysierte Cycloaddition vorliegt zeigen die Kontrollen ohne Kupfer. Nur bei Zugabe von Kupfer(I)-Ionen kommt es zur Markierung der DNA. Die Reaktion ist genauso selektiv wie die Reaktion mit Fluoreszein.

4.7.2. PCR-Produkte aus Alkintriphosphaten

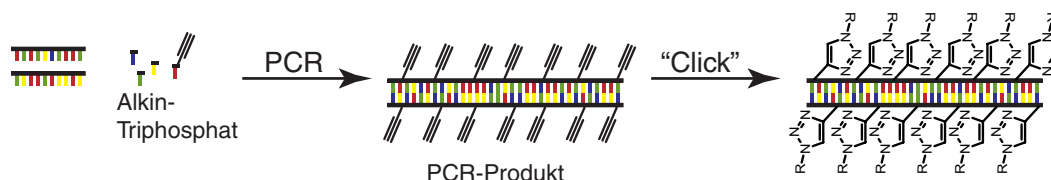


Abbildung 4.30: Herstellung von DNA mit vielen Alkinen durch PCR mit Alkintriphosphaten.

Neben der Synthese von kurzen Oligomeren an der festen Phase ermöglicht die Synthese durch Polymerasen die Herstellung von deutlich längeren Strängen mit vielen Alkinen. Dazu wird während der PCR eines der natürlichen Triphosphate mit einem der hergestellten Alkintriphosphat substituiert. Ein so hergestelltes PCR-Produkt enthält dadurch zum Beispiel anstatt Thymidin immer ein Alkinthymidin (s. Abb. 4.30). Auf die Entwicklung und die Bedingungen der PCR mit den modifizierten Triphosphaten wird in Kapitel 5 eingegangen.

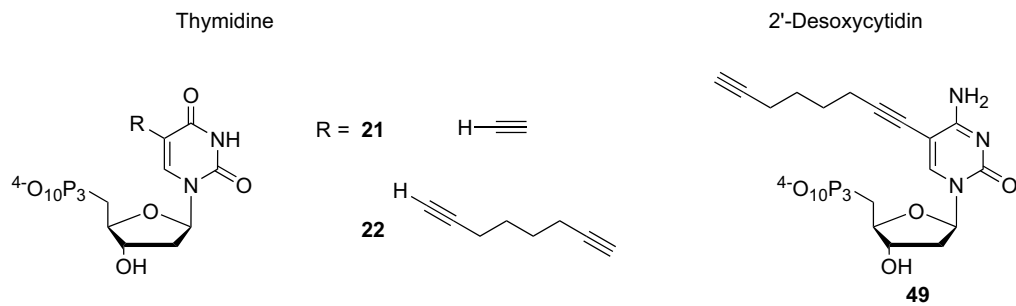


Abbildung 4.31: Verwendete Alkintriphosphate: Alkinthymidine (**21,22**) und Alkin-2'-Desoxycytidin (**49** von *P. Gramlich*).

Für die Herstellung solcher DNA wurden die in Abbildung 4.31 dargestellten Thymidin- und 2'-Desoxycytidintriphosphate synthetisiert und erfolgreich in der PCR eingesetzt. Ein mit diesen Triphosphaten hergestelltes 300 Basenpaare langes PCR-Produkt enthält bei Verwendung von **21** oder **22** 153 Alkin-Thymidine oder bei Verwendung von **49** 104 Alkin-2'-desoxycytidine.

Die an kurzen Oligomeren gemessenen stabilisierenden Eigenschaften der Monomere spiegeln sich auch in den Schmelzpunkten der PCR-Produkte wider (s. Abb. 4.32). Das „kurze“ Alkin **9** erhöht die Schmelztemperatur der DNA um 8 °C. Das Alkin mit der längeren Kette **12** stabilisiert etwas schlechter. Entsprechend den Arbeiten von *P. Gramlich* und *Seela*^[29] stabilisieren Alkin-2'-desoxycytidine noch stärker als die Alkinthymidine. Trotz des ebenso langen Restes wie in **12** zeigt das PCR-Produkt aus **49** den höchsten Schmelzpunkt. Allerdings ist aufgrund der Sequenz die Dichte der Modifikationen bei den 2'-Desoxycytidinen geringer. Vielleicht kommt es bei zu hoher Dichte der Alkine zu einer zunehmenden Destabilisierung durch die hydrophoben Reste.

Der Einbau der Triphosphate wurde durch enzymatischen Abbau mit anschließendem HPLC-MS-MS bestätigt (s. Abb. 4.33a). Dazu wird die DNA im ersten Schritt mit Nuklease P1 aus *Penicillium citrum* und Phosphodiesterase aus *calf spleen* versetzt. Im zweiten Schritt wird bei höherem pH-Wert *alkaline calf intestinal*-Phosphatase und *snake venom*-Phosphatase zugegeben. Die Enzymkombinationen bauen DNA von beiden Enden bis hin zu den freien Nucleosiden ab. Dabei spielen wahrscheinlich Modifikationen an den Basen keine Rolle, da nur Zucker-Phosphat-Bindungen erkannt und gespalten werden. Die modifizierte DNA wurde ohne Probleme zu den Monomeren abgebaut. Die erhaltenen Mischungen wurden danach über HPLC aufgetrennt und durch Massenkopplung die Masse und Fragmentierung der verschiedenen Signale bestimmt. In der Abbildung 4.33a sind in dem ersten Chromatogramm die Signale zugeordnet worden. Die Intensität der Signale entspricht nicht ihrer Häufigkeit, da die Extinkti-

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

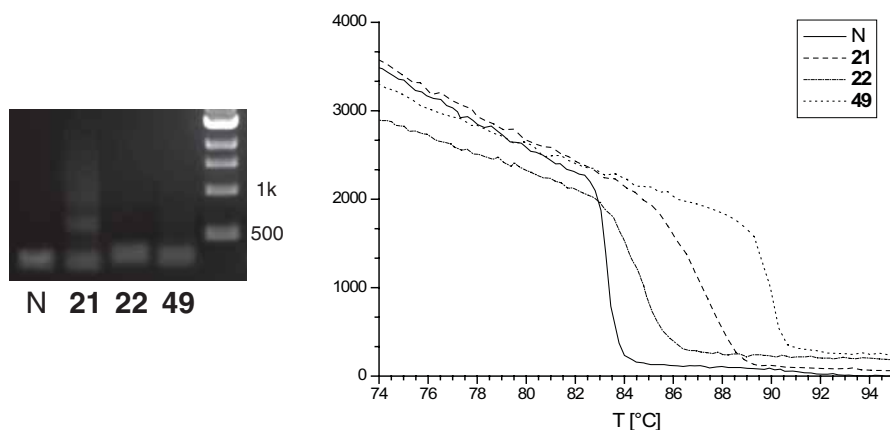


Abbildung 4.32: Gele und Schmelzkurven von 300 Basenpaare langen PCR-Produkten mit den Triphosphaten **21**, **22** und **49** (Schmelzkurven gemessen mit SYBR Green in Pwo-Puffer).

onskoeffizienten bei 260 nm unterschiedlich sind. Auch bei vollständigem Austausch des Thyminids mit einem Alkinthyminid sind immer noch die Thyminidine aus den Primersequenzen zu erkennen. Das kleine Signal vor dem Signal des 2'-Desoxyguanosins bei 18-19 Minuten entspricht Inosin. Das Nebenprodukt entsteht durch eine Deaminaseaktivität der verwendeten Enzyme. Wird die HPLC mit einem PDA (*Photo Diode Array*) aufgenommen, sind die Monomere auch anhand ihrer UV-Spektren zu unterscheiden. Dies ist besonders bei der Identifikation der Alkin-modifizierten Basen hilfreich, da sie als einzige Monomere eine Absorption jenseits von 300 nm besitzen. Bei dem enzymatischen Abbau der Alkin-DNA ist zu sehen, dass die langen Ketten die modifizierten Basen deutlich unpolarer werden lassen. So hat das Alkin-2'-desoxycytidin **50** eine Retentionszeit von 42 Minuten im Gegensatz von 10 Minuten des normalen 2'-Desoxycytidins.

Der enzymatische Abbau wurde auch verwendet, um die Effizienz der Reaktion an DNA mit sehr hoher Dichte von Alkinen zu überprüfen. So enthält die Sequenz des 300 Basenpaare langen PCR-Produkts einen Gesamtanteil von 60 % AT-Basenpaaren. Darin kommen sechsmal drei und dreimal vier Thyminidine nacheinander vor. Bei den 2'-Desoxycytidinen gibt es fünfmal drei und einmal sogar fünf hintereinander. Im Doppelstrang ist die längste Abfolge von AT-Basenpaaren neun, von GC-Basenpaaren sieben. Die Dichte an Alkinen ist im PCR-Produkt deutlich höher als in den Sequenzen der Einzelstränge. Die PCR-Produkte wurden mit dem Zuckerazid **44** umgesetzt, durch Fällung mit Ethanol gereinigt und enzymatisch zu den Monomeren abgebaut.

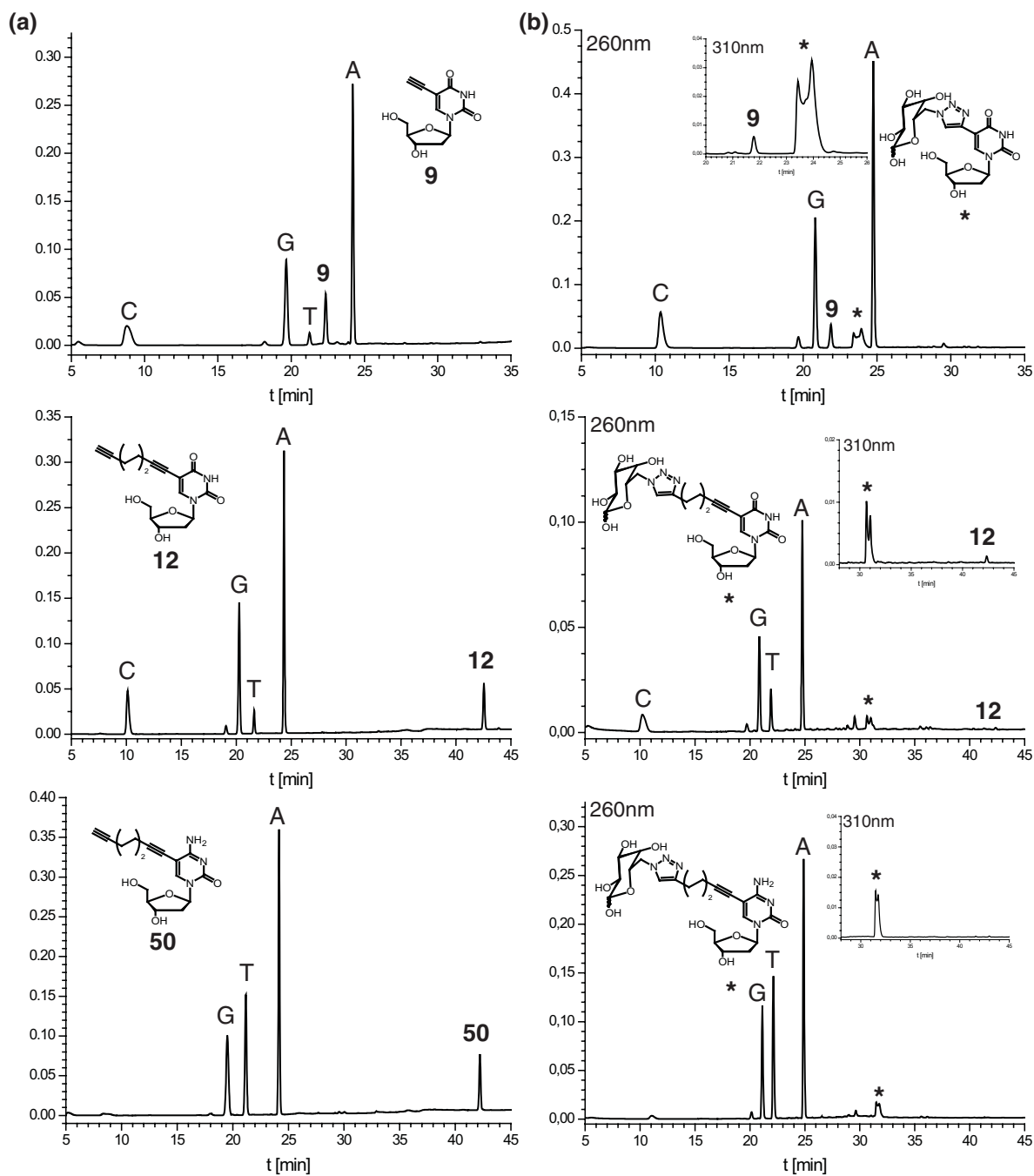


Abbildung 4.33: Enzymatischer Abbau der DNA (a) vor und (b) nach der „Click“-Reaktion mit Zuckerazid 44. Die jeweiligen Produkte sind mit * gekennzeichnet. Im Falle des Monomers 9 in (b) liegt das Signal des Edukts unter dem des Thymidins. Die Ausschnitte zeigen die Chromatogramme bei 310 nm zur Identifikation der Edukte und Produkte.

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

Der enzymatische Abbau der DNA zeigte eindrucksvoll die Effizienz der Reaktion (s. Abb. 4.33). Bei allen drei Alkinen tauchte ein neues Signal im Chromatogramm auf, das gemäß der Masse dem „Click“-Produkt entsprach. Durch das Anomerengleichgewicht des Zuckers traten zwei Signale direkt nebeneinander auf. Die Alkin-modifizierten Basen waren auch deutlich durch ihre Signale im Chromatogramm bei 310 nm zu erkennen. Bei dem PCR-Produkt mit dem Alkin-2'-desoxycytidintriphosphat **49** war gar kein Edukt **50** mehr zu finden. Bei den Alkin-Thymidinen zeigte sich überraschenderweise, dass unabhängig vom Abstand des Alkins von der Base das „kurze“ Alkin **9** genauso gut reagierte (ca. 95 % Integration bei 310 nm) wie das Alkin am flexiblen „Linker“ **12**. Dies widerspricht den Ergebnissen an den kurzen Strängen. Dort waren Reaktionen mit Oligomeren mit dem kurzen Alkin oft unvollständig. Allerdings wurden diese Experimente immer am Einzelstrang durchgeführt. Vielleicht liegt der Einzelstrang in einer verknäulten Konformation vor, welche eine bessere Reaktion verhindert. Dies könnte auch erklären, warum die Reaktion auch bei einem deutlichen Abstand der Alkine in **d3** nicht vollständig gewesen ist. Das PCR-Produkt liegt als Doppelstrang vor. Vielleicht ist dort das Alkin besser zugänglich als im Einzelstrang.

Entsprechend wurde ein deutlich längeres PCR-Produkt (2000 Basenpaare) mit dem 2'-Desoxycytidintriphosphat **49** hergestellt und wie oben beschrieben umgesetzt und analysiert. Auch bei nun fast 900 Alkinen war nach enzymatischem Abbau kein Edukt **50** mehr nachweisbar (s. Abb. 8.5 in Abschnitt 8.9.12).

Die Versuche zeigten auch die Abhängigkeit der Reaktion von der Durchführung und den Reagenzien. So wurde in einigen Proben auch eine geringe Menge des Reaktionsprodukts der Alkine mit Benzylazid gefunden. Dies war wahrscheinlich in kleinen Mengen noch als Verunreinigung im Kupferligand **1** vorhanden. Wenn das DMSO mit Vakuum und erhöhten Temperaturen vor dem Ausfällen entfernt wurde, kam es in geringem Umfang zur Oxidation

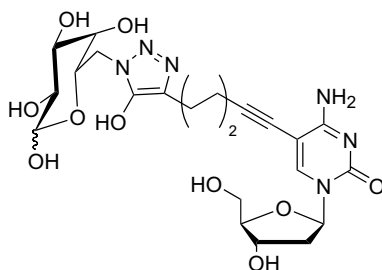


Abbildung 4.34: Vermutete Struktur eines Nebenprodukts der „Click“-Reaktion.^[44]

des Produkts. Das entstandene Nebenprodukt hat eine um genau ein Sauerstoffatom schwerere Masse und zeigt das zum normalen Produkt entsprechend verschobene MS-MS-Spektrum. Da das UV-Spektrum identisch ist, wurde das π -System der Base nicht verändert. Die Oxidation muss daher am Nucleosid oder Triazol stattgefunden haben. Zuerst wurde eine Addition eines Hydroxyradikals an der 6-Position der Base vermutet.^[171] Allerdings war in der Probe das wichtigste Oxidationsprodukt von DNA, 8-Oxoguanosin nicht nachzuweisen. Daher wurde vermutlich das Triazol oxidiert (s. Abb. 4.34). Vielleicht inseriert Sauerstoff in die Kupfer-Kohlenstoffbindung bei der Kupfer-Triazol-Zwischenstufe. Dieses Nebenprodukt wurde auch schon in einer anderen Veröffentlichung beschrieben.^[44] Wahrscheinlich war die zunehmende Kupferkonzentration und damit die erhöhte Konzentration von Sauerstoffradikalen für dieses Nebenprodukt verantwortlich (Für MS-MS-Spektrum s. Abb. 8.5 in Abschnitt 8.9.12).

4.8. Alkine in Zellen



Abbildung 4.35: Assay zur Untersuchung vom Einbau modifizierter Thymidine durch *E.coli*-Zellen.^[174]

Neben der Anwendung von modifizierten Nucleosiden in der PCR werden schon seit einiger Zeit 5-Brom- und 5-Iod-2'-desoxyuridine in lebenden Organismen verwendet. Dazu werden Lösungen der modifizierten Nucleoside zum Beispiel Mäusen injiziert und danach Proben, zum Beispiel der Gehirnzellen präpariert. Diese werden dann mit fluoreszent markierten Antikörpern gegen 5-Brom- oder 5-Ioduracil angefärbt, um Stellen vermehrter DNA-Syntheseaktivität nachzuweisen.^[175] Die „Click“-Reaktion könnte die Verwendung der Antikörper unnötig machen. Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Monomere von *E.coli*-Zellen akzeptiert werden, wurden das „kurze“ Alkin **9** und die beiden flexibleren Alkine **10** und **12** zu *E.coli*-Zellen gegeben. Die

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

verwendeten Zellen stellen in großen Mengen ein Plasmid her. Wenn die modifizierten Monomere akzeptiert werden, sollten sie sich in diesem Plasmid nachweisen lassen (s. Abb. 4.35).^[174] Nach Zugabe wurden die Zellen über Nacht kultiviert und danach das Plasmid extrahiert. Da die Probe noch große Mengen an RNA und anderer DNA enthielt wurde sie durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und enzymatisch zu den Monomeren abgebaut. Dazu wurde die gleiche Methode, wie im Falle der Alkin-DNA verwendet. Zum besseren Abbau der zyklischen Plasmide wurde noch Dnase I zugegeben. Danach wurden die Nukleoside per HPLC-MS analysiert.

Nur im Falle des kurzen Alkins **9** konnte das zugesetzte Monomer in den Plasmiden aus den Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 4.36 zeigt die HPLC-Chromatogramme der Versuche mit normalem Thymin und mit Monomer **9**. Das Monomer ist durch die Absorption bei 310 nm leicht zu erkennen. Leider war bei der Durchführung des Versuchs die HPLC-Säule beschädigt, was zur Verdoppelung aller Signale führte. Wegen der Überlagerung war keine Integration möglich.

Der Versuch zeigte jedoch, dass nur das Alkin **9** von den Zellen akzeptiert wurde. Trotzdem ist der Anteil der modifizierten Base nicht sehr hoch. Studien mit 5-Brom-2'-desoxyuracil zeigten für diese Methode einen Austausch von ca. 25 % der Thyminde.^[174] Auch wenn das Signal sehr schwach ist, könnte der Austausch in dem Assay bei 10-15 % liegen. Allerdings wurde das Experiment nur zweimal durchgeführt. Ein besserer Austausch der Thyminde lässt sich durch Inhibition der Thyminde synthese durch Zugabe von 5-Fluor-2'-desoxyuridin oder Verwendung von Thyminde synthese-defizienten Bakterienstämmen erreichen. Diese Versuche wurden nicht mehr durchgeführt.

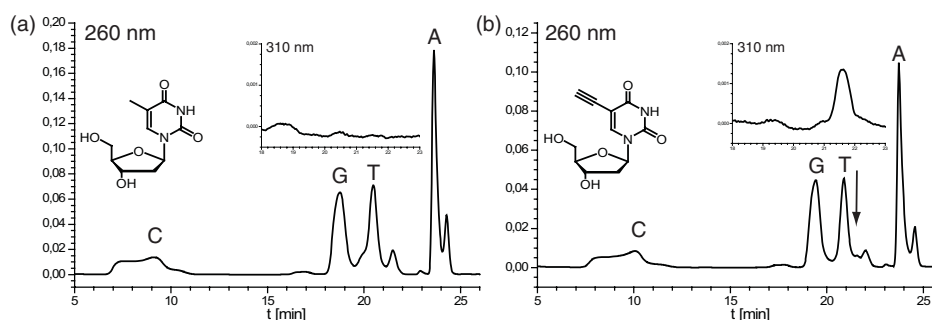


Abbildung 4.36: HPLC-Chromatogramm des enzymatischen Abbaus der aufgereinigten Plasmide mit (a) Thymin und (b) Monomer **9**. Das kleine Chromatogramm zeigt das Chromatogramm bei 310 nm.

4.9. Andere Monomere für terminale Alkine

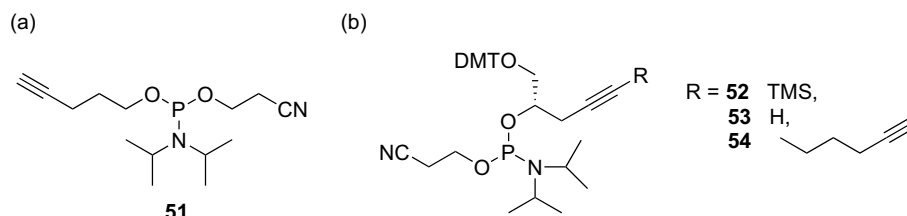


Abbildung 4.37: Festphasenbausteine für die Synthese terminaler Alkine: (a) 4-Pentin-1-ol-phosphoramidit (**51**) für terminalen Einbau (b) Glykol-Alkin-Bausteine zum terminalen und internen Einbau (**52**, **53**, **54**)

Alle bisher vorgestellten Bausteine beruhen auf dem Grundgerüst der natürlichen Nukleoside und sind daher vor allem für die interne Modifikation von DNA geeignet. Zur Erweiterung der „Click“-Chemie auf DNA-Stränge mit terminalem Alkin, z.B. zum Aufbringen auf Oberflächen, wurden weitere Monomere synthetisiert (s. Abb. 4.37). Phosphoramidit **51** wurde aus 4-Pentin-1-ol erhalten.^[176] Dieses Amidit ist zwar sehr leicht herzustellen, hat aber einige Nachteile. So kann es bei Standardsynthesen nur als letztes Monomer, d.h. nur am 5'-Ende des Stranges, eingebaut werden. Es eignet sich nur zur Synthese von kurzen Strängen, da mit zunehmender Länge der DNA eine Trennung von Abbruchsequenzen nicht mehr möglich ist.

Eine bessere Alternative zu **51** sind die Monomere auf Glykolbasis.^[177] Diese Monomere lassen sich einfach über die Öffnung des entsprechenden Epoxids herstellen.² Sie besitzen ebenso wie normale Bausteine eine abspaltbare DMT-Gruppe und können daher überall im Strang und an beiden Enden eingebaut werden. Die Synthese von langen Strängen ist ohne Schwierigkeit möglich, da die Monomere die Synthese „DMT-on“ ermöglichen.

DNA	Sequenz	X =
d11	5' - X GGAATTAAG	51
d12	5' - X TTAATTGAATTCGATTTGGGCCGATTTGTTTC	53
d13	5' - X GCGCTGTTTCATTCGCG	53
d14	5' - X GCGCTGTTTCATTCGCG-Fluo	54

Tabelle 4.3: Hergestellte Oligomere mit Alkinen am 5'-Ende. **d12** dient auch als PCR-Primer.

²Synthetisiert von G.A. Burley

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

Mit den vorgestellten Monomeren wurden einige Stränge analog zu den bisher verwendeten Sequenzen hergestellt. Dabei wurde das gleiche Kupplungsprotokoll wie bei den anderen Strängen verwendet, d.h. doppelte Kupplung für die Modifikation. Alle Stränge wurden wenn möglich „DMT-on“ synthetisiert. Bei Einsatz des TMS-geschützten Monomers **52** kam es bei der Entschützung und Abspaltung der DNA mit Ammoniak auch zur Entschützung des Alkins. Für **d14** wurde ein Fluoreszein-Träger verwendet. Die Sequenz **d11** wurde von *Carsten Pieck* zur photochemischen Erzeugung eines DNA-Schadens verwendet. Nach der Synthese des Schadens ermöglicht die „Click“-Reaktion eine Markierung des Strangs mit Fluoreszein. **d12** kann als mit Alkinen modifizierter Primer in der PCR verwendet werden. Die Stränge **d13** und **d14** besitzen die gleiche Sequenz wie die anderen Alkinoligomere zur Untersuchung der „Click“-Reaktion.

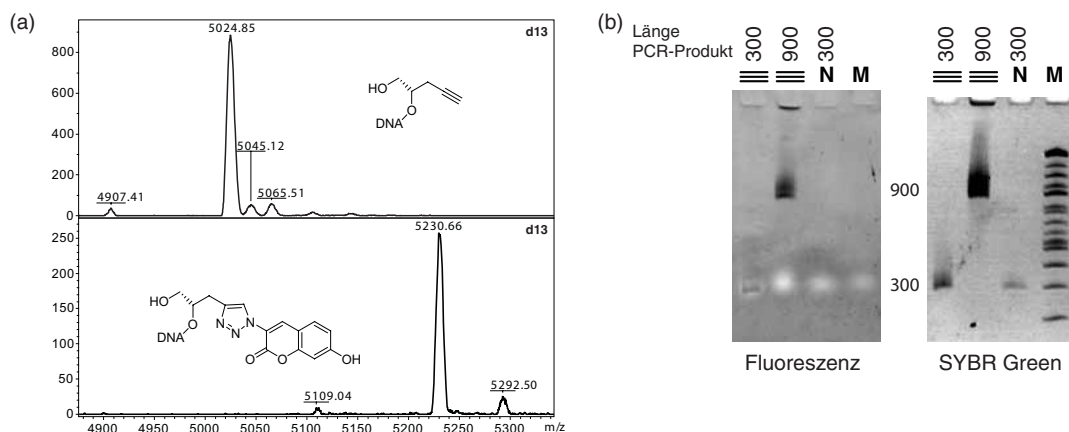


Abbildung 4.38: „Click“-Reaktionen mit DNA mit terminalen Alkinen: (a) MALDI-TOF-Analyse der Reaktion von Oligonukleotid **d13** mit Cumarinazid **46** (b) Gele der Reaktion von PCR-Produkten mit dem Primer **d12** von 300 und 900 Basenpaare Länge mit Fluoreszeinazid **45**. Links: Fluoreszenzbild (Die helle Bande ist ein Farbstoff im Auftragspuffer). Rechts: Das gleiche Gel angefärbt mit SYBR Green.

Um die Reaktion der Alkine zu überprüfen wurden **d13** und **d12** in „Click“-Reaktionen getestet (s. Abb. 4.38a). **d13** wurde mit Cumarinazid **46** unter Standardbedingungen umgesetzt. Wie erwartet kam es zu vollständigem Umsatz (M^+ : 5025 \rightarrow 5231), da keine Behinderung des Alkins zu erwarten war (s. Abb. 4.38a). Die anderen Massen im MALDI-Spektrum entstehen durch Depurinierung der DNA im MALDI^[178] ($M-120$) oder Anlagerung von Ionen von Natrium ($M+22$), Kalium ($M+39$) oder Kupfer ($M+63$). Analog zu den Versuchen an PCR-Produkten mit wenigen Alkinen wurden mit dem Primer **d12** PCR-

Produkte mit 300 und 900 Basenpaare Länge hergestellt. Diese wurden mit Fluoreszeinazid **45** umgesetzt (s. Abb. 4.38b). Wie auf dem Gel zu erkennen, wird die DNA mit dem Alkin selektiv markiert. Die Kontrollreaktion mit natürlicher DNA zeigt keine Reaktion. Wie in den vorherigen Versuchen kommt es zu keiner Schädigung der DNA durch die Reaktionsbedingungen.

4.9.1. *Microcontact Printing* (μ CP) mit Alkin-DNA

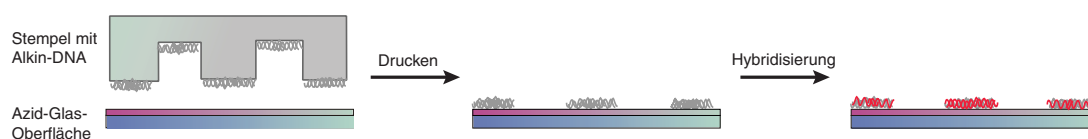


Abbildung 4.39: Das Prinzip von *microcontact printing* mit Alkin DNA (Abbildung von D. I. Rożkiewicz).^[119]

Im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe um Prof. Reinhoudt an der Universität von Twente wurde die Anwendung von Alkin-DNA in „Click“-Reaktionen auf Oberflächen untersucht. Die Gruppe verwendet *microcontact printing* (μ CP) zum Aufbringen verschiedener Substanzen auf Oberflächen (s. Abb. 4.39). Bei diesem Verfahren wird mit einem Kunststoffstempel ein bestimmtes Muster auf eine Oberfläche „gedruckt“. Durch die Fertigung des Stempels ist die minimale Größe der erzeugten Muster im Bereich von Mikrometern. In der ersten Durchführung diente das Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Strukturen auf Goldoberflächen.^[179] In den neuen Varianten findet die Immobilisierung durch Drucken auf ein reaktives *self assembled monolayer* (SAM) statt. So reagieren zum Beispiel Amine auf einem Stempel mit Anhydriden^[180] oder Aldehyden auf der Oberfläche.^[181,182] Mit diesem Verfahren wurden auch schon Aminosäuren und PNA^[183] immobilisiert.

In einem neuen Ansatz beschreibt die Gruppe um Reinhoudt die Anwendung der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden im *microcontact printing*.^[119] Dabei wird ein mit Alkinen beladener Stempel auf eine Azid-

DNA	Sequenz	X =
d5	5' -GCGCTGT X CATTCGCG	12
d9	5' -TTAATTGAATTCGATT X GGGCCGGAXTTGTTTC	12
d14	5' - X GCGCTGTTTCATTCGCG-Fluo	54

Tabelle 4.4: Zur Untersuchung von *microcontact printing* mit Alkin-DNA verwendete Oligomere.

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

Oberfläche gedrückt (s. Abb. 4.39). Durch die hohe Konzentration der Reaktanden läuft die Reaktion ohne Kupferkatalyse ab. Für die Untersuchung ob auch mit Alkinen modifizierte Oligonukleotide in diesem Verfahren verwendet wurden, wurden verschiedene Stränge hergestellt. (s. Tabelle 4.4). Alle hier gezeigten Experimente wurden von *Dorota I. Rożkiewicz* (Universität von Twente) durchgeführt.

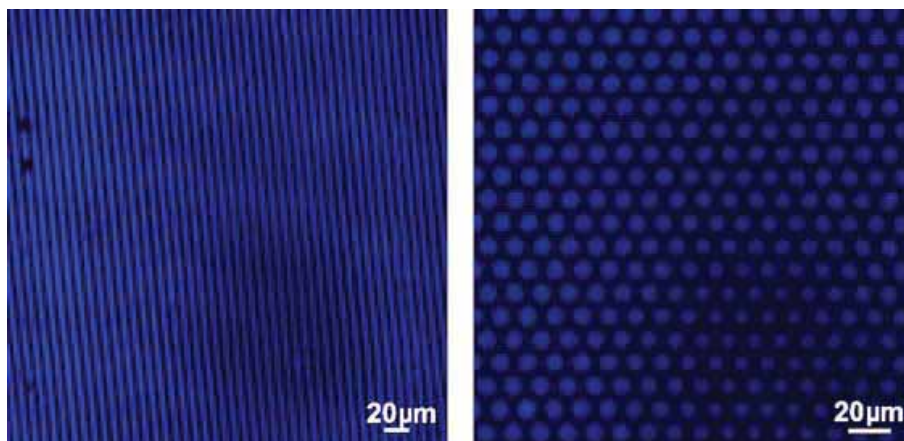


Abbildung 4.40: Gedruckte Muster mit **d5** (links) und **d9** (rechts) angefärbt mit TOTO-1 (Abbildung von *D. I. Rożkiewicz*).

Für erste Versuche wurden die Oligomere **d5** und **d9** mit alkinmodifizierten Thymidinen innerhalb des Strangs verwendet. Trotzdem zeigten gedruckte Muster, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff TOTO-1 angefärbt wurden, eine gleichmäßige Struktur (s. Abb. 4.40). Versuche, die DNA mit den entsprechenden Gegensträngen zu hybridisieren, schlugen allerdings fehl. Bei niedriger Temperatur gelang nur die Hybridisierung von **d5** mit einem zur einen Hälfte der Sequenz komplementären kürzeren Strang.^[184] Da sich die Alkine in der Mitte der Stränge befinden, müsste sich der Doppelstrang bei Hybridisierung der vollen Länge parallel zur Oberfläche bilden. Dort ist wahrscheinlich einfach zu wenig Platz für den deutlich steiferen Doppelstrang. Bei Bindung des kürzeren Strangs kann sich der Doppelstrang senkrecht zur Oberfläche ausrichten. Diese These wird von den Ergebnissen des endmodifizierten Strangs **d14** unterstützt. Nach dem Drucken war erneut ein sehr regelmäßiges Muster zu erkennen (s. Abb. 4.41). Mit diesem Strang gelang aber die Hybridisierung mit einem mit Cy5-markierten Gegenstrang ohne Probleme. Wahrscheinlich steht der Strang senkrecht auf der Oberfläche und ist so für den Gegenstrang einfacher zugänglich und der Doppelstrang kann sich ohne Behinderung ausbilden.

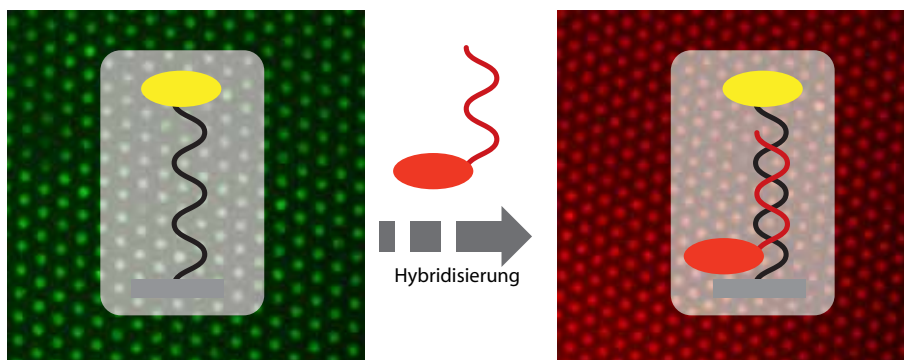


Abbildung 4.41: Fluoreszenzbild von **d14** (links) und hybridisiert mit dem Cy5-markierten Gegenstrang (rechts). Ein Kreis hat einen Durchmesser von 5 μm (Abbildung von D. I. Rożkiewicz).

Die Ergebnisse zeigen, dass *microcontact printing* mit „Click“-Chemie auch zur Immobilisierung von DNA auf Oberflächen verwendet werden kann. Mit einem terminalen Alkin mit hoher Flexibilität kann DNA so aufgebracht werden, dass sie für weitere Anwendungen, wie Hybridisierung mit Gegensträngen, zur Verfügung steht. Diese Technik könnte bei der Fabrikation von Microarrays und DNA-Chips eine wichtige Rolle spielen.

4.10. Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, wie auch mit Hilfe eines stabilisierenden Liganden die „Click“-Chemie sehr gut auf das biologische System DNA übertragen lässt. Die Reaktion funktioniert mit einer Vielzahl von Aziden und mit durchgehend hoher Ausbeute. Nur bei speziellen Aziden, vor allem wenn das Azid kein Alkylazid ist (z.B. Farbstoff **48**), kann eine verlängerte Reaktionszeit erforderlich sein. Durch die stabilisierenden Liganden kommt es zu keiner Schädigung der DNA.

Der einfache Einbau der Monomere über die feste Phase eröffnet und über PCR eröffnet viele Möglichkeiten zur effizienten, postsynthetischen Modifikation von DNA. In Kombination mit der „Click-Click“-Variante mit silylgeschützten Alkinen sollte auch die sequentielle Anwendung an DNA möglich sein. Die Reaktion eignet sich zur Funktionalisierung in sehr hoher Dichte, wie die quantitative Umsetzung von fast 900 Alkinen an dem 2000 Basenpaare langen PCR Produkt zeigt.

Die bisher gemachten Erfahrungen zeigen, dass die Reaktion eine robuste und zuverlässige Methode zur Funktionalisierung von DNA, sowohl an kur-

4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)

zen wie auch an langen Strängen ist. Die einfache Herstellung der Azide und die Orthogonalität zu anderen funktionellen Gruppen sind weitere Vorteile. Allerdings gibt es auch noch viele Verbesserungsmöglichkeiten. So wäre eine heterogene Reaktion, entweder mit der DNA oder dem Kupfer am festen Träger deutlich einfacher zu handhaben. Besser wasserlösliche Kupferliganden könnten den DMSO-Anteil in der Reaktion reduzieren und so die Aufarbeitung weiter erleichtern.

Trotzdem stellt die „Click“-Reaktion schon in ihrer jetzigen Durchführung eine sehr gute und effiziente Methode zur Funktionalisierung von DNA dar.

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

5.1. Einleitung

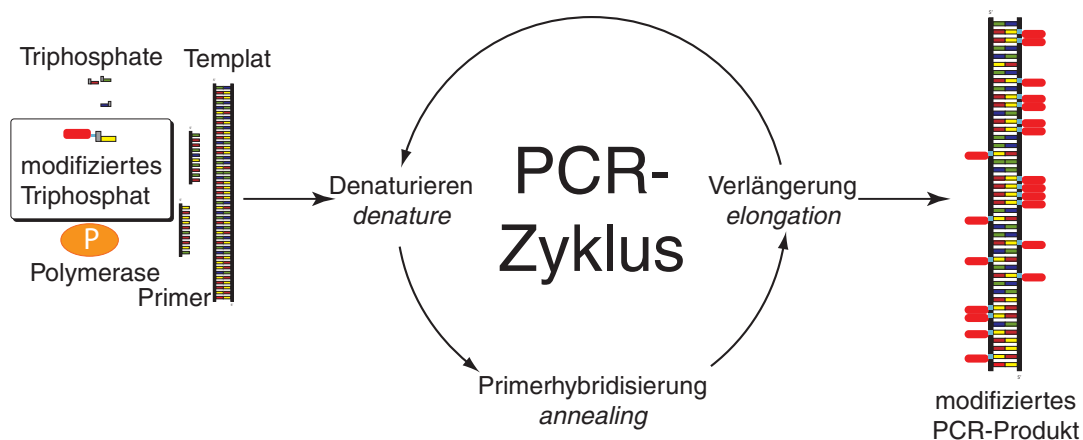


Abbildung 5.1: Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit modifizierten Triphosphaten.

Zur Einführung einer Modifikation über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird ein natürliches Triphosphat durch ein modifiziertes Triphosphat ersetzt oder das modifizierte der Mischung der natürlichen Triphosphate anteilig zugesetzt (s. Abb. 5.1). Bei vollständiger Substitution enthält das PCR-Produkt an Stelle der natürlichen Base immer die Modifikation (Außer im Bereich der Primer, welche natürlich auch in das PCR-Produkt eingebaut werden.). Dabei ist es eigentlich verwunderlich, dass Polymerasen die modifizierten Basen überhaupt akzeptieren. Sie sind in der Lage, entsprechend der Sequenz des Templates mit extrem hoher Genauigkeit nur das jeweils komplementäre Triphosphat zu erkennen und einzubauen. So macht zum Beispiel die Taq-Polymerase pro 10.000 prozessierter Basen nur etwas mehr als einen Fehler^[185] und gehört damit noch zu den schlechteren Polymerasen, die in der PCR eingesetzt werden.^[186] Die genauen Grundlagen für die Erkennung des korrekten Substrates sind noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen mit Nu-

kleobasen, welche keine Wasserstoffbrücken ausbilden können, zeigten, dass der sterische Anspruch der Base eines der Hauptkriterien für die Erkennung ist.^[12,187–191] Neben der Erkennung werden unterschiedliche Modelle diskutiert, auf welche Weise die Substraterkennung oder Substratbindung die Geschwindigkeit des Transfers des Triphosphats auf den entstehenden Doppelstrang beeinflusst.^[192–194]

Die Verwendung von modifizierten Triphosphaten in der PCR stellt an die Polymerase gleich mehrere Anforderungen. So muss das Triphosphat nicht nur korrekt erkannt und eingebaut werden, sondern auch mehrere Modifikationen hintereinander dürfen nicht zur Verlangsamung oder zum Abbruch führen. Zusätzlich muss das Enzym in der Lage sein, die modifizierte DNA als Templat zu erkennen und korrekt abzulesen. Nur wenn diese grundlegenden Kriterien erfüllt werden, ist eine PCR mit einem unnatürlichen Triphosphat möglich. Dafür kann es nötig sein, die PCR bei sehr hohen Temperaturen oder mit sehr langen Zykluszeiten durchzuführen. Für solche Bedingungen werden besonders hitzestabile (thermophile) Polymerasen benötigt.

5.1.1. Thermophile Polymerasen

Mit der Etablierung der PCR setzte eine starke Forschungstätigkeit in Richtung neuer thermophiler Polymerasen ein. Stammt die erste thermophile Polymerase noch aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*,^[195] so konzentrierte sich die spätere Suche auf Archäen, welche in heißen vulkanischen Gebieten meistens am Meeresboden leben. Solche Organismen leben unter extremen Bedingungen bei Temperaturen von über 80 °C. So stammt auch die Bezeichnung Vent-Polymerase von der Fundstelle, einer unterseeischen heißen Quelle (engl. *vent*) im Golf von Neapel. Tabelle 5.1 gibt einen kurzen Überblick über kommerziell erhältliche thermostabile Polymerasen. Allerdings bieten alle Hersteller auch noch eigene Varianten und andere Arten an.

DNA-Polymerasen kommen in allen drei Großreichen (Prokaryonten, Eukaryonten und Archäen) vor. Sie werden nach mehreren Homologiekriterien in Familien eingeteilt.^[209–211] Die meisten Polymerasen für PCR stammen aus der Familie B. Polymerasen aus dieser Familie besitzen 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, d.h. sie sind in der Lage, Fehler durch ein falsch eingebautes Triphosphat zu korrigieren. Die Bezeichnung *exo⁻* bedeutet, dass bei dieser Mutante diese Aktivität fehlt. Von den meisten Polymerasen ist eine solche Mutation erhältlich. KOD wird auch als „KOD XL“ einer Mischung aus der normalen Polymerase und der *exo⁻*-Mutante angeboten. Außerdem können Familie B Polymerasen Fehler im Templat erkennen.^[212] Aufgrund ihrer hohen Genauigkeit werden

Bezeichnung	Organismus	Familie	Kristallstruktur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> ^[195]	A	[196]
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i> ^[197]	B	
KOD	<i>Pyrococcus kodakaraensis</i> ^[198]	B	[199,200]
Vent	<i>Thermococcus litoralis</i> ^[201,202]	B	
Vent <i>exo</i> ⁻	<i>Thermococcus litoralis</i> ^[203]	B	
Deep Vent	<i>Pyrococcus</i> Strain GB-D ^[204]	B	
Tgo	<i>Thermococcus gorgonarius</i> ^[205]	B	[206]
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i> ^[207]	B	

Tabelle 5.1: Verschiedene thermophile Polymerasen (Pfu ist sequenzgleich mit Pwo^[208]).

diese Polymerasen für das Vervielfältigen von DNA zum Klonieren oder Sequenzieren verwendet.

Obwohl sie zur gleichen Familie gehören, können sich die Polymerasen deutlich voneinander unterscheiden. In Tabelle 5.2 sind einige wichtige Eigenschaften aufgeführt. So ist die Hitzestabilität ein wichtiges Kriterium, wenn bei schwierigen und hochschmelzenden Templaten eine längere und heißere Denaturierung benötigt wird. Es ist deutlich zu sehen, welchen Fortschritt die „neuen“ Polymerasen im Vergleich zur Taq-Polymerase darstellen. Besonders eindrucksvoll ist die enorme Geschwindigkeit der KOD-Polymerase. Sie ist in der Lage bei doppelter Geschwindigkeit eine wesentlich höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase zu erreichen.

Ein anderer Weg wurde vor kurzem mit den ersten thermophilen Mutanten einer Polymerase der Y-Familie eingeschlagen. Diese Polymerasen sind in der Lage Schäden an DNA zu überlesen. In Kombination mit Taq-Polymerase gelang es, ein durch UV-Bestrahlung stark geschädigtes DNA-Templat zu amplifizieren.^[213]

	KOD	Pfu	Deep Vent	Taq
Hitzestabilität (T _{1/2})	95 °C, 12 h; 100 °C, 3.0 h	95 °C, 6 h; 100 °C, 2.9 h	95 °C, 13.5 h; 100 °C, 3.4 h	95 °C, 1.6 h
3'-5'-Exo-nukleaseaktivität	+	+	+	-
Genauigkeit	3.5 × 10 ⁻³	3.9 × 10 ⁻³	-	1.3 × 10 ⁻²
Geschwindigkeit (Basen/s)	106-138	25	23	61

Tabelle 5.2: Eigenschaften verschiedener Polymerasen.^[198]

5.1.2. Quantitative PCR (qPCR)

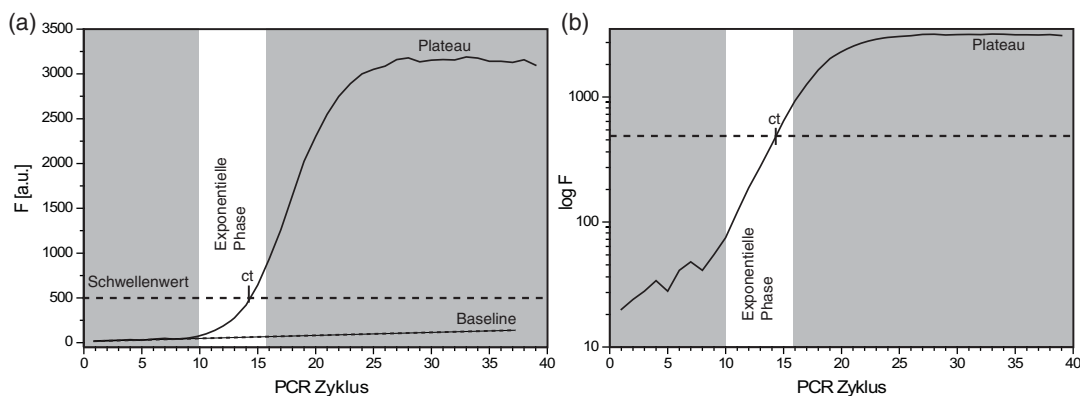


Abbildung 5.2: Typischer Verlauf einer qPCR in (a) linearer und (b) logarithmischer Auftragung (F: Fluoreszenzintensität, *ct*: cycle threshold).

Schon kurz nach Etablierung der PCR wurde zum ersten Mal durch Zugabe von Ethidiumbromid der Verlauf einer PCR in Echtzeit verfolgt.^[214] Ethidiumbromid fluoresziert, wenn es in DNA-Doppelstränge interkaliert. Je mehr DNA im Laufe der PCR gebildet wurde, desto stärker war die Fluoreszenz. Weitere Untersuchungen stellten einen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Templatmenge und dem Beginn der exponentiellen Phase der PCR her.^[215] Wegen der direkten Beobachtung des Reaktionsverlaufs wird die Methode auch als „real-time“-PCR (RT-PCR) bezeichnet. Um Verwechslungen mit der PCR nach reverser Transkription (RNA zu DNA) zu vermeiden wurde die Bezeichnung „quantitative“ PCR (qPCR) eingeführt. Abbildung 5.2a zeigt den typischen Verlauf eines qPCR-Experiments. In den ersten Zyklen der PCR ist noch keine Zunahme des Produkts messbar. Erst beim Erreichen der exponentiellen Phase steigt das Fluoreszenzsignal innerhalb weniger Zyklen stark an. Dabei sind nur zu Beginn des starken Anstiegs ideale Amplifikationsbedingungen gegeben. Später nimmt die Effizienz der PCR durch Hemmung durch Pyrophosphat, Denaturierung der Polymerase oder Abnahme der Triphosphatkonzentration stark ab und die Reaktion erreicht ihren Endpunkt (Plateau). Die nicht linear zunehmende Hemmung ist dafür verantwortlich, dass die Höhe des Plateaus nicht mit der vorher vorhandenen Menge an Templat korreliert.^[216]

Bei der Quantifizierung mit Hilfe von qPCR wird nicht die Höhe des Plateaus betrachtet, sondern der Zeitpunkt an dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Dieser Punkt wird als *ct*-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Er wird aus der logarithmischen Auftragung der Fluoreszenz bestimmt (s. Abb. 5.2b). Unter idealen PCR-Bedingungen steigt die Fluoreszenz

exponentiell an, d. h. linear in logarithmischer Auftragung. Im Beispiel ist das nur von Zyklus 10 bis 16 der Fall. In der linearen Auftragung ist das gerade der Beginn des Anstiegs der Fluoreszenz. Aus der Steigung der Geraden lässt sich die Effizienz der PCR bestimmen.^[217,218]

Da der *ct*-Wert im exponentiellen Bereich der PCR bestimmt wird, korreliert er direkt mit der eingesetzten Menge an Templat. Durch Messen einer Standardkurve mit bekannten Templatmengen kann eine unbekannte Probe durch Vergleich der *ct*-Werte quantifiziert werden (absolute Quantifizierung). Alternativ kann auch durch parallele oder gleichzeitige PCR gegen ein zweites Templat (*housekeeping gene*) in der gleichen Probe relativ quantifiziert werden (relative Quantifizierung). Dadurch lässt sich Genexpression relativ zueinander feststellen und im Bereich von mehreren Zehnerpotenzen akkurat bestimmen. Diese Bandbreite, die einfache Automatisierung, die hohe Kontaminierungssicherheit (alles findet in einem geschlossenen Reaktionsgefäß statt) haben dazu beigetragen, dass die qPCR zu einer der wichtigsten modernen Diagnostikmethoden geworden ist.^[219]

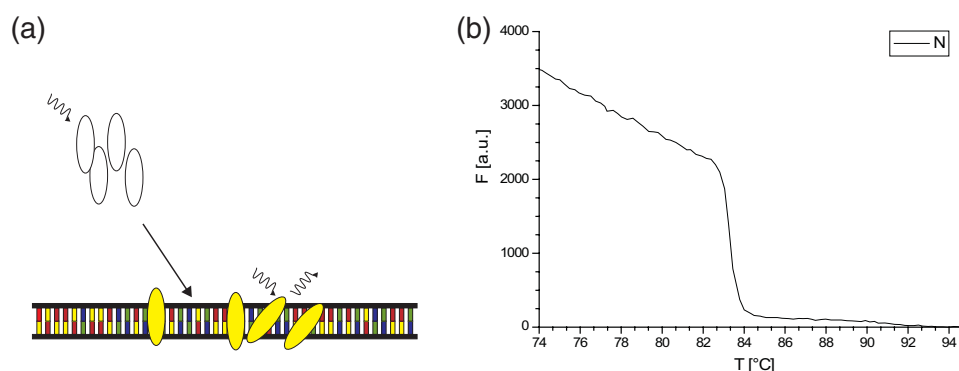


Abbildung 5.3: (a) Prinzip der qPCR mit einem DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff; (b) Fluoreszenzschmelzkurve nach einer PCR mit SYBR Green in Pwo-Puffer.

Die verschiedenen qPCR-Methoden unterscheiden sich im wesentlichen nur in der Generierung des Fluoreszenzsignals.^[219–222] Die in der Arbeit verwendete Zugabe eines Interkalators wie SYBR Green^[223,224] (s. Abb. 5.3a) ist nur eine von vielen Methoden, ein von der DNA-Menge abhängiges Fluoreszenzsignal zu generieren. Zur Untersuchung der PCR mit modifizierten Triphosphaten wurde die qPCR allerdings nicht zur Quantifizierung, sondern zur qualitativen Kontrolle der PCR genutzt. Dadurch ist direkt sichtbar, ob bei der Zugabe von Additiven oder bei unterschiedlichen Temperaturen, die Reaktion erfolgreich ist. Bei der Verwendung von SYBR Green ist es außerdem möglich, eine

Fluoreszenzschmelzkurve der Reaktion zu messen (s. Abb. 5.3b). Der Schmelzpunkt des PCR-Produkts zeigt den Einfluss der Modifikation auf die Stabilität der DNA. Kurze unspezifische Nebenprodukte sind normalerweise an deutlich niedrigeren Schmelzpunkten zu erkennen. Dies kann bei der Entwicklung von PCR-Programmen sehr hilfreich sein.

5.2. Primerverlängerung (*primer extension*)

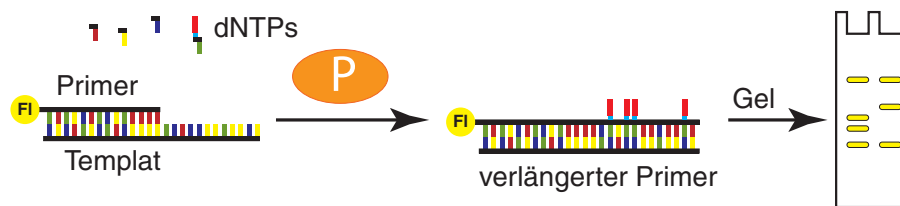


Abbildung 5.4: Das Prinzip der Primerverlängerung bei Einbau modifizierter Triphosphate (dNTPs).

Um zu prüfen, wie gut ein Triphosphat von einer Polymerase akzeptiert wird, sind Primerverlängerungsversuche sehr wichtig. Dabei wird der Beginn einer PCR, die Verlängerung des Primers um wenige Basen untersucht (*primer extension*). Ein fluoreszenz markierter Primer wird mit einem Templatstrang hybridisiert und durch Zugabe der Triphosphate und der Polymerase wird die Verlängerung gestartet. Nach der Reaktion werden die verlängerten Primer auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (s. Abb. 5.4). Wenn die Polymerase während der Verlängerung des Templats abbricht, sind auf dem Gel kürzere Abbruchsequenzen zu erkennen. Durch Wahl der Sequenz des Templats lässt sich der Einbau mehrerer Modifikationen hintereinander überprüfen. Wird ein modifiziertes Templat eingesetzt, kann das Ablesen dieser DNA durch die Polymerase untersucht werden. Ebenso ist es möglich bei entsprechender Variation in der Versuchsdurchführung die kinetischen Parameter des Einbaus zu bestimmen.^[225] Primerverlängerungsreaktionen erlauben es, mehrere Polymerasen miteinander zu vergleichen und geben deutlich mehr Information über Akzeptanz eines Triphosphats als eine PCR.

5.3. Einbau modifizierter Basen

5.3.1. Bisherige Arbeiten

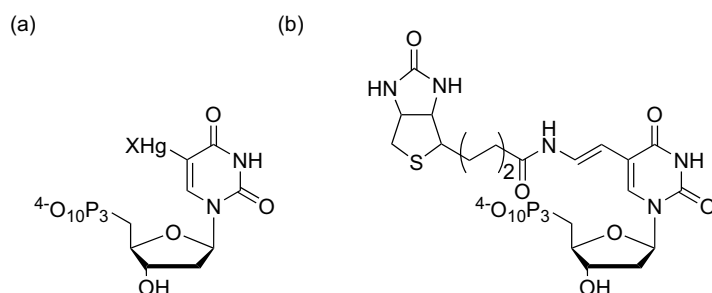


Abbildung 5.5: (a) Erstes mit Polymerasen verwendetes 5-Quecksilber-dUTP^[226] (b) Biotin-dUTP von *Langer et al.*^[227]

Schon vor der Entwicklung der PCR wurde untersucht, ob modifizierte Triphosphate Substrate für Polymerasen sind. 1973 verwendeten *Dale et al.* 5-Quecksilber-dUTP, dCTP und 7-dN-dATP¹ als Substrat für eine DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) in einer Primerverlängerung.^[226] Einige Jahre später untersuchte die Gruppe um Sági und Ötvös 5-Alkyl-, 5-Alkenyl- und 5-Alkynyl-dUTPs.^[228–231] Die erste DNA mit einem detektierbaren Label wurde von *Langer et al.* durch vollständigen Austausch von TTP durch ein Biotin-dUTP hergestellt (s. Abb. 5.5b).^[227] Inzwischen werden in vielen biochemischen Techniken modifizierte Triphosphate zugesetzt (z. B. *fluorescent in situ hybridization* (FISH),^[232,233] Microarrays^[234–236]), meistens um detektierbare Markierungen, wie Biotin oder Farbstoffe einzuführen. Fluoreszente Triphosphate werden in der Didesoxysequenzierung mit direkter Fluoreszenzdetektion eingesetzt.^[237]

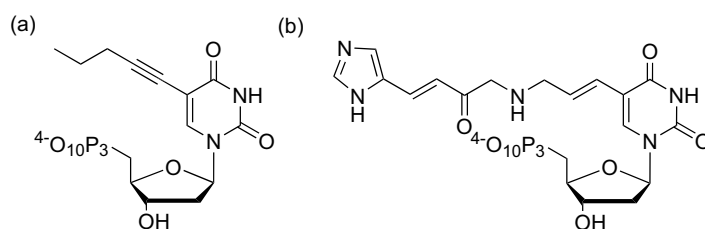


Abbildung 5.6: (a) Erstes für Aptamere verwendete modifizierte Thymidin^[238] (b) Histidin-dUTP für ein RNA schneidendes DNA-Enzym.^[239]

¹2'-Desoxytriphosphate werden üblicherweise dXTP abgekürzt, wobei X für den Buchstaben der jeweiligen Nukleobase steht (Ausnahme Thymidintriphosphat: TTP); modifizierte Thymidine werden entsprechend als modifizierte 2'-Desoxyuridine dUTPs bezeichnet.

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

Eine weitere wichtige Anwendung von Modifikationen in der PCR ist die Erweiterung der Funktion von DNA-Aptameren. Das sind kurze DNA-Stränge, welche sequenzbedingt eine spezielle Struktur ausbilden können, um andere Moleküle zu binden oder um Reaktionen zu katalysieren.^[1,240–242] Der Einbau von neuen funktionellen Gruppen, welche die Eigenschaften von DNA erweitern, war und ist eines der Forschungsgebiete für modifizierte Triphosphate. So wurde 1-Pentynyl-dUTP zur Selektion eines Thrombin-bindenden Aptamers eingesetzt (s. Abb. 5.6a).^[238] Seither wurden RNA- und DNA-Aptamere mit Histidinen (s. Abb. 5.6b),^[239,243] Pyridinen^[244] oder Aminen^[245,246] synthetisiert. Zum Finden der Sequenz der Aptamere wird häufig die SELEX-Methode verwendet (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).^[241] Dabei werden DNA-Bibliotheken mit tausenden von Sequenzen in mehreren Runden gegen ein Zielmolekül selektioniert. Bei jedem Zyklus werden die gefundenen Oligonukleotide per PCR amplifiziert. Bei der Verwendung von unnatürlichen Triphosphaten müssen diese in der PCR eingesetzt werden. Daher gibt es eine ganze Reihe von Arbeiten, in denen die Toleranz verschiedener Polymerasen gegenüber verschiedenen funktionellen Gruppen untersucht wurde.^[247–260]

Sehr vielfältig sind die Möglichkeiten zum Einbau von fluoreszenten Triphosphaten zur Detektion von DNA. Bei den meisten Markierungstechniken wird einer PCR Aminoallyl-dUTP anteilig zugesetzt. Die freien Aminogruppen werden nach der PCR mit Aktivestern der Fluoreszenzfarbstoffe umgesetzt.^[235] Ein direkter Einbau des Farbstoffes würde diesen Schritt unnötig machen. Zu der Problematik des Einbaus gibt es eine ganze Reihe von Arbeiten.^[232,233,261–267] Dabei wurde vor allem festgestellt, dass der konsekutive Einbau große Probleme bereiten kann^[261] und dass die hergestellte hochmodifizierte DNA vielleicht sogar nicht in B-Form, sondern in Z-Form vorliegt.^[264,268]

Der Einbau fluoreszenter Triphosphate und damit die Fluoreszenzmarkierung von jeder DNA-Base kann nicht nur zur Detektion verwendet werden.^[269–271] Durch den gesteuerten Abbau der DNA könnte es möglich sein, die DNA zu sequenzieren. Bei ausreichender Empfindlichkeit kann vielleicht die Sequenz eines einzelnen DNA-Strangs bestimmt werden.^[263,264,268,272–276]

Neben der Verwendung zur Herstellung von Aptameren oder Sequenzierung gibt es noch weitere Anwendungen. So wird 7-Desaza-dGTP bei der Amplifizierung von sehr GC-reichen Sequenzen eingesetzt, um den Schmelzpunkt der DNA zu senken. Der Austausch beider Purin-Basen durch ihre Desaza-Derivate machte die DNA resistenter gegenüber säurekatalysierten Depurinierungen.^[277] Dies verringerte die Fragmentierung von PCR-Produkten in Massenspektrometern. Auch der Ersatz der anderen DNA-Basen durch destabilisierende Varianten ermöglichte die Hybridisierung von Antisense-Oligomeren

an DNA mit sehr starker Sekundärstruktur.^[278] Zur Detektion von Einzelbasenmutationen wurden Nitro- und Hydroxyderivate der Basen, welche durch Oxidation Strangbrüche erzeugen, in der PCR eingesetzt.^[279]

Neben dem Austausch einer DNA-Base gegen eine modifizierte Variante wurde auch versucht, das DNA-Alphabet um eine neues Basenpaar zu erweitern.^[280-285] Erst vor kurzem gelang die Amplifikation eines neuen Basenpaares mit anschließender Transkription in RNA (s. Abb. 5.7).^[280] Die Struktur der modifizierten Basen zeigt, dass die Wasserstoffbrücken der Nukleobasen bei der Substraterkennung der Polymerasen keine große Rolle spielen können.

Die Positionierung von Modifikationen an DNA wurde bereits in Kapitel 3 behandelt. Daher soll hier nur eine kurze Übersicht über deren Einfluss auf die enzymatische Inkorporation gegeben werden. Tabelle 5.3 gibt einen Überblick über die eingesetzten Monomere, Polymerasen und Template. Dabei wurden vor allem Arbeiten ausgesucht, welche wirklich eine PCR durchführen und die modifizierten Triphosphate nicht nur anteilig zusetzen. Allerdings ist wegen der Vielzahl an Anwendungen im Bereich der Biochemie und Medizin ein vollständiger Überblick nicht möglich. In einigen Arbeiten wird keine PCR durchgeführt, sondern nur eine Primerverlängerungsreaktion. Diese werden durchgeführt, wenn das verlängerte Templat besonders lang ist, oder wenn mehr als ein Triphosphat substituiert wurde. Vor allem in älteren Arbeiten wurde die Taq-Polymerase eingesetzt. Neuere Untersuchungen verwenden meistens Pwo oder KOD. Einige Arbeiten verwenden Techniken, um sehr lange einzelsträngige DNA mit wiederholender Sequenz herzustellen. So wird bei der *rolling circle amplification* (RCA) ein zyklisches Templat immer wieder „im Kreis“ abgelesen.^[271] Eine andere Arbeit setzt eine Telomerase ein.^[290] Diese Enzyme stellen sehr lange DNA mit repetitiver Sequenz mit Hilfe eines eigenen RNA-Primers her. Die meisten Untersuchungen mit Templaten mit einer Länge unter 200 Basenpaare sind Untersuchungen zu Aptameren. Die Arbeit mit der MTaq-Polymerase nutzt eine mutierte Variante der Taq-Polymerase.^[289] Damit gelang

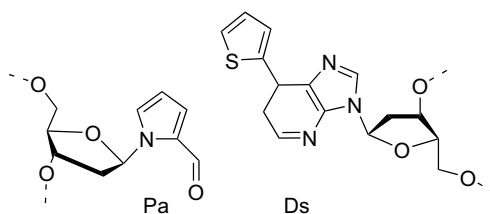


Abbildung 5.7: Erweiterung des genetischen Alphabets durch ein neues Basenpaar (Pa:Ds).^[280]

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

dNTPs	Länge	Polymerase	Quelle
7-Desaza-dGTP (<i>prim. ext.</i>)	501	Taq	[286]
1-Pentynyl-dUTP	60	Vent <i>exo</i> ⁻	[238]
Cy3-dUTP	50	Taq	[261]
Z-Alken-Amin-dUTP	519	Taq, rTh	[247]
Propinyl-Amin-dUTP	80	Vent	[245]
Alken-Amid-dUTP	124	Taq	[287]
Rhodamin-dUTP	217	Tgo <i>exo</i> ⁻	[273]
Alkin-, Alken-, Alkan-dUTP	62 - 224	Taq	[248]
Amid-dUTP	108	KOD	[249]
NO ₂ -dATP,OH-dCTP,NO ₂ -dGTP,OH-dUTP	80	Taq	[279]
Thiol-dUTP	94	Familie A + B Vergleich	[250]
Amid-dUTP, Fluoreszein-dUTP	108	KOD	[262]
Amin-dUTP,Amin-dCTP	108	Taq, Tth, Thermo Sequenase, Pwo Pfu, Vent <i>exo</i> ⁻ ,	[251]
Propinyl-dUTP, Propinyl-dCTP		Deep Vent <i>exo</i> ⁻	
Methylester-dUTP;	108	KOD, Pwo, Vent <i>exo</i> ⁻	[252]
MD-dATP	50	KOD, Bst, M-MuIV, SS II, Deep Vent	[288]
NH ₂ -, SH-dCTP	94	Vent <i>exo</i> ⁻	[253]
Rho,Biotin-dUTP; Fluo-dATP	400, 2.5k	MTaq	[289]
Amin-dUTP	108	KOD	[246]
Amin-dUTP	-	Telomerase	[290]
dUTP-amid;	108	KOD	[254,255]
dUTP-amid; dCTP-amid	108, 110	KOD	[260]
vollständige Substitution von zwei dNTPs			
7dNdATP + 7dNdGTP	99, 200	Pfu <i>exo</i> ⁻	[277]
dUTP + dATP	50	Vent <i>exo</i> ⁻ (linear Ampl.)	[291]
dUTP + dATP	98	Taq	[256]
dCTP + dUTP (<i>prim. ext.</i>)	2.7k	Klenow <i>exo</i> ⁻	[264]
dUTP + (dATP, dCTP) (<i>prim. ext.</i>)	900	Taq, Vent <i>exo</i> ⁻	[272]
Cy3-dCTP + Cy3-dUTP	RCA	Phi29	[271]
vollständige Substitution von allen dNTPs			
Alle (<i>prim. ext.</i>)	80	Pwo (mit nat. dNTPs)	[257]
Alle (<i>prim. ext.</i>)	300	Taq, Vent <i>exo</i> ⁻	[266]
Alle (<i>prim. ext.</i>)	RCA	Sequenase	[278]
Alle	80	Pwo	[258]
Alle	80	Pwo, Vent	[259]

Tabelle 5.3: Übersicht über PCR mit modifizierten Triphosphaten (RCA: *rolling circle amplification*, *prim. ext.*: Primerverlängerungsreaktion).

es ein 2500 Basenpaare langes PCR-Produkt mit einem Fluoreszein-dATP zu amplifizieren. Dies ist das längste publizierte PCR-Produkt mit vollständigem Austausch eines Triphosphats.

Schon sehr früh wurden modifizierte Thymidine in Primerverlängerungsreaktionen eingesetzt.^[228–231] Dabei wurde festgestellt, dass der Einbau durch die Klenow-Polymerase mit der Länge und der Struktur des Restes zusammenhängt. Bei den Versuchen wurde vor allem die erste Bindung an der 5-Position variiert. Diesen Studien zufolge nimmt die Akzeptanz des Triphosphates mit zunehmender Sättigung ab (Alkin > E-Alken > Z-Alken > Alkyl). Außerdem wurde die Polymerisation schlechter, je länger die Alkyl-Kette war. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Untersuchungen von *Lee et al.* für thermostabile Polymerasen.^[248] Es gibt nur wenige Beispiele für den Einbau von gesättigten Modifikationen an Thymidinen. Der Vergleich zeigt (s. Abb. 5.8), dass sich immer ein Heteroatom relativ nahe an der Base befindet.

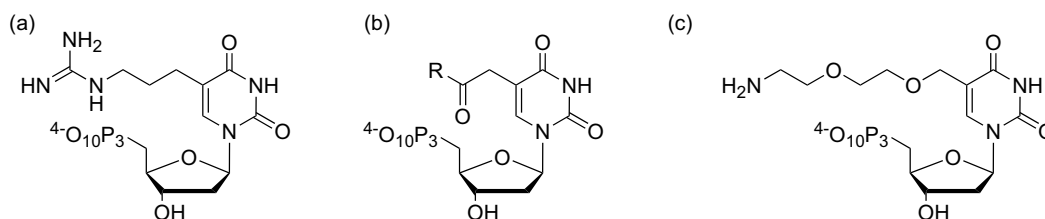


Abbildung 5.8: In der PCR eingesetzte dUTPs mit gesättigtem Kohlenstoff in C5- α -Position (a) von *Famulok*^[259] (b) von *Sawai*^[246, 249, 252, 254, 255, 262, 292] (c) von *Sawai*.^[251, 260]

Obwohl modifizierte Cytidine synthetisch ähnlich einfach herzustellen sind wie die entsprechenden Thymidine, gibt es nur relativ wenige Arbeiten. Meistens wird ebenso ein Alkin-Linker verwendet (s. Abb. 5.9).^[253, 257–259] *Sawai* verwendet eine ähnliche Struktur wie bei den Thymidinen mit einem gesättigten Kohlenstoff in C5- α -Position.^[251, 260] Versuche mit einem dCTP mit der Modifikation an der Amino-Gruppe zeigten, dass solche Substrate nur schlecht eingebaut werden.^[272]

Bei den Purinbasen gibt es zwei Beispiele für den Einbau eines an 8-Position modifizierten dATPs (s. Abb. 5.10a).^[272, 291] Meistens werden die 7-Desazapurine verwendet. Untersuchungen bezüglich des Linkers zeigten erstaunlicherweise, dass die Sättigung des Linkers keinen großen Einfluss auf die Inkorporation hat.^[256] In den meisten Fällen wird ein Alkin-Linker verwendet, weil die meisten Monomere über eine Sonogashira-Kupplung synthetisiert werden. Interessant ist das von *Famulok* verwendete 7dN-dGTP (s. Abb. 5.10c). Obwohl es sehr unpolar ist, wurde es in PCR-Experimenten von der Polymerase

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

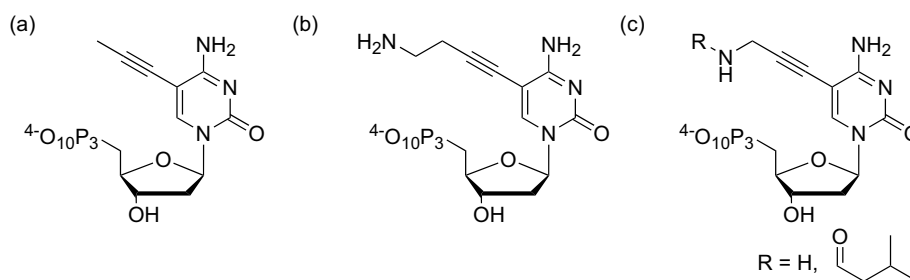


Abbildung 5.9: In der PCR eingesetzte dCTPs (a) von Sawai^[251,255] (b) von Famulok^[259] (c) von Benner.^[253]

Pwo akzeptiert und eingebaut (wenn auch nur unter Zusatz einer ganzen Reihe von Additiven). Bei Austausch von allen vier Nukleosiden kam es allerdings bei GC-reichen Sequenzen zum Verlust der Sequenzinformation.

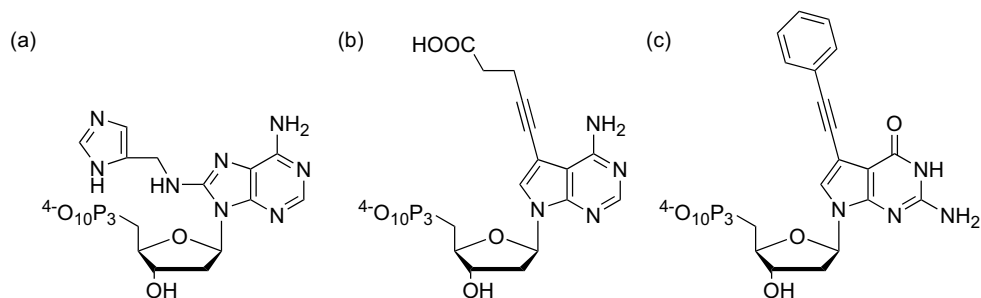


Abbildung 5.10: In der PCR eingesetztes (a) 8-modifiziertes dATP^[291] (b) modifiziertes 7dN-dATP^[259] (c) modifiziertes 7dN-dGTP.^[259]

Die bisher vorgestellten Arbeiten zeigen, dass die Einführung von Modifikationen über Substitution eines Triphosphates durchaus möglich ist. Da die zur „Click“-Reaktion benötigten Alkine und Azide sterisch wenig anspruchsvolle Reste darstellen, sollten sie von den Polymerasen gut akzeptiert werden. Im Folgenden soll auf Primerverlängerungsreaktionen und die PCR-Bedingungen für diese Monomere eingegangen werden. Außerdem wird der Einfluss der Modifikationen auf die Stabilität und die biochemischen Eigenschaften der DNA untersucht.

5.4. Primerverlängerung mit Alkin- und Azidtriphosphaten

Strang	
P	CATGGGCCAAGCTTCTTCGG-Fluo-5'
T1	TCGT C AGTCGGTACCCGGTTCGAAGAAGCC-3'
T2	TCGT AA GTCGGTACCCGGTTCGAAGAAGCC-3'
T3	CACA AA GAC A T CGT AA TGCGGTACCCGGTTCGAAGAAGCC-3'

Tabelle 5.4: Die zur Primerverlängerung verwendeten Sequenzen. **A** zeigt die Position des Einbaus eines modifizierten dUTPs.

Als erster Test wurden mit jedem Triphosphat Primerverlängerungsversuche durchgeführt. Dafür wurde ein von *Held et al.*^[250] entwickelter Assay zur Überprüfung des multiplen Einbaus verwendet (s. Tab. 5.4). Die verwendeten Sequenzen enthalten an unterschiedlichen Positionen Adenosine, an denen die modifizierten Thymidine eingebaut werden. Mit nur einer Modifikation stellt Templat T1 die einfachste Übung für die Polymerase dar. In Templat T2 müssen schon zwei Modifikationen hintereinander eingebaut werden. Am schwersten ist T3 mit einem doppelten und einem dreifachen Einbau der Modifikation.

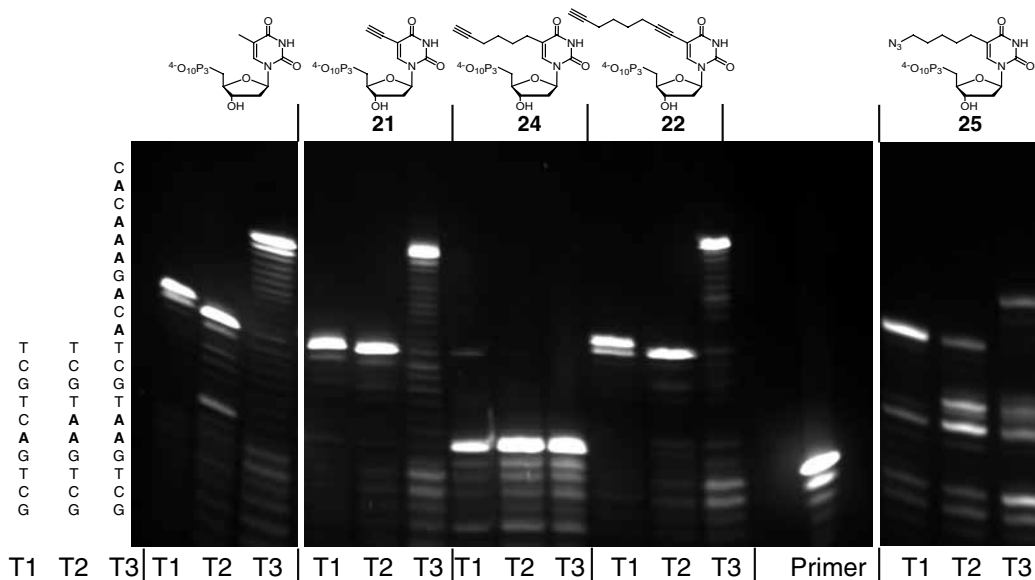


Abbildung 5.11: *Primer extension* mit verschiedenen Triphosphaten (Primer 750 nM; Template 900 nM; c(dNTP) 200 μ M; 1U Pwo; 1 h (25 10 Min.); 72 $^{\circ}$ C)

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

Abbildung 5.11 zeigt neben den Strukturen der Triphosphate ein typisches Gel von Versuchen mit der Polymerase Pwo. Je länger das Produkt desto langsamer ist es im Gel. Das normale Thymidin, das kurze Alkin **21** und das Alkin **22** werden sehr gut eingebaut. Bei dem Azid-Triphosphat **25** ist zu erkennen, dass der einfache und doppelte Einbau in **T1** und **T2** zwar erfolgreich ist, aber ein deutlicher Abbruch an der Position der Modifikationen und danach auftritt. Bei **T3** stoppt der Einbau dann auch vor dem Dreifacheinbau. Noch sehr viel schlechter wird das Triphosphat mit der gesättigten Alkylkette **24** akzeptiert. Nur bei **T1** ist neben Abbruch bei der ersten Modifikation eine kleine Menge Produkt zu erkennen. Diese Versuche wurden mit verschiedenen Kombinationen von Polymerasen und Triphosphaten durchgeführt. Die Reaktionszeit wurde in späteren Versuchen auf 10 Minuten verkürzt, um die Bedingungen während einer PCR nachzustellen.

Triphosphat	Pwo	Vent <i>exo</i> ⁻ / Deep Vent <i>exo</i> ⁻	KOD XL	Taq
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-

Tabelle 5.5: Ergebnisse der Primerverlängerungsreaktionen für die verschiedenen Triphosphate. (+: guter Einbau; -: Probleme bei allen Templaten); Die Vent-Polymerasen zeigten identisches Verhalten für alle Triphosphate.

Die Tabelle 5.5 fasst die Ergebnisse der Versuche zusammen. Von den vier Triphosphaten ist keine Polymerase in der Lage die Thymidine mit der gesättigten Bindung wie **24** neben der Base einzubauen. In keinem Fall konnte ein Produkt mit dem Templat **T3** erhalten werden. Die Triphosphate **21** und **22**, in denen das π -System der Base durch eine Dreifachbindung erweitert war, wurden ohne Probleme von allen Polymerasen akzeptiert.

Leider stellte sich heraus, dass eine gute *primer extension* keine gute PCR bedingt. Der verwendete Assay untersucht zwar den Einbau von bis zu drei Modifikationen hintereinander, aber das zur exponentiellen Amplifikation benötigte Ablesen des PCR-Produkts wird nicht getestet. Eine erfolgreiche Primerverlängerung ist daher ein notwendiges aber kein hinreichendes Kriterium für eine erfolgreiche PCR.

5.5. PCR mit modifizierten Triphosphaten

5.5.1. Primer und Template

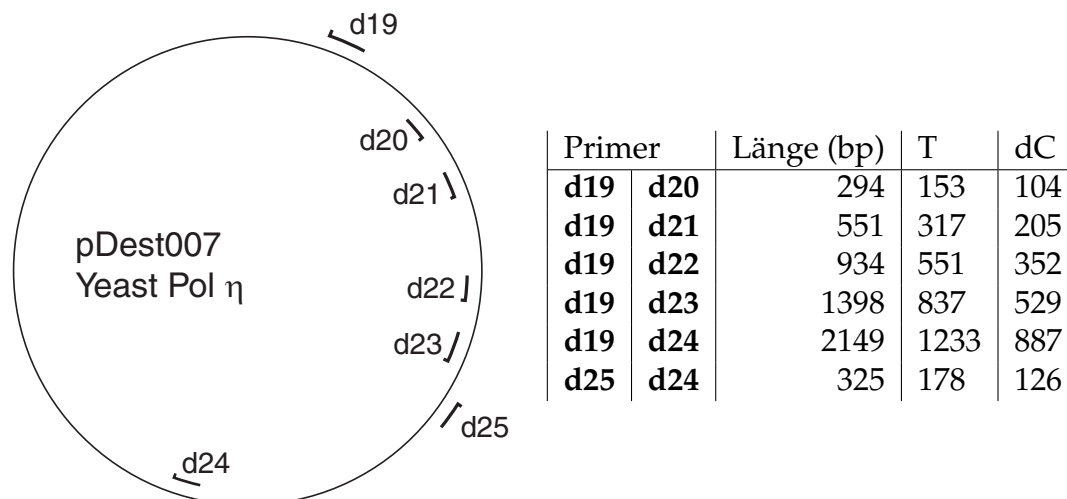


Abbildung 5.12: Links: Übersicht über die verwendeten Primer und ihre Lage auf dem Plasmid. Der Haken gibt das 5'-Ende des Primers an. Ein Primer von der Außenseite des Kreises und einem Gegenprimer (innen dargestellt) ergeben ein Primerpaar für ein bestimmtes PCR-Produkt; Rechts: Die Länge der hergestellten PCR-Produkte. Die letzten beiden Spalten geben jeweils die Anzahl an Modifikationen bei Austausch des Thymidins, bzw. 2'-Desoxycytidins an.

Alle PCR-Produkte wurden von einem zyklischen Plasmid (Vektor) abgelesen. Dieses enthielt das Gen der Polymerase η aus Hefe (*yeast*). Die Abbildung 5.12 zeigt die verschiedenen Primer und ihre Lage auf dem Vektor. Die meisten PCR-Produkte wurden mit Primer **d19** und wechselnden Gegenprimern hergestellt. So ergibt zum Beispiel **d19** mit **d20** ein 300 Basenpaare langes Produkt, während er mit **d22** ein 900 Basenpaar langes Produkt ergibt. Diese Art des Primerdesigns hatte den Vorteil, dass zum Beispiel für die PCR-Produkte mit dem Alkin-Primer **d9** (sequenzgleich zu **d19**) nur ein Primer für vier unterschiedliche PCR-Produkte von 300 bis 2000 Basenpaaren Länge hergestellt werden musste. Von vielen der Primer wurden auch modifizierte Varianten mit Fluoreszein, Phosphaten, Aminogruppen, Biotin oder Thiolen gekauft. Über die Wahl der Primer lassen sich zwei unterschiedliche Modifikationen an den Enden des Produkts einführen. Außerdem wurde noch Primer **d25** gewählt, welcher mit **d24** ein 325 Basenpaare langes PCR-Produkt ergibt.

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

Neben dem Templat Pol η Yeast wurde noch für wenige Versuche das Templat Pol η Human mit einem Satz Primer für ein 2000 Basenpaare langes Produkt und das FPG-Gen mit einem Produkt von 800 Basenpaaren Länge verwendet. Allerdings wurden nur vereinzelte Versuche mit diesen durchgeführt.

5.5.2. Polymerasen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Polymerase Kettenreaktionen wurden die Polymerasen Pwo, Vent exo^- , Deep Vent exo^- , KOD XL (im folgenden auch als KOD bezeichnet) und Taq verwendet. PCR-Produkte aus natürlichen Triphosphaten wurden mit Taq-Polymerase hergestellt. Die meisten Polymerase Kettenreaktionen mit modifizierten Triphosphaten wurden mit Pwo durchgeführt. Diese Polymerase ist wegen ihrer Exonukleaseaktivität genauer als die exo^- -Varianten von Vent und Deep Vent. Letztere Polymerasen wurden nur genommen, wenn keine andere Polymerase die Monomere akzeptierte. Die KOD XL-Polymerase, eine Mischung aus der natürlichen und einer exo^- -Mutation, ist erst seit kurzer Zeit auf dem europäischen Markt erhältlich. Daher konnten erst am Ende der Untersuchungen Versuche mit diesem Enzym durchgeführt werden. Die Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität und Genauigkeit aus, gehört allerdings auch zu den teuersten.

5.5.3. Herstellung eines PCR-Produkts mit 300 Basenpaaren

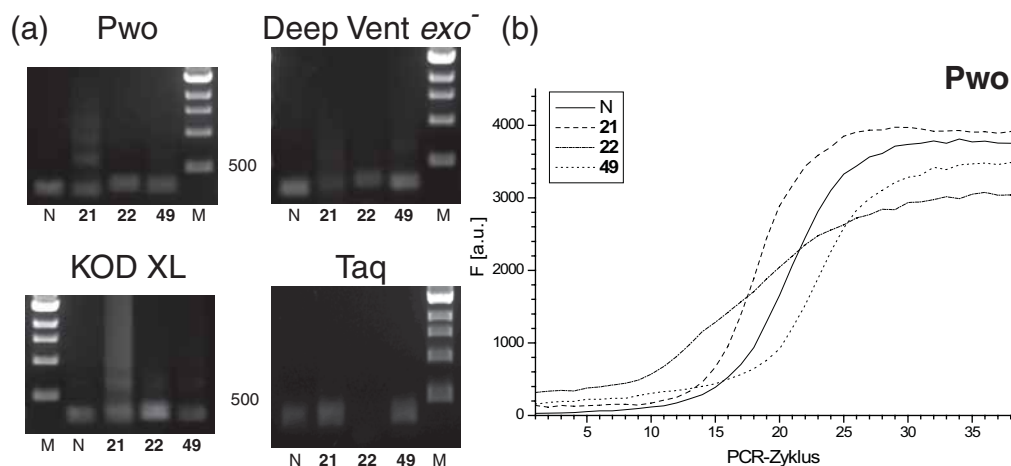


Abbildung 5.13: Gele und qPCR-Daten eines 300 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Triphosphaten 21, 22 und 49 (N: normales TTP; M: DNA Leiter).

Das PCR-Produkt mit den Primern **d19** und **d20** diente als „Standard“ für alle Triphosphate und Polymerasen. Es besitzt einen AT-Anteil von 60 % und enthält 153 austauschbare Thymidine und 104 austauschbare 2'-Desoxycytidine. Für alle Monomere betrug die Elongationszeit der PCR 45 Sekunden. Als Denaturierungstemperatur wurden 95 °C und als Hybridisierungstemperatur 57 °C gewählt (Protokoll JGY30057).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse mit den Alkintriphosphaten **21,22** und **49** gibt Abbildung 5.13a. Wie aus den Primerverlängerungsversuchen zu erwarten, ergaben die Triphosphate **24** und **25** mit keiner Polymerase ein Produkt (nicht gezeigt). Die Abbildung zeigt, dass alle Polymerasen der Familie B (Pwo, Deep Vent *exo*⁻ und KOD XL) die drei Triphosphate **21,22** und **49** akzeptieren. Der Einbau von dCTP **49** durch KOD XL ist ein unerwartetes Ergebnis. *Sawai* erhielt mit 5-Propin-2'-Desoxycytidintriphosphat bei zwei deutlich kürzeren Templaten kein Produkt.^[251,255] Bei den qPCR-Experimenten mit Pwo/**22** wurde festgestellt, dass bei der Kombination eine Inhibition der Polymerase durch SYBR Green auftrat. Ohne SYBR Green wurde ein Produkt erhalten. Um auch für diese Polymerase/Triphosphat-Kombination qPCR-Daten zu erhalten, wurde für diese qPCR die Menge an zugegebenen SYBR Green auf ein Viertel reduziert. Mit Taq-Polymerase aus Familie A konnte nur mit den Triphosphaten **21** und **49** ein Produkt erhalten werden.

In den qPCR-Profilen sind Unterschiede zwischen den Triphosphaten erkennbar (s. Abb. 5.13b). So ist der Verlauf der Kurve für das Triphosphat **22** bei den Polymerasen Pwo und Deep Vent *exo*⁻ deutlich flacher als bei den anderen Triphosphaten (für Deep Vent *exo*⁻ s. Abbildung 8.2 im experimentellem Teil). Dies deutet darauf hin, dass für dieses Triphosphat der Einbau nicht so effizient ist. Bei Triphosphat **21** sind im Gel längere Nebenprodukte der PCR zu erkennen. Diese werden wahrscheinlich aufgrund der für dieses Triphosphat zu langen Elongationszeit und der hohen Menge an Enzym gebildet. In den ersten Zyklen der PCR entstehen immer auch längere Produkte, welche aber maximal linear anwachsen können. Nur das korrekte PCR-Produkt wird exponentiell vervielfältigt. Wenn die Bedingungen der PCR nicht auf das Triphosphat und auf die Aktivität der Polymerase abgestimmt sind, kann es zur Bildung von Nebenprodukten kommen.

Um die Genauigkeit der Polymerase zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte, die mit Pwo erhalten worden waren, erneut als Templat in einer PCR mit normalen Triphosphaten eingesetzt. Die daraus erhaltene DNA wurde sequenziert. Dabei wurde kein Fehler im PCR-Produkt im Vergleich zur Ursprungssequenz gefunden. Allerdings ist aus einer Sequenzierung einer kurzen DNA-Sequenz kein Rückschluss auf die allgemeine Fehlerrate der Polymerase

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

möglich. Diese Ergebnisse zeigen aber, dass die modifizierten Triphosphate **21**, **22** und **49** von der Polymerase korrekt eingebaut und die DNA richtig abgelesen wird.

Wie schon im Abschnitt 4.7.2 beschrieben, spiegeln die Stabilitäten der PCR-Produkte die Einflüsse der Monomere in den kurzen Oligomeren wider (s. Tabelle 5.6). Unterschiede in der Zusammensetzung der PCR-Puffer der Polymerasen bedingen kleine Unterschiede der Schmelztemperaturen, aber die relative Stabilisierung der Monomere $TTP < \mathbf{22} < \mathbf{21} < \mathbf{49}$ ist gleich. Interessant wäre es, ein Ethin-2'-desoxycytidintriphosphat auszuprobieren. Wenn man annimmt, dass ähnlich wie bei den Alkinthymidinen der Schmelzpunkt des 1,7-Oktadiins um 3 °C erniedrigt ist, hätte eine solche DNA einen Schmelzpunkt von 95 °C.

Triphosphat	Pwo	Deep Vent <i>exo</i> ⁻	KOD	Taq
TTP	83	81	85	81
21	87	85	90	87
22	85	82	87	-
49	91	88	92	89

Tabelle 5.6: Schmelztemperaturen der verschiedenen PCR-Produkte (300 Basenpaare) in den unterschiedlichen Polymerase-Puffern

Die Versuche zeigen, dass die Triphosphate mit erweiterten π -System wie **21**, **22** und **49** von den getesteten Polymerasen der Familie B gut akzeptiert werden. Mit der Taq-Polymerase, welche der Familie A angehört, konnte nur mit dem Alkin-Thymidin **22** kein Produkt erhalten werden. Das Alkin-dCTP **49** besitzt den gleichen Rest, wird aber gut angenommen. Ob diese Unterschiede durch die Sequenz des Templats verursacht werden, die doppelt so viele Thymidine enthält wie 2'-Desoxycytidine, ist nicht sicher.

Obwohl die Polymerasen ähnliche Ergebnisse ergaben, wurden alle PCR-Produkte mit 300 Basenpaaren mit der Pwo-Polymerase hergestellt. Diese Polymerase wird bei vielen anderen Untersuchungen mit modifizierten Triphosphaten eingesetzt und besitzt im Gegensatz zu den anderen Polymerasen vollständige Exonukleaseaktivität. Nur im Fall von Triphosphat **22** wurde in wenigen Versuchen auch die Polymerase KOD XL verwendet.

UV- und CD-Spektren der PCR-Produkte

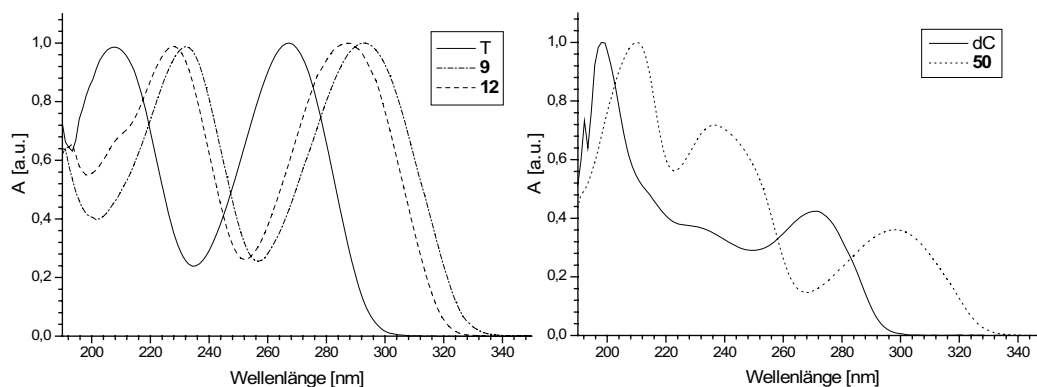


Abbildung 5.14: Vergleich der UV-Spektren der natürlichen Basen und der Alkin-Monomere (gemessen mit dem PDA der HPLC, auf 1 normiert).

Das erweiterte π -System verändert das Absorptionsspektrum der Base (s. Abb. 5.14). So zeigen alle Alkin-Monomere im Gegensatz zu allen natürlichen Basen eine Absorption jenseits von 300 nm. Im Falle der Thymidine ist das Spektrum um 20-30 nm zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Bei dem Alkin-Cytidin **50** kommt es neben der Verschiebung der Absorptionsbande bei 270 nm auf 300 nm zu einer neuen Absorption bei 240 nm. Die neuen Absorptionseigenschaften zeigen sich auch im UV-Spektrum der Alkin-DNA (s. Abb. 5.15). Der Einbau der Alkintriphosphate zeigt sich auch im UV-Spektrum. Dies ist im UV-Spektrum der DNA in einer Schulter im Bereich von 300-320 nm zu erkennen. Dabei kommt es auch zu einer höheren Absorption im Bereich von 230 nm. Dies spiegelt sich auch in den Verhältnissen der Absorptionen wider. So besitzt die DNA mit Alkin-Thymidinen ein 260/280-Verhältnis von 1.6-1.7, während die DNA mit Alkin-Cytidin **49** wie natürliche DNA ein Verhältnis von 2.0 aufweist. Das Verhältnis von 260/300 ist im Falle von dem Alkin-dCTP **49** am größten (7.3), gefolgt von **21** (5.1) und **22** (4.4). Wahrscheinlich hängen diese Unterschiede vor allem mit der deutlich höheren Anzahl an Alkin-Thymidinen in der modifizierten DNA zusammen. So enthält die Sequenz 50 % mehr Thymidine als Cytidine.

Im CD-Spektrum (Zirkularer Dichroismus) der Produkte führt der Austausch der Thymidine zu deutlichen Änderungen im Spektrum (s. Abb. 5.15). So kommt es zu einer leichten Veränderung bei der Lage der Minima und Maxima im Vergleich zur natürlichen DNA. Ein neues Minimum bei 290 nm zeigt fast die gleiche Intensität wie das bei 250 nm. Bei dem Alkin-dCTP **49** kommt es zu einer leichten Verschiebung zu größeren Wellenlängen im Vergleich zu na-

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

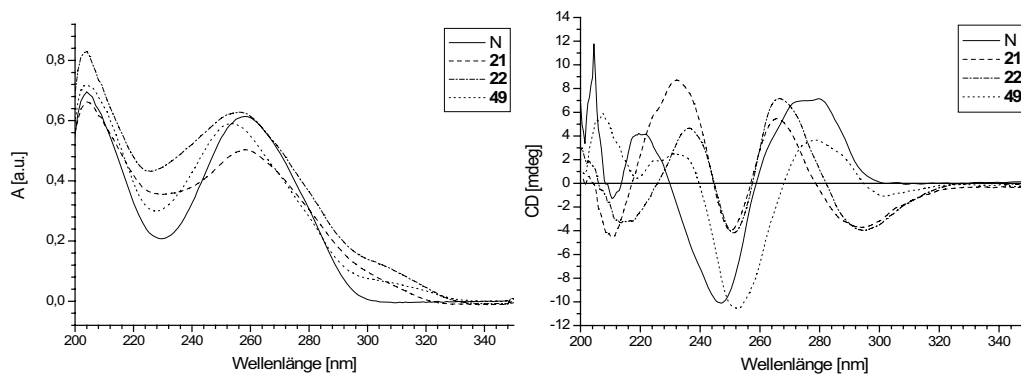


Abbildung 5.15: UV- und CD-Spektren von PCR-Produkten (300 Basenpaare) mit den Triphosphaten **21**, **22** und **49** (gemessen in 10 mM Tris/HCl).

türlicher DNA. Ebenso wie bei den Alkin-Thymidinen tritt ein neues Minimum im Bereich >280 nm auf.

Ob die Verschiebung der Minima und Maxima in den Spektren der modifizierten DNA im Vergleich zu natürlicher DNA auf eine andere Struktur zurückzuführen ist oder sie nur durch die Veränderung der Chromophore der Basen hervorgerufen wird lässt sich nicht sagen. Aus Untersuchungen mit Propin-Oligomeren ist bekannt, dass das erweiterte π -System der Alkine zu einer Verstärkung der Basenstapelung zwischen diesen Basen führt, was die B-Form der DNA stabilisiert.^[16,17] Alkin-DNA liegt daher wahrscheinlich in der B-Form vor.

Einfluss auf Restriktionsenzyme

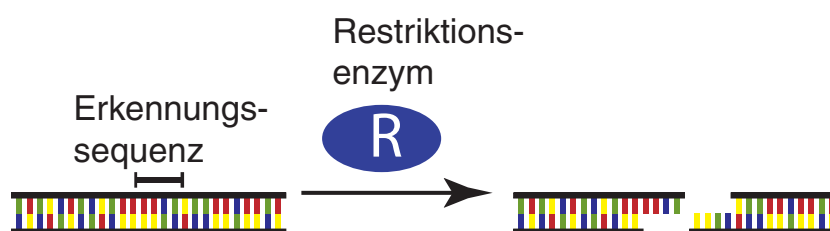


Abbildung 5.16: Prinzip der Restriktion von DNA. Das Restriktionsenzym erkennt seine Erkennungssequenz und schneidet dort die DNA.

Die Modifikationen beeinflussen nicht nur die Stabilität der DNA. Die Reste an den Basen können auch die Erkennung der DNA durch Enzyme verhindern. Das Schneiden von DNA durch Endonukleasen (Restriktionsenzyme) ist in der

Biochemie eine wichtige Technik zur Manipulation von genetischer Information (s. Abb. 5.16). Diese Enzyme schneiden sehr spezifisch eine bestimmte Sequenz in der DNA.^[293] Um diese Sequenz zu erkennen, prüfen die Restriktionsenzyme die große Furche der DNA auf bestimmte Wasserstoffbrückenmuster. Zum Beispiel bilden EcoRI-ähnliche Enzyme 15-20 Wasserstoffbrücken zu den Basen ihrer Erkennungssequenz aus.^[293] Da die Alkin-Modifikationen genau in der großen Furche liegen, wurde untersucht, ob die Enzyme immer noch in der Lage sind, diese DNA zu schneiden.

Zur Untersuchung der Restriktion von Alkin-DNA wurden drei Enzyme ausgewählt, welche das 300 Basenpaare lange PCR-Produkt ungefähr in der Mitte schneiden. So schneiden Bgl II und Bcl I an der Position 217, bzw. 222. Daraus entstehen je zwei Fragmente von 77 und 217, bzw. 72 und 222 Basenpaaren Länge. Das Enzym Tsp509I schneidet an mehreren Positionen. Dabei entstehen vor allem zwei Fragmente von 131 und 155 Basenpaaren Länge.

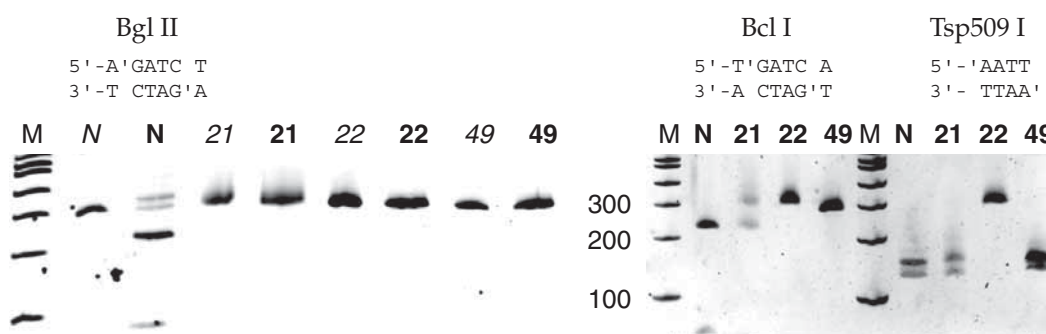


Abbildung 5.17: Restriktion verschiedener PCR-Produkte mit **21**, **22** und **49** (Ausgangsmaterial (*kursiv*); Reaktion **fett**; M: Marker). Die Sequenzen geben die Erkennungs- und Schnittsequenz der Enzyme an.

In Abbildung 5.17 sind Versuche mit den Produkten aus den drei Alkinen und den verschiedenen Restriktionsenzymen gezeigt. Im Falle von normaler DNA sind die kürzeren Fragmente im Gel deutlich zu erkennen. Das Ethin-Monomer **21** ist dem normalen Thymidin am ähnlichsten. Trotzdem war das Enzym Bgl II nicht in der Lage diese DNA zu schneiden, während Bcl I mit sehr ähnlicher Erkennungssequenz keine Schwierigkeiten hatte. Interessant sind die Unterschiede zwischen dem PCR-Produkt mit dem Thymidin mit längeren Resten **22** und dem Alkin-Cytidin **49**. Die DNA mit **22** wird von keinem Enzym geschnitten. Dagegen kann Tsp509 I in der DNA mit **49** an die Erkennungssequenz binden und dementsprechend schneiden. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass dieses Enzym an eine Sequenz ohne Cytidine bindet. Daher war an dieser Stelle im Gegensatz zu der DNA mit **22** keine Modifikation.

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

Die Restriktionsversuche der modifizierten DNA deuten darauf hin, dass die Störung der Protein/DNA-Wechselwirkung durch die langen hydrophoben Reste von **22** oder **49**, die Erkennung durch Restriktionsenzyme behindert. So wurde die DNA mit langen Resten nur geschnitten, wenn die Erkennungssequenz keine Modifikation enthielt. Allerdings lässt der geringe Umfang der Versuche keinen eindeutigen Schluss zu. Für jedes Enzym muss separat getestet werden, ob es die modifizierte DNA prozessieren kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie mit 7dN-dGTP und 7dN-dATP.^[286]

5.5.4. Herstellung eines PCR-Produkts mit 900 Basenpaaren

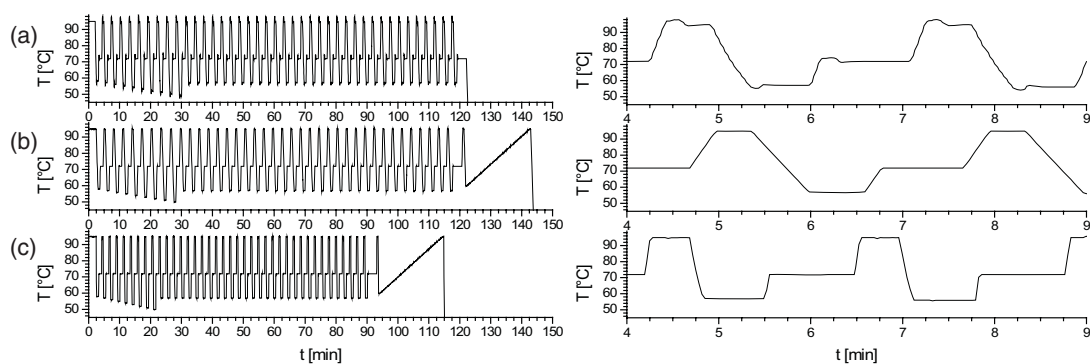


Abbildung 5.18: Temperaturprofile der verschiedenen PCR-Maschinen bei gleicher Programmierung (a) Eppendorf Cycler *personal* (b) Eppendorf *realplex* S (*simulate Mastercycler gradient*) (c) Eppendorf *realplex* S; Ausschnitt über 2 Zyklen (rechts)

Als nächstes wurde die Herstellung eines 900 Basenpaare langen PCR-Produkts untersucht. Dazu wurden die Primer **d19** und **d22** verwendet. Die ersten Versuche wurden mit dem gleichen PCR-Programm wie für das kürzere PCR-Produkt unternommen. Dabei stellte sich heraus, dass einige Polymerase-Triphosphat-Kombinationen reproduzierbar nur auf den Eppendorf Cycler *personal* funktionierten und nicht auf dem qPCR-Cycler Eppendorf *realplex*. Vor allem Versuche mit dem Triphosphat **49**, dem PCR-Produkt mit dem höchsten Schmelzpunkt, schlugen fehl. Ein Vergleich der Temperaturprofile zeigte bei gleicher Programmierung wichtige Unterschiede zwischen den Maschinen. So verfügt der qPCR-Cycler über einen Silberblock, der höhere Heiz- und Abkühlungsraten ermöglicht und die Dauer der PCR verkürzt (s. Abb. 5.18c). Um die Kompatibilität zu den älteren Maschinen zu gewährleisten, kann er deren geringere Heiz- und Kühlraten simulieren (5.18b). Der Vergleich des Temperaturprofils des Eppendorf Cycler *personal* (5.18a) mit dem des Eppendorf *realplex*

zeigte trotzdem einen deutlich anderen Verlauf. Beim Einstellen der geforderten Temperatur über- und untersteuert die ältere PCR-Maschine um bis zu 5 °C. Das hat zur Folge, dass während des nur 15 Sekunden langen Denaturierens die Temperatur fast die Hälfte der Zeit bei 98 °C liegt (s. Abb. 5.18 rechts). Diese erhöhte Temperatur kann dazu führen, dass das PCR-Produkt denaturiert wird, und die PCR ablaufen kann. Wie bei den kürzeren PCR-Produkten sollte die hergestellte DNA einen hohen Schmelzpunkt besitzen. Die verwendete Denaturierungstemperatur von 95 °C könnte bei den längeren Produkten nicht hoch genug sein. Der Schmelzpunkt des Produkts aus **49** liegt bereits bei über 90 °C. In der „modernen“ Maschine kann die DNA wegen der genaueren Temperatursteuerung nicht in die Einzelstränge aufgetrennt werden. Daher findet dort keine PCR statt. Dementsprechend wurde die Denaturierungstemperatur im Programm auf 99 °C angehoben.

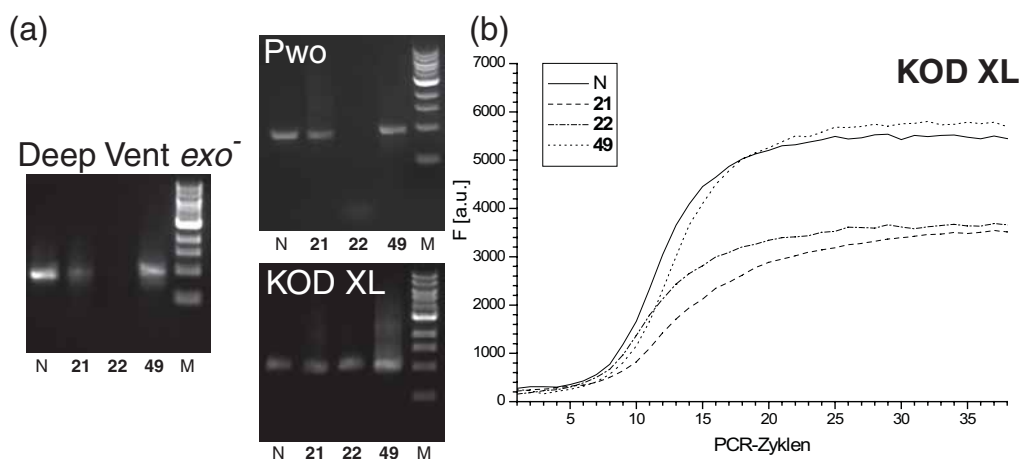


Abbildung 5.19: Gele und qPCR-Daten eines 900 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Triphosphaten **21**, **22** und **49** (N: TTP; M: DNA-Marker).

Die längeren Produkte sind für die Polymerasen deutlich schwieriger. So enthält die Sequenz sechsmal fünf Thymidine nacheinander und zweimal sogar sieben. Bei Austausch der 2'-Desoxycytidine treten einmal fünf und einmal vier hintereinander auf. Die PCR wurde mit einer Denaturierungstemperatur von 99 °C und einer verlängerten Elongationszeit von 1:30 Minuten durchgeführt. Durch Zugabe von 4 % DMSO wurden die Schmelztemperaturen noch etwas abgesenkt.^[294] Diese Änderungen ermöglichten auch auf der qPCR-Maschine die Herstellung des 900 Basenpaare langen PCR-Produkts.

Abbildung 5.19a zeigt Gele der PCR-Produkte der verschiedenen Polymerasen. Die Taq-Polymerase wurde nicht mehr getestet. Bei den anderen Polymerasen wurden Pwo, Deep Vent *exo⁻* und KOD XL untersucht. Alle Polymerasen

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

konnten mit **21** und **49** ein Produkt herstellen. Bei Triphosphat **22** war nur KOD in der Lage ein PCR-Produkt herzustellen. Die qPCR-Daten für KOD zeigen einen ähnlichen Verlauf. Zwar sind die Kurven für die Triphosphate **21** und **22** etwas flacher, als die für normales Triphosphat und **49**, aber in der Menge an DNA ist auf dem Gel kein Unterschied zu erkennen. Zur Herstellung größerer Mengen des 900 Basenpaare langen PCR-Produkts wurde für **21** und **49** Pwo und für **22** KOD XL verwendet.

Die Schmelzpunkte der PCR-Produkte zeigen die gleiche Abfolge, wie bei den kürzeren PCR-Produkten (s. Tabelle 5.7). Das „kurze“ Alkin stabilisiert den DNA-Strang besser, als das Alkin-Thymidin mit der längeren Kette **22**, aber nicht so stark wie das Alkin-Cytidin **49**. Die Absolutwerte der Schmelztemperaturen sind zwar denen der kürzeren PCR-Produkte ähnlich, aber der DMSO-Anteil in der Probe senkt den Schmelzpunkt um 2-3 °C. Die längeren PCR-Produkte sind also etwas stabiler als die kürzeren. Bei einer Schmelztemperatur von 94 °C zeigt sich, welchen Einfluss die nur um 4 °C höhere Denaturierungstemperatur im PCR-Programm hat.

Triphosphat	Pwo	Deep Vent <i>exo</i> ⁻	KOD
TTP	82	83	84
21	88	87	89
22	-	-	87
49	91	89	94

Tabelle 5.7: Schmelztemperaturen der unterschiedlichen PCR-Produkte (900 Basenpaare) in den unterschiedlichen Polymerase-Puffern (mit 4 % DMSO).

Bei den UV- und CD-Spektren sind die gleichen Einflüsse der Modifikationen, wie bei den kürzeren PCR-Produkten zu sehen (s. Abb. 5.20). Im UV-Spektrum zeigt sich die zusätzliche Absorption bei 300-320 nm und im CD-Spektrum die gleichen Verschiebungen der Minima und Maxima. Die Verhältnisse der Absorptionen sind in guter Übereinstimmung (260/280 **21**: 1.6, **22**: 1.6, **49**: 1.9; 260/300 **21**: 4.4, **22**: 3.7, **49**: 7.0). Auch die CD-Spektren der DNA sind fast deckungsgleich mit den Spektren der kürzeren PCR-Produkte. So zeigen die Alkin-Thymidine **21** und **22** das intensive Minimum bei 290 nm, während **49** ein deutlich schwächeres Minimum bei 300 nm besitzt. Die Zugabe von NaCl bis zu einer Konzentration von 1 M veränderte das CD-Spektrum nicht.

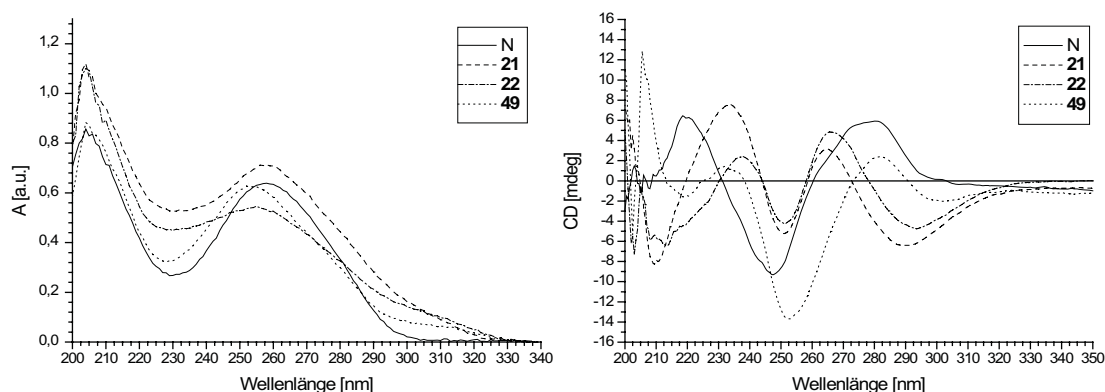


Abbildung 5.20: UV- und CD-Spektrum eines 900 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Triphosphaten 21, 22 und 49 (gemessen in 10 mM Tris/HCl).

5.5.5. Herstellung eines PCR-Produkts mit 2000 Basenpaaren

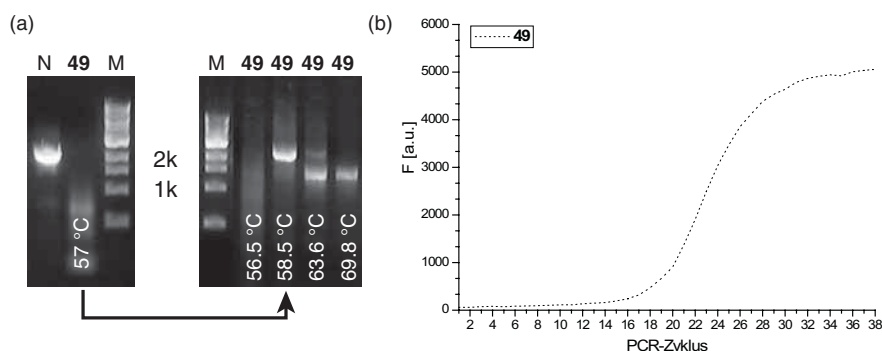


Abbildung 5.21: (a) Optimierung des PCR-Protokolls für ein 2000 Basenpaare langes PCR-Produkt mit 49 und Pwo. Links: Standard-Programm; Rechts: PCR mit verschiedenen Hybridisierungstemperaturen (b) qPCR-Diagramm des optimierten Programms.

Die Herstellung des längsten PCR-Produkts mit 2000 Basenpaare Länge mit dem Primerpaar **d19** und **d24** wurde für die Kombination **49**/Pwo optimiert. Durch die hohe Stabilisierung des PCR-Produkts erhöht sich auch der Schmelzpunkt der Primer/Templat-Hybride. Allerdings begünstigt das lange Templat die Möglichkeit der unspezifischen Bindung der Primer. Daher musste das PCR-Programm auf die Polymerase abgestimmt werden. So wurde die Denaturierungstemperatur auf 99 °C erhöht. Die Elongationszeit wurde auf 5:00 Minuten verlängert. Zur Absenkung der Schmelztemperatur wurden noch 4 % DMSO zugegeben. Abbildung 5.21a zeigt den Einfluss unterschiedlicher Hybri-

5. Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten

disierungstemperaturen im PCR-Programm auf das PCR-Produkt. Bei der niedrigsten Temperatur ist kein eindeutiges Produkt zu erkennen, während bei zu hoher Temperatur selektiv ein kürzeres Produkt entsteht. Nur in einem Temperaturbereich zwischen 58 °C und 61 °C wurde das korrekte Produkt gebildet. Im endgültigen Programm wurde dementsprechend eine Hybridisierungstemperatur von 59.3 °C gewählt. Diese Temperatur hat auch zur Folge, dass mit dem Programm kein PCR-Produkt mit normalen Triphosphaten hergestellt werden kann.

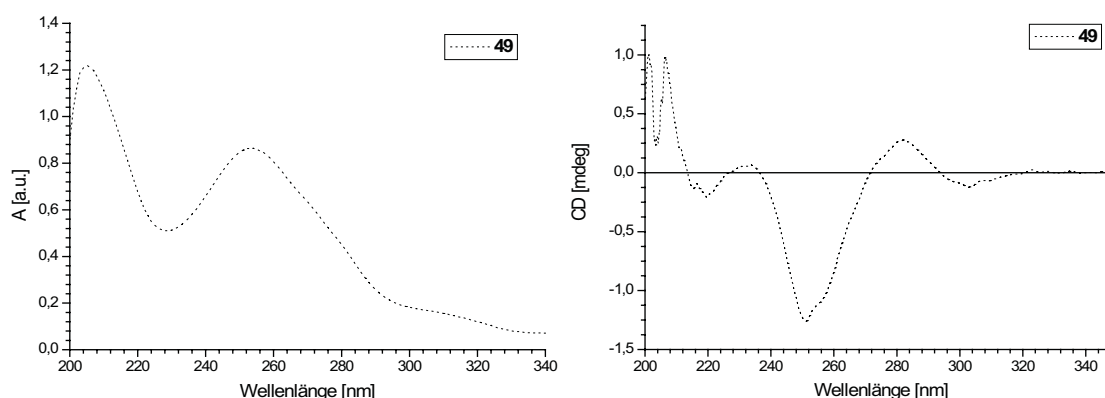


Abbildung 5.22: UV-Spektrum und CD-Spektrum eines 2000 Basenpaare langen PCR-Produkts mit Triphosphat 49 (gemessen in 10 mM Tris/HCl).

Das entstandene PCR-Produkt zeigt alle charakteristischen Eigenschaften der PCR-Produkte mit Triphosphat 49. So liegt der Schmelzpunkt bei ungefähr 90 °C. Die UV- und CD-Spektren sind mit denen der kürzeren Produkte identisch (s. Abb. 5.22). Zwar sind die Verhältnisse der Absorptionen leicht verändert (260/280: 1.8; 260/300: 4.4), aber im Verhältnis zu den kürzeren PCR-Produkten mit einem Alkin-Cytidin-Anteil von 35 % bzw. 37 %, hat das 2000 Basenpaare lange Produkt mit 887 Alkin-Cytidinen einen Anteil von 41 %. Das könnte die veränderten Verhältnisse erklären. Im CD-Spektrum ist erneut das typische Minimum bei 300 nm zu erkennen.

5.6. Ausblick

Die Untersuchungen zum enzymatischen Einbau modifizierter Triphosphate zeigen, dass die Struktur der Modifikation von entscheidender Bedeutung ist. Die Akzeptanz durch die Polymerase kann sich selbst bei Polymerasen aus der gleichen Familie stark unterscheiden. Außerdem können kleine Unterschiede in den Bedingungen der PCR über Erfolg und Misserfolg entscheiden. Dabei stellen die Alkin-Monomere nicht einmal sterisch besonders anspruchsvolle Modifikationen dar. So hatten fast alle Polymerasen bei kurzen PCR-Produkten noch keine Schwierigkeiten. Erst bei längeren PCR-Produkten waren deutliche Unterschiede zwischen den Polymerasen sichtbar. Das zeigte sich bei Triphosphat **22**, bei welchem nur noch mit der KOD-Polymerase ein Produkt mit 900 Basenpaaren Länge erhalten wurde. Noch längere PCR-Produkte wie das 2000 Basenpaare lange Produkt erforderten eine sehr genaue Optimierung der PCR-Bedingungen.

Die Schwierigkeiten der Polymerasen bei nur kleinen Änderungen in der Struktur der Triphosphate zeigen, dass der Einführung von Modifikationen durch PCR-Reaktion durchaus Grenzen gesetzt sind. So ist für eine bestimmte Struktur keine Vorhersage eines erfolgreichen Einbaus durch eine bestimmte Polymerase möglich. Diese Problematik kann durch Verwendung der Alkin-Triphosphate umgangen werden. Ihre hohe Ähnlichkeit mit den natürlichen Basen sollte einen relativ unproblematischen Einbau in Produkte mittlerer Länge erlauben. Nach Optimierung der Bedingungen sollte auch die Herstellung von längeren PCR-Produkten zum Beispiel mit **22** möglich sein. Die „Click“-Reaktion kann danach zur quantitativen Modifikation der PCR-Produkte eingesetzt werden.

6. Detektion von DNA

6.1. Einleitung



Abbildung 6.1: Grundlegendes Prinzip der Detektion von DNA.

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Erbguts gelang nicht nur ein Meilenstein in der Geschichte der Biochemie, sondern es zeigte auch die zunehmende Bedeutung der genetischen Information bei der Entdeckung und Behandlung von Krankheiten. Dabei spielt die Detektion von bestimmten DNA-Sequenzen, sei es aus dem Erbgut, aus cDNA oder aus RNA, eine sehr wichtige Rolle in der Diagnostik.

Das Schema 6.1 zeigt das grundlegende Prinzip der Detektion bestimmter DNA-Sequenzen. Im Gegensatz zu Proteinen beinhaltet die Struktur von DNA durch ihren Aufbau aus zwei Einzelsträngen bereits eine Möglichkeit zur selektiven Bindung. So basieren fast alle Methoden der DNA-Detektion auf der Bildung eines Doppelstrangs mit einem komplementären Gegenstrang. Dabei ist das Hauptproblem jeder Detektionsmethode unabhängig von der verwendeten Technik die „Übersetzung“ der erfolgreichen Hybridisierung der Zielsequenz in ein messbares Signal. Deshalb schließen sich in den meisten Fällen an diesen Schritt Separations-, Markierungs- und Amplifikationsschritte an. In verschiedenen Methoden kann sich die Reihenfolge der Schritte auch unterscheiden. Aufgrund der Bedeutung der Detektion von DNA gibt es eine sehr große Zahl an Methoden und Varianten. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über einige Methoden gegeben werden. Für weitergehende Information über Fluoreszenzmarkierung,^[295] Aptamere und Enzyme,^[296] Nanopartikel^[297,298] oder elektrochemische Sensoren^[299,300] sei auf die zitierten Übersichtsartikel verwiesen.

Eine der empfindlichsten Detektionstechniken ist die PCR. Bei dieser Methode sorgt die Hybridisierung der Primer für die Selektivität. Die erfolgreiche Amplifikation der DNA ist gleichzeitig die Verstärkung. Theoretisch ist die

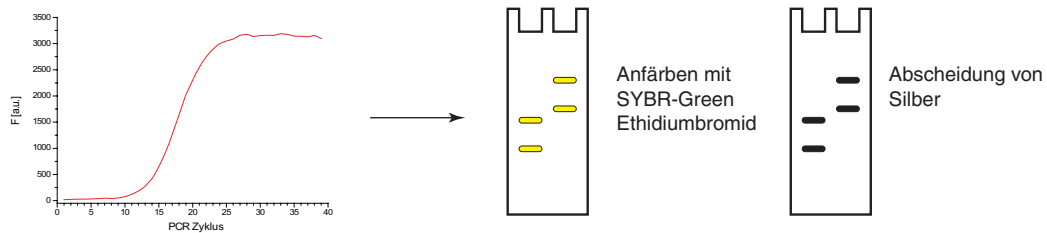


Abbildung 6.2: PCR mit anschließender Anfärbung der Gele mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Silber.

PCR in der Lage aus nur einem einzigen DNA-Molekül ein detektierbares Signal zu erzeugen. Als einfachste Methode zum Nachweis einer erfolgreichen PCR wird die DNA durch Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Zum Anfärben der DNA auf dem Gel werden meistens Interkalatoren wie Ethidiumbromid^[301] oder SYBR Green^[301–303] verwendet. Mit diesen Methoden auf Gelen lassen sich nach Herstellerangaben bis zu 50 pg nachweisen. Eine andere Möglichkeit ist die DNA im Gel durch Abscheidung von Silber sichtbar zu machen. Dieses Verfahren ist etwas empfindlicher und wird in Abschnitt 6.2 genauer vorgestellt. Diese Methoden zur Anfärbung von Gelen sind zwar oft einfach durchzuführen, aber sie färben nicht selektiv.

Deutlich besser als die normale PCR mit anschließender Elektrophorese ist die schon vorgestellte **qPCR**. Diese Reaktion erlaubt auch die parallele Quantifizierung mehrerer Proben in einer Reaktion (Multiplex-PCR) und eine Durchführung aus einer Mischung heraus ohne vorherige Reinigung. Diese Methode ist im klinischen Bereich bereits etabliert, erfordert aber einen hohen apparativen Aufwand mit hohen Anforderungen an die Durchführung. Mit einer Empfindlichkeit von 5-10 Molekülen in einer Probe ist diese Methode der „Standard“ an dem sich alle Methoden messen lassen müssen.^[304]

In Abbildung 6.3 werden die beiden am häufigsten verwendeten Verfahren der Detektion von DNA beschrieben. So sind *molecular beacons* kleine DNA-Haarnadeln, welche an einem Ende eine Fluorophor und am anderen Ende eine entsprechenden Quencher besitzen.^[305–307] Neben einer kurzen Sequenz an beiden Enden, welche den Strang in der geschlossenen Form hält, ist die eigentliche Erkennungssequenz im mittleren Teil des Strangs. Ohne einen geeigneten Gegenstrang liegen sie in der geschlossenen Form vor und der Quencher löscht die Fluoreszenz des Fluorophors. Bei Zugabe eines Gegenstrangs bildete sich der Doppelstrang und der Abstand zwischen Quencher und Fluorophor vergrößert sich. Dadurch ist die Fluoreszenz detektierbar. Dadurch wird die Hybridisierung direkt mit einem messbaren Signal verknüpft. Da sie in Mischungen

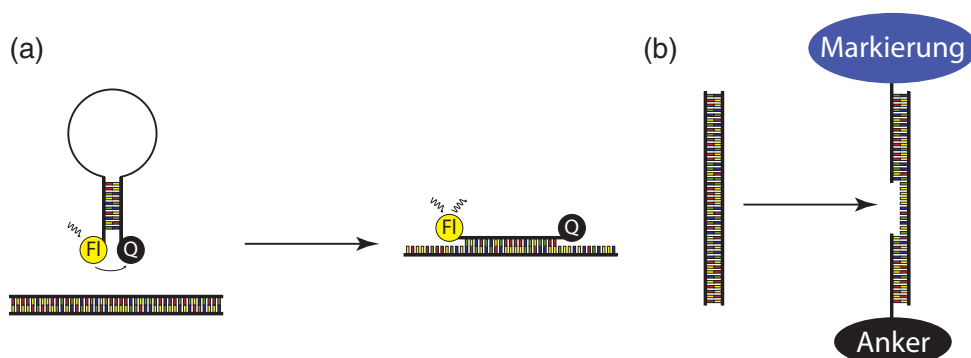


Abbildung 6.3: (a) Selektive Detektion durch *molecular beacons* (b) „Sandwich“-Methode zur Detektion von DNA.

eingesetzt werden können, werden sie in vielen Methoden verwendet. Allerdings ist die Detektion durch Fluoreszenz nicht sehr empfindlich. Aber auch andere Detektionsmethoden sind möglich. So konnte durch eine Haarnadel mit einer elektrochemischen Markierung (Methylenblau oder Ferrocen) durch Messung der Redoxpotentials eine sehr empfindliche Detektion erreicht werden (ca. 25 pmol).^[308,309]

Die meisten Assays arbeiten mit der „Sandwich“-Methode (s. Abb. 6.3). Dabei wird die Ziel-DNA mit zwei unterschiedlichen Strängen hybridisiert. Dabei dient der eine Strang meistens zur Separation der DNA aus der Probe („Anker“), während der andere die erfolgreiche doppelte Hybridisierung mit einem Signal verknüpft. Diese Methode hat einige Vorteile. So ist zur Erzeugung die Hybridisierung von zwei unterschiedlichen Sequenzen nötig, was die Wahrscheinlichkeit einer Fehldetektion verringert. Durch die Separation der DNA aus der Probe können im zweiten Schritt deutlich mehr Detektionsmethoden angewendet werden. Fast alle modernen Methoden basieren auf diesem Prinzip. Sie unterscheiden sich vor allem in der Art der Signalverstärkung. Zur Separation der Probe wird in fast allen Fällen Biotin als „Anker“ verwendet.

Neben der Bindung zu Biotin basieren viele Methoden auf mit DNA modifizierten Nanopartikel. So berichtete *Mirkin* schon 1996 über die selektive Anordnung von DNA-funktionalisierten Nanopartikeln.^[310] Die Aggregation der Nanopartikel bei der Hybridisierung der DNA auf der Oberfläche der Partikel ist durch einen Farbumschlag in der Lösung sichtbar. Abbildung 6.4a zeigt einen kurze Zeit später entwickelten Assay.^[311] Dabei wird ein „Sandwich“-Komplex zwischen einer DNA auf einer Glasoberfläche und einem Gold-Nanopartikel gebildet. Am Goldpartikel wird durch Zugabe von Silberionen und Hydrochinon selektiv Silber abgeschieden. Die Detektion erfolgte mit einem Flachbett-

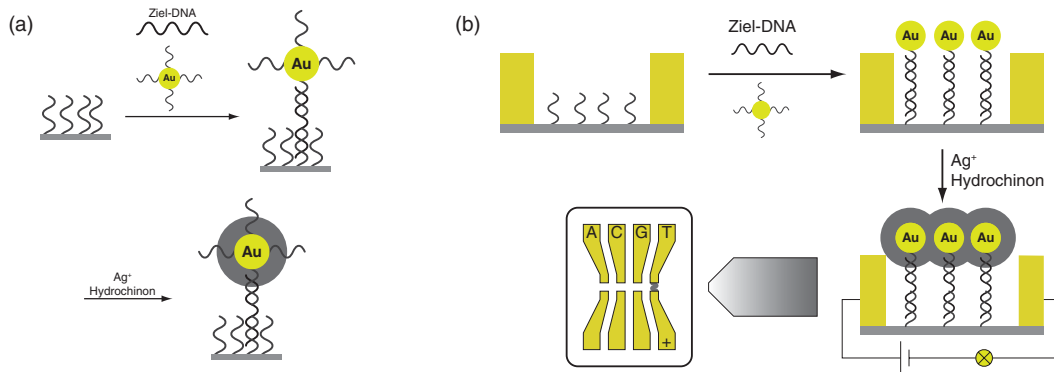


Abbildung 6.4: Sehr empfindliche DNA-Detektion durch Abscheidung von Silber an Goldclustern zur (a) Detektion auf Oberflächen (b) Detektion durch Leitfähigkeit.^[297]

scanner durch Bestimmung des Grauwerts. Damit liessen sich Konzentrationen von ca. 50 fM nachweisen. Dieses Prinzip wurde danach durch weitere Schritte erweitert. So konnte die Empfindlichkeit deutlich erhöht werden, indem die Probe mit einem „Barcode“-DNA-Nanopartikel hybridisiert wurde. Dieser Partikel enthält neben der Ziel-Sequenz noch eine große Menge an „Barcode“-DNA mit anderer Sequenz. Nach Abtrennung der Probe mit Hilfe eines magnetischen Nanopartikels, wurde die „Barcode“-DNA abgespalten und detektiert. Durch diesen zweiten Schritt wird die Anzahl an DNA pro Molekül Ziel-DNA erhöht und die Empfindlichkeit der Methode konnte auf 500 zmol (zeptomol: 10^{-21} mol) erhöht werden (s. Abb. 6.5).^[312] Durch Kombination unterschiedlicher Sequenzen und Antikörper konnte diese Methode auch zur Detektion von Proteinen verwendet werden.^[313]

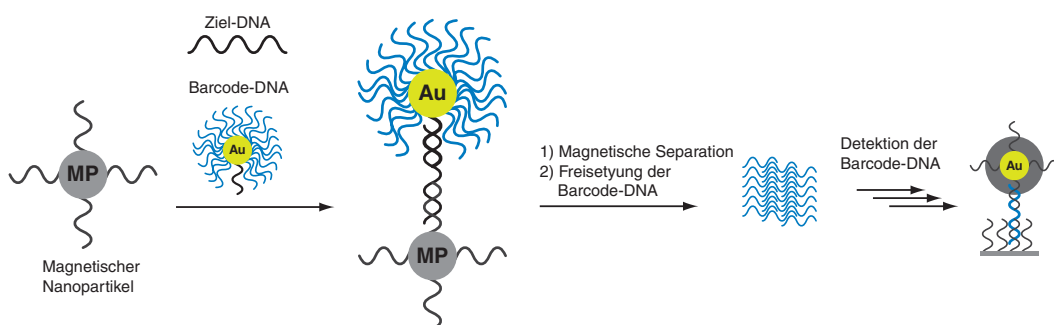


Abbildung 6.5: Steigerung der Empfindlichkeit durch Verwendung von Barcode-DNA.^[312]

6. Detektion von DNA

Die Abscheidung von Metallen an Nanopartikeln kann auch zur Detektion durch Veränderung in der Leitfähigkeit genutzt werden. So wurde durch Hybridisierung und Metallisierung ein Kontakt zwischen zwei Elektroden überbrückt (s. Abb. 6.4b). Dadurch wurde noch eine DNA-Konzentration von 500 fM nachgewiesen. Die Selektivität in Bezug auf Einzelbasenmutationen war deutlich höher als bei anderen Verfahren. Um diese Mutationen durch „Sandwich“-Verfahren nachzuweisen ist eine besondere Optimierung der Hybridisierungstemperatur und -bedingungen nötig. Ähnliche Verfahren wurden auch von anderen Gruppen entwickelt.^[314,315]

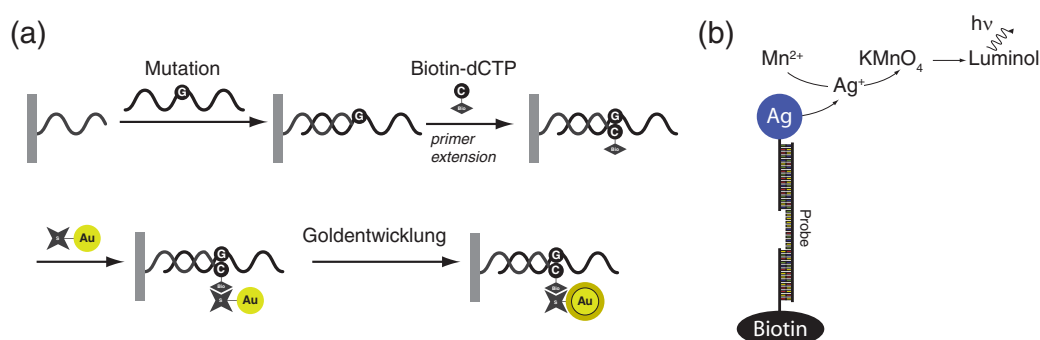


Abbildung 6.6: (a) Nachweis von Mutationen durch Primerverlängerung mit Biotin-dCTP; Die Metallisierung wurde mit Hilfe einer Mikro-Quartz-Waage nachgewiesen.^[316] (b) Kopplung der Auflösung eines Silbernanopartikels an Chemilumineszenz (Luminol).^[317]

Die Metallisierung von Gold-Nanopartikeln kann auch auf andere Weise detektiert werden. So maßen *Weizmann et al.* den Einfluss der Metallisierung auf einem Piezokristall (Mikro-Quartz-Waage). Die Methode basierte erneut auf der Separation der Probe über die Biotin/Streptavidin-Bindung an einem magnetischen Nanopartikel. Nach Markierung mit einem Gold-Nanopartikel wurde die Ablagerung von Silber auf einem Piezokristall gemessen. Damit gelang die Detektion einer DNA-Konzentration von 1 fM (27 Basenpaare Länge). In einem anderen Assay wurde durch eine Primerverlängerungsreaktion mit Biotin-dCTP durchgeführt (s. Abb. 6.6a). Auf diese Weise wurde der Strang nur bei der Mutation mit G an der Position nach dem Primer durch Einbau des Biotin-dCTP mit Biotin markiert. Nach Bindung von Streptavidin-Gold-Nanopartikeln konnte die gleiche Methode zur Detektion verwendet werden.^[316]

Neben der Ablagerung von Metallen an einen kleinen Metallcluster und der Detektion des entstehenden größeren Clusters ist die Kopplung an chemische Reaktionen eine weitere Methode der Signalverstärkung. In Abbildung 6.6b ist ein solches Beispiel gezeigt.^[317] Dort wird nach der Separation der Probe

ein Silber-Nanopartikel mit Salpetersäure aufgelöst. Die freiwerdenden Ag(I)-Ionen oxidieren Mn(II)-Ionen zu KMnO_4 . Dieses kann durch Reaktion mit Luminol eine Chemilumineszenz erzeugen, welche detektiert wird. Mit dieser Methode wurde ein Detektionslimit von 5 fM (30 Basenpaare Länge) erreicht. In neuen Arbeiten werden die chemischen Reaktionen oft durch Enzyme^[318,319] oder DNA-Aptamere^[320] katalysiert.^[296]

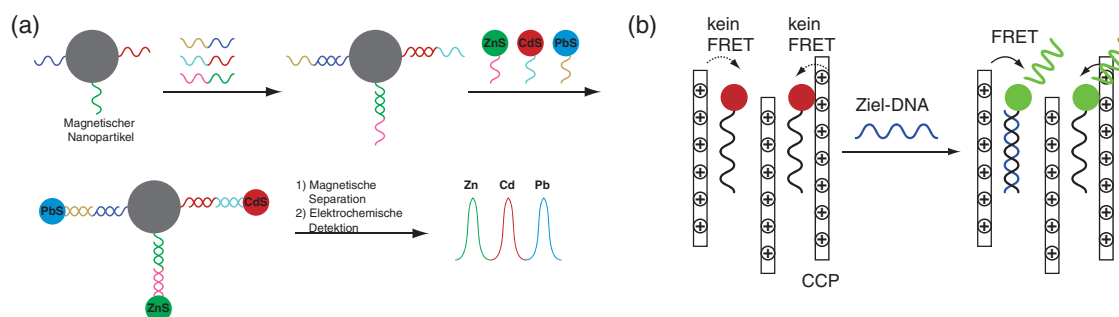


Abbildung 6.7: (a) Elektrochemischer Nachweis von DNA^[321] (b) Detektion von DNA durch Fluoreszenzverstärkung mit kationischen Polymeren.^[322]

Die Freisetzung von Metallionen oder einer anderen redoxaktiven Spezies bei der Detektion von DNA kann auch zur elektrochemischen Detektion von DNA verwendet werden.^[299,300,323] Dabei erlaubt die Chronopotentiometrie auch die parallele Detektion mehrerer verschiedener Metallionen nebeneinander. Dies wurde von Wang *et al.* zur parallelen Detektion mehrerer unterschiedlicher DNA-Proben in einer Messung genutzt (s. Abb. 6.7a). Dazu wurden mit DNA-Proben mit verschiedenen Nanopartikeln (CdS, ZnS, PdS) verschiedene Ziel-DNA-Moleküle hybridisiert und über magnetische Separation gereinigt (s. Abb. 6.7a).^[321] Nach Auflösen der Nanopartikel wurden die unterschiedlichen Ionen detektiert (Detektionslimit 270 pM). Bei Verwendung von Gold-Nanopartikeln mit Metallabscheidung konnte das Detektionslimit für nur eine Spezies auf 2 pM gesenkt werden.^[324] Mit analoger Technik wurden auch mit Ferrocen beladene Nanopartikel erfolgreich zur Detektion von DNA verwendet.^[325]

Eine völlig andere Technik zeigt Abbildung 6.7b. Bei Hybridisierung einer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA mit der Ziel-DNA kommt es durch eine Konformationsänderung in einem Polymer zu einer Fluoreszenzverstärkung. Als Polymer werden kationische konjugierte Polymere (*cationic conjugated polymers* CCP) wie Thiophene,^[322] Phenylene^[326,327] oder Polyphenylvinylene.^[328] Mit diesen Systemen konnten DNA-Konzentrationen von 3 zmol

nachgewiesen werden.^[322] Auch anorganische Materialien wie ZnO können zur Fluoreszenzverstärkung eingesetzt werden.^[329]

Neben diesen sehr speziellen Techniken wurde die „Sandwich“-Methode auch schon auf visuelle Detektionsmethoden übertragen. Bei dem „Dipstick“-Verfahren wird die selektive Bindung von Biotin und Streptavidin direkt mit der Detektion verknüpft. Dazu werden Assays verwendet, welche bei erfolgreicher Detektion die Probe mit Biotin markieren, z.B. durch Einbau von Biotin-dNTPs. Die Proben werden auf eine Membran aufgetragen. Durch Kapillarkräfte bewegt sich die DNA die Membran entlang und bleibt auf einem mit Streptavidin beschichteten Mittelteil der Membran hängen. Als Markierung wurden sowohl in Liposomen eingeschlossene Farbstoffe^[330] oder Gold-Nanopartikel verwendet.^[331,332] Der Farbstoff oder die Aggregation der Nanopartikel sind im beschichteten Bereich der Membran zu erkennen. Diese Verfahren erlauben den Nachweis von 200 fmol.

Die gezeigten Techniken zeigen die enorme Vielfalt der modernen Detektionsmethoden. Allerdings sind sie oft sehr kompliziert und benötigen einen hohen apparativen Aufwand. Die meisten Techniken basieren auf die Abscheidung von Edelmetallen an kleinen Metallclustern. Erst bei der Detektion kommen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. Dabei spielt die Abscheidung von Silber eine wichtige Rolle. Daher soll im folgenden Abschnitt die Abscheidung von Silber an DNA untersucht werden. Diese Technik wird seit langem zur Anfärbung von Gelen verwendet.

6.2. Abscheidung von Silber durch Aldehyde

6.2.1. Silberfärbung von Gelen

Die Anfärbung von Proteinen und DNA in Gelen mit Silber wird seit langem zur empfindlichen Detektion verwendet.^[333,334] In Abbildung 6.8 ist der typische Ablauf dargestellt. So wird das Gel zuerst mit einer Silberlösung behandelt. Dabei lagern sich die Ionen im gesamten Gel und an der DNA oder dem Protein an. Dabei kann es auch schon zur Bildung kleiner Silberkeime durch lokale Reduktion der Silberionen kommen. Im nächsten Schritt wird ein Großteil der überschüssigen Silberionen aus dem Gel herausgewaschen. Erst danach wird durch Zugabe eines Reduktionsmittels die Abscheidung von Silber eingeleitet (Entwickeln). Dadurch wird die DNA oder das Protein auf dem Gel sichtbar. Dieser Prozess muss rechtzeitig gestoppt werden, um die unspezifische Abscheidung von Silber an der Gel-Matrix zu vermeiden.

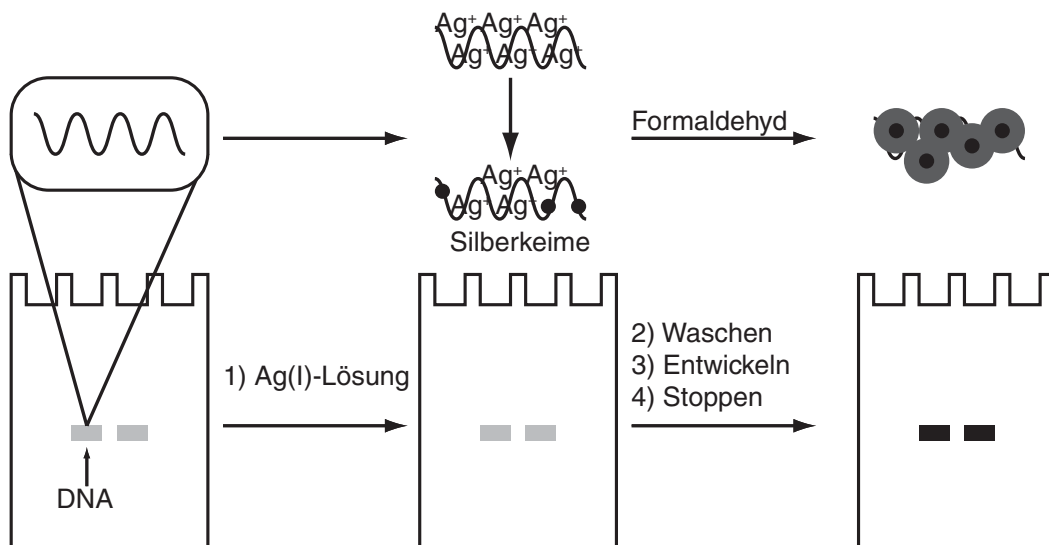


Abbildung 6.8: Prinzip der Silberfärbung von DNA in Gelen.

Seit der Einführung der Silberfärbung zu Beginn der achtziger Jahre wurden unterschiedliche Varianten entwickelt. Zur Erzeugung der ersten Silbercluster wurden die Gele belichtet,^[335–337] mit Formaldehyd/Silbernitrat-Lösungen behandelt^[338] oder Farbstoffe,^[339,340] Detergenzien^[341] oder Kaliumdichromat^[342–344] zugegeben. Die Gele werden entweder vor der Zugabe der Silberlösung mit Essigsäure und danach mit einer alkalischen Silberlösung behandelt, oder die Silberlösung selbst enthält HNO_3 oder Essigsäure. Nach dem Waschen des Gels wird entweder alkalisch mit Natriumcarbonat/Formaldehyd oder sauer mit Zitronensäure/Formaldehyd entwickelt. Gestoppt wird meistens durch Behandeln mit stärkerer Säure (meistens 1 % Zitronensäure). Die besten Protokolle geben Detektionsgrenzen von $1\text{--}10\text{ pg/mm}^2$, d.h. $50\text{--}150\text{ pg DNA an}$.

Alle Methoden zur Abscheidung beruhen auf der Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber. Diese Reaktion, besonders mit Silberhalogeniden, ist wegen ihrer Anwendung in der Photographie sehr gut untersucht.^[345] Mit einem Redoxpotential von 0.8 eV gehören Silberionen zu den am leichtesten zu reduzierenden Metallionen. Das Redoxpotential hängt sehr stark von der Umgebung oder Komplexbildung der Ionen ab. So hat AgBr nur ein Potential von 0.07 eV oder $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ von nur 0.37 eV .^[344] Allerdings ist das Redoxpotential allein nicht die entscheidende Größe. So katalysieren kleine Silbercluster die Abscheidung von weiterem Silber. Diese Eigenschaft wird in der Photographie ausgenutzt. Der Silberbromidkristall in dem sich nach der Belichtung Silber-

cluster gebildet haben (Latenzbild) ist deutlich schneller reduziert als andere Silberbromidkristalle. Analog wird bei der Anfärbung von Gelen versucht, dass sich an der DNA oder Protein bevorzugt kleine Silberkeime bilden. Im Falle von DNA ist das aus mehreren Gründen günstig. So bilden Silberionen wie auch andere Edelmetalle Komplexe mit den Purinbasen.^[346] Bei geringen Konzentrationen kommt es zuerst zu einer Bindung an der N7-Position von Guanosin und Adenosin. Erst bei höheren Konzentrationen spielt die elektrostatische Anziehung der Phosphatgruppen eine Rolle. Allerdings kann eine starke Bindung von Silberionen auch deren Reduktion verhindern. So gibt es auch Verfahren, in denen das Gel ohne Waschen entwickelt wird.^[336] Dann bleiben die Bereiche mit Protein oder DNA im Gel hell, während sich das restliche Gel dunkel färbt. Die Entwicklung des Gels ist immer ein Prozess, welcher stark von der Kinetik der Abscheidung bestimmt wird. Aus diesem Grund sind die Waschschriffe nach der Behandlung mit der Silberlösung sehr wichtig. Sie sorgen dafür, dass nur schwach gebundene Ionen aus dem Gel entfernt werden. Danach entscheidet der verwendete Entwickler über die Geschwindigkeit der Abscheidung. Entwickler aus der Photographie sind für die Anwendung an Gelen viel zu schnell. Der Entwickler muss erst in das Gel hineindiffundieren und darf nicht schon vorher Silber reduzieren. So können die Zersetzung des Gels durch den hohen pH-Wert von ammoniakalischen Silberlösungen^[347] oder Rückstände der verwendeten Radikalstarter^[348] Silberionen binden oder reduzieren und so zu einer starken Hintergrundfärbung führen. Zur Kontrastverstärkung verwenden einige Methoden einen Zwischenschritt mit Natriumthiosulfat, um unspezifisch abgeschiedenes Silber zu entfernen.^[349–352] Die Entwicklung selbst wird in fast allen Fällen mit einer Formaldehydlösung in leicht saurem oder alkalischem Milieu durchgeführt. Der pH-Wert bestimmt nicht nur das Redoxpotential des Formaldehyds sondern auch die Bindung des Silbers an die DNA. Dabei enthält die Entwicklungslösung oft keine zusätzlichen Silberionen. Daher ist bei allen Protokollen die genaue Einhaltung der zeitlichen Abfolge der Wasch- und Färbungsschriffe nötig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

6.2.2. Silberfärbung von Gelen mit Tollens-Reagenz

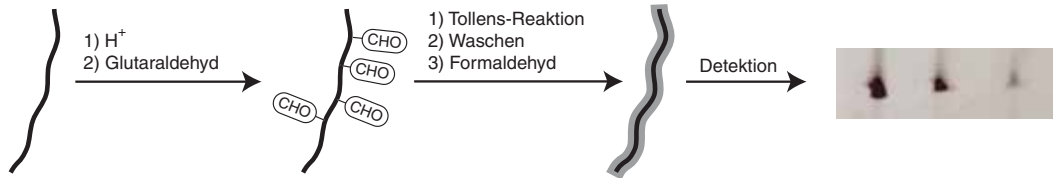
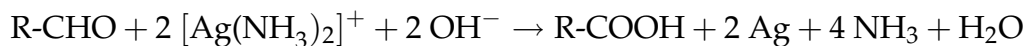


Abbildung 6.9: Silberfärbung von DNA zum Nachweis auf Gelen.

Die chemische Reaktion zur Reduktion von Silber durch Aldehyde basiert auf dem Tollens-Test.^[353] Ein Silber-Ammoniak-Komplex kann bei hohem pH-Wert durch Aldehyde reduziert werden:



Wenn diese Reaktion mit großen Mengen an Aldehyd durchgeführt wird, führt sie zur Abscheidung eines Silberspiegels, d.h. die Bildung von metallischem Silber. Diese Lösung wird auch zur Anfärbung von DNA in Gelen verwendet. Dabei ist interessant, dass bei fast allen Methoden die Gele vorher mit Säure behandelt werden. Meistens wird als Begründung das Herauswaschen von Harnstoff oder Puffer angegeben. Allerdings führt die Behandlung mit Säure bei DNA zur Protonierung der Purine und zur Spaltung der glykosidischen Bindung. Dadurch entstehen in der DNA freie Aldehyde.^[354–356] Es ist wahrscheinlich, dass diese zur Anfärbung der DNA beitragen. Um Aldehydgruppen gezielt einzuführen, wurden schon seit längerem bei Proteinen die Gele mit einer Lösung von Glutaraldehyd (Pentan-1,5-dial) behandelt.^[334] Der Dialdehyd polymerisiert in Lösung durch intermolekulare Aldolreaktion. Das entstehende α, β -ungesättigte Aldehyd-Polymer kann mit freien Aminogruppen reagieren oder als Michaelakzeptor agieren. So kommt in viele kommerziell erhältlichen Kits vor der Tollensreaktionen eine Behandlung des Gels mit einer Lösung von Glutaraldehyd vor. Dies wurde auch schon zur Abscheidung von Silber an DNA zum Aufbau von Nanodrähten eingesetzt.^[4]

6.2.3. Anfärbung von Membranen

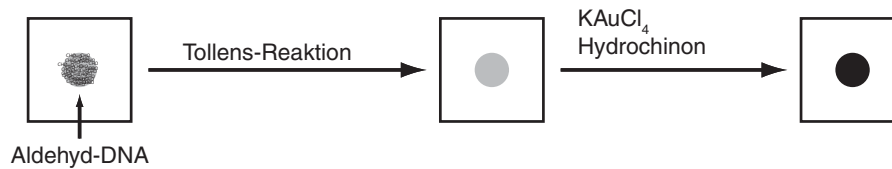


Abbildung 6.10: Nachweis von Aldehyd-DNA auf Membranen mit Gold-Verstärkung.

Eine andere Methode zum Nachweis von mit Aldehyden funktionalisierter DNA (z.B. mit Glutaraldehyd) ist die Verwendung von Membranen (s. Abb. 6.10).¹ Dazu wird die funktionalisierte Aldehyd-DNA auf Nylon-Amin-Membranen immobilisiert und mit Tollens-Lösung behandelt. Zum Entwickeln wird kein weiteres Silber verwendet, sondern an den Silberkeimen Gold abgeschieden. Dazu wird die Membran mit einer Au(III)-Lösung und Hydrochinon behandelt. Die Verwendung von Membranen hat den Vorteil, dass sich nach der Tollens-Reaktion die überschüssigen Silberionen durch Waschen fast vollständig entfernen lassen. Dadurch ist eine bessere Kontrolle der Rahmenbedingungen der Metallisierung möglich. Aus diesem Grund kann Hydrochinon als Reduktionsmittel verwendet werden, ohne dass es zur Anfärbung von natürlicher DNA oder unspezifischer Reduktion kommt. Außerdem ist die Anfärbung auf Membranen deutlich schneller und einfacher durchzuführen.

¹Entwickelt von Prof. Eichen.

6.3. Funktionalisierung von DNA mit Aldehyden

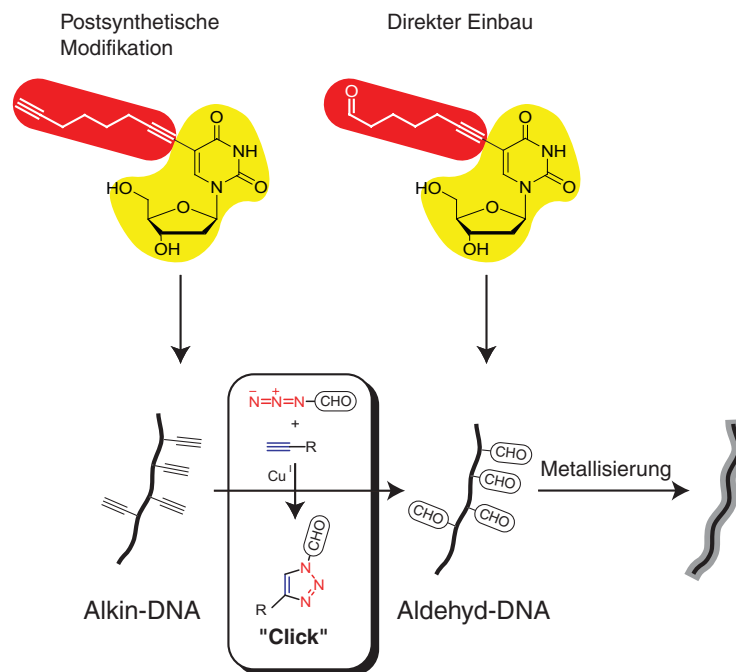


Abbildung 6.11: Funktionalisierung von DNA mit Aldehydgruppen.

Die Anwendung von Glutaraldehyd zur Einführung von Aldehyden an DNA führte zur Frage, ob es auch möglich wäre die Aldehydgruppen selektiv in die DNA einzuführen. Im Rahmen der Arbeit sollte sowohl der direkte Einbau von Aldehyden in DNA durch entsprechend modifizierte Basen, als auch die nachträgliche Funktionalisierung von Alkin-DNA mit Hilfe der „Click“-Reaktion untersucht werden (s. Abb. 6.11).

In den nächsten Abschnitten soll die Synthese von mehreren Monomeren, welche Aldehydgruppen enthalten, vorgestellt werden. Danach wird ihr Einbau in DNA über Festphasensynthese oder PCR behandelt. Im letzten Abschnitt werden die Ergebnisse zur postsynthetischen Funktionalisierung mit Aldehyden über die „Click“-Reaktion gezeigt.

6.4. Direkter Einbau von Aldehydfunktionen in DNA

6.4.1. Schutzgruppen für Aldehyde

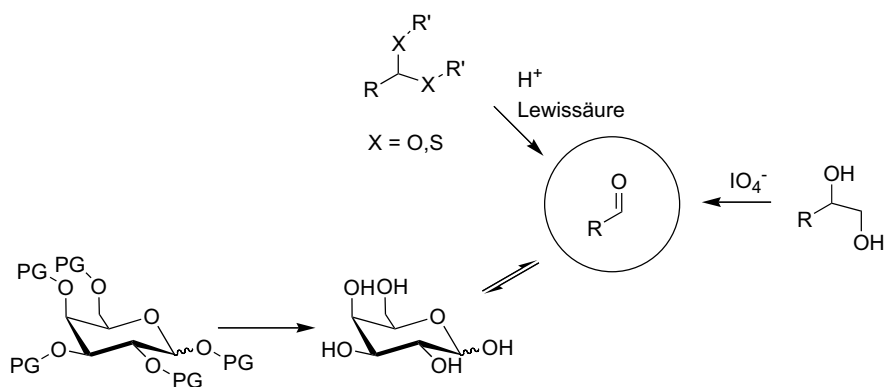


Abbildung 6.12: Verschiedene geschützte Aldehyde.

Für den Einbau in DNA müssen reaktive Aldehyde geschützt werden. In Abbildung 6.12 sind einige Möglichkeiten dargestellt. So lassen sich Aldehyde durch die Spaltung von Diolen mit Periodat an DNA herstellen.^[357–359] Eine andere Möglichkeit ist die Spaltung von Acetalen oder Thioacetalen.^[360] Dafür ist eine Behandlung der DNA mit Säure oder einer Lewissäure nötig. Eine elegante Variante ist die Verwendung von Zuckern. Diese liegen in wässriger Lösung im Gleichgewicht zwischen der offenen Aldehyd- und der geschlossenen Halbace-talform vor. Dadurch ist der Aldehyd vor Nebenreaktionen geschützt. Für die Synthese der Monomere mit Zuckern müssen allerdings die freien Hydroxylgruppen geschützt werden. Dies kann als Acetal oder mit basenlabilen Estern geschehen.

6.4.2. Synthese der Monomere

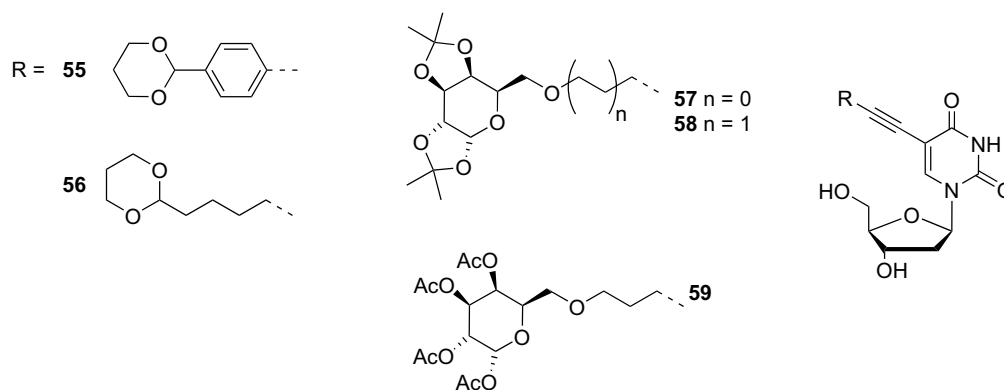
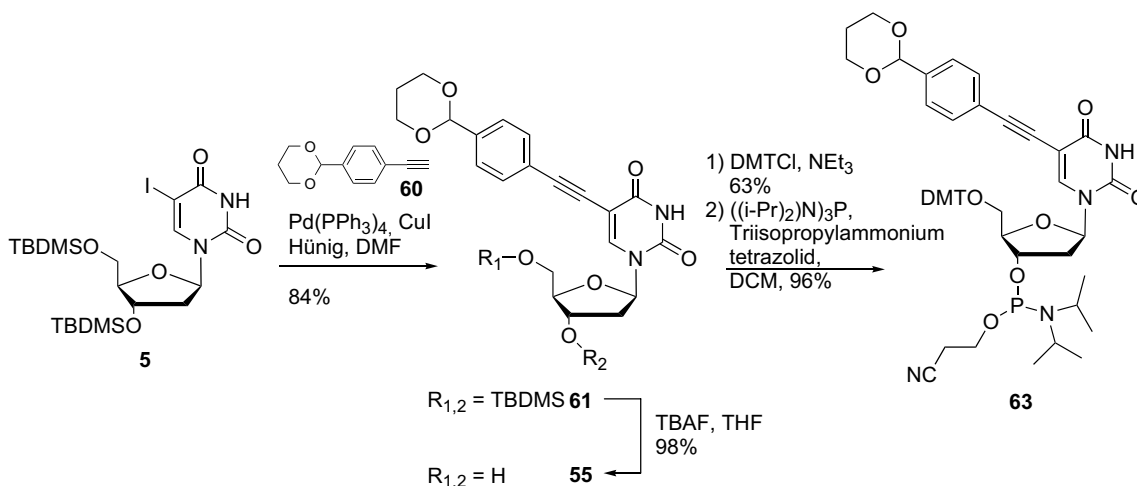
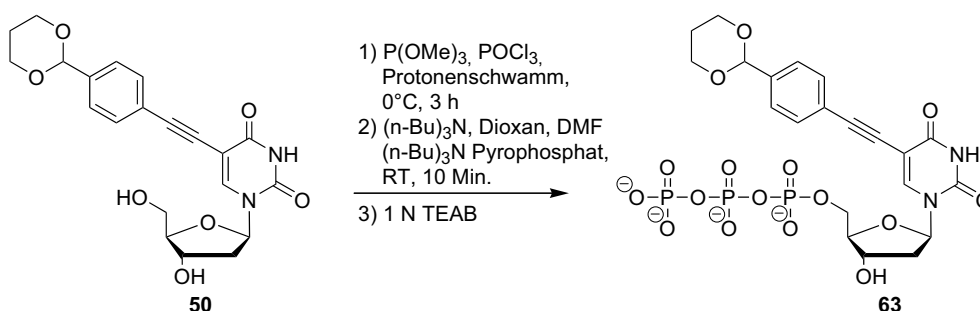


Abbildung 6.13: In dieser Arbeit verwendete Monomere zum direkten Einbau von Aldehyden in DNA.

Wie bei den Alkinen wurden die Aldehyde als modifizierte Thymidine synthetisiert. Als erste Schutzgruppe für den Aldehyd wurde ein zyklisches Acetal verwendet. Um den Aldehyd nach der Freisetzung zu stabilisieren, wurde der aromatische Aldehyd **55** hergestellt. Nach Schwierigkeiten mit dem enzymatischen Einbau dieses Bausteins wurde das aliphatische Acetal **56** von G. A. Burley hergestellt. Ebenfalls als Acetale geschützte Zucker wurden für die beiden Monomere **57** und **58** verwendet. Für diese Modifikation wurden zwei unterschiedliche Kettenlängen als Verbindung zwischen Base und Zucker getestet, da nicht sicher war, wie die Polymerasen die sehr hydrophobe Modifikation akzeptieren würden. Alle diese geschützten Aldehyde müssen durch die Behandlung der DNA mit Säure freigesetzt werden. Um diesen Schritt zu umgehen, wurde von G. A. Burley auch der mit Acetylgruppen geschützte Zucker **59** hergestellt. Da die Tollens-Lösung stark alkalisch ist, entfällt ein separater Entschützungsprozess. Nur **55** wurde in der Festphasensynthese eingesetzt, alle anderen Bausteine wurden ausschließlich als Triphosphate synthetisiert und versucht über die PCR einzubauen.

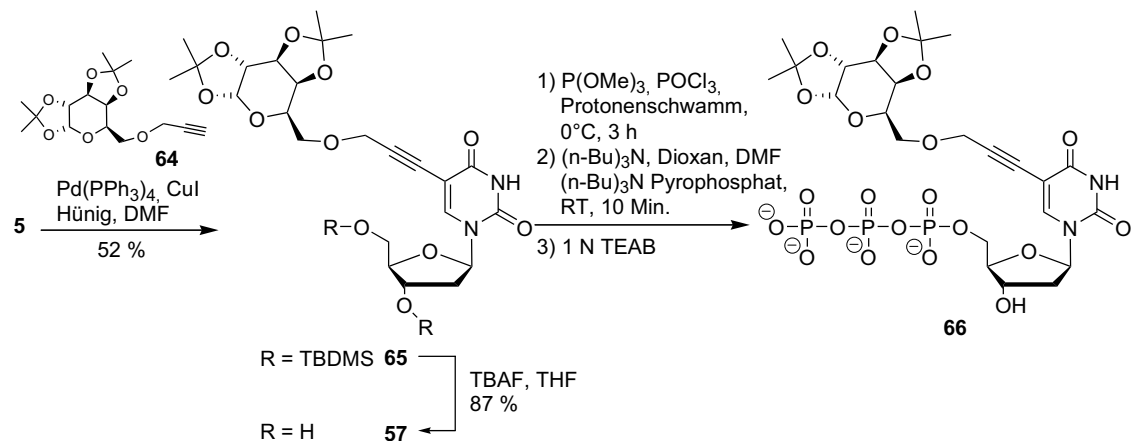
Synthese von 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-2'-desoxyuridin **55**

Das für **55** benötigte 2-(4-Ethynylphenyl)-[1,3]dioxan **60** ist literaturbekannt.^[361] Es wurde in zwei Schritten ausgehend von *para*-Brombenzaldehyd durch Sonogashira-Kupplung mit Trimethylsilylacetylen und anschließender Acetalisierung mit Propandiol synthetisiert. Umsetzung mit 5-Iod-5',3'-*O*-dimethyl-*tert*-butylsilyl-2'-desoxyuridin **5** ergab **61** in guter Ausbeute. Das erhaltene Acetal wurde bereits durch längeres Stehen in Chloroform teilweise gespalten. Nach Entschützung mit TBAF zum freien Nucleosid **55** erhielt man in zwei Schritten das Monomer für die Festphasensynthese von DNA.

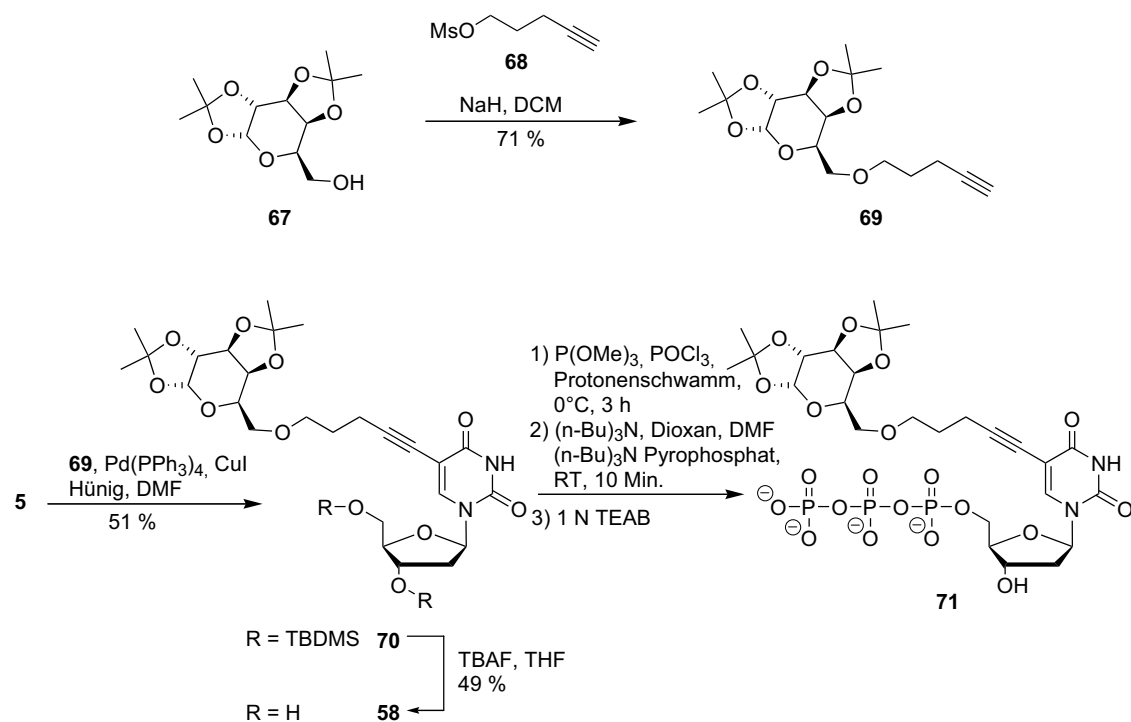


Das Triphosphat **63** wurde zuerst nach der Methode von *Eckstein* hergestellt.^[155] Dabei kam es aber zur teilweisen Spaltung des Acetals. Bei Verwendung der Bedingungen von *Kovács et al.*^[158] kann der Protonenschwamm das freiwerdende HCl abfangen. Das Acetal wurde bei dieser Methode nicht gespalten und das Triphosphat **63** mit intaktem Acetal konnte erhalten werden.

Synthese von 57 und 58



Die für 57 benötigte 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O-(prop-2-ynyl)- α -D-galactopyranose lässt sich durch Alkylierung des kommerziell erhältlichen geschützten Zuckers 67 mit Propargylbromid herstellen.^[362] Kupplung mit 5 und Entschützung mit TBAF ergab das freie Nucleosid 57. Das Triphosphat 66 wurde nach der Methode von Kovács *et al.*^[158] hergestellt.



In Baustein **58** wurde der Abstand zwischen Zuckereinheit und Base verlängert, da der große sterische Anspruch des Zuckers den enzymatischen Einbau stören könnte. Dazu wurde der geschützte Zucker **67** mit **68**, hergestellt aus Pentinol,^[363] alkyliert. Sonogashira-Kupplung und anschließende Entschützung lieferten das freie Nukleosid **58**, welches zum Triphosphat **71** umgesetzt wurde.

Leider scheiterten für beide Monomere Versuche, die Spaltung der Acetale auf der Stufe des Triphosphats durchzuführen. Es trat immer die Hydrolyse des Triphosphates auf. Trotzdem wurde auch für diese Triphosphate der enzymatische Einbau untersucht. Aufgrund der guten Resultate mit **71** wurde das acetylgeschützte Monomer **59** synthetisiert², bei dem die Schutzgruppen am Zucker nicht separat abgespalten werden müssen.

6.4.3. Einbau in DNA

Einbau durch Festphasensynthese

Strang	Sequenz	T_m [°C]
d15	TTTTTXXTTTT	
d16	TTTTTXXTTTT	
d17	GCCGAXGCGC	53.8 (56.5 natürliche DNA)
d18	GCGXATAXATAXTCGC	48.4 (53.7 natürliche DNA)

Tabelle 6.1: Hergestellte DNA-Stränge mit **X** = **55**.

Monomer **55** wurde über Festphasensynthese in kurze Oligomere eingebaut. Die modifizierte Base wurde doppelt gekuppelt und die Kupplungszeiten der folgenden Basen verlängert. Nach der Abspaltung der DNA vom Träger war das Acetal laut MALDI-TOF-Analyse teilweise gespalten. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die saure MALDI-Matrix und die Energie des Lasers zur Spaltung des Acetals geführt haben. In Tabelle 6.1 sind die hergestellten Stränge aufgeführt. Zur Untersuchung der Kupplungsbedingungen wurden die reinen Thymidin-Stränge **d15** und **d16** hergestellt. Der Einfluss der starren hydrophoben Modifikation zeigt sich in den Schmelzpunkten der Sequenzen **d17** und **d18**. So tritt eine deutliche Destabilisierung der DNA auf. Allerdings kann es wegen der Sequenz zu keiner zusätzlichen Stabilisierung der DNA durch π -Wechselwirkungen der Modifikationen kommen.

²von G. A. Burley und D. Hammond

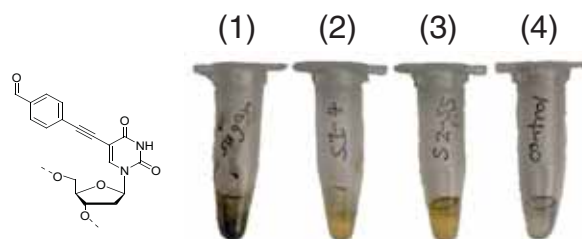


Abbildung 6.14: Silberspiegelprobe (Tollens-Reaktion) mit (1) Coca-Cola (2) **d15** (3) **d16** und (4) normaler DNA.

In einem einfachen Versuch wurden **d15** und **d16** mit Tollens-Reagenz^[353] behandelt (s. Abb. 6.14). Als Positivkontrolle wurde eine kleine Menge Coca-Cola und als Negativkontrolle natürliche DNA verwendet. Wie erwartet bildet sich bei der großen Menge an Zucker im Coca-Cola ein deutlicher Silberspiegel, während die Lösung mit normaler DNA klar bleibt. Bei beiden Aldehyd-DNA-Proben tritt eine leichte Braunfärbung auf. Das zeigt, dass diese DNA freie Aldehyde enthält.

Leider konnte diese positive Reaktion nicht durch selektive Anfärbung auf Gelen wiederholt werden. Durch die höhere Vernetzung der Gele für die kurzen Oligomere ist die Diffusion im Gel stark verlangsamt. Daher ist die Hintergrundmetallisierung dieser Gele sehr hoch. Deswegen war es wahrscheinlich nicht möglich einen deutlichen Unterschied zwischen der Aldehyd-DNA mit nur 2-3 Aldehydgruppen und der starken Anfärbung des Gels selbst zu erkennen. Außerdem kommt es bei hoher Beladung der Gele mit DNA zu einem „inversen“ Anfärben. Dabei bildet sich ein Ring von Silber um die Gel-Bande, während sich im Zentrum kein Silber abscheidet. Durch die große Menge an DNA wird das Silber in diesem Bereich des Gels stärker komplexiert und reagiert daher langsamer. Dadurch ist die Metallisierung der Gelmatrix selbst deutlich schneller. Wahrscheinlich ist die Menge an gespaltenem Acetal pro DNA zu gering, um ausreichend Silberkeime für eine selektive Reaktion zu erzeugen. So reicht ein Aldehyd nur zur Reduktion von 2 Silberatomen aus. Laut Literaturangaben werden zur Bildung eines stabilen Clusters mindestens 4 Atome benötigt.^[345]

Nach diesen Ergebnissen wurde die Anfärbung auf Gelen und die Metallisierung von kurzen Strängen nicht weiter verfolgt, da das eigentliche Ziel der Arbeit die Metallisierung langer DNA war, welche die Synthese via PCR erfordert. Die ersten Tests gaben vor allem Hinweise, dass die Abscheidung von Metallen an DNA durch Aldehyde prinzipiell funktioniert, wenn ausreichend freie Aldehyde vorhanden sind.

Primerverlängerungsreaktionen

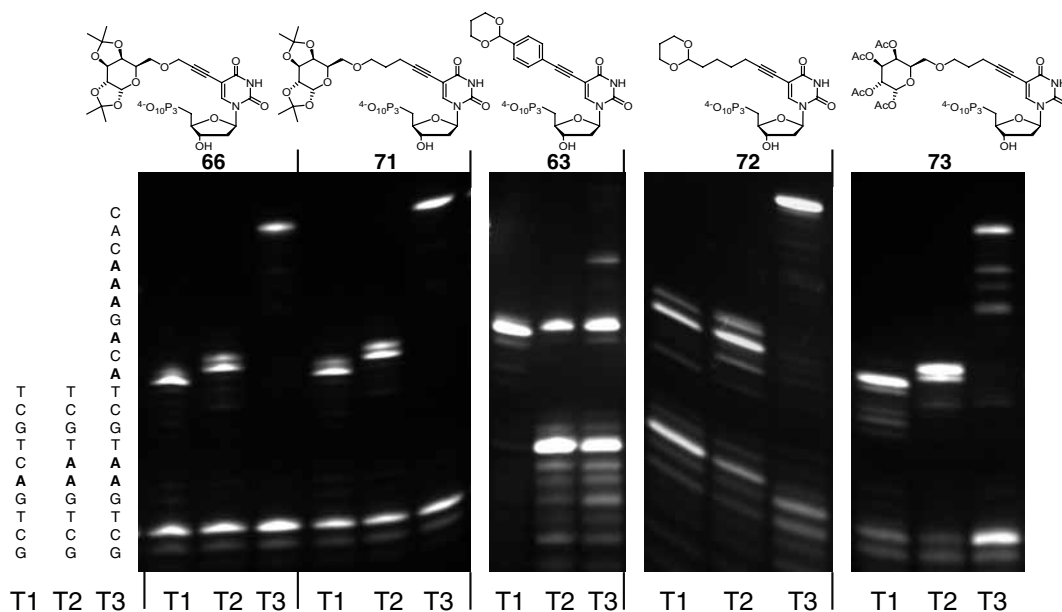


Abbildung 6.15: Primerverlängerungsreaktionen mit **66** und **71** mit Vent *exo*⁻; **63**, **72** (aus Monomer **56**) und **73** (aus Monomer **59**) mit Pwo.

Von allen Aldehydbausteinen wurden die Triphosphate hergestellt und in Primerverlängerungsreaktionen ihre Akzeptanz durch die verschiedenen Polymerasen untersucht. Abbildung 6.15 zeigt einige der durchgeführten Versuche. Bei dem sehr starren Benzaldehydbaustein **63** kommt es bei dem Einbau von zwei Modifikationen hintereinander (T2) zum großen Teil zu einem Abbruch der Verlängerung. Beim Templat T3 kann die Reaktion nicht bis zum Ende des Templats ablaufen. Die oberste Bande ist ein Abbruchprodukt vor dem dreifachen Abbau von **63**. Etwas besser wird **73** angenommen. Bei diesem Triphosphat kommt es zwar auch Abbrüchen bei dem dreifachen Einbau, aber es ist auch das vollständig verlängerte Produkt zu erkennen (oberste Bande). Bei allen Triphosphaten mit hydrophoben Resten kommt es mit mehreren Modifikationen zu einer zunehmenden Verlangsamung der DNA auf dem Gel (siehe T1 und T2 bei **66** und **71**).

Die Tabelle 6.2 fasst die Ergebnisse der unterschiedlichen Polymerasen zusammen. Pwo zeigt guten Einbau für sterisch anspruchslose Modifikationen, hat aber Schwierigkeiten mit großen hydrophoben Resten, wie **66** oder **71**. Die Taq-Polymerase akzeptiert keine der Modifikationen. Dagegen zeigen die Vent *exo*⁻-Polymerasen und KOD XL guten Einbau für alle Triphosphate. Da-

Triphosphat	Pwo	Vent <i>exo</i> ⁻ / Deep Vent <i>exo</i> ⁻	KOD XL	Taq
63	-	+	+	-
72	+	+	+	-
66	o	+	+	x
71	o	+	+	x
73	o	+	+	-

Tabelle 6.2: Ergebnisse der Primerverlängerungsreaktionen für die verschiedenen Triphosphate. (+: guter Einbau; o: Probleme bei T3, aber Produkt erkennbar; -: Probleme bei allen Templaten; x: kein Versuch); Die Vent-Polymerasen zeigten identisches Verhalten für alle Triphosphate.

bei ist noch zu beachten, dass sowohl die eingesetzten Vent-Polymerasen als auch KOD XL Mutanten oder Mischungen ohne Exonukleaseaktivität sind, was meistens zu einer größeren Akzeptanz von Modifikationen führt.

Einbau durch PCR

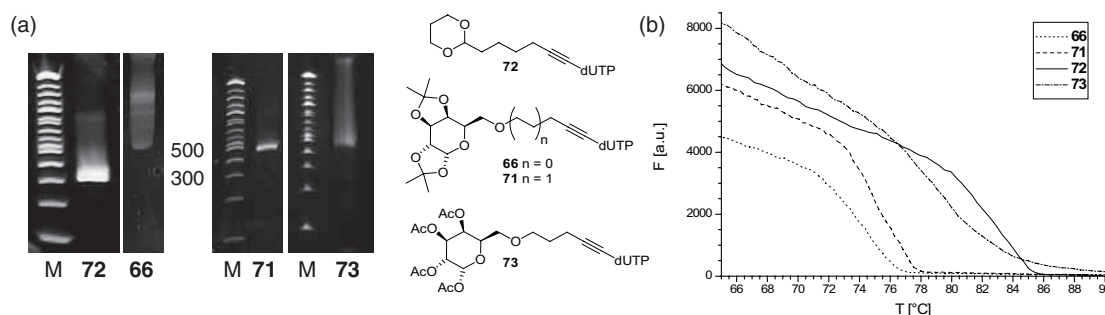


Abbildung 6.16: (a) Gele des 300 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Triphosphaten **72** (Pwo), **66,71** (beide Vent *exo*⁻) und **73** (KOD XL) (b) Fluoreszenzschmelzkurven im jeweiligen PCR-Puffer.

Die synthetisierten Aldehyd enthaltenden Triphosphate sind untereinander um einiges unterschiedlicher als die Triphosphate mit Alkinen und Aziden. Dies spiegelt sich auch in der Akzeptanz dieser Substanzen durch die Polymerasen wider. Das relativ kleine Alkylacetal **72** stellte für alle Polymerasen kein besonderes Problem dar. Es ließ sich in PCR-Produkten bis zu 1000 Basenpaare Länge einbauen. Das 300 Basenpaare lange PCR-Produkt mit **72** wurde mit der gleichen Methode wie die Alkin-DNA sequenziert. Es konnten keine Fehler in der Sequenz nachgewiesen werden.

Die acetalgeschützten Zucker **66** und **71** wurden nicht von allen Polymerasen akzeptiert. Die besten Ergebnisse wurden mit der Vent *exo*⁻-Polymerase erzielt. Die Verlangsamung, die schon in der Primerverlängerung aufgetreten war, war auch bei dem PCR-Produkt sichtbar. Das 300 Basenpaare lange PCR-Produkt läuft im Gel auf der Höhe von 500 Basenpaare langer natürlicher DNA der DNA Leiter (s. Abb. 6.16a). Das Triphosphat **71** mit der längeren Kette ist ein deutlich besseres Substrat. Wahrscheinlich ist bei dem anderen Triphosphat der Abstand zur Polymerase zu kurz. Im Falle des acetylgeschützten Zuckers **59** war nur der Einbau mit der Polymerase KOD erfolgreich. Dazu war noch eine deutliche Verlängerung der Elongationszeit und die Zugabe von 8 % Dimethylsulfoxid nötig. Allerdings konnten für alle diese Triphosphate nur ein PCR-Produkt mit 300 Basenpaaren erhalten werden. Versuche längere Produkte herzustellen, zum Beispiel durch längere PCR-Zyklen oder Zugabe von Additiven, schlugen fehl. Der sehr starre und hydrophobe Rest von Triphosphat **63** verhinderte einen Einbau durch alle getesteten Enzyme. Zwar gibt es eine Arbeit, in der ein ähnlicher Rest an einem 7-Desazaguanosintriphosphat durch PCR amplifiziert wurde, aber multipler Einbau per PCR führte zu einem Verlust der Sequenzinformation.^[258,259] Der Einbau der Triphosphate wurde durch enzymatischen Abbau mit anschließender HPLC-MS überprüft. Alle Acetale waren nach der PCR noch intakt. Bei **73** konnte nur das Monomer ohne Acetylgruppen nachgewiesen werden. Es ist nicht sicher, ob sie während der PCR oder bei dem enzymatischen Abbau abgespalten wurden.

Die verschiedenen Reste haben unterschiedliche Einflüsse auf die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte (s. Abb. 6.16b). Während **72** die DNA sogar stabilisiert (natürliche DNA T_m : 81 °C), erniedrigen die großen hydrophoben Reste von **66** und **71** die Schmelzpunkte der Produkte deutlich (74 °C und 75 °C). Dagegen hat die DNA mit dem hydrophileren Zucker von **73** einen Schmelzpunkt ähnlich dem natürlicher DNA. Das höhere Gewicht der DNA zeigt sich auch in der Mobilität auf dem Gel. Anstatt bei der eigentlichen Länge bei 300 Basenpaaren läuft die DNA mit den schweren Monomeren bei ungefähr 500 Basenpaaren. Wie bereits in Abbildung 6.16 zu sehen, ergeben die Produkte mit den Triphosphaten **71** und **73** sehr inhomogene Banden in Polyacrylamid-Gelen. Es ist nicht klar, ob das ein Effekt der Denaturierung der DNA auf dem Gel oder der Inhomogenität des PCR-Produktes ist. So könnte die Struktur der DNA mit **66** durch die vielen großen Reste stark gestört sein, was auf dem denaturierenden Polyacrylamid-Gel zu einem anteiligen Aufschmelzen der DNA führen könnte. Einzelsträngige DNA läuft im Gel deutlich langsamer als doppelsträngige. Im Falle von **73** könnte eine Reaktion der Zucker mit dem Gel oder dem Puffer die Laufeigenschaft der DNA beeinflussen.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Triphosphaten mit geschützten Aldehyden zeigten einige neue Aspekte der PCR mit modifizierten Triphosphaten. So wurden erneut schmale stabilisierende Monomere mit ähnlicher Struktur wie **72** eindeutig besser eingebaut. Sie erlaubten eine PCR ohne große Optimierung der Bedingungen. Andererseits war es ebenso möglich mit dem hydrophoben Triphosphat **71** ein PCR-Produkt zu erhalten, obwohl es den Schmelzpunkt der DNA deutlich verringert.

Freisetzung der Aldehyde

Das Hauptproblem der Triphosphate mit Acetalen war die Freisetzung der Aldehyde. So ließ die Behandlung von DNA mit **72** mit 5 % Trifluoressigsäure oder 50 % Eisessig mit nachfolgendem enzymatischen Abbau einen Großteil der Monomere intakt. Unter stark sauren Bedingungen kommt es bei DNA zu Depurinierungsreaktionen^[354–356] und damit zur Bildung von freien Zuckern auch an normaler DNA. Deshalb war es nicht möglich mit den acetalgeschützten Monomeren eine selektive Tollens-Reaktion zu erhalten.

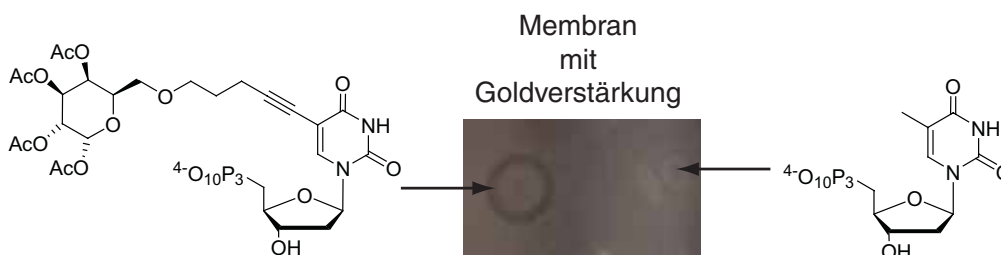


Abbildung 6.17: PCR-Produkt mit Triphosphat **73** und normale DNA auf einer Membran nach Tollens-Reaktion und Goldverstärkung (Abbildung von M. Fischler).

Dagegen gelang die Reaktion mit dem acetylgeschützten Zucker. Abbildung 6.17 zeigt eine Membran, auf der die Zucker-DNA und natürliche DNA mit Tollens-Lösung und anschließender Goldverstärkung behandelt wurde (Versuch durchgeführt von *Monika Fischler*, RWTH Aachen). Die DNA ist deutlich zu erkennen, während die natürliche DNA nicht dunkel anfärbt.

Neben der Anfärbung auf Gelen oder Membranen lässt sich die Abscheidung des Silbers auch mit UV-Spektroskopie verfolgen.^[364–366] So besitzen Nanopartikel entsprechend ihrer Größe spezifische Absorptionen. In Abbildung 6.18 sind zwei Messungen von DNA mit **73** und von natürlicher DNA gezeigt. Dazu wurde zu einer Probe von DNA in Wasser Tollens-Lösung gegeben (1:10

6. Detektion von DNA

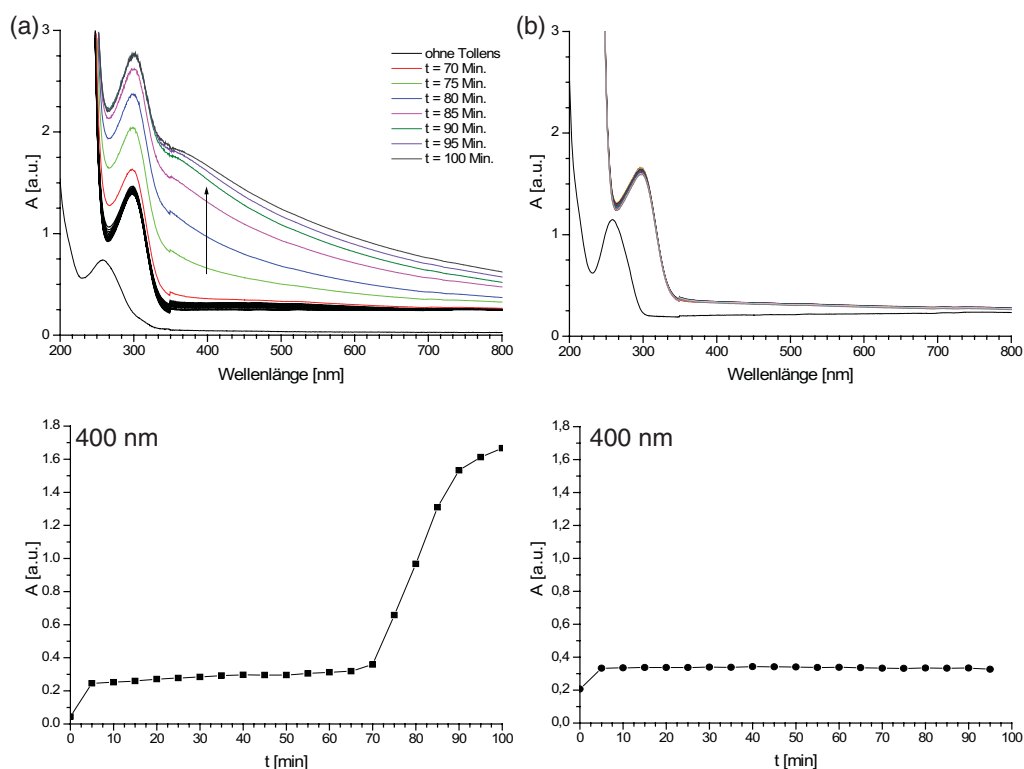


Abbildung 6.18: Verfolgung der Tollens-Reaktion durch UV-Spektroskopie. (a) PCR-Produkt mit **73** (b) natürliche DNA; Oben: UV-Spektren der Probe mit je 5 Minuten Abstand. Das unterste Spektrum ($t=0$ Min.) wurde vor der Zugabe der Tollens-Lösung aufgenommen; Unten: Die Entwicklung der Absorption bei 400 nm.

verdünnt im Verhältnis zur sonst verwendeten Tollens-Reagenz³). Danach wurde für 100 Minuten alle 5 Minuten ein UV-Spektrum aufgenommen. In dem UV-Spektrum vor der Zugabe der Tollens-Lösung ist im Falle der modifizierten DNA die schon bei der Alkin-DNA beobachtete Schulter bei 300-320 nm zu erkennen (s. Abb. 6.18a). Nach Zugabe der Tollens-Lösung ist zuerst eine starke Bande bei 310 nm zu erkennen. Diese stammt aus der Lösung selbst. Der Grund für diese Bande ist nicht klar. So besitzen kleine Silberpartikel erst eine Plasmonresonanz ab 370 nm.^[367] Vielleicht ist es eine Bande des Nitratansions. Diese Absorption verändert sich im Verlauf der Messung allerdings nicht, wie im Spektrum der natürlichen DNA zu sehen ist. Wie bei den Experimenten auf der Membran zeigt natürliche DNA mit Tollens-Lösung keine Reaktion. Bei der DNA mit **73** passiert in den ersten 70 Minuten nach Zugabe der Tollens-Lösung

³Protokoll von C. Wirges

fast gar nichts. Erst nach dieser Zeit setzt eine Zunahme der Absorption über das gesamte Spektrum hinweg ein. Dabei ist die Zunahme im Bereich von unter 220 nm (nicht sichtbar) und im Bereich von 350-400 nm etwas stärker.

Die Absorption im Bereich von 350-400 nm zeigt die Bildung von Silber-Nanopartikeln. Die Breite der Absorption deutet auf die Bildung von größeren Partikeln im Bereich von mehreren 100 nm hin.^[368] So wurden bei Untersuchungen über die Herstellung von Silberpartikeln aus Zuckerlösungen ähnliche UV-Spektren erhalten. Dabei wurde auch eine Abhängigkeit der Partikelgröße von der Ammoniakkonzentration festgestellt. Die hier beobachtete Bande ähnelt mit ihrer breiten Form, den Banden die für hohe Konzentrationen beobachtet wurden. Die Absorption bei 400 nm steigt nach 70 Minuten für 20 Minuten stark an. Das deutet darauf hin, dass der Prozess autokatalytischen Charakter besitzt. Analoges Verhalten wurde auch für Zuckerlösungen beobachtet.^[368] Bei Verwendung von DNA mit acetylgeschütztem Zucker **71** kam es ebenso wie bei natürlicher DNA zu keiner Reaktion.

Die Versuche zeigen, dass die Reduktion von Silber durch Aldehyde in DNA ein selektiver Prozess ist. Die Reaktion der Tollens-Reagenz kann zur Bildung von Silberkeimen verwendet werden. Ähnlich wie bei der Detektion von DNA mit Goldclustern kann an den entstandenen Silberkeimen Gold abgeschieden werden.

6.5. Postsynthetische Funktionalisierung mit Aldehyden

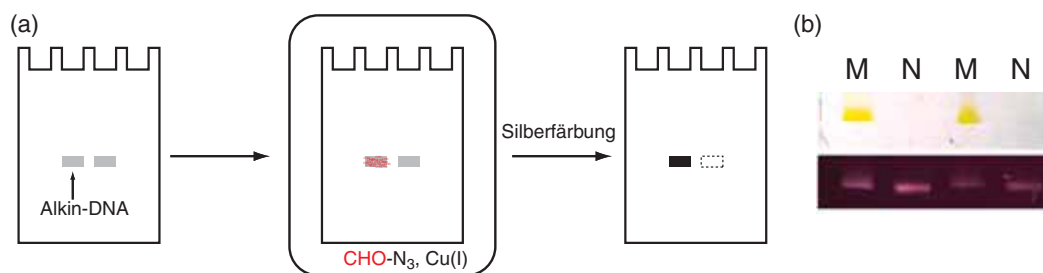


Abbildung 6.19: Detektion von Alkin-DNA **M** (Monomer **10**) mit Hilfe von selektiver Funktionalisierung mit Zuckerazid **44** mit nachfolgender Silberfärbung (rechts) im Vergleich mit natürlicher DNA (**N**); Unten angefärbt mit SYBR Green.

6. Detektion von DNA

Neben dem direkten Einbau kann die DNA auch selektiv mit Aldehyden funktionalisiert werden. Eine mögliche Reaktion dafür ist die bereits vorgestellte kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden. Die Effizienz der Reaktion ermöglicht eine nahezu quantitative Umsetzung der Alkine an der DNA zu Aldehyden.

Zur Detektion der DNA wurde an Gelen mit Alkin-DNA die „Click“-Reaktion mit Zuckerazid **44** durchgeführt (s. Abb. 6.19). Dazu wurden die Gele in eine Lösung mit Kupfersulfat, TCEP und Zuckerazid **44** gegeben und über Nacht geschüttelt. Nach gründlichem Waschen wurde das Gel eine halbe Stunde mit konzentrierter Tollens-Lösung inkubiert. Nach Waschen des Gels mit Wasser wurde es für drei Minuten durch Zugabe einer sauren Formaldehydlösung entwickelt. Der pH-Wert der Entwicklungslösung bestimmte die Geschwindigkeit der Entwicklung. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass der Prozess innerhalb von drei Minuten abgeschlossen war. Danach wurde die Abscheidung von Silber durch Zugabe von 1 %iger Zitronensäure gestoppt. Dabei zeigte sich, dass sich die nun mit Aldehyden modifizierte Alkin-DNA wie erwartet von der normalen DNA unterscheidet. Zwar ist normale DNA bei langer Entwicklungszeit auch sichtbar, aber dieser Prozess ist sehr viel langsamer. In der Abbildung 6.19b ist deutlich Selektivität der Reaktion zu erkennen. Bei gleicher DNA-Menge zeigt die Alkin-DNA die Abscheidung von Silber, während die normale DNA klar bleibt. Auch in Abbildung 6.20 wird der DNA-Marker im Gegensatz zur Alkin-DNA nicht angefärbt.

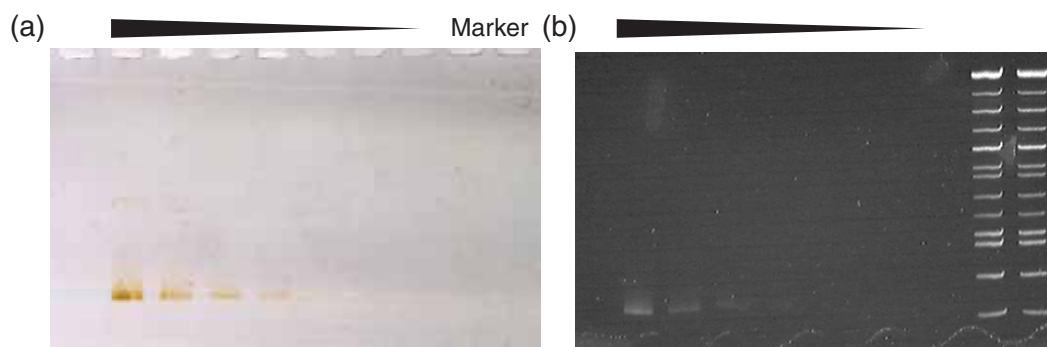


Abbildung 6.20: Empfindlichkeit der Silberfärbung von aldehydmodifizierter Alkin-DNA (Monomer **10**). (a) Gel mit Verdünnungsreihe (Menge an DNA: 7 ng, 3.5 ng, 1.75 ng, 0.88 ng, 0.44 ng, 0.22 ng) nach Silberfärbung (b) Gel identischer Proben gefärbt mit SYBR Green II.

Die Empfindlichkeit der selektiven Metallisierung von DNA zeigt Abbildung 6.20. Bei Verdünnungsreihen der DNA ließen sich DNA-Mengen von unter einem Nanogramm noch deutlich nachweisen. Alkin-DNA, hergestellt mit dem

kurzen Alkin **9**, war nur geringfügig schlechter. Dies bestätigt die Ergebnisse, dass die „Click“-Reaktion auch bei diesem Monomer fast quantitativ ist. Die Empfindlichkeit war vergleichbar mit den publizierten Werten für normale DNA. Durch die Verwendung von Zuckerdendrimeren ließ sich die Empfindlichkeit nochmal steigern.^[369] Das deutet darauf hin, dass Anzahl und Dichte an Aldehyden entscheidend für die Sensitivität der Methode sind.

6.6. Ausblick

Die direkte Inkorporation von Aldehyden in DNA zeigt, dass der entscheidende Faktor die Freisetzung derselben nach der Synthese ist. So sind geschützte Aldehyde als Festphasenbausteine erhältlich. Sie werden zur Funktionalisierung von DNA durch reduktive Aminierung verwendet.^[360] Allerdings werden meistens 5,5-Diethyl-1,3-dioxane eingesetzt, bei denen die Spaltungsreaktion wahrscheinlich deutlich schneller ist. Vielleicht ist es besser von der Acetalspaltung zu anderen (säurefreien) Reaktionen, welche Aldehyde freisetzen, zu wechseln. So wurden schon Diolsplaltungen zur Erzeugung von Aldehyden an DNA verwendet.^[357,359]

Die Silberfärbung der DNA an Gelen ist zwar ein etabliertes Verfahren, aber für den schnellen Einsatz zu kompliziert und schwierig. Auf Membranen sind die Bedingungen der Metallisierung besser zu kontrollieren. Außerdem sollte sich die aldehydmodifizierte DNA mit einigen der eingangs erwähnten Detektionsmethoden kombinieren lassen, z.B. Einsatz von Aldehyd-DNA bei Sandwich-Assays oder Blotting.

Ein weiterer bisher nur ungenügend untersuchter Prozess ist die Bildung der Silberkeime an der DNA. Sie sind der Schlüssel für eine empfindliche und selektive Metallisierung. Es ist bisher nicht bekannt, wie groß unter den gewählten Bedingungen entstehenden Silbercluster sind, noch ob die bisher untersuchte Menge von einem Aldehyd pro Monomer ausreichend ist. So könnte eine höhere Dichte an Aldehyden die Bildung von größeren Silberkeimen begünstigen. Dabei kann die postsynthetische Funktionalisierung der DNA eine wichtige Rolle spielen. Die Alkin-Triphosphate sind gute Substrate für Polymerasen, während die sterisch anspruchsvollen Aldehyd-Triphosphate eine Optimierung der Bedingungen erfordern. Durch die nachträgliche Derivatisierung, z. B. mit Aldehyd-Dendrimeren könnten relativ schnell unterschiedliche Aldehyde untersucht werden. Außerdem können auch andere Modifikationen wie z.B. Cluster-Liganden, Farbstoffe, redoxaktive Proben oder andere detektierbare Markierungen verwendet werden.

7. DNA als Templat zur Abscheidung von Metallen

7.1. Einleitung

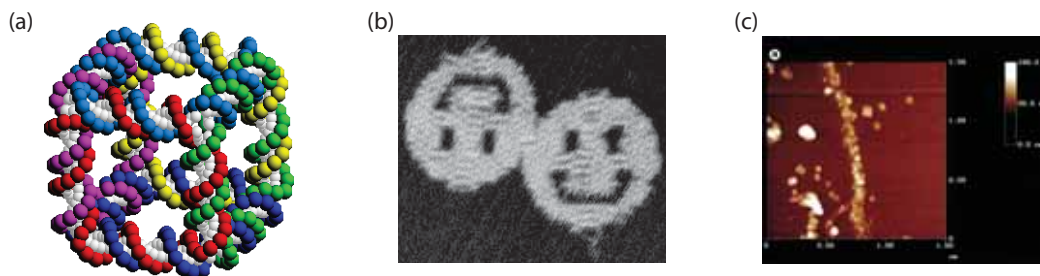


Abbildung 7.1: DNA als Material zum Aufbau von Strukturen (a) der DNA-Würfel von N. C. Seeman (John Wiley & Sons, Ltd. : *Angew. Chem.*, © 1998)^[370] (b) DNA-Origami^[3] (c) DNA als Templat zur Metallisierung (Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, © 1998, 2006).^[371]

DNA als programmierbares und selbstreplizierendes Polymer lässt sich nicht nur zum Speichern der genetischen Information verwenden. Die hohe Spezifität der Basenpaarung dient schon seit geraumer Zeit zum Aufbau selbstorganisierender Strukturen von erstaunlicher Komplexität. Ausgelöst durch den „Würfel“ von N. C. Seeman^[370] folgten bis heute Arbeiten, in denen zum Beispiel die Selbstorganisation der DNA demonstriert wird (s. Abb. 7.1a,b).^[3,372,373]

Zum Aufbau von elektronischen Schaltkreisen aus DNA müssen die Strukturen elektrischen Strom leiten können. Die Leitfähigkeit von natürlicher DNA war lange heftig umstritten. Allerdings gilt heute als sicher, dass unmodifizierte DNA ein Isolator ist.^[374] Braun *et al.* verwendeten 1998 DNA als Templat zum Abscheiden von Silber (s. Abb. 7.1c). Der entstandene Nanodraht war zwar nicht sehr homogen, leitete aber elektrischen Strom.^[371] Danach folgten weitere Arbeiten vieler Gruppen zur Abscheidung von Silber,^[371,375,376] Palladium,^[377–382] Platin,^[383–386] Gold,^[4,387–391] Kupfer,^[392,393] Cobalt^[394] und Nickel.^[395] Neben Metallen diente DNA auch schon als Templat für Halbleiter,^[396–398] Polymere^[399–402] und andere Materialien.^[403–407]

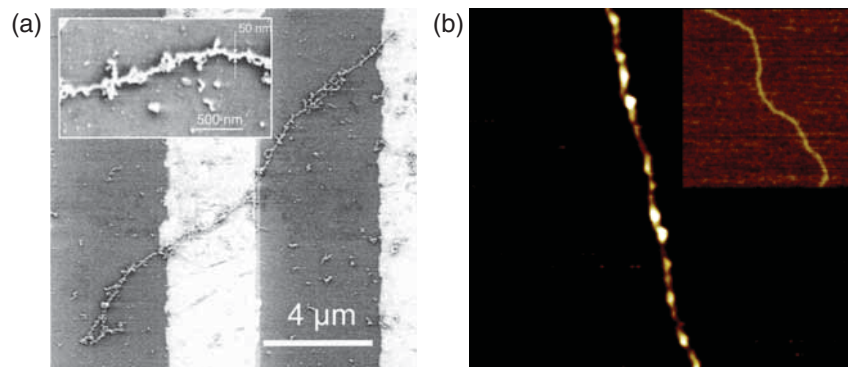


Abbildung 7.2: Metallisierung von λ -DNA mit (a) Palladium (Mit freundlicher Genehmigung von *Appl. Phys. Lett.* © 2001, American Institute of Physics)^[378] (b) Silber (nach Belichtung mit 254 nm, Mit freundlicher Genehmigung von *J. Am. Chem. Soc.* © 2005, American Chemical Society).^[376]

Die Metallisierung der DNA basiert auf ähnlicher Chemie wie bei der Detektion von DNA auf Gelen. So begünstigt DNA als Polyanion die Anlagerung von Metallionen durch elektrostatische Anziehung. Neben Silber bilden noch andere edle Übergangsmetallionen, wie zum Beispiel Platin oder Palladium, stabile Komplexe mit den Heteroatomen der Nukleobasen (z.B. cis-Platin). Nach der Anlagerung werden die Ionen an der DNA reduziert und die entstehenden Cluster katalysieren die weitere Abscheidung von Metall. Die Homogenität des entstehenden Drahtes ist entscheidend für seine spätere Leitfähigkeit. Schon kleine Unregelmäßigkeiten zwischen den Clustern haben einen großen Einfluss, da der ideale Draht die gleichen Eigenschaften wie das reine Metall haben muss.^[382] So erreichten *Richter et al.* mit Palladium-beschichteter DNA mit 50 nm Durchmesser ein Zehntel der Leitfähigkeit von metallischem Palladium (s. Abb. 7.2a).^[378,379]

Die Herstellung von Nanodrähten über die Bindung von Ionen an DNA hat auch Nachteile. So ist die Anlagerung der Ionen an die DNA nicht gesteuert. Dadurch ist auch die Verteilung der reduzierten Cluster entlang der DNA nicht gleichmäßig. Auch müssen die Metallionen mit starken Reduktionsmitteln reduziert werden. Daher kann es ähnlich wie im Gel zu starker Hintergrundmetallisierung kommen. Idealerweise sollte die DNA selbst das Metall reduzieren. So belichteten *Berti et al.* DNA in Silbernitratlösung mit ultraviolettem Licht bei 254 nm.^[376] Dabei konnten sie homogene Metallisierung der DNA beobachten (s. Abb. 7.2b). Jedoch ist noch nicht sicher, ob die DNA dabei als Photosensibilisator agiert oder selbst oxidiert wird.

7. DNA als Templat zur Abscheidung von Metallen

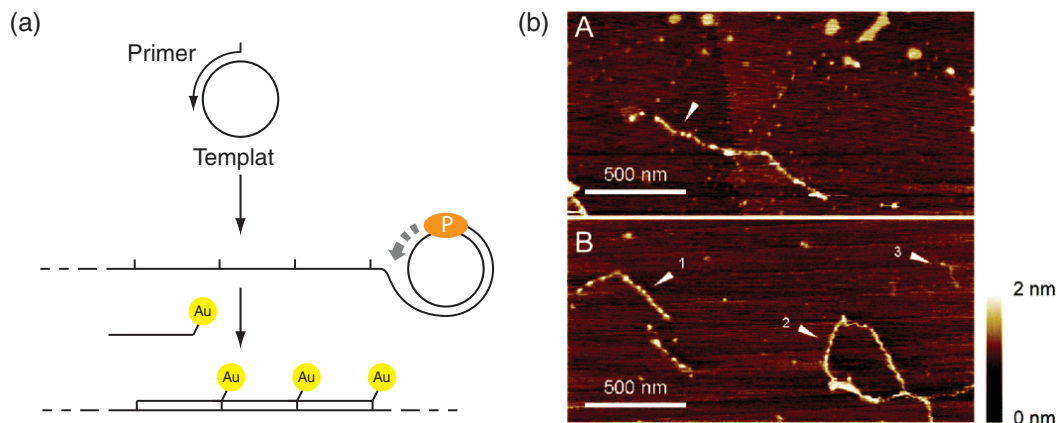


Abbildung 7.3: (a) Herstellung repetitiver DNA durch *rolling circle amplification*^[408] (b) Hybridisierung von RCA-DNA mit Biotin-markierten Einzelsträngen mit anschließender Bedeckung mit Streptavidin-Goldclustern (Mit freundlicher Genehmigung von *Nano Lett.* © 2005, American Chemical Society).^[409]

Gleichmäßige Anordnung von Reduktionszentren wie Metallclustern an DNA kann auch durch Hybridisierung von kurzen clustertragenden Oligomeren an ein einzelsträngiges DNA-Templat erfolgen.^[410] Dazu wurde in mehreren Arbeiten *rolling circle amplification* (RCA) verwendet (s. Abb. 7.3a).^[408,409,411] Dabei wird ein langer Einzelstrang durch wiederholtes Ablesen eines zyklischen Templates hergestellt. Dadurch entsteht ein Strang mit sich ständig wiederholender Sequenz, an den dann kurze Gegenstränge hybridisiert werden können. Die Abbildung 7.3b zeigt die Bildung von Goldclusterketten entlang solcher DNA.^[409] Außer mit RCA kann lange einzelsträngige DNA mit sich wiederholender Sequenz durch eine Telomerase hergestellt werden. Diese Enzyme besitzen einen eigenen Primer und produzieren daher einen DNA-Strang unter dauernder Wiederholung dieser einen Sequenz. Durch Zugabe eines Amino-Triphosphats wurde ein mit Aminen modifizierter DNA-Strang synthetisiert und mit aktivstermodifizierten Goldclustern funktionalisiert.^[290] Wie bei den Detektionsmethoden können solche Cluster zur weiteren Metallisierung genutzt werden.^[412]

Analog zu der Methode auf Gelen wurde auch versucht die DNA mit Aldehydgruppen zu funktionalisieren. So setzten *Keren et al.* Glutaraldehyd zur Einführung der Aldehyde ein. Dabei verwendeten sie auch unterschiedliche Techniken zur Beschränkung der Funktionalisierung, und damit auch der Metallisierung, auf bestimmte Teile der DNA. So wurden mit Glutaraldehyd behandelte DNA-Fragmente mit unbehandelten durch Ligation verknüpft (s. Abb. 7.4). Dadurch konnte DNA mit modifizierten und unmodifizierten Bereichen

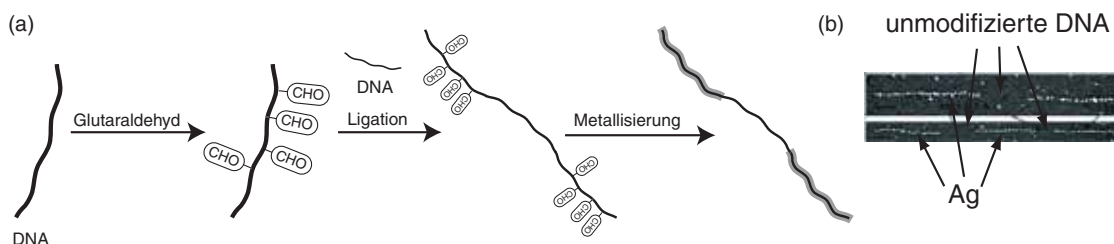


Abbildung 7.4: (a) Einführung von Aldehydfunktionen in DNA durch Reaktion mit Glutaraldehyd. Herstellung von partiell funktionalisierter DNA durch Verknüpfung (Ligation) mit normaler DNA (b) SEM-Bild der Aldehyd-DNA nach Reaktion mit Tollens-Reagenz (Mit freundlicher Genehmigung von *Nano Lett.* © 2004, American Chemical Society).^[387]

erhalten werden. Bei Zugabe von Tollens-Lösung bildeten sich nur in den behandelten Bereichen Silbercluster (s. Abb. 7.4b). Als alternative Technik wurden bestimmte Teile der DNA durch ein DNA-bindendes Protein vor der Reaktion mit Glutaraldehyd geschützt.^[4,387] Auch dadurch war eine selektive Metallisierung der DNA möglich.

7.2. Metallisierung von DNA

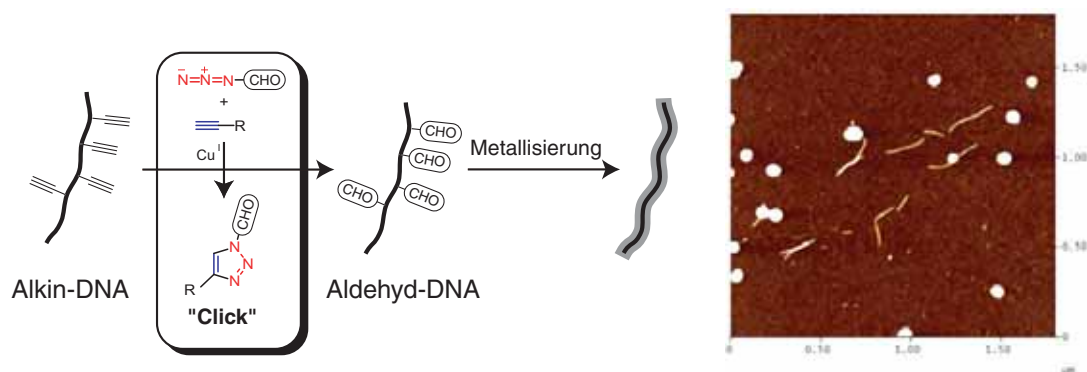


Abbildung 7.5: Verwendung der „Click“-Reaktion zur Einführung von Aldehyden in DNA zur Metallisierung von DNA. (Rechts: AFM-Aufnahmen eines mit Zuckerazid 44 funktionalisierten 900 Basenpaare langen PCR-Produkts (dCTP 49) nach Tollens-Reaktion und Goldentwicklung).^[413]

Wie die Arbeiten von *Keren et al.* zeigen, ist die selektive Metallisierung von DNA durch Einführung von Aldehydgruppen möglich. Allerdings ist die Reaktion mit Glutaraldehyd unselektiv und es ist nicht sicher wie viele Aldehyd-

gruppen an der DNA sind.^[4,387] Bei der Verwendung von DNA aus modifizierten Monomeren wäre es möglich die Dichte an Aldehyden genau zu kontrollieren und so den Prozess der Metallabscheidung besser zu steuern. Da für die Untersuchungen mit AFM oder STM lange DNA benötigt wird, wurde die Funktionalisierung der DNA mit Hilfe der „Click“-Reaktion gewählt (s. Abb. 7.5) Die ersten Arbeiten wurden in der Gruppe um Prof. Eichen (Technion, Israel) durchgeführt. Alle hier gezeigten Experimente wurden von Monika Fischler in der Gruppe von Prof. Simon an der RWTH Aachen entwickelt und durchgeführt.

Das AFM-Bild in der Abbildung 7.5 zeigt ein metallisiertes 900 Basenpaare langes PCR-Produkt (**d19:d22**; Triphosphat **dCTP 49**)^[413] Entsprechend den Ergebnissen aus dem enzymatischen Abbau der anderen PCR-Produkte sollte die Funktionalisierung mit dem Zuckerazid **44** quantitativ sein. Dieses PCR-Produkt enthält dann 352 Zucker pro PCR-Produkt. Die in der Abbildung gezeigten DNA-Proben wurden zuerst mit Tollens-Reagenz behandelt. Danach wurde an den Silberkeimen noch Gold abgeschieden. Die Länge der erhaltenen Drähte liegt bei ungefähr 300 Nanometern, was ungefähr einer DNA dieser Länge entspricht. Die Nanodrähte scheinen recht homogen zu sein. Zur Untersuchungen der Leitfähigkeit waren sie allerdings etwas zu kurz.

Ein unerwartetes Problem bei der Herstellung der Proben stellte das noch in der Probe vorhandene Templatplasmid der PCR dar. Die modifizierte DNA ist deutlich hydrophober als natürliche. Das hatte zur Folge, dass das Plasmid, obwohl nur in sehr geringen Mengen vorhanden, bevorzugt auf der Oberfläche haftete und daher im AFM deutlich zu sehen war. Die Alkin-DNA wurde deswegen vor der Reaktion per Gelelektrophorese gereinigt. Danach wurden durch Gelfiltration die Reste des Gels und der Extraktion entfernt. Mit der erhaltenen DNA wurde die „Click“-Reaktion mit dem Zuckerazid **44** durchgeführt und die DNA durch Fällung mit Ethanol gereinigt.

Für Untersuchungen der Leitfähigkeit wurde das 2000 Basenpaare lange PCR-Produkt (**d19:d24**; Triphosphat **49**) auf gleiche Weise wie das andere PCR-Produkt gereinigt, mit dem Zuckerazid **44** funktionalisiert und in Aachen vermessen. Es wurde für dieses Experiment nur mit Silber beschichtet (s. Abb. 7.6). Der vollständig metallisierte Strang hatte ungefähr die korrekte Länge und war sehr homogen. Dass es sich um DNA handelt, zeigt der Elementnachweis mit EXF. Neben dem deutlichen Silber- und Kohlenstoffsignal, ist auch ein Phosphorsignal zu erkennen.

Um die Leitfähigkeit zu messen wurde die metallisierte DNA mit zwei Elektroden kontaktiert. Leider waren die Untersuchungen zum Ende der Arbeit noch nicht abgeschlossen. Das Aufbringen der beiden Spitzen ist sehr kompli-

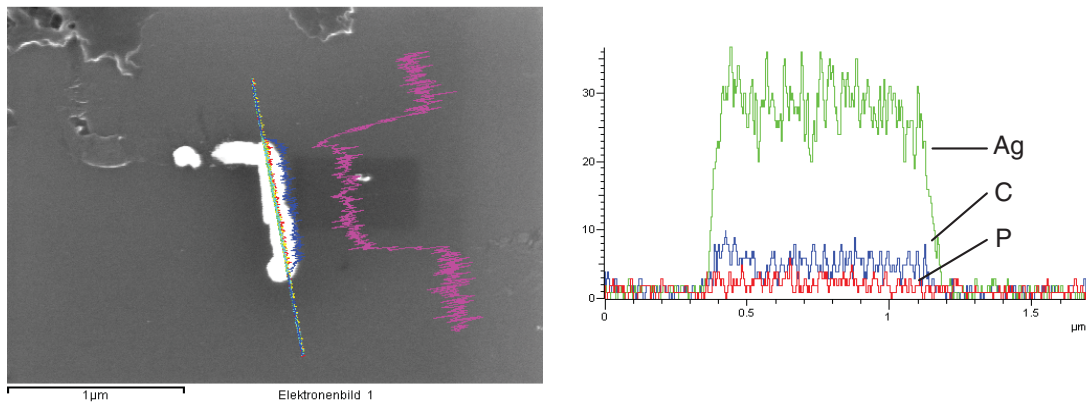


Abbildung 7.6: SEM-Aufnahmen eines mit Zuckerazid **44** funktionalisierten 2300 Basen langen PCR-Produkts (dCTP **49**) nach Tollens-Reaktion und Silberentwicklung mit Elementnachweis (rechts) (Bild von *M. Fischler*).

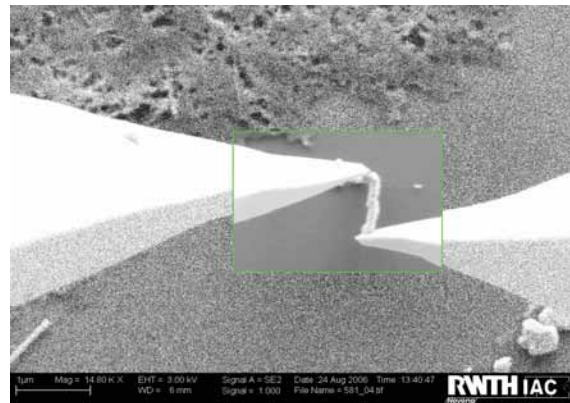


Abbildung 7.7: Kontaktierung der mit Silber metallisierten DNA für Leitfähigkeitsmessungen (Bild von *M. Fischler*).

ziert und schon sehr kleine Abstände zwischen der Elektrode und der DNA können großen Einfluss auf die gemessene Leitfähigkeit haben.

Die Arbeiten zeigen, dass die Einführung von Aldehyden in DNA die Abscheidung von Metall ermöglicht. Die Hintergrundmetallisierung ist gering und die entstehenden Strukturen sind recht homogen. Der nächste Schritt wäre die Konstruktion von Strukturen, welche normale und Aldehyd-DNA enthalten, um die Metallisierung zu steuern.

7.3. Herstellung von partiell modifizierter DNA

Ähnlich wie die selektive Funktionalisierung durch Glutaraldehyd sollte auch versucht werden, DNA herzustellen, welche aus modifizierten und unmodifizierten Bereichen besteht. Für Studien zur Selektivität der Metallisierung besteht das einfachste Konstrukt aus zwei modifizierten Sektionen und einem unmodifizierten Mittelteil. Dadurch wären im AFM oder SEM immer zwei metallisierte Bereiche, getrennt durch einen gleichen Abstand, sichtbar.

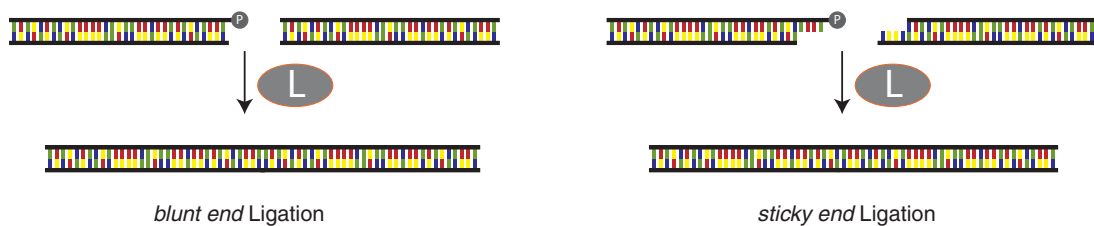


Abbildung 7.8: Prinzip der *blunt end*- und der *sticky end*-Ligation.

Die einfachste Methode zur Verknüpfung von DNA-Doppelsträngen ist die Verwendung von Ligasen (Ligation, s. Abb. 7.8). Diese Enzyme können beliebige DNA-Enden miteinander verknüpfen. Dafür muss mindestens einer der beiden Stränge phosphoryliert sein. Es gibt zwei Arten der Ligation. Bei der *blunt end*-Ligation werden zwei beliebige Enden ohne Überhang verbunden (s. Abb. 7.8). Bei dieser Methode steuert nur die Phosphorylierung, welche Enden ligiert werden können. Im Gegensatz dazu steuern bei der *sticky end*-Ligation kurze einzelsträngige Überhänge, welche DNA-Enden verbunden werden. Da diese Überhänge durch DNA-schneidende Enzyme (Restriktionsenzyme) erzeugt werden können, findet diese Technik breite Anwendung in der Biochemie.

Das Hauptproblem bei Verwendung von Ligation zur Herstellung dieser Konstrukte ist die Effizienz der Reaktion. So ist die Molarität der freien DNA-Enden sehr gering und damit auch die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens zweier passender Enden. Bei den meisten biochemischen Versuchen werden die Produkte nach der Reaktion in Zellen oder durch PCR gezielt amplifiziert. Bei Verknüpfung von DNA aus verschiedenen modifizierten Triphosphaten ist dies nicht möglich.

In ersten Versuchen wurde durch Zugabe von einer Kinase oder durch Verwendung von phosphorylierten Primern versucht verschiedene Stränge über *blunt end*-Ligation miteinander zu verknüpfen. Zwar waren die korrekten Produkte erkennbar aber die Ausbeute der Reaktion war zu gering. Auch die Verwendung von Additiven wie PEG-6000^[414,415] brachte keine Verbesserung.

Eine bessere Steuerung der Ligation kann durch die Verwendung von DNA-Überhängen erreicht werden (*sticky ends*). Allerdings kann modifizierte DNA resistent gegen die benötigten Restriktionsenzyme sein (s. Abschnitt 5.5.3).

Zu anderen Möglichkeiten zur Herstellung von Überhängen in PCR-Produkten gibt es einige Arbeiten. So wurden Monomere, wie Arabinose-Zucker,^[416] Uracile^[417] oder andere,^[418] in die Primer eingebaut, welche die Polymerase nicht prozessieren kann oder welche nach der PCR herausgeschnitten werden können. Ebenso möglich ist das Hybridisieren von PCR-Produkten, welche mit unterschiedlich langen Primern hergestellt wurden.^[419] Dadurch lassen sich zumindest anteilig beliebige DNA-Überhänge herstellen. Als weitere Alternative wurden auch viele chemische Ligationsmethoden entwickelt.^[420]

7.4. Ausblick

Die selektive Metallisierung von DNA ist ein wichtiger Schritt für die Konstruktion von leitfähigen Strukturen aus DNA. Der Einbau von Aldehydfunktionen direkt an die DNA kann dabei helfen die Abscheidung von Metallen auf bestimmte DNA-Bereiche zu beschränken. Wie die verwendeten Ansätze gezeigt haben, gibt es noch viel Spielraum in der Gestaltung der Monomere und Reaktionen. Der direkte Einbau von Aldehyden erfordert die Entwicklung und Synthese von Monomeren, welche gut eingebaut werden und quantitativ Aldehyde freisetzen können. Bei der postsynthetische Funktionalisierung ist die „Click“-Reaktion eine sehr zuverlässige Methode beliebige Funktionen einzuführen.

Unabhängig von der verwendeten Methode zur Einführung der Aldehyde ist die Herstellung von DNA-Konstrukten, welche eine selektive Positionierung von modifizierten Bereichen überhaupt ermöglichen, eine wichtige zukünftige Aufgabe. Die Ligation von mehreren DNA-Fragmenten mit hoher Zuverlässigkeit ist nur ein möglicher Weg. So ist die Kontrolle selbstorganisierender Strukturen aus kurzen, synthetischen DNA-Oligomeren ähnlich dem „Smiley“ schon sehr weit fortgeschritten. So wurden schon regelmäßige DNA-Gitter durch Selbstorganisation eines kreuzförmigen Bausteins hergestellt, der aus ineinander verwobenen DNA-Strängen besteht.^[375] Die erhaltenen breiten Bänder wurden mit Glutaraldehyd funktionalisiert und mit Silber metallisiert. Die Konstrukte zeigten eine gute Leitfähigkeit. Vielleicht ist auch durch die Hybridisierung von modifizierten und unmodifizierten kurzen synthetischen Einzelsträngen eine Herstellung von partiell funktionalisierten Strukturen möglich.

8. Experimenteller Teil

8.1. Material und Methoden

CD-Spektren (Zirkulardichroismus-Spektren) von DNA-Doppelsträngen wurden mit einem *J 810* Spektralphotometer der Firma *Jasco* und einem *CDF 426 S Temperature Controller* aufgenommen. Es wurden geschwärzte Küvetten der Firma *Helma* mit einem Innendurchmesser von 4 mm, einer Schichtdicke von 10 mm mit einem Gesamtvolumen von 100 μL verwendet. Vor oder nach jeder Messung wurde eine Leermessung mit dem verwendeten Puffer aufgenommen und von der Messung abgezogen.

Dünnschichtchromatogramme (DC) wurden mit Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck* (*Kieselgel 60 F₂₅₄*-Dünnschicht, 5 cm \times 10 cm) durchgeführt. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit Anisaldehyd-Tauchreagenz^[421] (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL Schwefelsäure, Platte auf 100 °C erwärmen) sichtbar gemacht.

Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden bei 260 nm wurden aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide (dA 15.2 L mmol⁻¹ cm⁻¹, dC 7.1 L mmol⁻¹ cm⁻¹, dG 12.0 L mmol⁻¹ cm⁻¹, dT 8.4 L mmol⁻¹ cm⁻¹), berechnet. Für die modifizierten Monomere wurde der Koeffizient von T angenommen.

HPL-Chromatographie wurde auf einer *Merck-Hitachi-Anlage* (L-7400 UV-Detektor, L-7480 Fluoreszenzdetektor, L-7100 Pumpe) oder Anlagen von *Waters* (*Alliance 2695* mit *Photo Diode Array 2996* oder *996* und Fluoreszenz-Detektor *2475*; Präparative HPLC *1525EF* mit *2484* UV-Detektor) durchgeführt. Für analytische Umkehrphasen-Trennungen wurden *CC Nucleosil 100-5 C18* oder *CC Nucleosil 100-3 C18* (*CC Nucleodur 100-3 C18ec*)-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Präparative Oligonukleotidtrennungen wurden mit *VP250/10 Nucleosil 100-5 C18*-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* durchgeführt. Triphosphate wurden über eine *VP250/21 Nucleosil 100-7 C18* mit einer Vorsäule *VP50/21* aus dem gleichen Material getrennt.

Infrarot-Spektren (IR) wurden von KBr-Presslingen (ca. 1 mg Substanz auf 300 mg KBr) oder als Film zwischen NaCl-Platten mit einem *Bruker IFS 88* bzw. *Bruker IFS 25* Spektrometer aufgenommen. Die Lage der Banden wird in cm^{-1} angegeben; die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *ss* (sehr stark), *s* (stark), *m* (mittel) oder *w* (schwach) vermerkt.

^1H -Kernresonanzspektren (^1H -NMR) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AMX 200*, *Varian Mercury 200VX*, *Bruker ARX 300*, *Varian VXR400S*, *Varian Inova 400*, *Bruker DRX 500* sowie *Bruker ARX 600* aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz sowie das Lösungsmittel vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das entsprechende Lösungsmittelsignal CHCl_3 ($\delta = 7.26$) in CDCl_3 , DMSO ($\delta = 2.50$) in DMSO-d_6 sowie HDO ($\delta = 4.65$) in D_2O als interne Referenz dient.^[422] Die Kopplungskonstante J ist in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden mit den Symbolen *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplet), *q* (Quartett), *m* (Multipllett), sowie ggf. deren Kombinationen gekennzeichnet. Breiten Signalen wurde das Symbol *b* vorangestellt. Die Signalzuordnungen wurden in der Regel unter Zuhilfenahme von COSY-Spektren durchgeführt.

^{13}C -Kernresonanzspektren (^{13}C -NMR) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AC 200*, *Bruker ARX 300*, *Varian VXR400S*, *Varian Inova 400*, *Bruker DRX 500* sowie *Bruker AMX 600* protonenentkoppelt aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen im MHz sowie das Lösungsmittel vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu TMS angegeben, wobei das entsprechende Lösungsmittelsignal CHCl_3 , ($\delta = 77.00$) in CDCl_3 bzw. DMSO ($\delta = 39.50$) in DMSO-d_6 als interne Referenz dient. Die Peakzuordnungen wurden per Inkrementrechnung, oder wenn nötig, mit Hilfe von APT-, HSQC- oder HMBC-Spektren durchgeführt.

^{31}P -Kernresonanzspektren (^{31}P -NMR) wurden bei Raumtemperatur auf den Geräten *Bruker AMX 200* oder *Varian Mercury 200VX* aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz sowie das Lösungsmittel vermerkt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu 85 % H_3PO_4 angegeben, welche als externer Standard dient.

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in den kommerziell erhältlichen Qualitäten *puriss.*, *p. a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Acros*, *Sigma* oder *Merck* bezogen. THF

wurde über K, CH₂Cl₂ über CaH₂, Toluol über Na und MeOH über Mg getrocknet und destilliert bzw. trocken von den Firmen *Fluka*, *Aldrich* oder *Acros* bezogen. Einengen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde mit einem Rotationsverdampfer *VV 2000* der Firma *Heidolph* am Membranpumpenvakuum durchgeführt. Reaktionsprodukte wurden mindestens acht Stunden am Hochvakuum (10⁻²–10⁻³ mbar) getrocknet. Kleinere Mengen wässriger oder alkoholischer Lösungen wurden auch mit einer *SpeedVac Plus SC110A* der Firma *Savant* am Ölpumpenvakuum eingengt. Wässrige Proben wurden in Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (*Christ ALPHA 2-4*)

Massenspektren (MS, HRMS): EI-Massenspektren wurden auf den Spektrometern *MAT CH7A* oder *MAT90* der Firma *Varian* aufgenommen. Für FAB-Massenspektren in Niedrig- und Hochauflösung wurde ein *Finnigan MAT95*-Massenspektrometer verwendet. Messungen von ESI-Massenspektren in Niedrig- und Hochauflösung wurden mit einem *Finnigan MAT95S*, *JEOL JMS-700* oder *PE ScieX API QStar Pulsar i*-Massenspektrometer durchgeführt. (Probenkonzentration ca. 10⁻⁵ M in MeOH oder MeCN). FTICR-Massenspektren wurden auf einem *Finnigan LQ ICR* aufgenommen. Die Polarität der gemessenen Ionen wird zusammen mit der Methode angegeben. Die Masse der detektierten Ionen wird in Abhängigkeit zur Ionenladung in der Form $\frac{m}{z}$ und die relativen Signalintensitäten bezogen auf das größte Signal in % angegeben. MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Bestimmung der Masse von Oligonukleotiden wurde mit einem *Bruker Autoflex II*-Spektrometer unter Verwendung einer Hydroxypicolinsäurematrix (HPA, 25 mg 3-Hydroxypicolinsäure, 5 mg Ammoniumcitrat und 5 μ L 15-Krone-5 in in 0.5 mL Wasser) durchgeführt. Für kleine Moleküle wurde auch mit 6-Aza-2-thiothymin (ATT, 14 mg auf 100 μ L H₂O:MeCN) als Matrix gemessen. Die Angabe der Messwerte erfolgt ebenfalls in der Form $\frac{m}{z}$.

Oligonukleotidsynthese wurde auf einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. *Ultramild*[®]-Phosphoramidite und das CPG-Trägermaterial für die DNA-Synthese wurden von *Glen Research* bezogen. Als Lösungsmittel für die Phosphoramidite und den Aktivator wurde Acetonitril mit einem Wassergehalt von 0.1 ppm verwendet. Die verwendeten Syntheseprotokolle werden in Abschnitt 8.6 und in Anhang A.1 erläutert. Nach Abspaltung vom Träger, Entschützung unter basischen Bedingungen und Reinigung mittels HPLC wurden die Massen der Oligonukleotide durch MALDI-TOF-

Massenspektrometrie gemessen und mit dem theoretischen Wert verglichen.

Säulenchromatographie wurde mit *Kieselgel 60* der Firma *Merck* durchgeführt. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Anwendung eines N₂-Überdrucks von 0.2–0.5 bar.

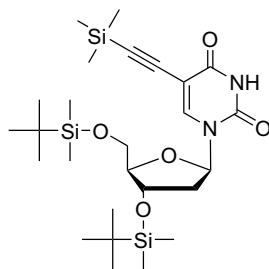
Schmelzkurven von Oligonukleotidkomplexen wurden mit einem *Cary 100 Bio* Spektralphotometer mit *Cary Temperature Controller*, *Sample Transport Accessory* und *Multi Cell Block* der Firma *Varian* ermittelt. Der Temperaturgradient betrug 0.5 °C/min. Es wurden in der Regel fünf aufeinanderfolgende Messungen im Temperaturbereich 85 °C → 0 °C und 0 °C → 85 °C bei 260 nm sowie 320 nm durchgeführt. Die Messung der Temperatur erfolgte in einer Referenzküvette. Der Probenraum wurde während der Messung mit Stickstoff gespült. Für die Messungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, Küvetten mit 4 mm Innendurchmesser und 10 mm Schichtdicke der Firma *Helma* verwendet. In der Regel wurden die Schmelzkurven mit DNA-Konzentrationen von 3 µM in wässrigen Lösungen mit NaCl (150 mM) und Tris/HCl, pH=7.4 (10 mM) bestimmt. Die Proben in den Küvetten wurden mit Dimethylpolysiloxan überschichtet. Zur Auswertung wurden mit Hilfe von *Microcal Origin* die fünf temperaturabhängigen Absorptionskurven bei 260 nm gemittelt. Von der erhaltenen Kurve wurde die gemittelte temperaturabhängige Hintergrundmessung bei 320 nm abgezogen. Schmelzpunkte (T_m) von Oligonukleotiden ergeben sich aus dem Nulldurchgang der geglätteten zweiten Ableitung der Schmelzkurve eines Oligonukleotiddoppelstrangs.

UV-Spektroskopie zur Quantifizierung von Oligonukleotiden wurde auf einem *Varian Cary 100 Bio* Spektralphotometer durchgeführt. Die Lösungen wurden im Konzentrationsbereich $0.5 \leq OD_{260} \leq 1.0$ bei 80 °C gemessen. Vom Messwert bei 260 nm wurde der Nullwert bei 320 nm abgezogen und die DNA-Konzentration mit Hilfe des errechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt.

8.2. Synthese der Alkinmonomere

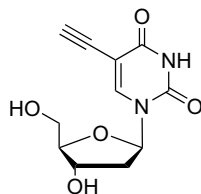
8.2.1. Synthese von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (6)

5-(2-Trimethylsilylethynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin (6)



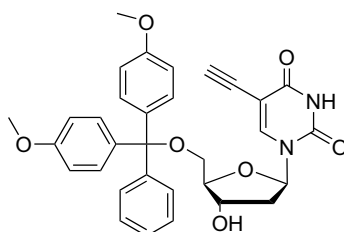
Zu einer entgasten Lösung von 5-Iod-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **5** (1 g, 1.72 mmol), Kupfer(I)-iodid (65 mg, 0.34 mmol, 0.2 eq) und Pd(PPh₃)₄ (199 mg, 0.17 mmol, 0.1 eq) in DMF (5 mL) wurde Hünig-Basis (366 µL, 2.15 mmol, 1.25 eq) gegeben und die Lösung erneut entgast. Dazu wurde entgastes Trimethylsilylethin (146 µL, 2.06 mmol, 1.2 eq) über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktion aufkonzentriert und Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser und zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan:Ethylacetat 5:1 → Ethylacetat) ergab **6** als weißen Schaum (635 mg, 1.14 mmol, 67 %).

$R_f = 0.52$ (Isohexan:Ethylacetat 1:1). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.07$ (s, 3 H, SiCH₃), 0.08 (s, 3 H, Si(CH₃)), 0.14 (s, 3 H, SiCH₃), 0.15 (s, 3 H, SiCH₃), 0.22 (s, 9 H, Si(CH₃)₃), 0.89 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.93 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 2.01 (ddd, 1 H, $J = 13.4, 7.8, 5.9$ Hz, C2'H), 2.31 (ddd, 1 H, $J = 13.1, 5.7, 2.4$ Hz, C2'H), 3.76 (dd, 1 H, $J = 11.4, 2.1$ Hz, C5'H) 3.90 (dd, 1 H, $J = 11.4, 2.3$ Hz, C5'H), 4.44-4.38 (m, 1 H, C4'H), 6.28 (dd, 1 H, $J = 7.8, 5.8$ Hz), 7.96 (s, 1 H, C6H), 8.39 (s, 1 H, NH). ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.5$ (SiCH₃), -5.1 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), -0.1 (Si(CH₃)₃), 18.0 (SiC(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 26.1 (SiC(CH₃)₃), 42.1 (C2'), 63.0 (C5'), 72.5 (C3'), 85.9 (C1'), 88.4 (C4'), 95.4 (C ≡ C-Si(CH₃)₃), 99.6 (C ≡ C-Si(CH₃)₃), 100.3 (C5), 142.8 (C6H), 149.0 (C2) 161.0 (C4). HRMS (FT-ICR⁺, M + H⁺): ber. für [C₂₆H₄₉N₂O₅Si₃]⁺: 553.2944 gef. 553.2945.

5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (9)^[143]

6 (1.27 g, 2.26 mmol) wurde in THF (15 mL) gelöst und TBAF (7.2 mL, 1 M in THF, 3.2 eq) zugegeben. Die Reaktion wurde drei Stunden gerührt. Nach vollständigem Umsatz (3 h, DC-Kontrolle) wurden drei Tropfen Eisessig zugegeben und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (CHCl₃:MeOH 10:1 → 5:1) ergab **9** als weißes Pulver (456 mg, 1.81 mmol, 80 %).

$R_f = 0.37$ (CDCl₃:MeOH 5:1). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.34$ -2.51 (m, 1 H, C2'H), 2.59 (ddd, 1 H, $J = 13.6, 6.3, 4.8$ Hz, C2'H), 3.37 (s, 1 H, C \equiv CH), 3.99 (dd, 1 H, $J = 12.1, 2.6$ Hz, C5'H), 4.11 (dd, 1 H, $J = 11.9, 2.7$ Hz, C5'H), 4.23-4.28 (m, 1 H, C4'H), 4.77-4.82 (m, 1 H, C3'H), 6.60 (t, 1 H, $J = 6.3$ Hz, C1'H), 7.89 (s, 1 H, C6H), 8.73 (s, 1 H, NH).

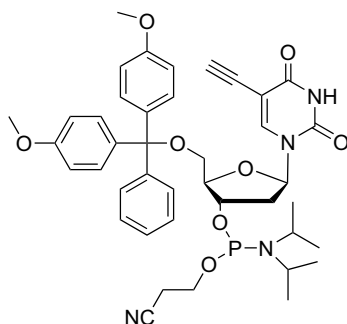
5-Ethynyl-5'-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin (75)^[145]

9 (477 mg, 1.89 mmol) wurde in Pyridin (20 mL) gelöst und die Lösung über Molsieb (4Å) drei Stunden gerührt. Danach wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (769 mg, 2.27 mmol, 1.2 eq) und eine katalytische Menge DMAP zugegeben. Die Reaktion wurde 16 Stunden gerührt und danach mit Chloroform verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (CHCl₃:MeOH:Pyridin 40:1:0.2 → 20:1:0.2) ergab **75** als weißen Feststoff (678 mg, 1.22 mmol, 63 %).

$R_f = 0.26$ (CHCl₃:MeOH 40:1). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.38$ -2.19 (m, 1 H, C2'H), 2.53 (ddd, 1 H, $J = 13.7, 5.9, 3.0$ Hz, C2'H), 2.89 (s, 1 H, C \equiv CH),

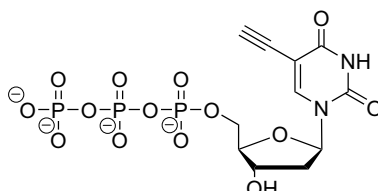
3.38 (m, 2 H, C5'H), 3.78 (s, 6 H, OCH₃), 4.10-4.12 (m, 1 H, C4'H), 4.54-4.57 (m, 1 H, C3'H), 6.29 (dd, 1 H, J = 7.2, 6.0 Hz, C1'H), 6.76-6.97 (m, 4 H), 7.38-7.17 (m, 9 H), 8.08 (s, 1 H, C6H), 9.34 (bs, 1 H, NH).

5-Ethynyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphono)-2'-desoxyuridin (15**)^[145]**



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **75** (500 mg, 0.90 mmol) in trockenem Dichlormethan (10 mL) wurde Triisopropylammonium tetrazolid^[147] (169 mg, 0.99 mmol, 1.1 eq) und 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit^[146] (755 µL, 2.38 mmol, 2.6 eq) gegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (deakt. Si, Dichlormethan mit 2 % MeOH und 1 % Pyridin und anschließend Isohexan mit 35 % Ethylacetat → 1:1) Man erhielt **15** als klaren Film (284 mg, 0.23 mmol, 38 %).

$R_f = 0.14$ (Dichlormethan mit 2 % MeOH und 1 % Pyridin); ³¹P-NMR (80.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 149.5, 150.0$; MS (MALDI-TOF⁺, [M+Na⁺]⁺): 777.5.

5-Ethynyl-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (21)^[158]

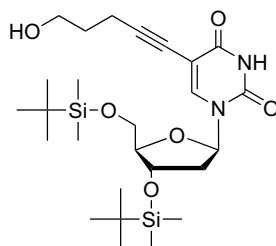
Synthese nach *Eckstein*:^[155]

5-Ethynyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin¹ **76** (29.42 mg, 100 μmol) wurde in 2 mL Pyridin gelöst und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der trockene Rückstand wurde in Pyridin:Dioxan (100 μL : 300 μL) gelöst und 2-Chloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on **74** (100 μL , 1 M in DMF) zugegeben und die Reaktion 10 Minuten gerührt. Danach wurde eine Lösung von Pyrophosphat (0.5 M in Tri-*n*-butylamin:DMF 3:1) zugegeben. Es fiel ein Feststoff aus, der sich sofort wieder löste. Nach 20 Minuten wurde Iod-Lösung (2 mL, 1 % I_2 in Pyridin:H₂O 98:2) zugegeben und nach weiteren 15 Minuten wurde das überschüssige Iod mit NaHSO₃-Lösung (5 % in Wasser, 28 Tropfen) reduziert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 3 mL Wasser aufgenommen. Nach einer halben Stunde wurden 6 mL konzentrierte Ammoniak-Lösung zugegeben und nach einer weiteren Stunde das überschüssige Ammoniak im Hochvakuum entfernt und die restliche Lösung lyophilisiert. Reinigung mit DEAE Sephadex (TEAB 0.1M \rightarrow 1 M; Produkt bei 0.5) ergab **21** als Triethylammoniumsalz.

RP-HPLC (0 \rightarrow 30 % in 45 Minuten; 0.1 M TEA:AcOH 0 \rightarrow 80 % MeCN, Produkt bei 15.6 Min.). ³¹P-NMR (80.9 MHz, D₂O): $\delta = -22.14$ (t, J = 19.7 Hz), -10.52 (d, J = 20.1 Hz), -8.90 (d, J = 19.9 Hz). MALDI-MS⁻ (ATT): [M-H]⁻ 490.76.

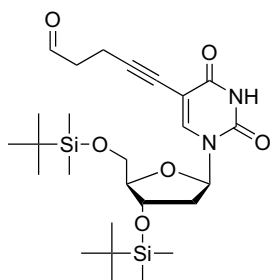
¹Zur Verfügung gestellt von G.A. Burley.

8.2.2. Synthese von 5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin (10)

5-(5-Hydroxy-pent-1-inyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin (7)^[423]

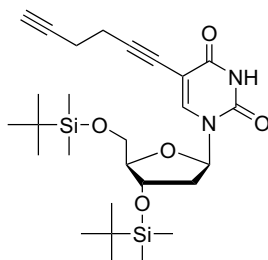
5-Iod-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **5** (1.00 g, 1.72 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.198 g, 0.172 mmol, 0.1 eq) und CuI (0.065 g, 0.344 mmol, 0.2 eq) wurden in DMF (3 mL) gelöst und dreimal entgast. Zu dieser Lösung wurde entgastes *N,N*-Diisopropylethylamin (1.5 mL, 8.59 mmol, 5 eq) gegeben. Nach 10 Minuten wurde eine Lösung von 4-Pentin-1-ol (320 µL, 3.44 mmol, 2 eq in 1 mL DMF) innerhalb einer Stunde zugetropft und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des DMF *in vacuo* wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen (200 mL) und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (3x) und einmal mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan: Ethylacetat 1:1 → 2:1) ergab **7** als hellgelben Schaum (0.790 g, 1.47 mmol, 86 %).

$R_f = 0.35$ (Ethylacetat). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.01$ (s, 3 H, SiCH₃), 0.00 (s, 3 H, SiCH₃), 0.05 (s, 3 H, SiCH₃), 0.07 (s, 3 H, SiCH₃), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.85 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.74 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂OH), 1.95 (m, 1 H, C2'H), 2.20 (m, 1 H, C2'H), 2.42 (t, 2 H, J = 6.0 Hz, C ≡ CCH₂CH₂), 3.67 (dd, 1 H, J = 11.4, 2.1 Hz, C5'H), 3.70 (m, 2 H, J = 6.0 Hz, CH₂CH₂CH₂OH), 3.81 (dd, 1 H, J = 11.4, 2.1 Hz, C5'H), 3.89 (m, 1 H, C4'H), 4.32 (m, 1 H, C3'H), 6.20 (dd, 1 H, J = 7.5, 6.0 Hz, C1'H), 7.83 (s, 1 H, C6H), 8.84 (bs, 1 H, NH). OH fehlt. ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.4$ (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), -4.6 (SiCH₃), 16.7 (C ≡ CCH₂CH₂), 18.0 (SiC(CH₃)₃), 18.5 (SiC(CH₃)₃), 26.1 (SiC(CH₃)₃), 26.4 (SiC(CH₃)₃), 31.5 (CH₂CH₂CH₂OH), 42.3 (C2'), 61.9 (CH₂CH₂CH₂OH), 63.3 (C5'), 72.4 (C ≡ C), 72.7 (C3'), 86.0 (C1'), 88.7 (C4'), 95.0 (C ≡ C), 100.9 (C5), 141.9 (C6), 149.6 (C2), 162.4 (C4). HRMS (ESI⁺, M + Na⁺): ber. für [C₂₆H₄₆N₂O₆Si₂ + Na⁺]⁺: 561.2787 gef. 561.2803.

5-(5-Oxo-pent-1-ynyl)-5',3'-O-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxyuridin (**16**)

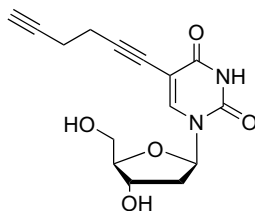
Zu einer Lösung von **7** (0.30 g, 0.56 mmol) in Dichlormethan (5 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre eine Lösung von Dess-Martin-Periodinan (0.378 g, 0.89 mmol, 1.6 eq) in Dichlormethan (5 mL) über einen Zeitraum von 5 Minuten zugetropft. Die Reaktion wurde noch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann gesättigte Natriumthiosulfat-Lösung (10 mL) zugegeben. Die Reaktion wurde mit Dichlormethan (200 mL) verdünnt und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (2x) und mit Wasser (3x) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 2:1) ergab **16** als gelblichen Schaum (0.193 g, 0.36 mmol, 65 %).

$R_f = 0.78$ (Isohexan:Ethylacetat 2:1). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.07$ (s, 3 H, SiCH₃), 0.00 (s, 3 H, SiCH₃), 0.05 (s, 3 H, SiCH₃), 0.06 (s, 3 H, SiCH₃), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.85 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.95 (m, 1 H, C2'H), 2.21 (m, 1 H, C2'H), 2.61 (t, 2 H, J = 7.2 Hz, CH₂CH₂), 2.67 (t, 2 H, J = 7.2 Hz, CH₂CH₂), 3.68 (dd, 1 H, J = 11.4, 2.4 Hz, C5'H), 3.81 (dd, 1 H, J = 11.4, 2.4 Hz, C5'H), 3.89 (m, 1 H, C4'H), 4.32 (m, 1 H, C3'H), 6.20 (dd, 1 H, J = 7.2, 6.0 Hz, C1'H), 7.84 (s, 1 H, C6H), 8.99 (bs, 1 H, NH), 9.72 (s, 1 H, CHO). ¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): $\delta = -3.8$ (SiCH₃), -3.7 (SiCH₃), -3.1 (SiCH₃), -2.9 (SiCH₃), 14.4 (C \equiv CCH₂CH₂), 19.7 (SiC(CH₃)₃), 20.1 (SiC(CH₃)₃), 27.4 (SiC(CH₃)₃), 27.7 (SiC(CH₃)₃), 43.7 (C2'), 44.1 (CH₂CH₂CHO), 64.6 (C5'), 74.0 (C3' und C \equiv C), 87.5 (C1'), 90.0 (C4'), 94.3 (C \equiv C), 101.9 (C5), 143.8 (C6), 150.9 (C2), 163.7 (C4), 201.6 (CHO). HRMS (ESI⁺, M + Na⁺) ber. für [C₂₆H₄₄N₂O₆Si₂ + Na⁺]⁺ 559.2635 gef. 559.2634.

5-(Hexa-1,5-diinyl)-5',3'-O-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxyuridin (**18**)

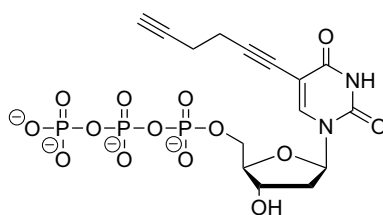
Zu einer Lösung von **16** (0.463 g, 0.86 mmol) und K_2CO_3 (0.233g, 1.72 mmol, 2 eq) in trockenem Methanol wurde unter Stickstoffatmosphäre eine Lösung von 1-Diazo-2-oxo-propyl-phosphonsäurediethylester (**17**, 227 mg, 1.03 mmol, 1.2 eq in 20 mL Methanol) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, danach filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (2x) und mit Wasser (2x) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 4:1 \rightarrow 2:1) ergab **18** als farblosen Schaum (220 mg, 0.41 mmol, 48 %).

$R_f = 0.72$ (Isohexan:Ethylacetat 4:1). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.00$ (s, 3 H, SiCH_3), 0.01 (s, 3 H, SiCH_3), 0.06 (s, 3 H, SiCH_3), 0.07 (s, 3 H, SiCH_3), 0.82 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.86 (s, 9 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.93 (m, 1 H, $\text{C}2'\text{H}$), 1.95 (s, 1 H, $\text{C} \equiv \text{CH}$), 2.22 (m, 1 H, $\text{C}2'\text{H}$), 2.39 (dt, 2 H, $J = 8.4, 2.4$ Hz, CH_2CH_2), 2.55 (t, 2 H, $J = 8.4$ Hz, CH_2CH_2), 3.68 (dd, 1 H, $J = 11.4, 2.4$ Hz, $\text{C}5'\text{H}$), 3.81 (d, 1 H, $J = 11.4, 2.4$ Hz, $\text{C}5'\text{H}$), 3.89 (m, 1 H, $\text{C}4'\text{H}$), 4.33 (m, 1 H, $\text{C}3'\text{H}$), 6.20 (dd, 1 H, $J = 7.8, 6.0$ Hz, $\text{C}1'\text{H}$), 7.85 (s, 1 H, $\text{C}6\text{H}$), 8.33 (bs, 1 H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = -7.0$ (SiCH_3), -6.9 (SiCH_3), -6.4 (SiCH_3), -6.2 (SiCH_3), 16.5 ($\text{C} \equiv \text{CCH}_2\text{CH}_2$), 16.9 ($\text{C} \equiv \text{CCH}_2\text{CH}_2$), 17.0 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.2 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 24.2 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 24.5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 40.4 ($\text{C}2'$), 61.4 ($\text{C}5'$), 67.9 ($\text{C} \equiv \text{CH}$), 70.8 ($\text{C}3'$), 70.9 ($\text{C} \equiv \text{C}$), 80.9 ($\text{C} \equiv \text{C}$), 84.1 ($\text{C}1'$), 86.8 ($\text{C}4'$), 91.2 ($\text{C} \equiv \text{C}$), 98.7 ($\text{C}5$), 140.6 ($\text{C}6$), 147.5 ($\text{C}2$), 159.9 ($\text{C}4$). HRMS (FAB^+ , $M + \text{H}^+$) ber. für $[\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}_2]^+$ 533.28670 gef. 533.26009.

5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin (10)

Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **18** (270 mg, 0.51 mmol) in THF (5 mL) wurde TBAF (1.52 mL, 1.52 mmol, 1 M in THF, 3 eq) gegeben. Die Reaktion wurde für 3 Stunden gerührt, dann Eisessig (1 mL) zugegeben und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (Ethylacetat:MeOH 19:1) ergab **10** als weißen Feststoff (127 mg, 0.42 mmol, 82 %).

$R_f = 0.28$ (Ethylacetat mit 5 % MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.88$ (s, 1 H, C \equiv CH), 2.07 (m, 2 H, C2'H), 2.36 (dt, 2 H, J = 7.2, 2.4 Hz, CH₂CH₂), 2.54 (t, 2 H, J = 6.8 Hz, CH₂CH₂), 3.53 (dd, 1 H, J = 12.0, 4.0 Hz, C5'H), 3.58 (dd, 1 H, J = 12.0, 4.0 Hz, C5'H), 3.76 (m, 1 H, C4'H), 4.19 (m, 1 H, C3'H), 5.07 (bs, 1 H, OH), 5.23 (bs, 1 H, OH), 6.08 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, C1'H), 8.11 (s, 1 H, C6H), 11.55 (bs, 1 H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl₃): $\delta = 17.6$ (C \equiv CCH₂CH₂), 18.9 (C \equiv CCH₂CH₂), 39.5 (C2'), 60.7 (C5'), 70.0 (C3'), 73.7 (C \equiv CH), 75.1 (C \equiv C), 84.6 (C1'), 87.3 (C4'), 89.1 (C \equiv C), 93.0 (C \equiv C), 100.2 (C5), 144.7 (C6), 151.0 (C2), 163.2 (C4). HRMS(FT-ICR⁻, M + AcO⁻): ber. für [C₁₇H₁₉N₂O₆]⁻ 363.1198 gef. 363.1221, MS-MS [M]⁻ ber. für [C₁₅H₁₅N₂O₅]⁻ 303.1 gef. 303.1.

5-(Hexa-1,5-diinyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (23)

Synthese nach Kovács *et al.*:^[158]

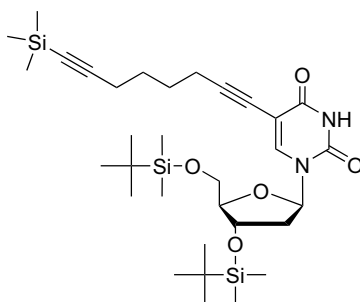
Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von 5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin **10** (0.060 g, 0.197 mmol) und 1,8-bis(dimethylamino)naphthalin (*proton sponge*, 68 mg, 0.316 mmol, 1.6 eq) in Trimethylphosphat (2 mL) wurde Phosphorylchlorid POCl₃ (22 μ L, 0.237 mmol, 1.2 eq) zugetropft. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Zu der Reaktion wurde eine Lösung von

Tri-*n*-butylammonium Pyrophosphat (80 mg, 0.237 mol, 1.2 eq) in trockenem DMF gegeben und die Reaktion nach einer Minute durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (1.0 M, 20 mL, pH 8.5) beendet. Die Reaktion wurde noch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach lyophilisiert. RP-HPLC Aufreinigung (C18) (0→50 % 0.1 M Triethylammoniumacetat → 20 : 80 H₂O : MeCN mit 0.1 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 45 min) ergab **23** (17.7 min) als Triethylammoniumsalz.

³¹P-NMR (80.9 MHz, D₂O): $\delta = -22.4$ (t, 1 P, J = 19.8 Hz, P- β), -10.5 (d, 1 P, J = 20.3 Hz, P- α), -9.7 (d, 1 P, J = 19.8 Hz, P- γ). MALDI-TOF (ATT, M + 2H⁻): 542.

8.2.3. Synthese von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin (**12**)

5-(8-Trimethylsilylocta-1,7-diinyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin (**8**)

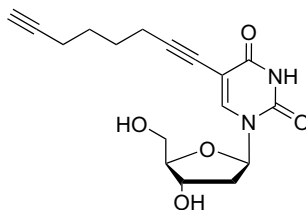


Eine Lösung von 5-Iod-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **5** (2.70 g, 4.26 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (299 mg, 0.426 mmol, 0.1 eq) und CuI (161 mg, 0.852 mmol, 0.2 eq) in DMF (3 mL) wurde dreimal entgast und ebenfalls entgastes N,N-Diisopropylethylamin (3.9 mL, 21.3 mmol, 5 eq) zugegeben und die Lösung erneut entgast. Zu der Reaktion wurde eine ebenfalls dreimal entgaste Lösung von 1-Trimethylsilyl-1,7-oktadiin **19** (0.908 g, 5.54 mmol, 1.3 eq) in DMF (1 mL) langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen (200 mL). Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung (3x50 mL) und Wasser (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan → Isohexan:Ethylacetat 5:1) ergab **8** als gelblichen Schaum (2.63 g, 4.15 mmol, 92 %).

$R_f = 0.50$ (Isohexan:Ethylacetat 2:1). ¹H-NMR (600 MHz): $\delta = -0.06$ (s, 3 H, SiCH₃), -0.05 (s, 3 H, SiCH₃), 0.00 (s, 12 H, SiCH₃, SiC(CH₃)₃), 0.01 (s, 3 H,

SiCH₃), 0.76 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.80 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.51 (m, 4 H, CH₂), 1.89 (m, 1 H, CH₂), 2.11 (t, 2 H, J = 6.5 Hz, C ≡ CCH₂), 2.16 (m, 1 H, C2'H), 2.19 (m, 1 H, C2'H), 2.26 (t, 2 H, J = 6.5 Hz, C ≡ CCH₂), 3.63 (dd, 1 H, J = 9.8, 1.4 Hz, C5'H), 3.76 (dd, 1 H, J = 9.8, 1.4 Hz, CH'5), 3.82 (d, 1 H, J = 1.4 Hz, C4'H), 6.16 (t, 1 H, J = 6.8 Hz, C1'H), 7.8 (s, 1 H, C6H), 9.64 (s, 1 H, NH). ¹³C-NMR (150.8 MHz): δ = -5.7 (SiCH₃), -5.5 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), 0.0 (Si(CH₃)₃), 17.8 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 19.0 (CH₂), 19.2 (CH₂), 25.6 (SiC(CH₃)₃), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 27.4 (C ≡ CCH₂), 27.9 (C ≡ CCH₂), 41.7 (C2'), 62.9 (C5'), 71.6 (C ≡ C), 72.0 (C3'), 84.4 (C ≡ C), 85.4 (C1'), 88.0 (C4'), 94.2 (C ≡ C), 100.6 (C5), 106.8 (C ≡ C), 141.3 (C6), 149.4 (C2), 162.1 (C4). HRMS (ESI⁺, M + Na⁺) ber. für [C₃₂H₅₆N₂O₅Si₃ + Na⁺]⁺ 655.3389 gef. 655.3400.

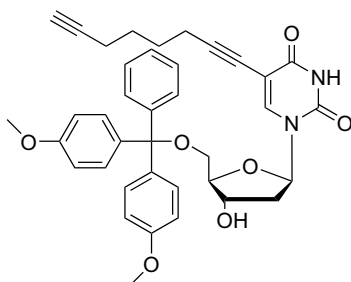
5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin (12)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **8** (2.10 g, 3.32 mmol) in THF (5 mL) wurde TBAF (1 M in THF, 10.9 mL, 10.9 mmol, 3.2 eq) gegeben. Die Reaktion wurde noch 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach Eisessig (1.0 mL) zugegeben. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat:Methanol 9:1). Man erhielt **12** als weißen Feststoff (0.96 g, 2.89 mmol 85 %).

R_f = 0.21 (Ethylacetat). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.57 (m, 4 H, CH₂CH₂), 2.11 (m, 2 H, C2'H), 2.19 (m, 2 H, HC ≡ CCH₂), 2.38 (m, 2 H, C ≡ CCH₂), 2.75 (m, 1 H, C ≡ CH), 3.55-3.65 (m, 2 H, C5'H), 3.78 (dd, 1 H, J = 6.6, 3.5 Hz, C4'H), 4.23 (m, 1 H, C3'H), 5.06 (t, 1 H, J = 4.8 Hz, OH), 5.22 (bd, 1 H, J = 4.0 Hz, OH), 6.10 (t, 1 H, J = 6.5 Hz, C1'H), 8.10 (s, 1 H, C6H), 11.3 (bs, 1 H, NH). ¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆): δ = 17.1 (HC ≡ CCH₂), 18.2 (C ≡ CCH₂), 27.0 (C ≡ CCH₂CH₂), 27.1 (C ≡ CCH₂CH₂), 39.9 (C2'), 60.9 (C5'), 70.1 (C3'), 71.3 (C ≡ CH), 72.9 (C5), 84.2 (HC ≡ C), 84.5 (C1'), 87.4 (C4'), 92.8 (C ≡ CCH₂), 98.9 (C ≡ CCH₂), 142.6 (C6), 149.4 (C2), 161.6 (C4). HRMS (ESI⁻, M - H⁺): ber. für [C₁₇H₁₈N₂O₅]⁻ 331.1299 gef. 331.1295.

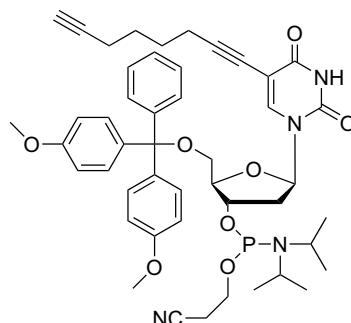
5-(Ohta-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin (77)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **12** (1.58 g, 4.97 mmol) in trockenem Pyridin (5 mL) wurde eine katalytische Menge DMAP und 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (1.85 g, 5.47 mmol, 1.1 eq) gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung (3x50 mL) und mit Wasser (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan : Ethylacetat mit 1 % Pyridin 9:1 → 1:1) ergab **77** (1.41 g, 2.22 mmol, 46 %) als gelben Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ = 1.42 (m, 4 H, CH₂CH₂), 1.96 (t, 1 H, J = 2.5 Hz, C ≡ CH), 2.07 (td, 2 H, J = 6.8, 2.5 Hz, CH₂C ≡ CH), 2.15 (td, 2 H, J = 7.1, 1.6 Hz, CH₂C ≡ C), 2.28 (m, 1 H, C2'H), 2.46 (m, 1 H, C2'H), 3.34 (d, 2 H, J = 3.3 Hz, C5'H), 3.79 (s, 6 H, OCH₃), 4.08 (dd, 1 H, J = 6.2, 3.3 Hz, C4'H), 4.55 (m, 1 H, C3'H), 6.29 (dd, 1 H, J = 7.7, 5.8 Hz, C1'H), 6.87 (d, 4 H, J = 8.5 Hz, CH_{Ar}), 7.24 (m, 1 H, CH_{Ar}), 7.31 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.36 (dd, 4 H, J = 8.5, 1.9 Hz, CH_{Ar}), 7.45 (dd, 2 H, J = 8.6, 1.5 Hz, CH_{Ar}), 7.97 (s, 1 H, C6H). OH und NH nicht beobachtet. ¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₂Cl₂): δ = 20.1 (C ≡ CCH₂CH₂), 21.2 (C ≡ CCH₂CH₂), 29.7 (C ≡ CCH₂), 30.0 (C ≡ CCH₂), 45.7 (C2'), 59.6 (OCH₃), 67.9 (C5'), 72.6 (C ≡ CH), 75.6 (C3'), 76.5, 88.4, 89.6 (C1'), 90.9 (C4'), 91.3, 98.6, 105.0, 117.6 (4 C), 128.0, 128.2, 131.3 (2 C), 132.2, 132.4, 134.3, 134.4, 139.9, 140.0, 140.4, 146.0, 146.2, 149.1, 153.8, 153.9, 163.0, 163.3. HRMS (ESI⁺, M + Na⁺): ber. für [C₃₈H₃₈N₂O₇ + Na⁺]⁺ 657.2571 gef. 657.2570.

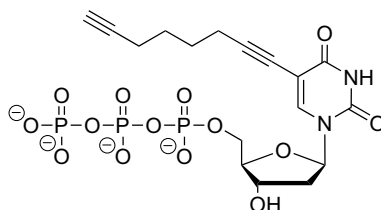
5-(Okta-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino)-2'-desoxyuridin (20)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **77** (200 mg, 0.32 mmol) in trockenem Dichlormethan (5 mL) wurde Triisopropylammonium tetrazolid^[147] (68 mg, 0.40 mmol, 1.25 eq) und 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit^[146] (306 µL, 0.97 mmol, 3 eq) gegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Isohexan:Ethylacetat 3:1 + 1 % Pyridin). Man erhielt **20** als weißen Feststoff (188 mg, 0.23 mmol, 70 %).

³¹P-NMR (80.9 MHz, CD₂Cl₂): δ = 149.9, 149.6. MS (MALDI-TOF⁺, M+Na⁺): 857.

5-(Okta-1,7-diinyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (22)



Synthese nach Kovács *et al.*:^[158]

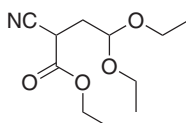
Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin **12** (0.10 g, 0.3 mmol) und 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (*proton sponge*, 102.8 mg, 0.48 mmol, 1.6 eq) in Trimethylphosphat (1 mL) wurde Phosphorylchlorid POCl₃ (41 µL, 0.45 mmol, 1.5 eq) zugetropft. Die Reaktion wurde

3 Stunden bei 0 °C gerührt. Zu der Reaktion wurde eine Lösung von Tri-*n*-butylammonium Pyrophosphat (188.9 mg, 0.55 mmol, 1.86 eq und N(*n*-Bu)₃ 0.478 mL in 3 mL DMF) gegeben und die Reaktion nach 20 Minuten durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (1.0 M, 20 mL, pH 8.5) beendet. Die Reaktion wurde noch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach lyophilisiert. RP-HPLC Aufreinigung (C18) (0→50 % 0.1 M Triethylammoniumacetat → 20 : 80 H₂O : MeCN mit 0.1 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 45 min) ergab **22** (30.2 min) als Triethylammoniumsalz.

³¹P-NMR (80.9 MHz, D₂O): $\delta = -22.4$ (t, 1 P, J = 20.2 Hz, P- β), -10.5 (d, 1 P, J = 20.4 Hz, P- α), -9.7 (d, 1 P, J = 20.1 Hz, P- γ). MALDI-TOF (ATT, M + 2H⁺): 570.6.

8.2.4. Synthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyguanosin (**26**)

Ethyl-2,2-diethoxyethylcyanoacetat (**32**)^[21]

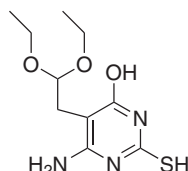


Getrocknetes Kaliumcarbonat (7.01 g, 0.051 mol, 1 eq) wurde zusammen mit NaI (0.495 g, 0.003 mol), Cyanoessigsäureethylester **33** (26.98 mL, 0.254 mol, 5 eq) und Bromacetaldehyddiethylacetal **34** (7.630 mL, 0.051 mol, 1 eq) vorsichtig auf 145-150 °C erhitzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung (CO₂) wurde noch weitere 4 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser (100 mL) und Ether (100 mL) extrahiert. Die Etherphase wurde nochmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen noch dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch fraktionierte Destillation aufgereinigt (4 mbar, 85-115 °C, 2. Fraktion) Man erhielt **32** als gelbliche Flüssigkeit (7.58 g, 0.033 mol, 69 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.20$ (t, 6 H, J = 7.0 Hz, CH₃CH₂ Acetal), 1.32 (t, 3 H, J = 7.2 Hz, CH₃), 2.26 (m, 2 H, CH₂), 3.48-3.71 (m, 5 H, CH₂CH₃ Acetal, CHCN), 4.27 (q, 2 H, J = 7.1 Hz, CH₂CH₃), 4.69 (dd, 1 H, J = 6.2, 5.2 Hz, CHCH₂). ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.0$ (CH₃CH₂ Acetal, 2 C), 15.1 (CH₃CH₂), 33.6 (CHCN), 33.6 (CH₂), 62.6 (CH₂CH₃), 62.7 (CH₂CH₃ Acetal), 62.8 (CH₂CH₃

Acetal), 99.9 (CHO₂), 116.3 (CN), 165.8 (C=O). IR: (KBr) 2980, 3338, 2902, 2251, 1748, 1445, 1373, 1261.

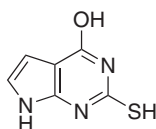
6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercapto-pyrimidin-4-ol (**31**)^[21]



Zu einer Lösung von Thioharnstoff (6.93 g, 0.091 mol, 1.1 eq) und Natriumethanolat (4.92 g, 0.091 mol, 1.1 eq) in trockenen Ethanol (91 mL) wurde Ethyl-2,2-diethoxyethylcyanoacetat **32** (18.05 g, 0.083 mol, 1 eq) gegeben und 4 h refluxiert. Die Reaktion wurde über Nacht abgekühlt und danach das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in Wasser gelöst und die wässrige Lösung mit Ether gewaschen und mit einer äquivalenten Menge von Eisessig (5.21 mL, 0.091 mol) versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **31** als weißen Feststoff (16.89 g, 0.065 mol, 79 %).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.07 (t, 6 H, J = 7.0 Hz, CH₃CH₂O), 2.43 (d, 2 H, J = 5.6 Hz, CH₂CH), 3.40 (dq, 2 H, J = 9.6, 7.1 Hz, CH₂CH₃), 3.59 (dq, 2 H, J = 9.5, 7.1 Hz, CH₂CH₃), 4.50 (t, 1 H, J = 5.6 Hz, CHO₂), 6.05 (s, 2 H, NH₂), 11.43 (s, 1 H, SH), 11.72 (s, 1 H, OH). ¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 15.2 (CH₃, 2C), 27.8 (CH₂CH, 2 C), 61.6 (CH₂CH₃), 85.6, 101.6 (CHO₂), 151.7, 161.6, 172.7 (C=O). MS (EI⁺): 259.0. IR (KBr) 3426, 3338, 2975, 2900, 1640, 1590, 1432.

2-Mercapto-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (**30**)

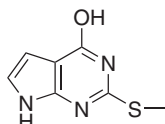


31 (0.50 g, 1.93 mmol) wurde bei Raumtemperatur in 0.2 N Salzsäure (14.48 mL, 2.90 mmol) suspendiert und 24 h gerührt. Es fiel ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet wurde. Man erhielt **30** als weißen Feststoff (0.276 g, 1.65 mmol, 85 %).

8. Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 6.33$ (s, 1 H), 6.71 (s, 1 H), 11.22 (s, 1 H, SH), 11.83 (s, 1 H, OH), 13.16 (s, 1 H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 102.6, 103.7, 118.3, 138.7, 158.1, 172.2$. HRMS (DEI^+ , $M+\text{H}^+$): ber. für $[\text{C}_6\text{H}_6\text{OSN}_3]^+$ 167.0153 gef. 167.0164. IR (KBr) 3203, 3146, 2603, 1681, 1610, 1508.

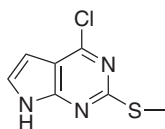
2-Methylsulfanyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ol (35)



Zu einer Lösung von **30** (1.60 g, 9.57 mmol) in 1 M Natronlauge (50 mL) wurden nach Abkühlen auf 5 °C Methyljodid (1.79 mL, 9.57 mmol, 1 eq) zugetropft und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Eisessig neutralisiert und der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **35** als weißen Feststoff (1.60 g, 8.8 mmol, 92 %).

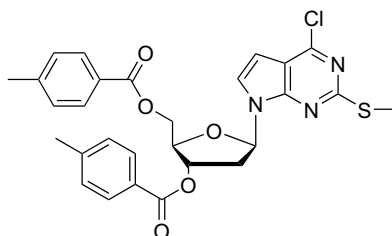
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 2.57$ (s, 3 H, CH_3S), 4.92 (breit, 1 H, OH oder NH), 6.97 (dd, 1 H, $J = 2.1, 1.2$ Hz, CH_{Ar}), 7.14 (dd, 1 H, $J = 2.4, 0.9$ Hz, CH_{Ar}). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, Pyridin- d_5): $\delta = 15.6$ (SCH_3), 105.7 (CH), 108.2, 121.8 (CH), 138.2, 157.3, 162.8. HRMS (EI^+ , $M+\text{H}^+$): ber. für $[\text{C}_7\text{H}_8\text{OSN}_3]^+$ 181.0310 gef. 181.0306. IR (KBr) 3246, 3093, 3006, 2956, 2910, 2837, 1669, 1560.

4-Chloro-2-methylsulfanyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (28)



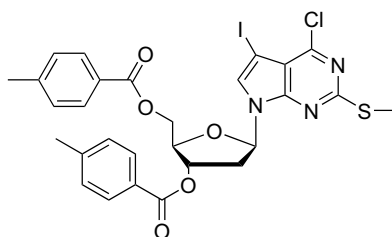
35 (0.400 g, 2 mmol) wurde in POCl_3 (2 mL) suspendiert und eineinhalb Stunden bei 145 °C refluxiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegeben und der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **28** als braunen Feststoff (0.160 g, 0.802 mmol, 36 %).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.64$ (s, 3 H, SCH_3), 6.55 (m, 1 H, CH), 7.21 (m, 1 H, CH), 9.79 (s, NH). HRMS (EI^+ , $M+\text{H}^+$): ber. für $[\text{C}_7\text{H}_7\text{ClN}_3\text{S}]^+$ 198.9951 gef. 198.9971.

2-Methylsulfanyl-4-chloro-7-desaza-5',3'-O-*p*-toluoyl-2'desoxyguanosin (36)^[23]

Zu einer Lösung von **28** (3.2 g, 16.0 mmol) in 131 mL abs. Acetonitril wurde NaH (676.8 mg 60 % Suspension in Mineralöl, 17.6 mmol, 1.3 eq) gegeben und 30 min unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 1- α / β -Chlor-2-desoxy-3,5-*p*-toluoyl-D-ribofuranose **29** (6.2 g, 16.0 mmol, 1 eq) in zwei Portionen zugegeben und über Nacht bei 50 °C gerührt. Danach wurde vom Feststoff abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 4:1) ergab **36** als β -Anomer (5.9 g, 20.9 mmol, 67 %).

$R_f = 0.3$ (Isohexan:Ethylacetat 4:1). ¹H-NMR (400 MHz): $\delta = 2.41$ (s, 3 H, CH₃), 2.44 (s, 3 H, CH₃), 2.63 (s, 3 H, SCH₃), 2.71-2.77 (m, 1 H, C2'H), 2.84-2.91 (m, 1 H, C2'H), 4.57-4.63 (m, 2 H, C5'H), 4.70-4.73 (m, 1 H, C4'H), 5.74-5.75 (m, 1 H, C3'H), 6.48 (d, 1 H, J = 3.7 Hz, C5H), 6.74 (dd, 1 H, J = 8.0, 5.9 Hz, C1'H), 7.22-7.29 (m, 5 H, C6H + CH_{Tol.}), 7.88-7.98 (m, 4 H, CH_{Tol.}).

2-Methylsulfanyl-4-chloro-7-desaza-7-iod-5',3'-O-*p*-toluoyl-2'desoxyguanosin (37)^[33]

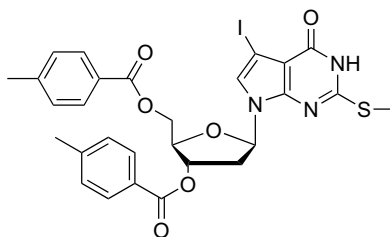
Zu einer Lösung von **36** (100 mg, 0.18 mmol) in DMF (5.4 mL) wurde N-Iodsuccinimid (NIS, 296 mg, 0.70 mmol, 3.8 eq) gegeben und 6 h bei 96 °C umgesetzt. Nach dem Abkühlen wurde 10%ige Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugefügt, mit Essigsäureethylester extrahiert, und die organische Phase erst

8. Experimenteller Teil

mit Wasser, anschließend mit 5 %iger Natriumdithionit-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 5:1) ergab **37** (46 mg, 0.07 mmol, 38 %).

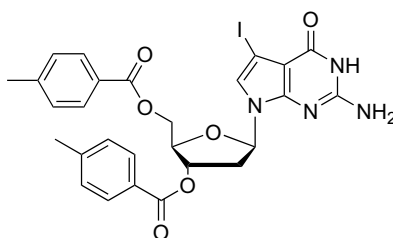
$R_f = 0.25$ (Isohexan:Ethylacetat). $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.43$ (m, 6 H, CH_3), 2.61 (s, 3 H, SCH_3), 2.72-2.79 (m, 2 H, $\text{C}2'\text{H}$), 4.55-4.60 (m, 2 H, $\text{C}5'\text{H}$), 4.66-4.72 (m, 1 H, $\text{C}4'$), 5.69-5.75 (m, 1 H, $\text{C}3'$), 6.74 (dd, 1 H, $J = 8.5, 5.4$ Hz, $\text{C}1'\text{H}$), 7.24-7.26 (m, 5 H, $\text{C}6\text{H} + \text{CH}_{\text{Tol}}$), 7.87-7.99 (m, 4 H, CH_{Tol}). HRMS (FT-ICR $^+$, $\text{M}+\text{H}^+$): ber. für $[\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{ClIN}_3\text{O}_5\text{S}]^+$ 678.0321 gef. 678.0329.

2-Methylsulfanyl-7-desaza-7-iod-5',3'-O-*p*-toluoyl-2'desoxyguanosin (**38**)^[33]



37 (1.79 g, 2.96 mmol) wurden in DMF (26.5 mL) und Dioxan (18.0 mL) gelöst und *syn*-2-Pyridinaldoxim (1.61 g, 13.2 mmol, 5 eq) und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin (1.79 mL, 16.0 mmol, 5.4 eq) zugegeben und die Reaktion für 24 h gerührt. Die Reaktion wurde aufkonzentriert und mit Dichlormethan (300 mL) verdünnt und die organische Phase zweimal mit 0.1 N Zitronensäure (100 mL), einmal mit NaHCO_3 (100 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan 0→10 % Ethylacetat) ergab **38** als weißes Pulver (1.57 g, 2.33 mmol, 88 %).

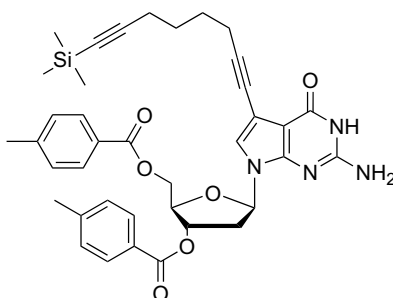
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.42$ (s, 3 H, CH_3), 2.44 (s, 3 H, CH_3), 2.63 (s, 3 H, SCH_3), 2.67-2.76 (m, 2 H, $\text{C}2'\text{H}$), 4.54-4.56 (m, 1 H, $\text{C}5'\text{H}$), 4.66-4.68 (m, 2 H, $\text{C}4'\text{H}+\text{C}5'\text{H}$), 5.68-5.70 (m, 1 H, $\text{C}3'\text{H}$), 6.61 (t, $J = 6.6$ Hz, $\text{C}1'\text{H}$), 7.25-7.30 (m, 4 H, CH_{Tol}), 7.91-7.97 (m, 4 H, CH_{Tol}), 10.55 (bs, NH).

7-Desaza-7-iod-5',3'-O-*p*-toluoyl-2'desoxyguanosin (27)^[33]

38 (134 mg, 0.203 mmol) wurde in Dichlormethan (10 mL) gelöst und bei 0 °C 3-Chlorperoxybenzoesäure (MCPBA, 70-75 %, 65.7 mg, 1.36 eq) zugegeben. Nach 15 Minuten wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion noch weitere 105 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Methanol auf 4 % Methanol eingestellt und über eine kurze Säule gereinigt. Man erhielt 2-Methylsulfonyl-7-desaza-7-iod-5',3'-*p*-toluoyl-2'desoxyguanosin **78** als weißen Feststoff (127 mg, $R_f = 0.44$ (Isohexan:Ethylacetat 1:1)), der direkt weiter umgesetzt wurde.

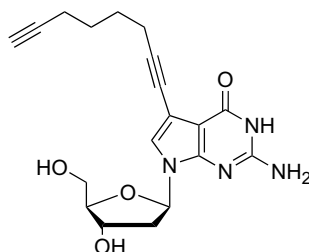
Unter Eiskühlung (4 °C) wurde **78** in trockenem Dioxan (15 mL) suspendiert und die Lösung mit Ammoniak gesättigt. Die Suspension wurde in ein Druckrohr überführt und geschlossen 8.5 Stunden auf 140 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan mit 5 % Methanol) ergab **27** als gelblichen Feststoff (84 mg, 0.133 mmol, 66 % bez. auf **38**).

$R_f = 0.39$ (DCM mit 5 % MeOH). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.42$ (s, 3 H, CH₃), 2.44 (s, 3 H, CH₃), 2.52-2.83 (m, 2 H, C2'H), 4.52-4.57 (m, 1 H, C4'H), 4.68 (dd, 2 H, $J = 6.1, 4.1$ Hz, C5'H), 5.64-5.74 (m, 1 H, C3'H), 5.98 (s, 2 H, NH₂), 6.48 (dd, 1 H, $J = 8.2, 5.9$ Hz, C1'H), 6.87 (s, 1 H, C8H), 7.28 (d, 4 H $J = 7.1$ Hz), 7.93 (m, 2 H), 7.97 (m, 2 H), 10.85 (s, 1 H, NH).

**7-Desaza-7-(8-trimethylsilylocta-1,7-diinyl)-5',3'-O-*p*-toluoyl-2'desoxyguanosin
(79)**

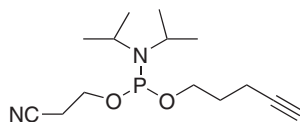
Zu einer entgasten Lösung von **27** (130 mg, 0.207 mmol), Kupfer(I)-iodid (15.7 mg, 0.082 mmol, 0.4 eq) und PdCl₂(PPh₃)₂ (29 mg, 0.041 mmol, 0.2 eq) in DMF (0.7 mL) wurde entgaste Hünig-Basis (180 µL, 1.06 mmol in 0.4 mL, 0.5 eq) gegeben und die Lösung erneut entgast. Danach wurde eine entgaste Lösung von 1-Trimethylsilyl-1,7-oktadiin **19** (92 µL, 0.4 mmol, 2 eq) hinzugegeben. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan:Methanol 20:1) ergab **79** als leicht gelbes Pulver (107 mg, 0.158 mmol, 76 %).

$R_f = 0.45$ (CHCl₃:MeOH 10:1). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.13 (s, 9 H, ((CH₃)₃Si), 1.63-1.73 (m, 4 H, CH₂(CH₂)₂CH₂), 2.25 (t, 2 H, J = 6.9 Hz, H₂CC ≡ CSi), 2.41 (s, 3 H, CH₃), 2.44 (s, 3 H, CH₃), 2.45 (t, 2 H, J = 6.6 Hz, H₂CC ≡ CC), 2.62 (ddd, 1 H, J = 14.1, 5.8, 2.1 Hz, C2'H), 2.73-2.79 (m, 1 H, C2'H), 4.53-4.56 (m, 1 H, C4'H), 4.60 (dd, 1 H, J = 11.8, 4.3 Hz, C5'H), 4.69 (dd, 1 H, J = 11.8, 4.6 Hz, C5'H), 5.67-5.70 (m, 1 H, C3'H), 5.97 (sbr, 2 H, NH₂), 6.48 (dd, 1 H, J = 8.2, 6.1 Hz, C1'H), 6.94 (s, 1 H, C8H), 7.25 (d, 2 H, J = 7.8 Hz, CH_{Ar}), 7.27 (d, 2 H, J = 7.8 Hz, CH_{Ar}), 7.94 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, CH_{Ar}), 7.96 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, CH_{Ar}), 11.17 (sbr, 1 H, NH). ¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 0.2 (Si(CH₃)₃, 3C), 19.4 (CH₂C ≡ C, 2C), 21.7 (CH₃), 21.7 (CH₃), 27.7 (CH₂CH₂CH₂), 27.9 (CH₂CH₂CH₂), 37.5 (C2'), 64.2 (C5'), 73.8 (C ≡ C), 75.1 (C3'), 81.9 (C4'), 83.7 (C1'), 84.8 (C ≡ C), 90.6, 100.5, 100.6, 107.1, 121.6 (C8), 126.5, 126.8, 129.2 (2C), 129.2 (2C), 129.7 (2C), 129.8 (2C), 143.9, 144.3, 151.1 (C7), 152.9, 160.1, 165.9 (CO_{Tol}), 166.3 (CO_{Tol}). HRMS (ESI⁺, M+H⁺): ber. für [C₃₈H₄₃N₄O₆Si]⁺ 679.2952, gef. 679.2962.

7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyguanosin (26)

79 (30.0 mg, 0.044 mmol) wurde in trockenem Methanol gelöst (10 mL) und mit Ammoniak-Gas gesättigt. Die Lösung wurde in ein Druckrohr überführt und verschlossen für 2 Stunden auf 140 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan:Methanol 9:1) ergab **26** als leicht braunes Pulver (11 mg, 0.027 mmol, 67 %).

$R_f = 0.16$ (Dichlormethan:MeOH 9:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.63\text{-}1.74$ (m, 4 H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 2.19 (t, 1 H, $J = 2.8$ Hz, $\text{HC} \equiv \text{C}$), 2.20-2.27 (m, 3 H, $\text{CH}_2\text{C} \equiv \text{CH}$, $\text{C}2'\text{H}$), 2.42 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{C} \equiv \text{CC}$), 2.49 (ddd, 1 H, $J = 13.8, 8.0, 6.1$ Hz, $\text{C}2'\text{H}$), 3.66-3.73 (m, 2 H, $\text{C}5'\text{H}$), 3.92 (dt, 1 H, $J = 4.0, 2.8$ Hz, $\text{C}4'\text{H}$), 4.45 (td, 1 H, $J = 5.9, 2.8$ Hz, $\text{C}3'\text{H}$), 6.35 (dd, 1 H, $J = 8.0, 6.1$ Hz, $\text{C}1'\text{H}$), 7.08 (s, 1 H, $\text{C}8\text{H}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CD_3OD): $\delta = 18.6$ ($\text{CH}_2\text{C} \equiv \text{CH}$), 19.9 ($\text{CH}_2\text{C} \equiv \text{CC}$), 28.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 41.3 ($\text{C}2'$), 63.7 ($\text{C}5'$), 69.6, 72.9, 73.6, 74.7, 84.9, 85.4 ($\text{C}1'$), 88.7 ($\text{C}4'$), 91.3, 101.8, 123.3 ($\text{C}8$), 151.9, 154.3, 161.3. HRMS (ESI⁻, $M\text{-H}^+$): ber. für $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4]^-$ 369.1563, gef. 369.1573.

8.2.5. Synthese von 5-((2-Cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphonoxy)-pent-1-in (51)**5-((2-Cyanoethoxy)-diisopropylamino-phosphonoxy)-pent-1-in (51)^[176]**

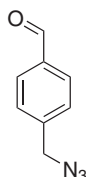
Zu einer Lösung von Pent-4-in-1-ol (165 μL , 150 mg, 1.78 mmol) und Hünig-Base (620 μL , 3.56 mmol, 2 eq) in Dichlormethan (2 mL) wurde CED-Chlorid (377 μL , 1.69 mmol, 0.95 eq) zugetropft. Nach 2 Stunden wurde die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2x) und ges. NaCl-Lösung (1x)

gewaschen und über Mg_2SO_4 getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (5% Ethylacetat in Isohexan + 1% Triethylamin mit deaktiviertem Silica) ergab **51** als farbloses Öl (72 mg, 0.25 mmol, 14 %).

$R_f = 0.11$ (10% Ethylacetat in Isohexan). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.175$ (d, 6 H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.180 (d, 6 H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.82 (quin., 2 H, $J = 7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.92 (t, 1 H, $J = 2.7$ Hz, $\text{C} \equiv \text{CH}$), 2.29 (td, 2 H, $J = 7.1, 2.7$ Hz, $\text{C} \equiv \text{CCH}_2$), 2.62 (t, 2 H, $J = 6.5$ Hz, CH_2CN), 3.60 (d sept., 2 H, $J = 10.2, 6.8$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.67-3.88 (m, 4 H, OCH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.1$ ($\text{C} \equiv \text{CCH}_2$), 20.3 (d, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.5 (CH_3), 24.5 (CH_3), 24.6 (CH_3), 24.6 (CH_3), 30.1 (d, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 43.7 (d, $J = 12.4$ Hz, CH_2CN), 58.3 (d, $J = 19.1$ Hz, OC), 62.0 (d, $J = 17.3$ Hz, OC), 68.5 ($\text{C} \equiv \text{C}$), 83.6 ($\text{C} \equiv \text{C}$), 117.4 (CN). $^{31}\text{P-NMR}$ (80.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 148.85$. HRMS (FT-ICR⁺, $M+\text{H}^+$): ber. für $[\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_2\text{P}^+]^+$ 285.1726 gef. 285.1719.

8.3. Synthese der Azide

4-Azidomethylbenzaldehyd (**43**)



4-Bromomethylbenzaldehyd **80**^[169] (612 mg, 3.08 mmol) wurde in DMF (10 mL) gelöst, NaN_3 (300 mg, 4.61 mmol, 1.5 eq) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Reaktion wurde Ethylacetat (50 mL) gegeben und die organische Phase dreimal mit Wasser und zweimal mit ges. NaCl -Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Öl am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **43** als farbloses Öl (428 mg, 2.66 mmol, 86 %).

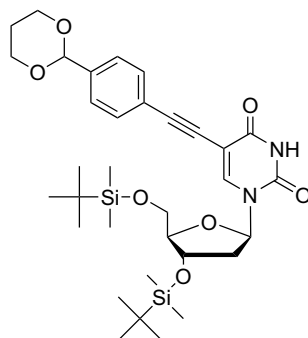
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.46$ (s, 2 H), 7.49 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz), 10.05 (s, 1 H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 54.3$ (CH_2), 128.5 (2C), 130.2 (2C), 136.2, 142.1, 191.6 (CHO). MS (EI^+ , M^+) 161.0 (4 %), $M-\text{N}_2$: 132.0 (100 %)

8.4. Synthese der Aldehydbausteine

8.4.1. Synthese von

5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-2'-desoxyuridin (55)

5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin (61)

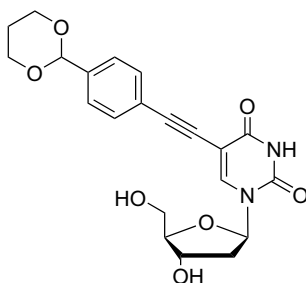


5-Iod-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin **5** (2.00 g, 3.44 mmol), Pd(PPh₃)₄ (397 mg, 0.69 mmol, 0.2 eq) und Kupfer(I)-iodid (130 mg, 0.34 mmol, 0.4 eq) wurden in DMF (10 mL) gelöst. 2-(4-Ethynyl-phenyl)-[1,3]dioxan **60**^[361] (777 mg, 1.2 eq) wurde in DMF (5 mL) gelöst und alle Lösungen dreimal durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff entgast. Zu der Lösung mit **5** wurde Hünigbase (0.731 µL, 4.3 mmol, 1.25 eq) gegeben und erneut einmal entgast. Zu dieser Lösung wurde die Lösung von **60** langsam zugetropft und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (Hexan:Ethylacetat 5:1 → 2:1) gereinigt. Man erhielt **61** als gelben Schaum (1.87 g, 2.91 mmol, 85%).

$R_f = 0.58$ (Tol.:EtOAc 1:1); ¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 0.00$ (s, 3 H, SiCH₃), 0.04 (s, 3 H, SiCH₃), 0.05 (s, 3 H, SiCH₃), 0.79 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.81 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.32 (dtt, 1 H, $J = 13.5, 2.6, 1.4$ Hz, CH₂), 2.03-1.84 (m, 2 H, CH₂+C2'H), 2.22-2.12 (m, 1 H, C2'H), 3.91-3.72 (m, 5 H, CH₂O+C5'H+C4'H), 4.09-3.99 (m, 2 H, CH₂O), 4.44 (m, 1 H, C3'H), 5.39 (s, 1 H, CHO₂), 6.16 (t, 1 H, $J = 6.7$ Hz, C1'H), 7.32 (s, 4 H), 7.95 (s, 1 H, C6H), 10.20 (s, 1 H, NH). ¹³C-NMR (75.5 MHz, Aceton-d₆): $\delta = -4.2$ (SiCH₃), -4.1 (SiCH₃), -3.6 (SiCH₃), -3.5 (SiCH₃), 19.6 (SiC(CH₃)₃), 20.0 (SiC(CH₃)₃), 27.1 (SiC(CH₃)₃), 27.5 (SiC(CH₃)₃), 27.6 (C-Acetal), 43.1, 64.8, 68.8 (2C-Acetal), 74.4, 83.9, 87.2, 89.9, 94.1, 101.1, 102.5 (C-Acetal), 125.0, 128.2 (2C), 132.7 (2C), 141.6, 144.2, 151.2, 162.7. MS (FAB⁺):

643.9 $[M + H^+]^+$; HRMS (MALDI⁺, $M + Na^+$): ber. für $[C_{33}H_{50}N_2O_7Si_2 + Na^+]^+$: 665.3049, gef. 665.3074.

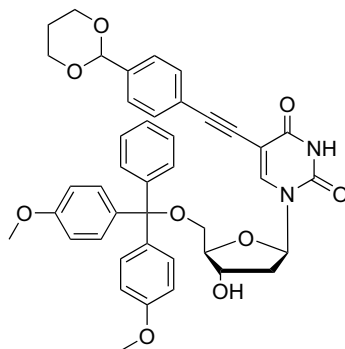
5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-2'-desoxyuridin (55)



Zu **61** (170 mg, 0.26 mmol) gelöst in THF (15 mL) wurde TBAF (0.728 mL, 1 M in THF, 2.8 eq) gegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit zwei Tropfen Eisessig beendet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (CHCl₃:MeOH 5:1) aufgereinigt. Man erhielt **55** als weißen Feststoff (107 mg, 0.25 mmol, 96 %).

$R_f = 0.14$ (CHCl₃:MeOH 5:1); ¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 1.47$ (bd, 1 H, CH-Acetal), 2.05 (m, 1 H, CH-Acetal), 2.33 (dd, 2 H, $J = 6.0, 4.8$ Hz, C2'H), 3.81–3.88 (m, 2 H, C5'H), 3.97–4.02 (m, 3 H, (C4'H) CH-Acetal), 4.40 (bs, 1 H, C5'OH), 4.42 (b m, 1 H, C3'OH), 4.54 (m, 1 H, C3'H), 5.53 (s, 1 H, CHO₂) 6.32 (t, 1 H, $J = 6.6$ Hz, C1'H), 7.45 (s, 4 H, CH-Aromat), 8.46 (s, 1 H, C6H), 10.26 (s, 1 H, NH). ¹³C-NMR (150.8 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 27.5$ (CH₂), 41.9 (C2'), 62.6 (C5'), 68.0 (CH₂, 2C), 72.0 (C3'), 83.3 (C_q), 86.6 (C1'), 89.1 (C4'), 92.7 (C_q), 100.0 (C_q), 101.7 (CH), 124.3 (C_q), 127.4 (CH, 2C), 131.9 (CH, 2C), 140.7 (C_q), 144.7 (C6), 150.5 (C_q), 161.9 (C_q). MS (EI⁺): 414.4 $[M^+]$. HRMS (FT-ICR⁺, $[M+H^+]^+$): ber. für $[C_{21}H_{23}N_2O_7]^+$ 415.1500 gef. 415.1495.

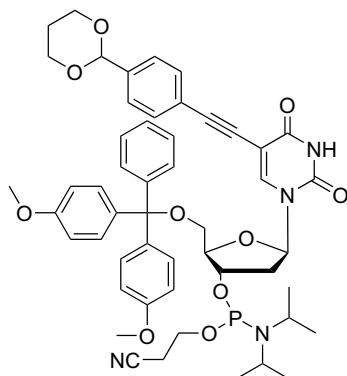
5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin (81)



55 (102 mg, 0.246 mmol) wurde in Pyridin gelöst (15 mL) und mit 4 Å Molsieb für eine Stunde gerührt. Danach wurde DMTCl (100 mg, 0.295 mmol, 1.2 eq) zugegeben und die Reaktion für einen Tag gerührt. Am Ende der Reaktion wurde CHCl_3 (50 mL) hinzugegeben und die organische Phase mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (CHCl_3 :MeOH:Pyridin 20:1:0.2) ergab **81** als gelblichen Film (165 mg, 0.231 mmol, 94 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 1.37-1.48 (m, 1 H, $\text{CH}_{\text{Acetal}}$), 1.97-2.14 (m, 1 H, $\text{CH}_{\text{Acetal}}$), 2.39-2.47 (m, 2 H, $\text{C}2'\text{H}$), 3.33-3.41 (m, 2 H, $\text{C}5'\text{H}$), 3.68 (s, 3 H, CH_3), 3.68 (s, 3 H, CH_3), 3.95 (dt, 2 H, $J = 12.2, 12.2, 2.4$ Hz, $\text{CH}_{\text{Acetal}}$), 4.13-4.17 (m, 3 H, $\text{C}4'\text{H} + \text{CH}_{\text{Acetal}}$), 4.61 (m, 2 H, $\text{C}3'\text{H} + \text{OH}$), 5.48 (s, 1 H, CH), 6.32 (t, 1 H, $J = 6.8$ Hz, $\text{C}1'\text{H}$), 6.81-6.85 (m, 4 H, CH_{DMT}), 7.09 (d, 2 H, $J = 8.3$ Hz, CH_{Ar}), 7.25-7.36 (m, 6 H, $\text{CH}_{\text{DMT}} + 2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$), 7.37-7.44 (m, 2 H, CH_{DMT}), 7.52 (dd, 2 H, $J = 8.3, 1.0$ Hz, CH_{DMT}), 8.18 (s, 1 H, C6H), 10.53 (s, 1 H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, Aceton- d_6): δ = 27.6 (C_{Acetal}), 42.9 ($\text{C}2'$), 56.4 (CH_3 , 2 C), 65.7 ($\text{C}5'$), 68.8 (C_{Acetal} , 2 C), 73.4 ($\text{C}3'$), 83.6, 87.5 ($\text{C}1'$), 88.5, 88.7 ($\text{C}4'$), 94.0, 101.2, 102.5 (CHO_2), 115.0 (C_{DMT} , 4 C), 124.8, 127.9 (C_{Phenyl} , 2 C), 128.6 (C_{DMT} , 2 C), 129.7 (C_{DMT} , 2 C), 129.9 (C_{DMT} , 2 C), 131.85 (C_{DMT} , 2 C), 131.9 (C_{DMT} , 2 C), 132.8 (C_{Phenyl} , 2 C), 137.6, 137.7, 141.3, 144.4 (C6), 146.9, 151.3, 160.6 (2 C), 162.9. MS (FAB $^+$): 718.0 [M] $^+$. HRMS (FT-ICR $^-$, [$M + \text{HCOO}^-$] $^-$): ber. für [$\text{C}_{43}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{11}$] $^-$ 761.2716 gef. 761.2701.

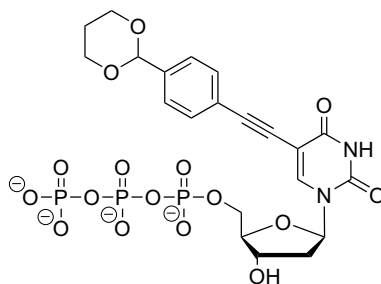
5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(2-cyanoethoxy-diisopropylaminophosphono)-2'-desoxy-uridin (62)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **81** (444 mg, 0.62 mmol) in trockenem Dichlormethan (20 mL) wurde Triisopropylammonium tetrazolid^[147] (53 mg, 0.30 mmol, 0.5 eq) und 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit^[146] (236 µL, 0.74 mmol, 1.2 eq) gegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (deakt. Si, Dichlormethan mit 2 % MeOH und 1 % Pyridin). Man erhielt **62** als weißen Feststoff.

$R_f = 0.21$ (CHCl₃:MeOH 20:1). ³¹P-NMR (80.9 MHz, CD₂Cl₂): $\delta = 149.5, 150.0$.

5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (63)



Synthese nach Kovács *et al.*:^[158]

Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-2'-desoxyuridin **55** (0.10 g, 0.24 mmol) und 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin

(*proton sponge*, 83 mg, 0.39 mmol, 1.6 eq) in Trimethylphosphat (2 mL) wurde Phosphorylchlorid POCl₃ (26 µL, 0.29 mmol, 1.1 eq) zugetropft. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Zu der Reaktion wurde eine Lösung von Tri-*n*-butylammonium Pyrophosphat (211.5 mg, 0.55 mmol, 1.85 eq und N(*n*-Bu)₃ 0.377 mL in 2.6 mL DMF) gegeben und die Reaktion nach 2 Minuten durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (1.0 M, 40 mL, pH 8.5) beendet. Die Reaktion wurde noch 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach lyophilisiert. Reinigung mit DEAE Sephadex (TEAB 0.1 M → 1 M; Produkt bei 0.5) und nachfolgende RP-HPLC Aufreinigung (C18) (0→80 % 0.01 M Triethylammoniumacetat → 20 : 80 H₂O : MeCN mit 0.01 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 35 min) ergab **63** (27.1 min) als Triethylammoniumsalz.

Synthese nach *Eckstein*.^[155]

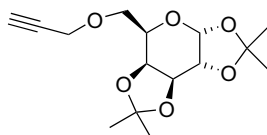
5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-3'-*O*-acetyl-2'-desoxyuridin² (28.4 mg, 100 µmol) wurde in 2 mL Pyridin gelöst und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der trockene Rückstand wurde in Pyridin:Dioxan (100 µL : 300 µL) gelöst und 2-Chloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on **74** (100 µL, 1 M in DMF) zugegeben und die Reaktion 10 Minuten gerührt. Danach wurde eine Lösung von Pyrophosphat (400 µL, 0.5 M in Tri-*n*-butylamin:DMF 3:1) zugegeben. Es fiel ein Feststoff aus, der sich sofort wieder löste. Nach 15 Minuten wurde Iod-Lösung (2 mL, 1 % I₂ in Pyridin:H₂O 98:2) zugegeben und nach weiteren 15 Minuten wurde das überschüssige Iod mit NaHSO₃-Lösung (5 % in Wasser, 40 Tropfen) reduziert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 3 mL Wasser aufgenommen. Nach einer halben Stunde wurden 6 mL konzentrierte Ammoniak-Lösung zugegeben und nach einer weiteren Stunde das überschüssige Ammoniak im Hochvakuum entfernt und die restliche Lösung lyophilisiert. Reinigung mit DEAE Sephadex (TEAB 0.1 M → 1 M; Produkt bei 0.5) und nachfolgende RP-HPLC Aufreinigung (C18) (0→80 % 0.1 M Triethylammoniumacetat → 20 : 80 H₂O : MeCN mit 0.1 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 35 min) ergab **63** (27.1 min) als Triethylammoniumsalz. (Als Nebenprodukt konnte das Triphosphat mit gespaltenem Acetal bei 22.6 Min. isoliert werden).

³¹P-NMR (80.9 MHz, D₂O): δ = -22.8 (t, 1 P, J = 21.2 Hz, P-β), -10.5 (d, 1 P, J = 20.1 Hz, P-α), -5.8 (d, 1 P, J = 21.3 Hz, P-γ). MALDI-TOF (ATT, M + 2H⁺): 652.8.

²Zur Verfügung gestellt von G.A. Burley.

8.4.2. Synthese von 5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (66) und 5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (71)

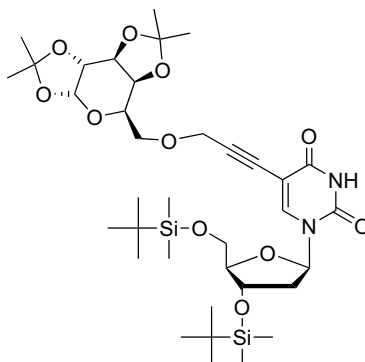
1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O-(prop-2-ynyl)- α -D-galactopyranose (64)^[362]



1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose **67** (1.107 g, 4.25 mmol) wurden bei 0 °C in trockenem DMF (3 mL) gelöst und NaH (204 mg, 60 % Suspension in Mineralöl, 1.2 eq) zugegeben. Nach 15 Minuten wurde Propargylbromid (695 mg, 80 % in Toluol, 1.1 eq) langsam dazugetropft und die Kühlung entfernt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion mit Methanol (1 mL) beendet, Wasser zugegeben und das Produkt zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 4:1) ergab **64** als weißen Feststoff (1.204 g, 4.04 mmol, 95 %).

$R_f = 0.29$ (Isohexan:Ethylacetat 4:1) ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.32$ (s, 3 H, CH₃), 1.34 (s, 3 H, CH₃), 1.45 (s, 3 H, CH₃), 1.54 (s, 3 H, CH₃), 2.40-2.45 (m, 1H), 3.71 (ddd, 2 H $J = 17.2, 10.1, 6.2$ Hz), 3.99 (ddd, 1 H, $J = 7.2, 5.2, 1.9$ Hz), 4.19-4.43 (m, 4 H), 4.60 (dd, 1 H, $J = 7.9, 2.4$ Hz), 5.53 (d, 1 H, $J = 5.0$ Hz).

5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-5',3'-O-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxyuridin (65)

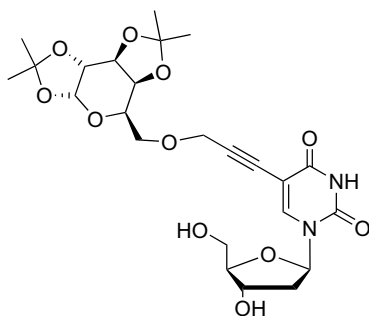


Zu einer entgasten Lösung von **5** (1.20 g, 2.06 mmol), Pd(PPh₃)₄ (238.7 mg, 0.21 mmol, 0.1 eq) und Kupfer(I)-iodid (78.5 mg, 0.41 mmol, 0.2 eq) in DMF (8 mL) wurde entgaste Hünig-Basis (439 μ L, 1.25 eq) gegeben. Die Lösung wurde noch einmal entgast und dann **64** (740 mg, 2.48 mmol, 1.2 eq) zugegeben. Die Reaktion rührte über Nacht bei Raumtemperatur. Danach wurde das DMF *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser (2x) und ges. NaCl-Lösung (2x) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach zweimaliger chromatographischer Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 8:1 \rightarrow 3:1; 5:1 \rightarrow 2:1) erhielt man **65** als weißen Schaum (815 mg, 1.07 mmol, 52 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.04 (s, 3 H, SiCH₃), 0.05 (s, 3 H, SiCH₃), 0.06 (s, 3 H, SiCH₃), 0.11 (s, 3 H, SiCH₃), 0.13 (s, 3 H, SiCH₃), 0.87 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.90 (s, 9 H, Si(CH₃)₃), 1.14 (s, 3 H, CH₃), 1.19 (s, 3 H, CH₃), 1.30 (s, 3 H, CH₃), 1.32 (s, 3 H, CH₃), 1.42 (s, 3 H, CH₃), 1.50 (s, 3 H, CH₃), 1.95-2.04 (m, 1 H, C2'H), 2.35 (ddd, 1 H, J = 13.1, 5.8, 2.6 Hz, C2'H), 3.74 (dd, 1 H, J = 11.5, 2.1 Hz, C6H), 3.88 (dd, 1 H, J = 11.5, 2.5 Hz, C6H), 3.99 (m, 1 H, C5H), 4.04 (dt, 1 H, J = 6.5, 1.7 Hz), 4.23-4.41 (m, 7 H, C4H + C2H + CH₂ + C5'H + C3'H), 4.60 (dd, 1 H, J = 7.9, 2.4 Hz, C3H), 5.50 (d, 1 H, J = 4.5 Hz, C1H), 6.23 (dd, 1 H, J = 7.2, 6.0 Hz, C1'H), 8.23 (s, 1 H, C6H), 8.83 (s, 1 H, NH). Die Signale der TBDMS-Gruppen und CH₃-Gruppen treten im Spektrum als Rotamere unterschiedlicher Konformationen auf). ¹³C-NMR (100.6 MHz): δ = -5.5 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), 18.0 (Si(C(CH₃)₃), 18.4 (Si(C(CH₃)₃), 23.8 (CH₃), 24.5 (CH₃), 24.9 (CH₃), 25.7 (CH₃), 26.0 (CH₃, 3 C), 26.1 (CH₃, 3 C), 42.3 (C2'), 62.9 (C6H), 64.3 (C5' + CH₂), 65.4 (C5), 70.4, 70.6 (C3), 70.7, 72.5 (C3'), 78.7 (C_q), 85.0 (C_q), 86.5 (C1'), 88.8 (C4'), 96.2 (C1), 96.8 (C_q), 108.8 (C_q), 109.6 (C_q), 146.6 (C6H),

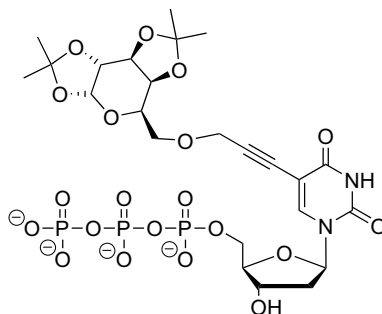
148.8 160.4. HRMS (FT-ICR⁺, M+H⁺): ber. für [C₃₆H₆₁N₂O₁₁Si₂⁺]⁺ 753.3808 gef. 753.3802.

5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-2'-desoxyuridin (57)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **65** (479 mg, 0.64 mmol) in THF (10 mL) wurde TBAF (1.91 mL, 1 M in THF, 3.0 eq) gegeben. Die Kühlung wurde nach einer Stunde entfernt und die Reaktion noch weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit zwei Tropfen Eisessig beendet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (Ethylacetat mit 10 % MeOH) aufgereinigt. Man erhielt **57** als weißen Feststoff (188 mg, 0.54 mmol, 87 %).

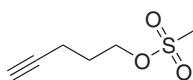
$R_f = 0.21$ (Ethylacetat mit 10 % Methanol) ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.32$ (s, 3 H, CH₃), 1.33 (s, 3 H, CH₃), 1.44 (s, 3 H, CH₃), 1.53 (s, 3 H, CH₃), 2.31 (dd, 1 H, J = 13.4, 6.7 Hz, C2'H), 2.39-2.43 (m, 1 H, C2'H), 3.15 (s, 1 H, OH), 3.36 (s, 1 H, OH), 3.68-3.74 (m, 2 H, C6H), 3.83 (d, 1 H, J = 10.9 Hz, C5'H), 3.93 (d, 1 H, J = 10.6 Hz, C5'H), 3.97-4.01 (m, 1 H, C5H), 4.03 (m, 1 H, C4'H), 4.26 (dd, 1 H, J = 7.9, 1.7 Hz, C4H), 4.32 (dd, 1 H, J = 5.0, 2.4 Hz, C2H), 4.37 (s, 2 H, CH₂), 4.56 (m, 1 H, C3'H), 4.60 (dd, 1 H, J = 7.9, 2.3 Hz, C3H), 5.54 (d, 1 H, J = 5.0 Hz, C1H), 6.22 (t, 1 H, J = 6.3 Hz, C1'H), 8.27 (s, 1 H, C6H_{Base}), 9.24 (s, 1 H, NH). ¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): $\delta = 24.5$ (CH₃), 24.9 (CH₃), 25.9 (CH₃), 26.0 (CH₃), 41.0 (C2'), 59.2 (CH₂), 61.7 (C5'), 66.9 (C5), 68.6 (C6), 70.5 (C2), 70.6 (C3), 70.9 (C3'), 71.1 (C4), 78.1 (C5_{Base}), 86.2 (C1'), 87.3 (C4'), 89.1 (C \equiv CCH₂), 96.3 (C1), 99.2 (C \equiv CCH₂), 108.9 (C_q), 109.5 (C_q), 144.6 (C6_{Base}), 149.4, 161.6. HRMS (FT-ICR⁺, M+H⁺): ber. für [C₂₄H₃₃N₂O₁₁]⁺ 525.2079 gef. 525.2073.

5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (66)

Synthese nach Kovács *et al.*:^[158]

Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **57** (0.09 g, 0.17 mmol) und 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (*proton sponge*, 59 mg, 0.28 mmol, 1.6 eq) in Trimethylphosphat (1.38 mL) wurde Phosphorylchlorid POCl₃ (18.6 μ L, 0.21 mmol, 1.2 eq) zugetropft. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Zu der Reaktion wurde eine Lösung von Tri-*n*-butylammonium Pyrophosphat (149 mg, 0.32 mmol, 1.85 eq und N(*n*-Bu)₃ 0.267 mL in 2 mL DMF) gegeben und die Reaktion nach 1 Minute durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (1.0 M, 40 mL, pH 8.5) beendet. Die Reaktion wurde noch 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach lyophilisiert. Reinigung mit RP-HPLC Aufreinigung (C18) (0 \rightarrow 50 % 0.1 M Triethylammoniumacetat \rightarrow 20 : 80 H₂O : MeCN mit 0.1 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 45 min mit 5 mL/min) ergab **66** (27.3 min) als Triethylammoniumsalz.

³¹P-NMR (80.9 MHz, D₂O): $\delta = -22.4$ (t, 1 P, J = 20.2 Hz, P- β), -10.5 (d, 1 P, J = 20.2 Hz, P- α), -9.9 (d, 1 P, J = 20.1 Hz, P- γ). MALDI-TOF (ATT, M + 2H⁺): 762.7.

Methansulfonsäure-pent-4-inylester (68)^[363]

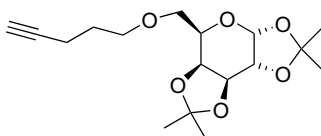
Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von Pent-4-in-1-ol (698 mg, 8.23 mmol) in trockenem Dichlormethan (5 mL) wurden Mesylchlorid (770.7 μ L, 9.96 mmol, 1.2 eq) und Ethyldiisopropylamin (2.66 mL, 1.9 eq) nacheinander zugetropft.

8. Experimenteller Teil

Die Lösung wurde zwei Stunden bei 0 °C gerührt und danach das Lösungsmittel vorsichtig abkondensiert. Man erhielt **68** als farbloses Öl (866 mg, 5.35 mmol, 65 %).

$R_f = 0.55$ (Isohexan:Ethylacetat 2:1). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.97$ (quin., 2 H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.01 (t, 1 H, $J = 2.4$ Hz, CH), 2.37 (td, 2 H, $J = 6.6, 2.4$ Hz, $\text{C} \equiv \text{CCH}_2$), 3.03 (s, 3 H, CH_3), 4.36 (t, 2 H, $J = 6.0$ Hz, CH_2O). $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.7$ ($\text{C} \equiv \text{CCH}_2$), 27.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 37.3 (CH_3), 68.2 (CH_2O), 69.8 ($\text{HC} \equiv \text{C}$), 82.1 ($\text{HC} \equiv \text{C}$).

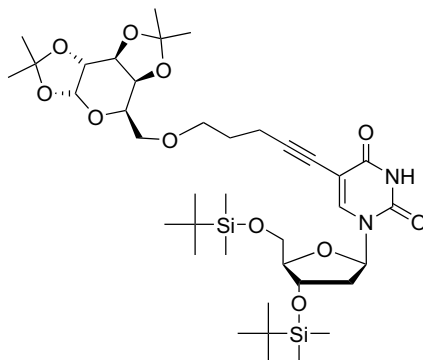
1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O-(pent-4-ynyl)- α -D-galactopyranose (**69**)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose **67** (644 mg, 2.47 mmol) in THF wurde NaH (118.7 mg, 60 % Suspension in Mineralöl, 2.97 mmol, 1.2 eq) gegeben und 30 Minuten gerührt. Dazu wurde eine Lösung von **68** (422 mg, 2.72 mmol, 1.1 eq) in THF (2 mL) langsam zugetropft und die Kühlung entfernt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 40 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit MeOH (1 mL) beendet und Wasser (20 mL) zugegeben. Danach wurde mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung (2x) und Wasser (1x) gewaschen. Säulenchromatographische Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 4:1) ergab **69** (575 mg, 1.76 mmol, 71 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.37$ (Isohexan:Ethylacetat 4:1). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.32$ (s, 3 H, CH_3), 1.33 (s, 3 H, CH_3), 1.44 (s, 3 H, CH_3), 1.53 (s, 3 H, CH_3), 1.79 (quin., 1 H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.92 (t, 1 H, $J = 2.6$ Hz, $\text{C} \equiv \text{CH}$), 2.27 (td, 1 H, $J = 7.1, 2.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{C} \equiv \text{C}$), 3.53-3.65 (m, 4 H, CH_2 , $2 \times \text{C}_6\text{H}$) 3.95 (td, 1 H, $J = 6.4, 1.5$ Hz, C_5H), 4.25 (dd, 1 H, $J = 7.9, 1.7$ Hz, C_4H), 4.30 (dd, 1 H, $J = 5.0, 2.3$ Hz, C_2H), 4.59 (dd, 1 H, $J = 7.9, 2.3$ Hz, C_3H), 5.52 (d, 1 H, $J = 5.0$ Hz, C_1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.2$ ($\text{C} \equiv \text{CCH}_2$), 24.4 (CH_3), 24.9 (CH_3), 26.0 (CH_3), 26.1 (CH_3), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 66.6 (C_5) 68.3 ($\text{C} \equiv \text{CH}$) 69.4 (OCH_2), 69.7 (OCH_2), 70.6 (2C, C_2+C_3), 71.2 (C_4), 84.0 ($\text{C} \equiv \text{CH}$), 96.4 (C_1), 108.5, 109.2. MS (EI^+ , M^+): 326.2, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$: 311.1. HRMS (EI^+ , M^+): ber. für $[\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_6]^+$ 326.1729 gef. 326.1689, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ber. für $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_6]^+$ 311.1489 gef. 311.1481.

5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5',3'-O-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxyuridin (70)

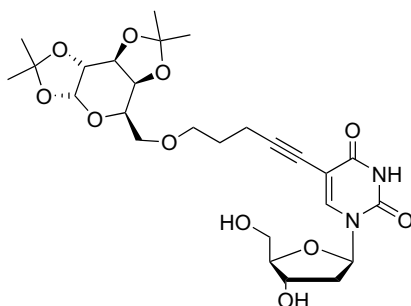


Zu einer entgasten Lösung von **5** (634 mg, 1.09 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (76 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq) und Kupfer(I)-iodid (41 mg, 0.2 mmol, 0.2 eq) in DMF (1 mL) wurde entgaste Hünigsbase (231 μ L, 1.25 eq) gegeben. Die Lösung wurde noch einmal entgast und dann eine Lösung von **69** (427 mg, 1.3 mmol, 1.2 eq) zugegeben. Die Reaktion rührte sieben Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde das DMF *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser (2x) und ges. NaCl-Lösung (2x) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach zweimaliger chromatographischer Reinigung (Isohexan:Ethylacetat 5:1 \rightarrow 1:1) erhielt man **70** als weißen Schaum (438 mg, 0.56 mmol, 51 %).

$R_f = 0.21$ (Isohexan:Ethylacetat 4:1). ¹H-NMR (400 MHz): $\delta = 0.05$ (s, 3 H, SiCH₃), 0.06 (s, 3 H, SiCH₃), 0.10 (s, 3 H, SiCH₃), 0.12 (s, 3 H, SiCH₃), 0.87 (m, 9 H, SiC(CH₃)₃), 0.90 (m, 9 H, SiC(CH₃)₃), 1.30 (s, 3 H, CH₃), 1.31 (s, 3 H, CH₃), 1.41 (s, 3 H, CH₃), 1.50 (s, 3 H, CH₃), 1.78-1.85 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂), 1.96-2.03 (m, 1 H, C2'H), 2.27 (ddd, 1 H, J = 13.1, 5.8, 2.7 Hz, C2'H), 2.43 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, CH'2), 3.51-3.70 (m, 4 H, C6H + CH₂O), 3.72-3.90 (m, 3 H, C5'H+C4'H), 3.92-3.94 (m, 1 H, C5H), 4.21-4.24 (m, 1 H, C4H), 4.27-4.29 (m, 1 H, C2H), 4.37-4.39 (m, 1 H, C3'H), 4.56-4.58 (m, 1 H, C3H), 5.50 (d, 1 H, J = 4.9 Hz, C1H), 6.26 (dd, 1 H, J = 7.6, 6.0 Hz, C1'H) 7.86 (s, 1 H, C6H), 9.2 (s, 1 H, NH). (Die Signale der TBDMS-Gruppen treten im Spektrum als Rotamere unterschiedlicher Konformationen auf, im Verhältnis 1:2) -5.6 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), 16.4 (CH₂), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 18.3 (SiC(CH₃)₃), 24.4 (CH₃), 24.9 (CH₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 25.9 (CH₃, 4 C), 26.0 (CH₃), 28.6 (CH₂CH₂CH₂), 41.8 (C2'), 62.9 (C5'), 66.6 (C5), 69.4 (CH₂), 69.9 (CH₂), 70.5 (C2), 70.6 (C3), 71.1 (C4), 71.4 (C_q), 72.2 (C3'), 85.5 (C1'), 88.2 (C4'), 94.5 (C_q), 96.3 (C1), 100.7 (C_q), 108.4

(C_q), 109.1 (C_q), 141.5 (C₆), 149.3 (C_q), 162.0 (C_q). HRMS (FT-ICR⁺, M+H⁺): ber. für [C₃₈H₆₅N₂O₁₁Si₂]⁺ 781.4121 gef. 781.4121.

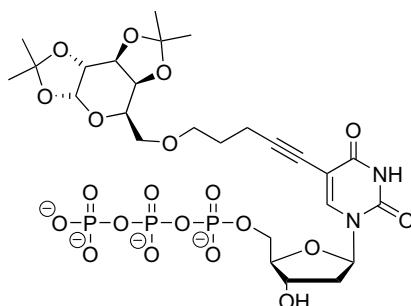
5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-2'-desoxyuridin (58)



Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **70** (254 mg, 0.32 mmol) gelöst in THF (5 mL) wurde TBAF (0.98 mL, 1 M in THF, 3.0 eq) gegeben. Die Kühlung wurde nach einer Stunde entfernt und die Reaktion noch weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit zwei Tropfen Eisessig beendet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (Ethylacetat mit 10 % MeOH) aufgereinigt. Man erhielt **58** als weißen Feststoff (86 mg, 0.16 mmol, 49 %).

R_f = 0.21 (Ethylacetat mit 10 % Methanol); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (d, 6 H, J = 2.5 Hz, CH₃), 1.44 (s, 3 H, CH₃), 1.53 (s, 3 H, CH₃), 1.77-1.87 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂), 2.00 (bs, 1 H, OH), 2.26-2.34 (m, 1 H, C2'H), 2.35-2.43 (m, 1 H, C2'H), 2.47 (t, 2 H, J = 6.92 Hz, CH₂C \equiv C), 3.29 (bs, 1 H, OH), 3.54-3.69 (m, 4 H, C5'H + C6H), 3.74-4.05 (m, 4 H, C5'H + C5H + C4'H), 4.24-4.27 (m, 1 H, C4H), 4.31 (dd, 1 H, J = 4.9, 2.3 Hz, C2H), 4.54 (m, 1 H, C3'H), 4.60 (dd, 1 H, J = 7.9, 2.2 Hz, C3H), 5.54 (d, 1 H, J = 5.0 Hz, C1H), 6.21 (t, 1 H, J = 6.5 Hz, C1'H), 8.03 (s, 1H, C6H), 9.18 (s, 1 H, NH). ¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 16.2 (CH₂), 24.4 (CH₃), 24.9 (CH₃), 26.0 (CH₃, 2 C), 28.3 (CH₂), 40.7 (C2'), 61.9 (C5'), 66.9 (C5), 69.6 (CH₂), 69.8 (CH₂), 70.6 (C2), 71.1 (C3), 71.2 (C3'), 71.7 (C4), 77.2 (C_q), 86.3 (C1'), 87.2 (C4'), 94.2 (C_q), 96.3 (C1), 100.6 (C_q), 108.7 (C_q), 109.3 (C_q), 143.1 (C6H), 149.5, 161.9. HRMS (FT-ICR⁺, M+Na⁺): ber. für [C₂₆H₃₆N₂O₁₁+Na⁺]⁺ 575.2211 gef. 575.2208.

5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-2'-desoxyuridintriphosphat (71)



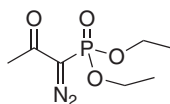
Synthese nach Kovács *et al.*:^[158]

Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von **58** (78 mg, 0.14 mmol) und 1,8-bis(dimethylamino)naphthalin (*proton sponge*, 48.7 mg, 0.23 mmol, 1.6 eq) in Trimethylphosphat (1.5 mL) wurde Phosphorylchlorid POCl₃ (15.3 μ L, 0.17 mmol, 1.2 eq) zugetropft. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Zu der Reaktion wurde eine Lösung von Tri-*n*-butylammonium Pyrophosphat (123 mg, 0.26 mmol, 1.85 eq und N(*n*-Bu)₃ 0.219 mL in 2 mL DMF) gegeben und die Reaktion nach 1 Minute durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (1.0 M, 40 mL, pH 8.5) beendet. Die Reaktion wurde noch 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach lyophilisiert. Reinigung mit RP-HPLC Aufreinigung (C18) (0 \rightarrow 50 % 0.1 M Triethylammoniumacetat \rightarrow 20 : 80 H₂O : MeCN mit 0.1 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 45 min) ergab **71** (29.6 min) als Triethylammoniumsalz.

³¹P-NMR (80.9 MHz, D₂O): δ = -22.4 (t, 1 P, J = 19.8 Hz, P- β), -10.5 (d, 1 P, J = 22.6 Hz, P- α), -9.9 (d, 1 P, J = 19.8 Hz, P- γ). MALDI-TOF (ATT, M + 2H⁺): 790.7.

8.5. Sonstige Substanzen

1-Diazo-2-oxo-propyl-phosphonsäurediethylester (17)^[153]

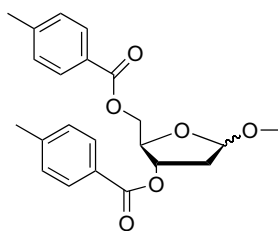


Diethyl-2-oxopropylphosphonat (1.0 g, 5.12 mmol) wurde bei 0 °C in THF (50 mL) gelöst und NaH (226 mg, 60 % in Mineralöl, 5.67 mmol, 1.1 eq) zugegeben (Gasentwicklung). Die Lösung wurde eine Stunde gerührt und dann 4-Acetamidobenzolsulfonylazid (1.36 g, 5.67 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Nach 40 Minuten wurde die Kühlung entfernt und die Reaktion weitere 24 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Diethylether suspendiert und über Kieselgur filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt und danach säulenchromatographisch gereinigt (Isohexan:Ethylacetat 1:1). Man erhielt **17** als gelbes Öl (918 mg, 4.17 mmol, 81 %).

$R_f = 0.18$ (Isohexan:Ethylacetat 1:1). $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.38$ (td, 6 H, $J = 7.1, 0.7$ Hz, CH_2CH_3), 2.27 (s, 3 H, CH_3), 4.09-4.30 (m, 4 H, CH_2CH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (80.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.12$.

8.5.1. 1- α/β -Chlor-2-desoxy-3,5-*p*-toluoyl-D-ribofuranose (29)

1- α/β -O-Methyl-2-desoxy-3,5-*p*-toluoyl-D-ribofuranose (82)^[160]



D-2'-Desoxyribose (7.0 g, 0.052 mol) wurde in 0.1%iger methanolischer HCl-Lösung (139 mL Methanol mit 32 μL Acetylchlorid) gelöst. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (CHCl_3 :MeOH 5:1) kontrolliert und nach vollständigem Umsatz Silbercarbonat (3.36 g, 12.2 mmol) zugegeben. Es wurde vom ausgefallenen Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde am Hochvakuum getrocknet und noch zweimal mit Pyridin ko-evaporiert. Danach wurde in 20 mL trockenem Pyridin gelöst und 2 h über Molsieb (4 Å) gerührt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und *p*-Toluoylchlorid

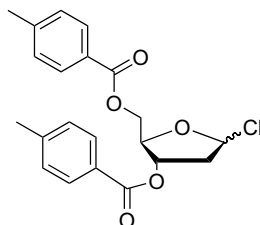
(15.33 mL, 0.115 mmol, 2.2 eq) und DMAP (kat.) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser (200 mL) wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser, 2 N Salzsäure und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Isohexan:Ethylacetat 10:1). Man erhielt **82** als Gemisch der Isomere (12.9 g, 336 mmol, 64 %).

$R_f = 0.42$ (Isomer 1): ¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 1.97$ -2.03 (m, 1 H, C2'H), 2.24 (s, 6 H, CH₃), 2.46 (m, 1 H, C2'H), 3.22 (s, 3 H, OCH₃), 4.40 (m, 3 H, C4'H, C5'H), 5.03 (dd, 1 H, J = 5.41, 2.26 Hz, C1'H), 5.31 (m, 1 H, C3'H), 7.16 (dd, 4 H, J = 5.69, 0.69 Hz), 7.78 (m, 4 H).

(Isomer 2): ¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 2.20$ -2.42 (m, 2 H, C2'H), 2.25 (s, 6 H, CH₃), 3.19 (s, 3 H, OCH₃), 4.37 (m, 3 H, C4'H, C5'H), 5.10 (dd, 1 H, J = 5.34, 0.87 Hz, C1'H), 5.31 (m, 1 H, C3'H), 7.16 (m, 4 H), 7.78 (m, 4 H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 22.0$ (2C, CH₃), 40.2 (C2'), 55.4 (OCH₃), 65.6 (C5'), 76.1 (C3'), 82.3 (C4'), 106.3 (C1'), 128.7 (2C, C_q), 130.4 (4C, CH), 130.7 (4C, CH), 145.1 (2C, C_q2C), 206.5 (2C, C=O).

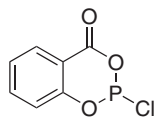
1- α/β -Chlor-2-desoxy-3,5-p-toluoyl-D-ribofuranose (**29**)^[160]



In einer Gaseinleitungsapparatur wurde Eisessig (40 mL) mit HCl-Gas gesättigt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von **82** (12.0 g, 31 mmol) in Eisessig (24 mL) gegeben. Durch die Lösung wurde unter Kühlung HCl-Gas geleitet. Nach 10 Minuten fiel ein weißer Feststoff aus. Nach 15 Minuten wurde schnell abfiltriert und fünfmal mit Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt **29** als weißen Feststoff (8.1 g, 20.8 mmol, 67 %).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.06$ -2.53 (m, 1 H, C2'H), 2.41 (s, 6 H, CH₃), 4.47-4.71 (m, 2 H, C4'H, C5'H), 5.47-5.80 (m, 1 H, C3'H), 7.19-8.02 (m, 8 H).

8.5.2. 2-Chloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on (74)^[156]



Salicylsäure (5 g, 36 mmol) wurde in trockenem Toluol (10 mL) suspendiert und PCl_3 (5.47 g, 3.476 mL, 39.9 mmol, 1.1 eq) zugegeben. Die Reaktion wurde 3 Stunden refluxiert, bis die Gasentwicklung abgeklungen war. Das Toluol wurde vorsichtig abkondensiert und der Rückstand mit einer kurzen Vigreux-Kolonnen destilliert (2 mbar, 105 °C). Man erhielt **74** als weißen Feststoff (2.2 g, 10.8 mmol, 30 %).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.16$ (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.35 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.68 (ddd, $J = 9.3, 8.2, 1.8$ Hz, 1 H), 8.12 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1 H). $^{31}\text{P-NMR}$ (80.9 MHz, CDCl_3): $\delta = 149.40$ (s).

8.6. Synthese der DNA Oligomere

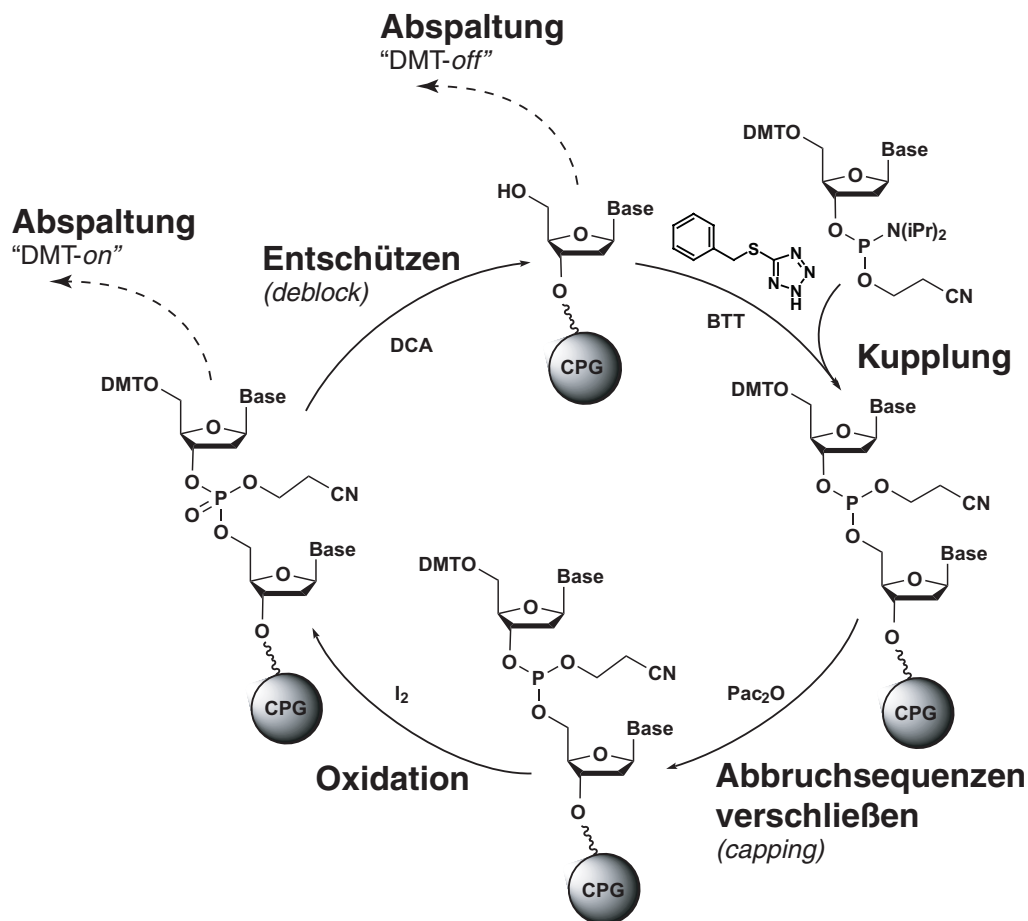


Abbildung 8.1: Prinzip der Festphasensynthese von DNA mit DMT-Phosphoramiditchemie.

Die Synthese an der festen Phase wurde mit DMT-Phosphoramiditchemie durchgeführt (s. Abb. 8.1). Zu Beginn des Zyklus wird mit Hilfe von Säure (2% Dichloressigsäure in Dichlormethan) die Dimethoxytritylgruppe abgespalten („Entschütten“). Zur Bestimmung der Kupplungseffizienz wird das Signal des entstehenden tiefroten Kations mit Hilfe eines UV-Detektors integriert. Dieser Wert ist ein wichtiger Hinweis auf Probleme während der Synthese. Im nächsten Schritt werden die freien Hydroxylgruppen mit dem aktivierten Phosphoramidit der nächsten Base gekuppelt. Zur Aktivierung hat sich Benzylthiotetrazol (BTT, 0.25 M in trockenem MeCN) als Aktivator bewährt. Es ist einfacher herzustellen als Ethylthiotetrazol (ETT) und gab bes-

sere Kupplungen als DCI (Dicyanimidazol) oder Turbotetrazol (Tetrazol mit 4-Nitrophenyltetrazol). Nach der Kupplung muss verhindert werden, dass nicht umgesetzte freie 5'-OH-Gruppen im nächsten Kupplungsschritt reagieren. Dazu werden sie mit Phenoxyessigsäureanhydrid (Pac_2O) umgesetzt (Lösung Cap A: 0.52 M Pac_2O in 2,6-Lutidin:MeCN (1:8); Lösung Cap B: 16 Vol-% 1-Methylimidazol in MeCN). Nachfolgende Oxidation des Phosphors mit Iod-Lösung (0.01 M Iod in MeCN/2,6-Lutidin/ H_2O 65:6:30) verhindert eine Hydrolyse während der weiteren Synthese. Danach kann der Zyklus mit einer neuen Entschützung erneut beginnen. Für den Zeitpunkt der Abspaltung des DNA-Strangs vom Träger gibt es nach der Synthese zwei Möglichkeiten. Bei kurzen Oligomeren (bis 30 Basen) wird nach einer abschließenden Entschützung der Strang ohne DMT vom Träger abgespalten („DMT-off“). Das hat den Vorteil, dass der Strang nach einer Aufreinigung direkt sauber erhalten werden kann. Andererseits kann es bei langen Strängen schwierig werden, eine um eine Base kürzere Abbruchsequenz über HPLC abzutrennen. In solchen Fällen wird der Strang mit der letzten DMT-Gruppe vom Träger abgespalten („DMT-on“). Dadurch ist diese Sequenz deutlich unpolarer als Abbruchsequenzen und ist daher leichter aufzureinigen. In einem zweiten Schritt wird die DMT-Gruppe abgespalten und der Strang ein zweites Mal gereinigt.

In Tabelle 8.1 sind die mit verschiedenen Modifikationen hergestellten DNA-Stränge angegeben. Alle Stränge wurden mit dem Protokoll „Glenn_110804_long“ (s. Anhang A.1) synthetisiert. In diesem Protokoll ist die modifizierte Base etwas geringer (1.0 mM) konzentriert, wird dafür aber doppelt gekuppelt und deutlich länger entschützt. Die Zeiten für Entschützung und Kupplung wurden auch für die nachfolgenden Basen verlängert. Die Abspaltung wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (4 h, 40 °C, NH_3 :EtOH 3:1). Die Aufreinigung der DNA wurde mit Hilfe von RP-HPLC (C18, 0→30 % 0.1 M Triethylammoniumacetat → 20 : 80 H_2O : MeCN mit 0.1 M Triethylammoniumacetat, Gradient in 45 min, für „DMT-on“ 0→60 %). Zur Abspaltung der DMT-Gruppe bei „DMT-on“ wurde der Strang auf eine SePac-Kartusche (Nach Aktivierung mit 5 mL MeCN und Spülen mit 10 mL H_2O) aufgetragen und mit TFA (2 %, 10 Min., danach sofort mit 0.1 M Triethylammoniumacetat neutralisieren) behandelt. Danach wurde mit Wasser gewaschen und mit MeCN: H_2O 80:20 eluiert.

8.6. Synthese der DNA Oligomere

Sequenz (X = 9)		Masse	T _m [°C]
5' -GCGCTGT X CATTTCGCG	d1	4871.0 (4871.8)	69.1 (68.1)
5' -GCGCTG XX CATTTCGCG	d2	4881.5 (4881.8)	69.4
5' -GCGC XGTXCAX TCGCG	d3	4891.8 ([M+ Na ⁺] ⁺ : 4889)	69.9
5' -GCGC XXXXXXXX GTCGCG	d4	4928.2 (4927.7)	
X = 12			
5' -GCGCTGT X CATTTCGCG	d5	4954.6 (4951.9)	65.5
5' -GCGCTG XX CATTTCGCG	d6	5042.0 (5041.9)	
5' -GCGC XGTXCAX TCGCG	d7	5134.4 (5132.0)	66.1
5' -GCGC XXXXXXXX GTCGCG	d8	5413.1 (5408.1)	
5' -TTAATTGAATTCGATT XGGG CC GG AX TTGTTTC	d9	10351.7 (10345.8)	72.0 (71.9)
5' -GCAGGC XTCA XGCC CAGAATTAC CAGAAG	d10	8784.8 (8782.6)	
X = 51			
5' - X GGAAATTAAG	d11	2934.57 (2931.54)	
X = 53			
5' - X TTAATTGAATTCGATTTGGGC CGGATTTGTTTC	d12	10334.93 (10327.69)	
5' - X GCGCTGTTTCATTTCGCG	d13	5024.85 (5023.83)	
X = 54			
5' - X GCGCTGTTTCATTTCGCG-Fluo	d14	5024.85 (5023.83)	
X = 55			
5' -TTTTTT X TTTTT	d15	4006.0 (Aldehyd: 4004.65)	
5' -TTTTTT XX TTTTT	d16	4120.3 (2x Ald.: 4118.7)	
5' -GCCG AX GCGC	d17	4060.6 (Ald.: 4061.7)	53.8 (56.5)
5' -GCG X ATA X ATA X TCGC	d18	5270.5 (2x Ald.: 5268.9)	48.4 (53.7)

Tabelle 8.1: Die mit den verschiedenen Alkinen (X = 9, 12, 51, 53, 54) und Aldehyd (X = 55) hergestellten Stränge. Die Massen in Klammern geben die berechneten Massen an. Die Stränge **d17** und **d18** wurden als Mischungen der Aldehyde und Acetale erhalten. Die Schmelzpunkte in Klammern geben den Schmelzpunkt natürlicher DNA an.

8.7. „Click“-Protokolle

8.7.1. Für DNA-Oligomere

CuSO₄/TCEP Zu einer Lösung der DNA (ca. 0.2 mM in Wasser) wurden die Lösung des Azids (je nach Azid 10 mM in Wasser, H₂O:MeOH oder DMSO, 50 eq), CuSO₄/Ligand **1** (1:1, in DMSO, 0.05 M, 20 eq) und als letztes eine Lösung von TCEP (in Wasser, 0.1 M, 40 eq) gegeben. Die Reaktion wurde zwischen 2 Stunden und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Analyse mit MALDI wurden die Proben durch Dialyse entsalzt. Zur Aufreinigung wurde die DNA ohne Aufkonzentrieren mit Ethanol gefällt.

CuBr Zu 25 µL einer Lösung der DNA (0.5 mM, 12.5 nmol in Wasser) wurden die Lösung des Azids (6.25 µL, 0.1 M, 625 nmol, 50 eq) und 10 µL einer frisch hergestellte Lösung von CuBr und Ligand **1** im Verhältnis 1:1 (4:3:1 Wasser : DMSO : tBuOH, 0.05 M, 250 nmol, 20 eq) zugegeben. Die Reaktion wurde durchmischt und bei 15 °C für 1 Stunde geschüttelt. Zur Analyse mit MALDI wurden die Proben durch Dialyse entsalzt. Zur Aufreinigung wurde die DNA ohne Aufkonzentrieren mit Ethanol gefällt.

8.7.2. Für PCR-Produkte

Reaktion auf dem Gel Die PAAG-Gele (5 %) wurden in Wasser : MeOH (1:1, 25 mL) gegeben und nacheinander eine Lösung von Zuckerazid **44** (0.1 M, 3 mL), eine Lösung von CuSO₄ (0.1 M, 600 µL in Wasser) und TCEP (0.1 M, 1.2 mL). Die Gele wurden über Nacht in Lösung geschwenkt. Nach der Reaktion wurden die Gele mit MeOH : H₂O (1:1, 3 x 50 mL, jeweils 10 Min.) und mit Wasser (3 x 50 mL, jeweils 10 Min.) gewaschen.

CuBr Zu einer Lösung des PCR-Produkts (10 µL, 1-4 pmol DNA in Wasser oder 10 mM Tris/HCl) wurden eine Lösung des Azids (10 µL, Fluoreszeinazid **45** (5 mM, verdünnt mit 10 mM Tris (pH=7.5) mit 5% tBuOH aus einer Stocklösung 0.1 M in DMSO oder Zuckerazid **44** 5 mM in 10 mM Tris (pH=7.5)) und frisch hergestellter Cu(I)-Komplex (10 µL, 10 mM; 1 mg CuBr (99.99 %) gelöst in 700 µL 10 mM Ligand **1** in tBuOH : DMSO 1:3) Die Reaktion wurde 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Zur Analyse der Produkte auf Gelen wurde direkt mit Auftragspuffer beendet. Zur Aufreinigung der Produkte wurde mit Ethanol gefällt.

8.7.3. Aufreinigung durch Fällung mit Ethanol

Zu der Click-Reaktion wurde NaOAc-Lösung (0.3 M, 100 μ L) und anschließend 900 μ L Ethanol (95 %). Die Lösung wurde dreimal invertiert und eine Stunde auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Danach wurde die Probe für 4 Minuten zentrifugiert (13.4×10^3 rpm) und erneut für eine Stunde auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Danach wurde erneut für 4 Minuten zentrifugiert (13.4×10^3 rpm) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Der Rückstand wurde mit Ethanol gewaschen (2-3x je 500 μ L). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und die DNA in Wasser wieder aufgenommen (100 μ L). Alternativ kann auch in einem Schritt mit verlängerter Kühlungsphase gefällt werden (4 Stunden).

8.8. Metallisierung

8.8.1. Lösungen

Tollens-Lösung 80 mL H_2O , 5 mL AgNO_3 -Lösung (0.5 M) und 1 mL NaOH Lösung (3.0 M) wurden gründlich vermischt. Der ausgefallene Feststoff wurde danach durch Zugabe von Ammoniak-Lösung (2.2 mL, 12.5 % NH_3 ; Konzentrierte Ammoniaklösung 1:1 verdünnt) aufgelöst. Die Lösung muss sofort verwendet werden, da Tollenslösungen nach längerem Stehen explodieren können (Dies ist einmal nach 3 Wochen geschehen.).

Gold-Verstärkung Zu einer Lösung von KSCN (0.5 mL, 60 mg/mL) wurde eine Lösung von KAuCl_4 solution (0.5 mL, 23 mg/mL) gegeben und eine Minute zentrifugiert (2000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und der Feststoff in Phosphatpuffer gelöst (8 mL, 0.05 M, pH=5). Kurz vor der Verwendung wurde eine Lösung von Hydrochinon (250 μ L, 5.5 mg/mL) zugegeben.

8.8.2. Protokolle

Silberfärbung von Gelen Die Gele wurden für 30 Minuten mit Tollens-Lösung (40 mL) inkubiert und danach mit Wasser gewaschen (3 x 50 mL, jeweils 10 Min.). Zur Entwicklung wurden die Gele mit einer sauren Formaldehydlösung (100 mL H_2O , 250 μ L Zitronensäure (1 %), Formaldehydlösung (35 %, 80-200 μ L)). Abhängig von der Formaldehydmenge kann die Entwicklung 2 bis 20 Minuten dauern. Weniger Zitronensäure beschleunigt die Reaktion. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 1%iger Zitronensäure gestoppt.

Membran Die DNA wurde auf eine Nylonmembran aufgebracht und getrocknet. Die Membran wurde für 25 Minuten mit Tollenslösung (1:10 verdünnt) inkubiert und danach für 30 Minuten in Wasser gewaschen. Dann wurde die Membran in die Gold-Lösung gegeben.

8.9. Biochemische Arbeiten

8.9.1. Material und Methoden

PCR -Reaktionen wurden auf einem *Eppendorf Mastercycler personal* in 0.2 mL PCR-Gefäßen von *Eppendorf* durchgeführt. **qPCR** wurde auf einem *Eppendorf Mastercycler Sep realplex⁴* in einer 96-well-Platte mit *Eppendorf Capstrips* durchgeführt. Dieser Cyclus besitzt einen Silberblock für hohe Heiz- und Kühlraten und erlaubt das gleichzeitige Screening von verschiedenen Bedingungen durch einen Temperaturgradienten über die Proben.

PAAG-Gele: Kurze Polyacrylamid-Gele (8 cm) wurden in einer *Mini-PROTEAN 3-Kammer* von *Biorad*, lange Gele (20 cm) mit einer *PROTEAN II xi-Kammer* von *Biorad* gefahren. Die Geldicke war bei kurzen Gelen 0.75 mm, bei langen Gelen 1 mm. Zusammensetzung und Herstellung siehe Abschnitt 8.9.3. Gele wurden bei einem konstanten Strom von 12 mA bei kurzen, bzw. 30 mA bei langen Gelen gefahren, bzw. mit dem Strom bei der maximalen Spannung von 300 V, bzw. von 1000 V. Die langen Gele wurden durch Wasserkühlung auf 40 °C gehalten.

Agarose-Gele wurden in einer horizontalen Gelkammer *Mini-Sub-Cell GT* von *Biorad* gefahren. Dabei wurde eine konstante Spannung von 110 V verwendet.

DNA-Konzentrationen wurden mit einem *BioPhotometer* der Firma *Eppendorf* oder einem *Nanodrop ND-1000* von *PreQ-Lab* bestimmt. Als Extinktionskoeffizient wurde der Standard für dsDNA verwendet.

Gel-Detektion wurde für die geringe Auflösung auf einem *IDA Imager (Raytest)* und für Bilder mit hoher Qualität auf einem *LAS-3000 Imager (Raytest)* durchgeführt. Abhängig vom Farbstoff wurden entsprechende Cutoff-Filter verwendet. (515 nm für SYBR Green und Fluoreszein, 460 nm für Cumarin, 605 nm für Ethidiumbromid). Als Lichtquelle wurde entweder 312 nm Durchlicht oder 460 nm LED-Auflicht verwendet.

Schmelzpunkte der PCR-Produkte wurden mit dem qPCR-Cycler direkt nach der jeweiligen PCR im PCR-Puffer aufgenommen.

Enzyme und Marker Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von *Roche Diagnostics*, *New England Biolabs* und *Novogen* bezogen. Als Marker wurde die 2-log-Leiter und die 1-kb-Leiter von *New England Biolabs* verwendet.

Puffer

10x TBE: 0.89 M Tris (108 g), 0.89 M Borsäure (55 g), 32 mM EDTA (9.3 g) auf 1 L.

10x TAE-Laufpuffer: 0.4 M Tris (48.46 g), 10 mM EDTA (2.92 g) auf 1 L. pH-Wert mit NH_3 -Lösung auf 7.5 einstellen. 10x TAE-Laufpuffer entspricht 20x-TAE-Gelpuffer.

2x Auftragspuffer: 89 mM Tris/HCl, pH 8.0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 12 % Ficoll, 0.01 % Bromophenol Blau (Lauffront), 0.02 % Xylene Cyanol FF (mittlere Bande).

PAAG-Stocklösung wurde von *Roth* bezogen (Sequenziergelkonzentrat, 25 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 mit 50 % Harnstoff.).

PAAG-Gelverdünner ist eine 7.0 M Harnstofflösung (500 g/L).

PAAG-APS-Lösung ist eine Lösung von Ammoniumperoxodisulfat (10 %; 10 mg auf 100 mL)

8.9.2. Enzymatischer Abbau von DNA

Zur Bestimmung der Zusammensetzung von hergestellter DNA mittels HPLC-MS/MS wurde die DNA nach folgendem Protokoll zu ihren Monomeren abgebaut: Im Falle von kurzen Oligomeren wurden 100 μL mit 20 μM verwendet, bei PCR-Produkten oder Plasmiden sollte die DNA mindestens eine Konzentration von 30 ng/ μL bei einem Volumen von 50 μL haben. Dazu wurden 10 μL eines Puffers (300 mM Ammoniumacetat, 100 mM CaCl_2 und 1 mM ZnSO_4 , pH=5.7) hinzugegeben. Bei Plasmiden wurde noch 1 μL (1 U) DNase I (*NEB*) zugegeben. Diese Lösung wurde mit 11 U Nuklease P1 aus *Penicillium citrum* (*Sigma*,

5 μL einer Lösung mit 2.2 U/ μL in 30 mM NH_4OAc pH=5.0) sowie 0.05 U *calif spleen*-Phosphodiesterase versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 12 μL eines zweiten Puffers (500 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH=8.0), 10 U *alkaline calf intestinal*-Phosphatase (1 μL , NEB) sowie 9 U *snake venom*-Phosphatase hinzugegeben und bei 37 °C weitere 3 h inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde HCl (6 μL , 0.1 M) hinzugegeben. Die Lösung wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

8.9.3. Gele

PAAG-Gele: Es wurden meistens 5 %ige (für 2 kurze Gele: 2 mL Stocklösung, 7 mL Verdünner und 1 mL 10x-TBE vermischen und 5 μL TEMED und 50 μL APS-Lösung zugeben und sofort verwenden) oder 20 %ige (für 2 kurze Gele: 9 mL Stocklösung und 1 mL 10x-TBE vermischen und 5 μL TEMED und 50 μL APS-Lösung zugeben und sofort verwenden) verwendet. Für ein langes Gel wurden die oben angegebenen Mengen vervierfacht. Zur Detektion der DNA wurden die Gele 15 Minuten in einer Lösung mit SYBR Green (10 μL Stocklösung auf 100 mL 1xTBE).

Agarose-Gele: Für eine 1 %iges Gel wurden 0.5 g Agarose in 50 mL TAE-Gelpuffer suspendiert und die Lösung in der Mikrowelle (700 W, ca. 35 s) erhitzt. Dabei wurde die Lösung alle 5 Sekunden geschwenkt. War die Agarose vollständig gelöst, wurden nach kurzer Kühlung 8 μL Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und die noch warme Lösung in die Gießform gefüllt. Für DNA-Stränge unter 1000 Basenpaare Länge wurden 2 % Gele (1 g Agarose auf 50 mL) verwendet.

8.9.4. Präparation der Plasmide

Die Plasmide mit den Templaten für die PCR wurden in *E. coli*-Zellen amplifiziert. Die Klone mit den Plasmiden wurden von Carsten Pieck zur Verfügung gestellt.

Anzucht der Bakterien Zu 50 mL LB Medium (10 g tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl pH 7.5) wurden 50 μL Antibiotikum Ampicillin (Stocklg. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugegeben und je 5 mL Medium in Kultur-Röhrchen gefüllt. Danach wurden die Kulturen mit ein paar Zellen aus der tiefgefrorenen Stocklösung angeimpft und bei 37 °C geschüttelt (ca. 12 Stunden).

Herstellen einer Zell-Stocklösung Zu 5 mL der hergestellten Kultur wurde 0.5 mL Glycerol (40 %) zugegeben und bei -80 °C aufbewahrt.

Präparation der Plasmide Das verwendete Protokoll ist eine Abwandlung des *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Dabei wird die DNA mit Ethanol gefällt, anstelle der *spin columns* des Kits.

- Kulturen 10 Min. mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugieren.
- Überstand abschütten.
- 250 µL P1-Puffer (RNase, auf Eis) zugeben, Zellen resuspendieren und in 1.5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführen.
- 250 µL P2 Lyase zugeben. (nicht länger als 4:45 Min), Proben 2x invertieren.
- 350 µL N3-Puffer zugeben, invertieren.
- 30 Min. 4 °C 13200 rpm zentrifugieren.
- Überstand abpipettieren und Bodensatz verwerfen.
- 700 µL Isopropanol zugeben, invertieren.
- 10 Min. 4 °C 13200 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen. (vorsichtig dekantieren).
- Ca. 200 µL 70 % Ethanol zugeben und das Pellet aufwirbeln.
- 10 Min 4 °C 13200 rpm zentrifugieren.
- Ethanol vorsichtig dekantieren und verdunsten lassen. Die DNA darf nicht völlig austrocknen.
- 40 µL bidest. H₂O oder EB-Puffer (10 mM Tris/HCl) zugeben.
- Pellet bei 34 °C lösen (400 rpm).

8.9.5. Primerverlängerung

Strang	
P	CATGGGCCAAGCTTCTTCGG-Fluo-5'
T1	TCGTC A GTCGGTACCCGGTTCGAAGAAGCC-3'
T2	TCGT AA GTCGGTACCCGGTTCGAAGAAGCC-3'
T3	C ACAAAGACA T CA TCGT AA TGCGGTACCCGGTTCGAAGAAGCC-3'

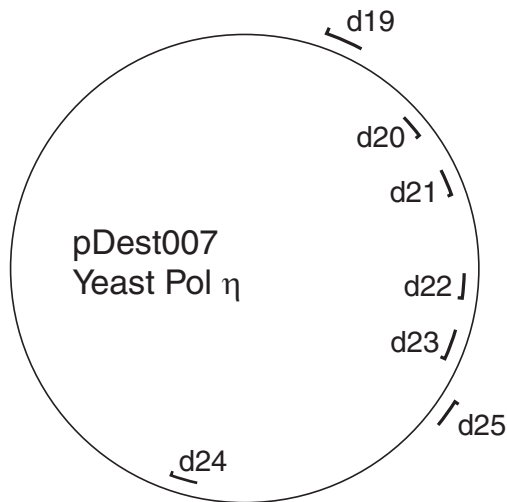
Tabelle 8.2: Die zur Primerverlängerungen verwendeten Sequenzen (P ist am 5'-Ende mit Fluoreszein markiert). **A** zeigt die Position des Einbaus eines modifizierten dUTPs.

Zur Durchführung der Primerverlängerung (nach^[250]) wurde für eine größere Anzahl von Reaktionen (meistens 10) Primer und Templat im entsprechenden Polymerasepuffer hybridisiert und bis zur Reaktion bei 4 °C gelagert. Dazu wurden pro Reaktion 15 nmol Primer (1.5 µL Stocklösung mit 10 pmol/µL), 18 nmol Templat (1.8 µL Stocklösung mit 10 pmol/µL), 1 µL Puffer (10x) und 5.7 µL Wasser zusammengegeben. Die DNA wurde dann mit dem Programm JG_Hybrid_2h hybridisiert. Die Lösung wurde bis zur Durchführung im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Reaktion wurden die Triphosphate (2 µL einer 2 mM Stocklösung aller verwendeten Triphosphate) mit Puffer (1 µL, 10x) und Wasser (7 µL – Volumen Polymerase) vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden auf 0 °C gekühlt und 10 µL der Primer/Templat-Lösung zugegeben. Zu der Lösung wurde 1 U Polymerase zugegeben und die Probe sofort bei 72 °C inkubiert. Nach 10 Minuten (in den ersten Versuchen auch länger) wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µL EDTA (0.1 M, pH=7.5) beendet. Zu den Proben wurde 10 µL Auftragspuffer gegeben und 10 µL auf ein langes PAAG-Gel aufgetragen.

Die Bedingungen entsprechen folgenden endgültigen Konzentration: Primer: 750 nM; Templat: 900 nM; dNTP: 200 µM im Gesamtvolumen von 20 µL.

8.9.6. PCR-Primer und -Produkte



Primer		Länge (bp)	T	dC
d19	d20	294	153	104
d19	d21	551	317	205
d19	d22	934	551	352
d19	d23	1398	837	529
d19	d24	2149	1233	887
d25	d24	325	178	126

d19	5'- <u>TTA ATT GAA TTC</u> GAT TTG GGC CGG ATT TGT TTC
d20	5'-TTT TAT GCT ATC TCT GAT ACC CTT G
d21	5'-TAA GCT GGC CAG CAT TAT CAG
d22	5'-TGA TGC CCT TGT ACG CAA CTG
d23	5'-GGA AGA TGT AAC TTG TTT CTT CTG
d24	5'-GGG TTA TTG TCT CAT GAG CG
d25	5'-AAG CCT ATG CCT ACA GCA TC
d26	5'-GAT TTG GGC CGG ATT TGT TTC
d27	5'- <u>ATT AAG AAT TCT</u> TTT ATG CTA TCT CTG ATA CCC TTG
d28	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GCC AGA GTT ACC AGA AG
d29	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA TTT TTG CTG ACA GAA TGG G

Von zwei Primern wurden zwei unterschiedliche Varianten verwendet (**d19:d26** und **d27:d20**). Die längere (**d19** und **d27**) verlängert das PCR-Produkt um eine EcoR I-Restriktionsschnittstelle (in der Tabelle unterstrichen). In den Versuchen wurde vor allem **d19** und **d20** verwendet. Bei den kurzen PCR-Produkten machte es keinen Unterschied, welche Primer verwendet wurden. Bei den langen PCR-Produkten wurde nur mit dem längeren Primer ein Produkt erhalten.

8.9.7. PCR-Bedingungen

Stocklösungen Alle Stocklösungen wurde mit autoklaviertem Wasser hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt.

	Konzentration
Primer	10 pmol/μL
Templat	200 ng/μL
dNTPs	2 mM

Polymerasen Die Polymerase Pwo wurde von *Roche Diagnostics* bezogen. Deep Vent *exo*⁻ und Vent *exo*⁻ wurden von *New England Biolabs* bezogen, KOD XL über *VWR* von *Merck Biosciences (Novagen)*. Die Taq-Polymerase wurde von *Claudia Gräf* exprimiert und aufgereinigt.

Polymerase	PCR-Puffer (10x)
Taq	100 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 1 % Triton X-100 (pH=9.0)
Pwo	100 mM Tris/HCl, 250 mM KCl, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgSO ₄ (pH=8.85)
Deep Vent <i>exo</i> ⁻	200 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgSO ₄ 1 % Triton X-100 (pH=8.8)
KOD XL	200 mM Tris/HCl, 80 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, 500 μg/mL BSA (pH=7.5)

PCR mit Taq-Polymerase Mit den folgenden Bedingungen wurde die PCR mit natürlichen Triphosphaten zur Herstellung der DNA für Kontrollexperimente und die Produkte mit Alkinprimern durchgeführt. Dazu wurde für kurze DNA das Programm BACCO PCR und für die DNA >900 das Programm BACCO 2min verwendet. Für 10 Reaktionen wurde Templat (jeweils 1 μL) in den Reaktionsgefäßen vorgelegt und 14 μL Wasser zugegeben. Dann wurde der PCR-Master aus den Primern (2 μL pro Primer), Triphosphaten (20 μL), Puffer (20 μL, 10x, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 0.1 % Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂), Wasser (24 μL) und Polymerase (2.5 μL) gemischt und je 7 μL der Masterlösung auf die Reaktionsgefäße verteilt. Diese Bedingungen entsprechen folgenden Konzentrationen in der PCR: dNTPs: 0.18 mM; Primer 0.09 μM. Für Reaktionen im größeren Maßstab wurden alle Volumina verdoppelt.

Standard PCR Mit den folgenden Bedingungen wurde die PCR mit modifizierten Triphosphaten durchgeführt. In den meisten Reaktionen wurden die Triphosphate und das Wasser in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Falls die Zugabe von DMSO nötig war (bei den längeren PCR-Produkten), wurde es mit einer Multipette ebenfalls in die Reaktionsgefäße gegeben. Alle anderen Reagenzien (Templat, Puffer, Primer, SYBR Green, Polymerase) wurden in der Masterlösung gemischt und auf die Reaktionsgefäße verteilt. Die erforderlichen Volumina der PCR wurden über ein Excel-Dokument berechnet, was entsprechend der Anzahl an Reaktionen die benötigten Mengen berechnete. Die PCR wurde mit folgenden Mengen und Konzentrationen durchgeführt: dNTPs: 0.2 mM, Primer: 0.3 μ M, Templat: 400 ng, Polymerase: 1 U, Puffer: 1x, Gesamtvolumen: 25 μ L. Zur Herstellung größerer Mengen wurde das Gesamtvolumen verdoppelt.

Additive Für die qPCR wurde pro Reaktionsgefäß 1 μ L einer Verdünnung der kommerziell erhältlichen SYBR Green-Lösung (10.000x) zugegeben (1:100 in Wasser). Bei Triphosphat **22** mit der Polymerase Pwo führte diese Menge an SYBR Green zur Inhibition der PCR. Daher wurde für diese qPCR die Menge auf 1/4 herabgesetzt.

PCR-Kombinationen

Triphosphat	PCR-Produkt	Polymerase	Additive	Programm
N	300,500	Taq	-	Bacco PCR
	900, 2k	Taq	-	Bacco PCR 2 Min
21,22,49,72	300	Pwo	-	JGY30057
22	300	KOD	-	JGY30057
21,49	900	Pwo	4 % DMSO	JGY90057
22	900	KOD	4 % DMSO	JGY90057
49	2k	Pwo	4 % DMSO	JGY2k58
66,71	300	Deep Vent <i>exo</i> ⁻		JGY30057
73	300	KOD	8 % DMSO	TP10300

Die Tabelle gibt die am häufigsten verwendeten Kombinationen von Triphosphaten, Programmen und Polymerasen an. Die Protokolle sind im Anhang A.2 angegeben.

8.9.8. PCR-Produkt mit 300 Basenpaaren

Die folgenden Abbildungen zeigen die einzelnen qPCR-Daten der unterschiedlichen Polymerase/Triphosphat-Kombinationen.

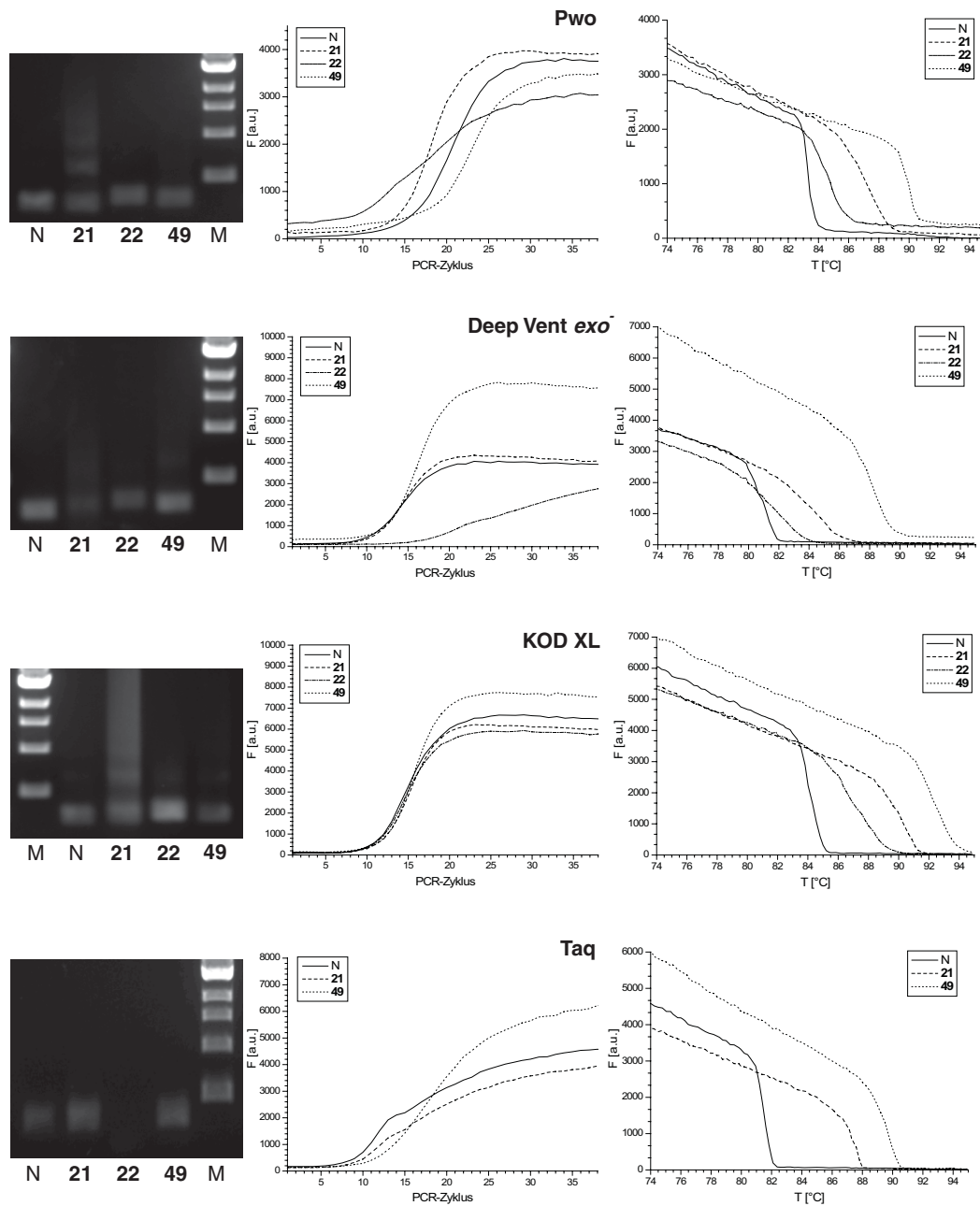


Abbildung 8.2: Gele und qPCR-Daten des 300 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Alkin-Triphosphaten 21, 22 und 49.

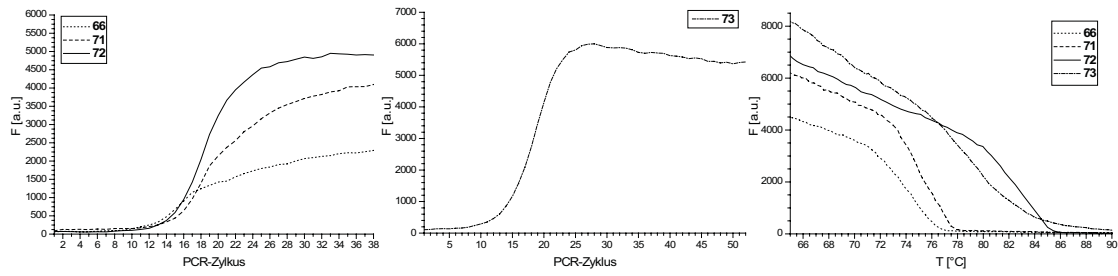


Abbildung 8.3: qPCR-Daten des 300 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Aldehyd-Triphosphaten 66, 71, 72, und 73.

8.9.9. PCR-Produkt mit 900 Basenpaaren

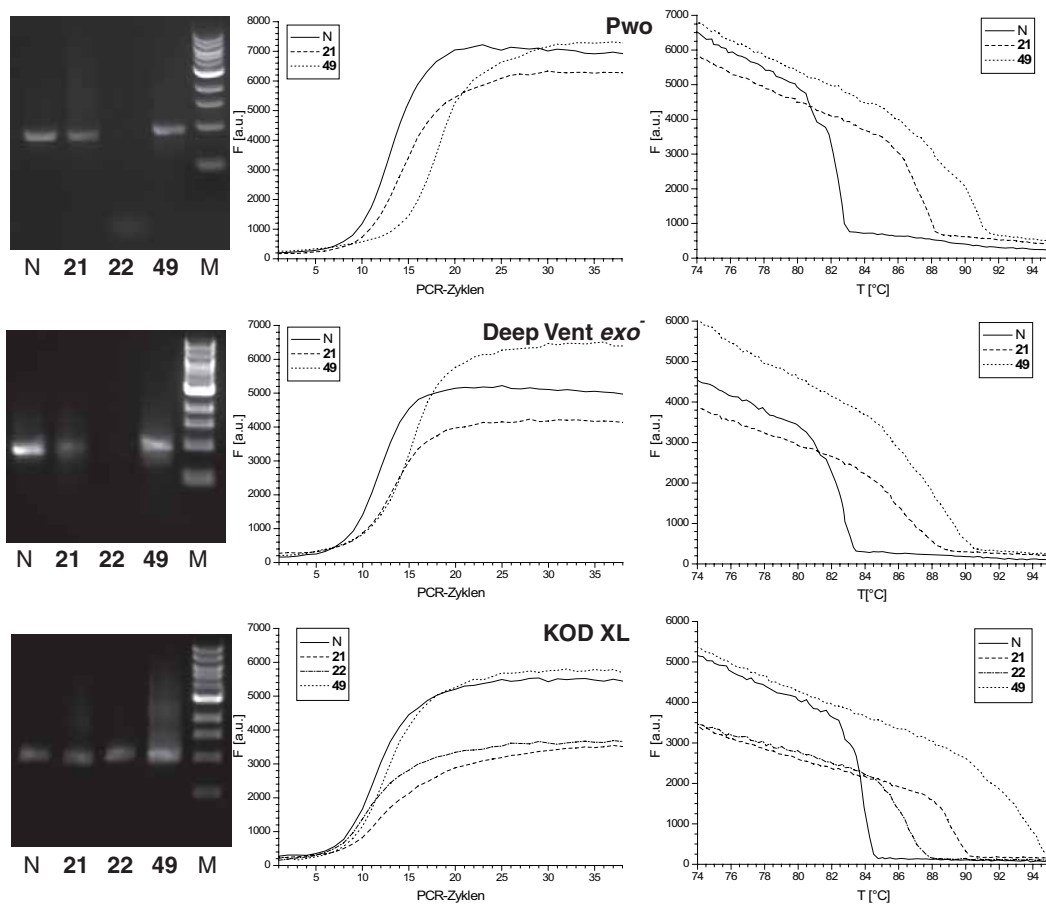


Abbildung 8.4: Gele und qPCR-Daten des 900 Basenpaare langen PCR-Produkts mit den Triphosphaten 21, 22 und 49.

8.9.10. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die meisten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *Qiaquick PCR-Cleanup kit* von *Qiagen* aufgereinigt. Mit dieser Methode lassen sich Primer, Enzyme und Triphosphate abtrennen, aber nicht das PCR-Templat. Wenn dies nötig war, z. B. für AFM-Proben, wurden die Proben auf eine Agarose-Gel aufgetragen und die DNA mit dem *Qiaquick Gel extraction kit* von *Qiagen* aus den ausgeschnittenen Banden extrahiert. Nach dieser Behandlung ist die DNA ausreichend sauber für weitere biochemische Arbeiten, wie z. B. Sequenzierung, aber Rückstände aus der Agarostextraktion mit Hilfe des Kits machten die Anwendung im AFM unmöglich. Die Verunreinigungen zeigen eine starke Absorption im Bereich von 230 nm. Um davon abzutrennen, wurden die Proben über eine Gelfiltration (*HiLoad 16/60 Superdex 30*, 1 mM Tris pH=7.5, Fluss 1 mL/min auf einer Äkta-MPLC) aufgereinigt. Die DNA kam im Durchbruch der Säule zwischen 40-50 mL. Die Fraktionen wurden vereinigt und auf 1/10 des Volumens eingengt.

8.9.11. Sequenzierung

Um die modifizierte DNA zu sequenzieren, wurden je 500 ng des 300 Basenpaare langen PCR-Produkts aus den Alkin-Triphosphaten **21**, **22** und **49** mit einem Agarosegel gereinigt (*Gel extraction kit*). Von den erhaltenen 50 µL mit ca. 4-8 ng/µL DNA wurden je 5 µL als Templat in einer PCR eingesetzt (5x je 25 µL Gesamtvolumen, halbe Primerkonzentration, Programm: JGY30057, natürliche Triphosphate, Pwo). Die PCR-Produkte wurden erneut mit Agarose gereinigt (2 *spin columns*). Man erhielt zwei Lösungen mit je ca. 25 ng/µL an natürlicher DNA, von denen eine zu *GATC* (Konstanz) zum Sequenzieren geschickt wurde (gleiche Primersequenzen, wie für die PCR). Für die Daten siehe Anhang A.3.

8.9.12. HPLC-MS-MS-Experimente von enzymatisch abgebauten PCR-Produkten

Nach dem enzymatischen Abbau von PCR-Produkten und Oligonukleotiden wurden die erhaltenen Lösungen mit HPLC analysiert. Dazu wurde eine *Uptisphere 3 HDO*-Säule (150×2.1 mm) von *Interchrome* verwendet. Als mobile Phase wurde entweder 2 mM NEt_3/AcOH oder 2 mM NH_3/HCOOH (pH 5.0), jeweils in H_2O (Puffer A) und in 80 % Acetonitril (Puffer B), verwendet. Es wurde folgender Gradient verwendet: 0 min: 0 % B, 12 min: 3 % B, 60 min: 40 % B; Flussrate: 0.2 mL/min. Die Säule benötigt zwischen den Proben mindestens 15 Minuten Regeneration.

Für die verschiedenen Monomere und „Click“-Produkte wurden folgende Massen gemessen:

Alkin-DNA

Triphosphat	FT-ICR MS	MS-MS
21	$[\text{M}+\text{CHO}_2^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_7]^-$: 297.0730 gef. 297.0728 $[\text{M}+\text{Cl}^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}_5]^-$: 287.0673 gef. 287.0438	$[\text{M}]^-$: 251.1
22	$[\text{M}+\text{CHO}_2^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7]^-$: 377.1354 gef. 377.1352	$[\text{M}]^-$: 331.2
49	$[\text{M}+\text{CHO}_2^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6]^-$: 376.1514 gef. 376.1512	$[\text{M}]^-$: 330.1

Aldehyd-DNA

Nach dem enzymatischen Abbau des PCR-Produktes mit Triphosphat **59** nur Monomer ohne Acetylgruppen nachgewiesen. Es ist nicht sicher, ob die Gruppen während der PCR oder während des Abbaus abgespalten werden.

Triphosphat	FT-ICR MS	MS-MS
72	$[\text{M}+\text{CHO}_2^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_9]^-$: 411.1409 gef. 411.1407	$[\text{M}]^-$: 365.1
66	$[\text{M}+\text{CHO}_2^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_{13}]^-$: 569.1988 gef. 569.1983	$[\text{M}]^-$: 523.2
71	$[\text{M}+\text{CHO}_2^-]^-$ ber. für $[\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{13}]^-$: 597.2301 gef. 597.2293	$[\text{M}]^-$: 551.3
59	$[\text{M}]^-$ ber. für $[\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{11}]^-$: 471.1618 gef. 471.1620	

„Click“-Reaktion an PCR-Produkten

HPLC-MS-MS-Experimente des enzymatischen Abbaus der „Click“-Reaktionen von PCR-Produkten mit Zuckerazid **44**:

PCR-Produkt	FT-ICR MS	MS-MS
300 bp / 21 Edukt 21	[M+OAc ⁻] ⁻ ber. für [C ₁₉ H ₂₆ N ₅ O ₁₂] ⁻ : 516.1583 gef. 516.1573 [M+Cl ⁻] ⁻ ber. für [C ₁₇ H ₂₃ ClN ₅ O ₁₀] ⁻ : 492.1139 gef. 492.1130 [M] ⁻ ber. für [C ₁₇ H ₂₂ N ₅ O ₁₀] ⁻ : 456.1372 gef. 456.1365 [M+Cl ⁻] ⁻ ber. für [C ₁₁ H ₁₂ ClN ₂ O ₅] ⁻ : 287.0440 gef. 287.0436	[M] ⁻ : 455.9 [M] ⁻ : 456.0
300 bp / 22 Edukt 22 (bei 42 Min.)	[M+OAc ⁻] ⁻ ber. für [C ₂₅ H ₃₄ N ₅ O ₁₂] ⁻ : 596.2209 gef. 596.2197 [M+Cl ⁻] ⁻ ber. für [C ₂₃ H ₃₁ ClN ₅ O ₁₀] ⁻ : 572.1765 gef. 572.1754 [M] ⁻ ber. für [C ₂₃ H ₃₀ N ₅ O ₁₀] ⁻ : 391.1511 gef. 391.1505 [M+OAc ⁻] ⁻ ber. für [C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₇] ⁻ : 595.2369 gef. 595.2357	[M] ⁻ : 536.2 [M] ⁻ : 536.2
300 bp / 49	[M+OAc ⁻] ⁻ ber. für [C ₂₅ H ₃₅ N ₆ O ₁₁] ⁻ : 595.2369 gef. 595.2357 [M+Cl ⁻] ⁻ ber. für [C ₂₃ H ₃₂ ClN ₆ O ₉] ⁻ : 571.1925 gef. 571.1913 [M] ⁻ ber. für [C ₂₃ H ₃₁ N ₆ O ₉] ⁻ : 535.2158 gef. 535.2148	[M] ⁻ : 535.0
2000 bp / 49	[M+OAc ⁻] ⁻ ber. für [C ₂₅ H ₃₅ N ₆ O ₁₁] ⁻ : 595.2369 gef. 595.2356 [M+Cl ⁻] ⁻ ber. für [C ₂₃ H ₃₂ ClN ₆ O ₉] ⁻ : 571.1925 gef. 571.1912 [M] ⁻ ber. für [C ₂₃ H ₃₁ N ₆ O ₉] ⁻ : 535.2158 gef. 535.2147	[M] ⁻ : 535.1 [M] ⁻ : 535.0

Die Produkte zeigen ein ähnliches MS-MS-MS-Spektrum, welches durch Eliminierung des Pyranosylzuckers bis zum terminalen Triazol entsteht (für Triphosphat **49** [M]⁻ : 373.1). Die Abbildung 8.5 zeigt das HPLC-MS-Experiment eines 2000 Basenpaare langen PCR-Produkts mit **49**. Im oberen Teil sind die HPLC-Chromatogramme bei 260 nm und bei 310 nm zu sehen. Bei 27.6 Minuten wurde das Reaktionsprodukt, bei 23.5 Minuten das Oxidationsprodukt de-

tektiert. Im unteren Bereich sind die jeweiligen MS-Experimente für das Reaktionsprodukt (links), bzw. Oxidationsprodukt (rechts) zu sehen. Im Diagramm ist immer das Signal markiert, dessen MS-MS-Spur darunter abgebildet ist. Das Oxidationsprodukt weist genau das um 16 verschobene MS-MS-Spektrum auf. In dem drittletzten Spektrum war die MS-MS-Spur nur von dem Signal bei 461.2 aufgenommen worden.

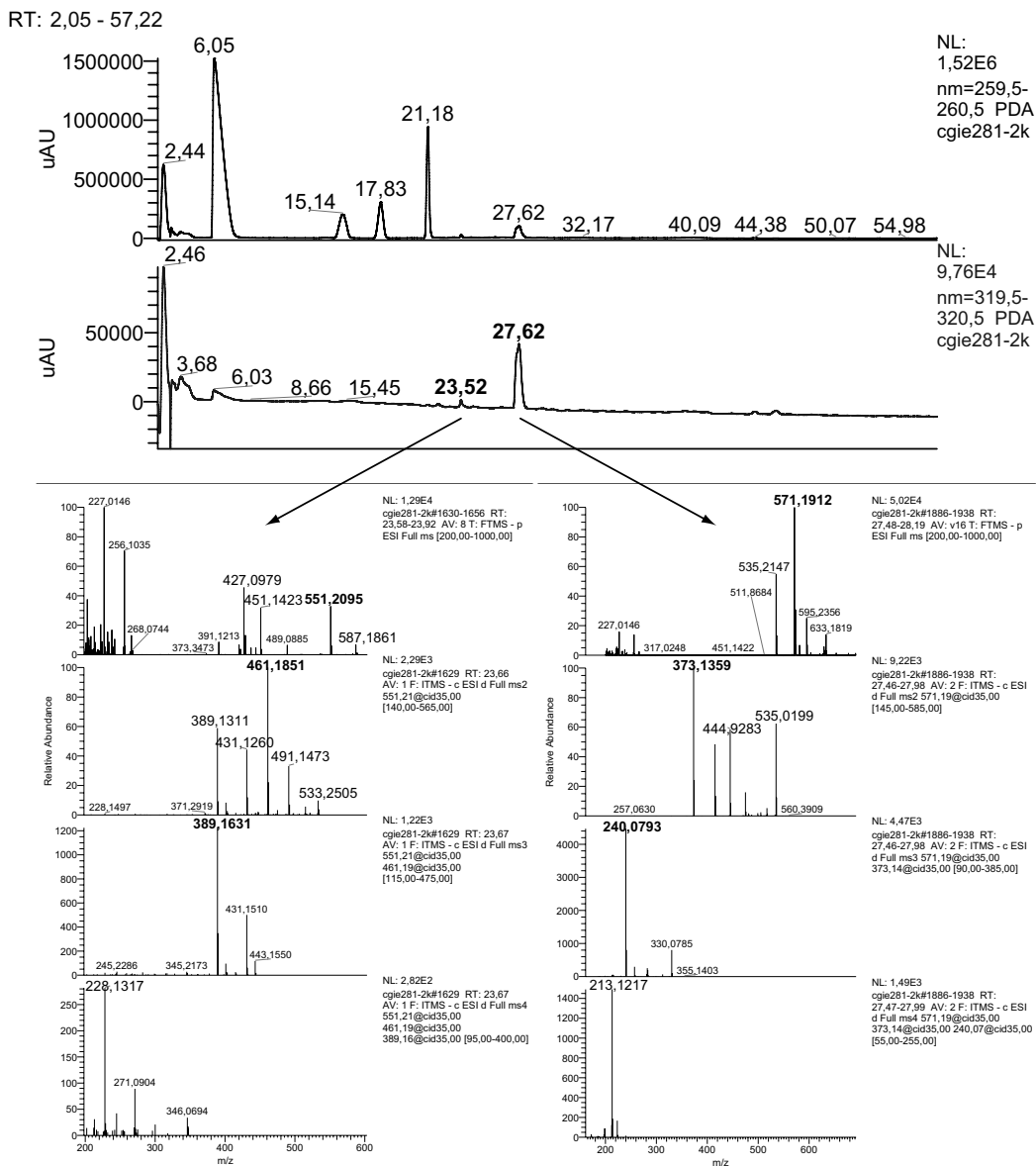


Abbildung 8.5: HPLC-MS-MS-Experiment eines 2000 Basenpaare langen PCR-Produkts mit 49. Genauere Beschreibung siehe Text.

8.9.13. Restriktion der PCR-Produkte

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μ L durchgeführt. 200 ng DNA wurden mit 10 Units Bgl II oder Tsp509 I, bzw. 15 Units Bcl I, (alle *New England Biolabs*) in *NEB*-Puffer 3 (50 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂ 1 mM Dithiothreitol, pH=7.9) bei der optimalen Temperatur (Bgl II: 37 °C; Bcl I: 50 °C; Tsp509 I: 65 °C) für eine Stunde inkubiert. Die Reaktionen wurden mit dem *Qiaquick PCR reaction cleanup kit* (*Qiagen*) aufgereinigt und auf 5 % PAAG analysiert.

Enzym	Sequenz	Schnittposition	Fragmente
Bgl II	5' -A' GATC T 3' -T CTAG' A	217	77, 217
Bcl I	5' -T' GATC A 3' -A CTAG' T	222	72,222
Tsp509I	5' -' AATT 3' - TTAA'	3,8,139	131, 155

8.9.14. Inkorporation der Alkine in Zellen

Für die Untersuchung wurden *E.coli Top 10* mit dem Vektor *pTOPOSD* verwendet. Der Assay wurde entsprechend der Vorschrift von *Pérez-Bello et al.* durchgeführt.^[174]

Von einer 5 mL Übernachtskultur der Zellen wurde 1 mL zu 50 mL M9-Minimalmedium (mit 50 μ L Carbencillin) gegeben und bis zu einem OD von 0.4 bei 37 °C inkubiert (ca. 3 Stunden). Dann wurden 8.5 mg Chloramphenicol und 10 mg freies Nukleosid zugegeben. Die Kulturen wurden über Nacht inkubiert und die Plasmide nach der Standardprozedur aufgereinigt. Die Plasmide wurden durch Agarose aufgereinigt und enzymatisch abgebaut.

A. Anhang

A.1. Syntheseprotokolle für modifizierte Oligonukleotide

A.1.1. Protokoll „Glenn_110804_long“

```
/* ----- */
/*      Function                Mode  Amount  Time(sec)      Description      */
/*                                /Arg1  /Arg2                                     */
/* ----- */
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA          1      0  "Event out ON"
   0 /*Default            */ WAIT         0     1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA          1      1  "START data collection"
   16 /*Dblk              */ PULSE        10     0  "Dblk to column"
   16 /*Dblk              */ PULSE        50    148 "Deblock"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE        40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA          0      1  "STOP data collection"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE        40     0  "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA          2      0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                 */ PULSE         5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE         5     0  "Flush system with Act"
  23 /**6 + Act           */ PULSE         4     0  "Monomer + Act to column"
   4 /**6                 */ PULSE         1    60  "Monomer to column"
   2 /*Act                 */ PULSE         4   178  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE         7   284  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE         8     0  "Flush system with Wsh"
   1 /*Wsh                 */ PULSE         5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE         5     0  "Flush system with Act"
  23 /**6 + Act           */ PULSE         4     0  "Monomer + Act to column"
   4 /**6                 */ PULSE         1    60  "Monomer to column"
   2 /*Act                 */ PULSE         4   178  "Couple monomer2"
   1 /*Wsh                 */ PULSE         7   284  "Couple monomer2"
   1 /*Wsh                 */ PULSE         8     0  "Flush system with Wsh"
$Capping
  12 /*Wsh A              */ PULSE        20     0  "Flush system with Wsh A"
  13 /*Caps               */ PULSE         8     0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE         6    30  "Cap"
  12 /*Wsh A              */ PULSE        14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
```

A. Anhang

```

15 /*Ox          */ PULSE 15 60 "Ox to column"
12 /*Wsh A      */ PULSE 15 0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
13 /*Caps       */ PULSE 7 0  "Caps to column"
12 /*Wsh A      */ PULSE 30 0 "End of cycle wash"

```

Für Kupplungen an Port 7 wurde ein entsprechend angepaßtes Protokoll verwendet.

Protokoll für A und T mit verlängerter Kupplungszeit

```

/* ----- */
/*      Function          Mode  Amount  Time(sec)      Description      */
/*                               /Arg1   /Arg2                               */
/* ----- */
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      1      0      "Event out ON"
    0 /*Default          */ WAIT    0      1.5    "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      1      1      "START data collection"
16  /*Dbblk            */ PULSE 10     0      "Dbblk to column"
16  /*Dbblk            */ PULSE 50    100    "Deblock"
38  /*Diverted Wsh A    */ PULSE 40     0      "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      0      1      "STOP data collection"
38  /*Diverted Wsh A    */ PULSE 40     0      "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      2      0      "Event out OFF"
$Coupling
1  /*Wsh              */ PULSE 5      0      "Flush system with Wsh"
2  /*Act              */ PULSE 5      0      "Flush system with Act"
18 /*A + Act         */ PULSE 5      0      "Monomer + Act to column"
18 /*A + Act         */ PULSE 2     68     "Couple monomer"
2  /*Act              */ PULSE 3     96     "Couple monomer"
1  /*Wsh              */ PULSE 7    168    "Couple monomer"
1  /*Wsh              */ PULSE 8      0      "Flush system with Wsh"
$Capping
12 /*Wsh A           */ PULSE 20     0      "Flush system with Wsh A"
13 /*Caps            */ PULSE 8      0      "Caps to column"
12 /*Wsh A           */ PULSE 6     15     "Cap"
12 /*Wsh A           */ PULSE 14     0      "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
15 /*Ox              */ PULSE 12     0      "Ox to column"
15 /*Ox              */ PULSE 3     30     "Ox to column"
12 /*Wsh A           */ PULSE 15     0      "Flush system with Wsh A"
$Capping
13 /*Caps            */ PULSE 7      0      "Caps to column"
12 /*Wsh A           */ PULSE 30     0      "End of cycle was

```

Das Protokoll für T war analog.

A.1. Syntheseprotokolle für modifizierte Oligonukleotide

Protokoll für C und G mit verlängerter Kupplungszeit

```
/* ----- */
/*      Function           Mode  Amount  Time(sec)      Description     */
/*                               /Arg1  /Arg2                                     */
/* ----- */
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA        1      0  "Event out ON"
   0 /*Default            */ WAIT       0     1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA        1      1  "START data collection"
   16 /*Dbldk             */ PULSE     10     0  "Dbldk to column"
   16 /*Dbldk             */ PULSE     50    100 "Deblock"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA        0      1  "STOP data collection"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE     40     0  "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA        2      0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                 */ PULSE     5      0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                 */ PULSE     5      0  "Flush system with Act"
  19 /*C + Act            */ PULSE     5      0  "Monomer + Act to column"
  19 /*C + Act            */ PULSE     2     68  "Couple monomer"
   2 /*Act                 */ PULSE     3     96  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE     7    168  "Couple monomer"
   1 /*Wsh                 */ PULSE     8      0  "Flush system with Wsh"
$Capping
  12 /*Wsh A              */ PULSE    20     0  "Flush system with Wsh A"
  13 /*Caps               */ PULSE     8      0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE     6     15  "Cap"
  12 /*Wsh A              */ PULSE    14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
  15 /*Ox                 */ PULSE    12     0  "Ox to column"
  15 /*Ox                 */ PULSE     3     30  "Ox to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE    15     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
  13 /*Caps               */ PULSE     7      0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A              */ PULSE    30     0  "End of cycle wash"
```

Das Protokoll für G war analog.

A.2. PCR-Programme

Die PCR-Programme wurden so wie angegeben in die Cycler eingegeben. Aufgrund von Unterschieden in der Interpretation der Zyklusanzahl führte der Mastercycler *personal* einen PCR-Zyklus mehr aus.

JG_Hybrid_2h

	Control device : Tube
	Lid 105 °C, no Wait
	95 °C, 4:00 min, Ramp 3 °C/s
70x	95 °C, 0:30 min, Ramp 1 °C/s, TempInc -1.3 °C
	Hold 4 °C

Bacco PCR

	Control device : Tube
	Lid 105 °C, no Wait
	96.0 °C, 1:30 min, Ramp 3 °C/s
29x	94.0 °C, 0:10 min, Ramp 3 °C/s
	58.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s, TempInc -0.3 °C
	72.0 °C, 1:00 min, Ramp 3 °C/s
24x	96.0 °C, 0:10 min, Ramp 3 °C/s
	55.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s
	72.0 °C, 1:00 min, Ramp 3 °C/s
	Hold 4 °C

Bacco PCR 2min

	Control device : Tube
	Lid 105 °C, no Wait
	96.0 °C, 1:30 min, Ramp 3 °C/s
29x	94.0 °C, 0:10 min, Ramp 3 °C/s
	58.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s, TempInc -0.3 °C
	72.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
24x	96.0 °C, 0:10 min, Ramp 3 °C/s
	55.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s
	72.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
	Hold 4 °C

JGY30057

	Control device : Tube Lid 107 °C, no Wait 95.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
9x	95.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s 58.0 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s, TempInc -1.0 °C 72.0 °C, 0:45 min, Ramp 3 °C/s
30x	95.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s 57.0 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s 72.0 °C, 0:45 min, Ramp 3 °C/s
	72.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s Hold 4 °C

JGY90057

	Control device : Tube Lid 107 °C, no Wait 95.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
9x	99.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s 58.0 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s, TempInc -1.0 °C 72.0 °C, 1:30 min, Ramp 3 °C/s
30x	99.0 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s 57.0 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s 72.0 °C, 1:30 min, Ramp 3 °C/s
	72.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s Hold 4 °C

TP10300

	Control device : Tube Lid 105 °C, no Wait 96.0 °C, 1:30 min, Ramp 3 °C/s
29x	94.0 °C, 0:10 min, Ramp 3 °C/s 57.6 °C, 0:15 min, Ramp 3 °C/s, TempInc -0.3 °C 72.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
24x	96.0 °C, 0:10 min, Ramp 3 °C/s 55.6 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s 72.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
	Hold 4 °C

A. Anhang

JGY2k58

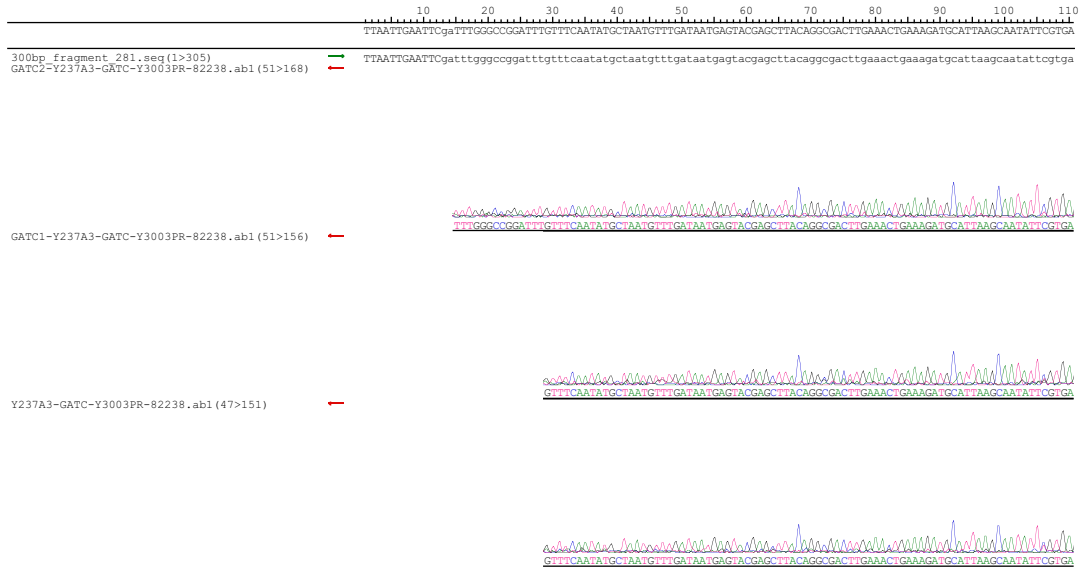
	Control device : Tube
	Lid 107 °C, no Wait
	99.0 °C, 2:00 min, Ramp 3 °C/s
	99.0 °C, 0:45 min, Ramp 3 °C/s
9x	58.0 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s, TempInc -1.0 °C
	72.0 °C, 5:00 min, Ramp 3 °C/s
	99.0 °C, 0:45 min, Ramp 3 °C/s
30x	59.3 °C, 0:30 min, Ramp 3 °C/s
	72.0 °C, 5:00 min, Ramp 3 °C/s
	72.0 °C, 10:00 min, Ramp 3 °C/s
	Hold 4 °C

A.3. Daten der DNA-Sequenzierung

Sequenzierung von 21

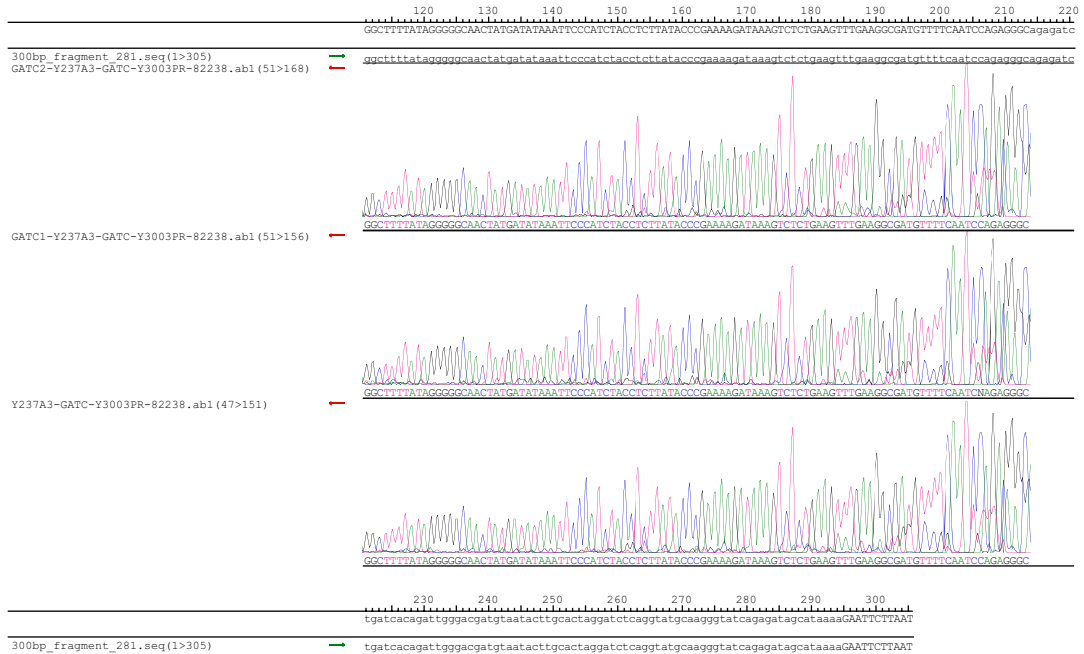
Dienstag, 24. Oktober 2006 15:23
Project: y237_a3_tp3.sqd Contig 1

Page 1



Dienstag, 24. Oktober 2006 15:23
Project: y237_a3_tp3.sqd Contig 1

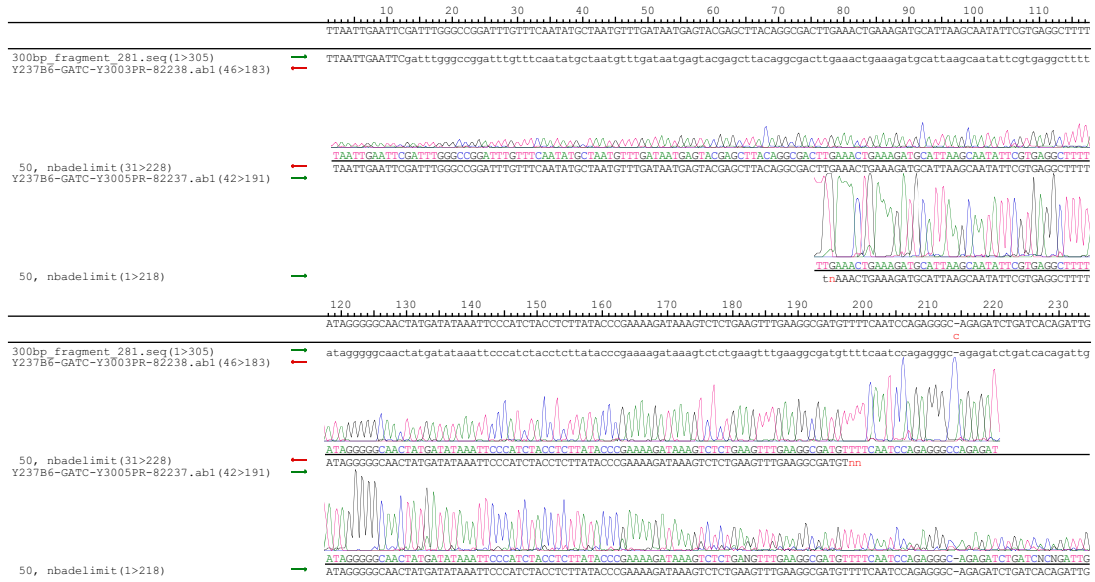
Page 2



Sequenzierung von 22

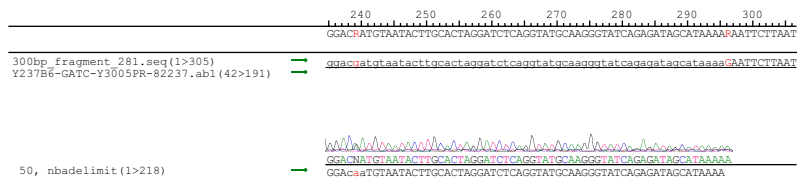
Dienstag, 24. Oktober 2006 15:27
Project: y237_b6_tp6.sqd Contig 1

Page 1



Dienstag, 24. Oktober 2006 15:27
Project: y237_b6_tp6.sqd Contig 1

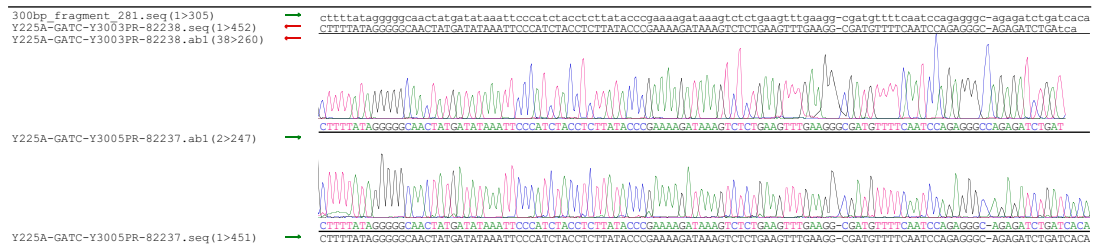
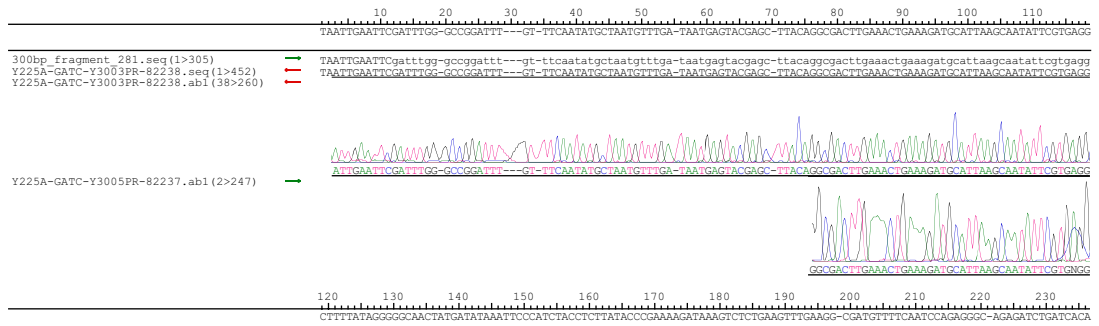
Page 2



Sequenzierung von 49

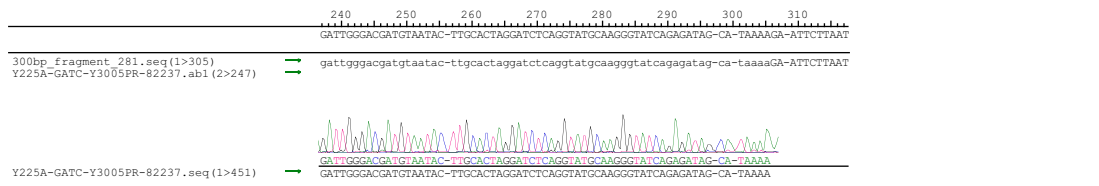
Dienstag, 24. Oktober 2006 15:32
Project: y225A_tp9.sqd Contig 1

Page 1



Page 2

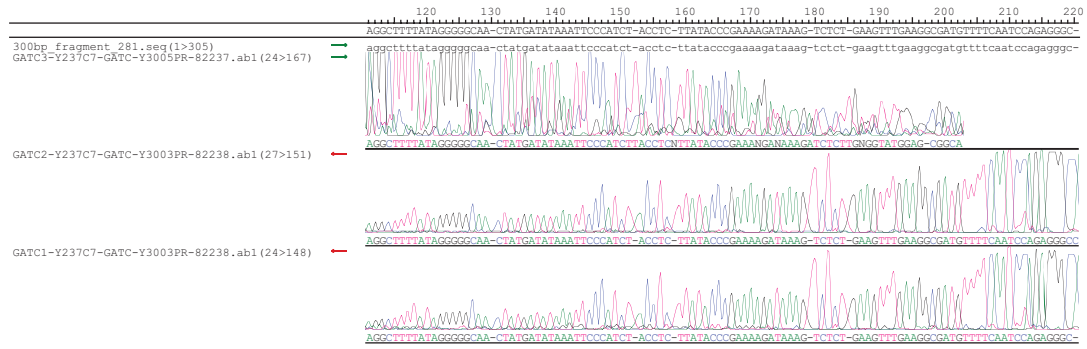
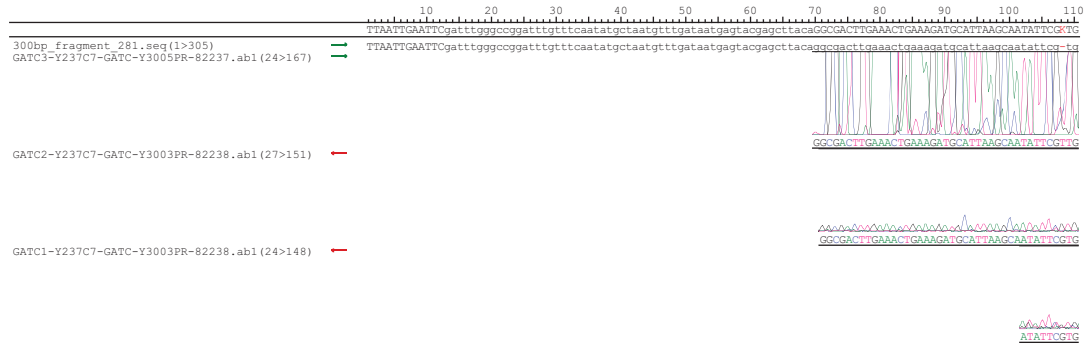
Dienstag, 24. Oktober 2006 15:32
Project: y225A_tp9.sqd Contig 1



Sequenzierung von 72

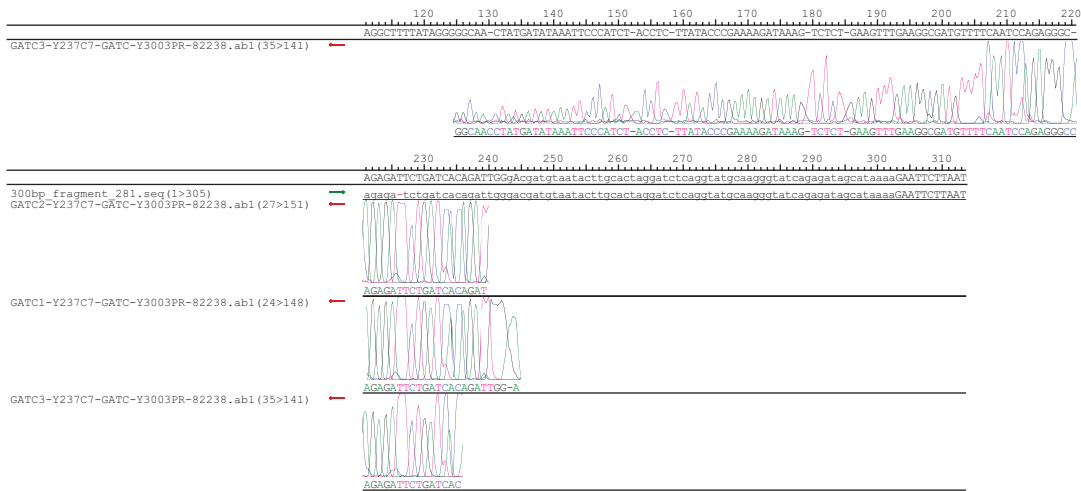
Dienstag, 6. Februar 2007 14:46
Project: y237_c7_tp7.sq Contig 1

Page 1



Dienstag, 6. Februar 2007 14:46
Project: y237_c7_tp7.sq Contig 1

Page 2



B. Nummerierung der Verbindungen

B.1. Kleine Moleküle

- 1 Tris-(1-benzyl-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-amin
- 2 Bipyridin-Ligand
- 3 Pybox-Ligand
- 4 *N,N'*-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-4,5-dihydro-imidazol-2-yliden
- 5 5-Iod-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 6 5-(2-Trimethylsilylethynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 7 5-(5-Hydroxy-pent-1-ynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 8 5-(8-Trimethylsilylocta-1,7-diynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 9 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
- 10 5-(Hexa-1,5-diynyl)-2'-desoxyuridin
- 11 5-(Hexa-1-ynyl)-2'-desoxyuridin
- 12 5-(Okta-1,7-diynyl)-2'-desoxyuridin
- 13 5-(5-Azidohexa-1-ynyl)-2'-desoxyuridin
- 14 5-Iod-2'-desoxyuridin
- 15 5-Ethynyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-*O*-(2-cyanoethoxy-diisopropylamino-phosphino)-2'-desoxyuridin
- 16 5-(5-Oxo-pent-1-ynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 17 1-Diazo-2-oxo-propyl-phosphonsäurediethylester
- 18 5-(Hexa-1,5-diynyl)-5',3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 19 1-Trimethylsilyl-1,7-oktadiin
- 20 5-(Okta-1,7-diynyl)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-*O*-(2-cyanoethoxy-diisopropylamino-phosphino)-2'-desoxyuridin
- 21 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin-triphosphat
- 22 5-(Okta-1,7-diynyl)-5'-*O*-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 23 5-(Hexa-1,5-diynyl)-5'-*O*-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 24 5-(Hexa-1-ynyl)-5'-*O*-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 25 5-(5-Azidohexa-1-ynyl)-5'-*O*-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 26 7-Desaza-7-(okta-1,7-diynyl)-2'-desoxyguanosin
- 27 7-Desaza-7-iod-5',3'-*O*-*p*-toluoyl-2'-desoxyguanosin
- 28 4-Chloro-2-methylsulfanyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin
- 29 1- α / β -Chlor-2-desoxy-3,5-*O*-*p*-toluoyl-D-ribofuranose
- 30 2-Mercapto-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ol

B. Nummerierung der Verbindungen

- 31 6-Amino-5-(2,2-diethoxyethyl)-2-mercapto-pyrimidin-4-ol
- 32 Ethyl-2,2-diethoxyethylcyanoacetat
- 33 Cyanoessigsäureethylester
- 34 Bromacetaldehyddiethylacetal
- 35 2-Methylsulfanyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-ol
- 36 2-Methylsulfanyl-4-chloro-7-desaza-5',3'-*O-p*-toluoyl-2'-desoxyguanosin
- 37 2-Methylsulfanyl-4-chloro-7-desaza-7-iod-5',3'-*O-p*-toluoyl-2'-desoxyguanosin
- 38 2-Methylsulfanyl-7-desaza-7-iod-5',3'-*O-p*-toluoyl-2'-desoxyguanosin
- 39 Benzylazid
- 40 Biotinazid
- 41 3-(4-Azidomethyl-phenyl)-3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin
- 42 *N*-[4-(3-Azido-propyl)-2-(ethoxyoxalyl-amino)-phenyl]-oxalsäureethylester
- 43 4-Azidomethylbenzaldehyd
- 44 6-*O*-Azido-*D*-galaktopyranose
- 45 Fluoreszeinazid
- 46 3-Azido-7-hydroxy-chromen-2-on
- 47 Cy3-Azid
- 48 6-Azidomethyl-1-ethyl-2-[3-(1-ethyl-1*H*-quinolin-2-ylidene)-propenyl]-quinolinium
- 49 5-(Okta-1,7-diinyl)-5'-*O*-triphosphat-2'-desoxycytidin
- 50 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxycytidin
- 51 5-((2-Cyanoethoxy)-diisopropyl-amino-phosphonoxy)-pent-1-in
- 52 S-5-Trimethylsilyl-1-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-pent-4-in-2-*O*-phosphoramidit
- 53 S-1-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-pent-4-in-2-*O*-phosphoramidit
- 54 S-1-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-undeca-4,10-diin-2-*O*-phosphoramidit;
- 55 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-2'-desoxyuridin
- 56 5-(6-[1,3]Dioxan-2-yl-hex-1-inyl)2'-desoxyuridin
- 57 5-(3-(1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-*O*- α -*D*-galactopyranosyl)-prop-1-inyl)-2'-desoxyuridin
- 58 5-(5-(1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-*O*- α -*D*-galactopyranosyl)-pent-1-inyl)-2'-desoxyuridin
- 59 5-(5-(1,2,3,4-*O*-tetraacetyl-6-*O*- α -*D*-galactopyranosyl)-pent-1-inyl)-2'-desoxyuridin
- 60 2-(4-Ethynyl-phenyl)-[1,3]dioxan
- 61 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5',3'-*O-tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 62 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-*O*-(2-cyanoethoxy-diisopropylamino-phosphino)-2'-desoxyuridin
- 63 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5'-*O*-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 64 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-*O*-(prop-2-inyl)- α -*D*-galaktopyranose
- 65 5-(3-(1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-*O*- α -*D*-galactopyranosyl)-prop-1-inyl)-5',3'-*O-tert*-butyldimethyl-

- silyl-2'-desoxyuridin
- 66 5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 67 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose
- 68 Methanesulfonsäure-pent-4-ynylester
- 69 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O-(pent-4-ynyl)- α -D-galactopyranose
- 70 5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5',3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyuridin
- 71 5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 72 5-(6-[1,3]Dioxan-2-yl-hex-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 73 5-(5-(1,2,3,4-O-tetraacetyl-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin
- 74 2-Chloro-5,6-benzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-on
- 75 5-Ethynyl-5'-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin
- 76 5-Ethynyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyuridin
- 77 5-(Okta-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin
- 78 2-Methylsulfonyl-7-desaza-7-iod-5',3'-*p*-toluoyl-2'-desoxyguanosin
- 79 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-5',3'-*p*-toluoyl-2'-desoxyguanosin
- 80 4-Bromomethyl-benzaldehyd
- 81 5-(4-[1,3]Dioxan-2-yl-phenylethynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin
- 82 1- α / β -O-Methyl-2-desoxy-3,5-*p*-toluoyl-D-ribofuranose

B.2. Oligonukleotide

- d1 5'-GCG CTG TXC ATT CGC G
- d2 5'-GCG CTG **XXC** ATT CGC G
- d3 5'-GCG CXG TXC AXT CGC G
- d4 5'-GCG CXX **XXX** XGT CGC G
- d5 5'-GCG CTG TXC ATT CGC G
- d6 5'-GCG CTG **XXC** ATT CGC G
- d7 5'-GCG CXG TXC AXT CGC G
- d8 5'-GCG CXX **XXX** XGT CGC G
- d9 5'-TTA ATT GAA TTC GAT TXG GGC CGG AXT TGT TTC
- d10 5'-GCA GGC XTC AXG CCA GAA TTA CCA GAA G
- d11 5'-XGG AAT TAA G
- d12 5'-XTT AAT TGA ATT CGA TTT GGG CCG GAT TTG TTT C
- d13 5'-XGC GCT GTT CAT TCG CG
- d14 5'-XGC GCT GTT CAT TCG CG-Fluo
- d15 5'-TTT TTT XTT TTT
- d16 5'-TTT TTT **XXT** TTT T
- d17 5'-GCC GAX GCG C
- d18 5'-GCG XAT AXA TAX TCG C
- d19 5'-TTA ATT GAA TTC GAT TTG GGC CGG ATT TGT TTC
- d20 5'-TTT TAT GCT ATC TCT GAT ACC CTT G
- d21 5'-TAA GCT GGC CAG CAT TAT CAG
- d22 5'-TGA TGC CCT TGT ACG CAA CTG
- d23 5'-GGA AGA TGT AAC TTG TTT CTT CTG
- d24 5'-GGG TTA TTG TCT CAT GAG CG
- d25 5'-5'-AAG CCT ATG CCT ACA GCA TC
- d26 5'-GAT TTG GGC CGG ATT TGT TTC
- d27 5'-ATT AAG AAT TCT TTT ATG CTA TCT CTG ATA CCC TTG
- d28 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAT GCC AGA
GTT ACC AGA AG
- d29 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA TTT TTG
CTG ACA GAA TGG G

Abkürzungsverzeichnis

δ	NMR: chemische Verschiebung
$\tilde{\nu}$	IR: Wellenzahl
A	Adenin, DNA: 2'-Desoxyadenosin
Ac	Acetyl, Acetat
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ber.	berechnet
br	NMR, IR: breites Signal
BSA	<i>chem. N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid; biol. bovine serum albumin</i>
C	Cytosin, DNA: 2'-Desoxycytidin
CD	<i>circular dichroism</i> , Zirkulardichroismus
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPG	<i>controlled pore glass</i> , Glasgranulat mit def. Porengröße
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatogramm, Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
d	NMR: Dublett
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DIEA	Diisopropylethylamin, auch Hünig-Base
DMAP	<i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO-d ₆	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMTCI	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
DQF-COSY ...	<i>Double-Quantum Filtered COSY</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	<i>Electron Impact Ionisation</i>
eq	Äquivalente
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i> , Elektronensprayionisation

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform IR</i>
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
G	Guanin, DNA: 2'-Desoxyguanosin
H	NMR: Proton
h	Stunde(n)
HMBC	<i>Heteronuclear Multi-Bond Connectivity</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> Hochdruckchromatographie
HPLC-MS/MS	MS eines mit HPLC und MS isolierten Ions
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> , Hochauflösende MS
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HV	„Hochvakuum“, 10^{-2} – 10^{-3} mbar
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
IR	Infrarot, Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	NMR: Kopplungskonstante
Konf.	Konformation, Konfiguration
konz.	konzentriert
Lsg.	Lösung
M	Molar, mol/L
<i>M</i>	MS: Molekülion
<i>m</i>	IR: mittel (middle), MS: Molekülmasse
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeOTMS	Methoxy(trimethyl)silan
m	NMR: Multiplett
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
<i>n</i> Bu	<i>n</i> -Butyl
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
p-Tol	para-Toluoyl
p. a.	<i>pro analysi</i> , zur Analyse
Pac	Phenoxyacetyl

PCR	Polymerase Kettenreaktion, auch <i>polymerase chain reaction</i>
Ph	Phenyl
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
Pol	Polymerase
ppm	<i>parts per million</i>
Pr	Propyl
psi	<i>pounds per square inch</i> , 1 psi \approx 6895 Pa
q	NMR: Quartett
quant.	quantitativ
quint.	NMR: Quintett
R_f	<i>ratio of fronts</i> , Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	IR: stark (strong)
SAM	S-Adenosylmethionin
Smp.	Schmelzpunkt
s	Sekunde(n), NMR: Singulett
ss	IR: sehr stark
T	Temperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBTA	Tris-(1-benzyl-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-amin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEMED	Tetramethylethyldiamin, auch TMEDA
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
ToF	<i>Time of Flight</i> , Flugzeit
Tol.	Toluol
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T	Thymin, DNA: 2'-Desoxythymidin
t	NMR: Triplett
TTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
U	Uracil, RNA: Uridin
Vol.	Volumen
w	IR: schwach (weak)
z	MS: Ladungszahl
Zers.	Zersetzung, Zersetzungsbereich

Literaturverzeichnis

- [1] M. Famulok, G. Mayer, *ChemBioChem* **2005**, 6(1), 19–26. *Intramers and Aptamers: Applications in Protein-Function Analyses and Potential for Drug Screening.*
- [2] T. Aboul-Fadl, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12(19), 2193–2214. *Antisense Oligonucleotides: The State of the Art.*
- [3] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, 440(7082), 297–302. *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.*
- [4] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, 297(5578), 72–75. *Sequence-Specific Molecular Lithography on Single DNA Molecules.*
- [5] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, A. Norman, *Science* **1985**, 230(4732), 1350–1354. *Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia.*
- [6] W. Bloch, *Biochemistry* **1991**, 30(11), 2735–2747. *A Biochemical Perspective of the Polymerase Chain Reaction.*
- [7] R. A. Gibbs, *Anal. Chem.* **1990**, 62(13), 1202–1214. *DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction.*
- [8] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, 239(4839), 487–491. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase.*
- [9] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2003**, 13(3), 284–299. *Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides.*
- [10] P. Herdewijn, *Antisense Nucl. Acid Drug Develop.* **2000**, 10(4), 297–310. *Heterocyclic Modifications of Oligonucleotides and Antisense Technology.*
- [11] J. Sági, A. Szemző, K. Ebinger, A. Szabolcs, G. Sági, E. Ruff, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34(13), 2191–2194. *Base modified oligonucleotides: 1. Effect of 5-Alkyl, 5-(1-Alkenyl) and 5-(1-Alkynyl) substitution of the pyrimidines on duplex stability and hydrophobicity.*

- [12] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, 112(6), 1046–1068. *Einsichten in Stabilität und Replikation der DNA durch Nachahmung ihrer Struktur und Funktion.*
- [13] T. Kottysch, C. Ahlborn, F. Brotzel, C. Richert, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10(16), 4017–4028. *Stabilizing or Destabilizing Oligodeoxynucleotide Duplexes Containing Single 2'-Deoxyuridine Residues with 5-Alkynyl Substituents.*
- [14] B. C. Froehler, S. Wadwani, T. J. Terhorst, S. R. Gerrard, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33(37), 5307–5310. *Oligodeoxynucleotides Containing C-5 Propyne Analogs of 2'-Deoxyuridine and 2'-Deoxycytidine.*
- [15] R. W. Wagner, M. D. Matteucci, D. Grant, T. Huang, B. C. Froehler, *Nature Biotech.* **1996**, 14(7), 840–844. *Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleoside.*
- [16] T. W. Barnes III, D. H. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(18), 4107–4118. *Long-Range Cooperativity in Molecular Recognition of RNA by Oligodeoxynucleotides with Multiple C5-(1-Propynyl) Pyrimidines.*
- [17] B. M. Znosko, T. W. Barnes III, T. R. Krugh, D. H. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(20), 6090–6097. *NMR Studies of DNA Single Strands and DNA:RNA Hybrids with and without 1-Propynylation at C5 of Oligopyrimidines.*
- [18] M. T. Tierney, M. W. Grinstaff, *Org. Lett.* **2000**, 2(22), 3413–3416. *Synthesis and Stability of Oligodeoxynucleotides Containing C8-Labeled 2'-Desoxyadenosine: Novel Redox Nucleobase Probes for DNA-Mediated Charge-Transfer Studies.*
- [19] K. Isono, *J. Antibiot.* **1988**, 41(12), 1711–1739. *Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis.*
- [20] F. Seela, A. Kehne, *Liebigs. Ann. Chem.* **1983**, (5), 876–884. *2'-Desoxytubercidin - Synthese eines 2'-Desoxyadenosin-Isosteren durch Phasentransferglycosylierung.*
- [21] J. Davoll, *J. Chem. Soc.* **1960**, 1960, 130–138. *26. Pyrollo[2,3-D]pyrimidines.*
- [22] M. J. Robins, W. H. Muhs, *Chem. Commun.* **1976**, (7), 269. *Synthesis of 2'-Desoxytubercidin 4-Amino-7-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)pyrollo[2,3-d]pyrimidine from the Parent Antibiotic.*
- [23] Z. Kazimierczuk, H. B. Cottam, G. R. Revankar, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106(21), 6379–6382. *Synthesis of 2'-Desoxytubercidin, 2'-Desoxyadenosine, and Related 2'-Deoxynucleosides via a Novel Direct Stereospecific Sodium Salt Glycosylation Procedure.*

- [24] F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4(9), 1781–1790. 7-Deazaadenine-DNA: Bulky 7-Iodo Substituents or Hydrophobic 7-Hexynyl Chains Are Well Accommodated in the Major Groove of Oligonucleotide Duplexes.
- [25] F. Seela, H. Thomas, *Helv. Chim. Act.* **1995**, 78(1), 94–108. 8. Duplex Stabilization of DNA: Oligonucleotides Containing 7-Substituted 7-Deazaadenines.
- [26] F. Seela, M. Zulauf, *Helv. Chim. Act.* **1999**, 82(11), 1878–1898. Oligonucleotides Containing 7-Deazaadenines: The Influence of the 7-Substituent Chain Length and Charge on the Duplex Stability.
- [27] N. Ramzaeva, C. Mittelbach, F. Seela, *Helv. Chim. Act.* **1997**, 80(6), 1809–1822. 123. 7-Deazaguanine DNA: Oligonucleotides with Hydrophobic or Cationic Side Chains.
- [28] N. Ramzaeva, C. Mittelbach, F. Seela, *Nucleosides, Nucleotides* **1999**, 18(6-7), 1439–1440. 7-Deaza-2'-deoxyguanosines functionalized with 7-(aminoalk-1-ynyl) residues.
- [29] J. He, F. Seela, *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30(24), 5485–5496. Propynyl groups in duplex DNA: stability of base pairs incorporating 7-substituted 8-aza-7-deazapurines or 5-substituted pyrimidines.
- [30] X. Peng, F. Seela, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2(19), 2838–2846. Halogenated 7-deazapurine nucleosides: stereoselective synthesis and conformation of 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleosides.
- [31] H. Rosemeyer, F. Seela, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, (11), 2341–2345. Stereoelectronic effects of modified purine bases on the sugar conformation of nucleosides: pyrrolo[2,2-d]pyrimidines.
- [32] F. Seela, X. Peng, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(1), 81–90. 7-Functionalized 7-Deazapurine Ribonucleosides Related to 2-Aminoadenosine, Guanosine, and Xanthosine: Glycosylation of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines with 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranose.
- [33] C. A. Buhr, R. W. Wagner, D. Grant, B. C. Froehler, *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24(15), 2974–2980. Oligodeoxynucleotides containing C-7 propyne analogs of 7-deaza-2'-deoxyguanosine and 7-deaza-2'-deoxyadenosine.
- [34] F. Seela, K. I. Shaikh, *Tetrahedron* **2005**, 61(10), 2675–2681. Oligonucleotides containing 7-propynyl-7-deazaguanine: synthesis and base pair stability.
- [35] H. Hashimoto, M. G. Nelson, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115(16), 7128–7134. Zwitterionic DNA.
- [36] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, 113(11), 2056–2075. „Click-Chemie“: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen.

- [37] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, 75(13), 604–637. *1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick.*
- [38] K. V. Gothelf, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* **1998**, 98(2), 863–909. *Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction.*
- [39] I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*; VCH, Weinheim, **1979**.
- [40] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem.* **2005**, 117(33), 5320–5374. *Organische Azide - explodierende Vielfalt bei einer einzigartigen Substanzklasse.*
- [41] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, 100(8), 2494–2507. *Kinetik der Addition organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen.*
- [42] S. J. Howell, N. Spencer, D. Philp, *Tetrahedron* **2001**, 57(23), 4945–4954. *Recognition-mediated regiocontrol of a dipolar cycloaddition reaction.*
- [43] J. Chen, J. Rebek Jr., *Org. Lett.* **2002**, 4(3), 327–329. *Selectivity in an Encapsulated Cycloaddition Reaction.*
- [44] A. Krasinski, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Org. Lett.* **2004**, 6(8), 1237–1240. *Direct Synthesis of 1,5-Disubstituted-4-magnesium-1,2,3-triazoles, Revisited.*
- [45] D. J. Hlasta, J. H. Ackerman, *J. Org. Chem.* **1994**, 59(21), 6184–6189. *Steric Effects on the Regioselectivity of an Azide-Alkyne Dipolar Cycloaddition Reaction: The Synthesis of Human Leukocyte Elastase Inhibitors.*
- [46] S. J. Coats, J. S. Link, D. Gauthier, D. J. Hlasta, *Org. Lett.* **2005**, 7(8), 1469–1472. *Trimethylsilyl-Directed 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions in the Solid-Phase Synthesis of 1,2,3-Triazoles.*
- [47] D. Liu, W. Gao, Q. Dai, X. Zhang, *Org. Lett.* **2005**, 7(22), 4907–4910. *Triazole-Based Monophosphines for Suzuki-Miyaura Coupling and Amination Reactions of Aryl Chlorides.*
- [48] Q. Dai, W. Gao, D. Liu, L. M. Kapes, X. Zhang, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(10), 3928–3924. *Triazole-Based Monophosphine Ligands for Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Aryl Chlorides.*
- [49] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67(9), 3057–3064. *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides.*
- [50] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114(14), 2708–2711. *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective „Ligation“ of Azides and Terminal Alkynes.*

- [51] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, (1), 51–68. *CuI-Catalyzed Alkyne-Azide „Click“ Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective.*
- [52] W. H. Binder, C. Kluger, *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10(14), 1791–1815. *Azide/Alkyne-„Click“ Reactions: Applications in Material Science and Organic Synthesis.*
- [53] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov.* **2003**, 8(24), 1128–1137. *The growing impact of click chemistry on drug discovery.*
- [54] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chem. Biol.* **2005**, 1(1), 13–21. *Chemistry in living systems.*
- [55] G. W. Goodall, W. Hayes, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35(3), 280–312. *Advances in cycloaddition polymerizations.*
- [56] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2005**, 117(15), 2250–2255. *Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed, Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction.*
- [57] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(1), 210–216. *Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates.*
- [58] P. Siemsen, R. C. Livingston, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2000**, 112(15), 2740–2767. *Acetylenkupplungen: eine leistungsfähige Methode für den Aufbau von Molekülen.*
- [59] L. V. Lee, M. L. Mitchell, S.-J. Huang, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(32), 9588–9589. *A Potent and Highly Selective Inhibitor of Human α -1,3-Fucosyltransferase via Click Chemistry.*
- [60] P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Fréchet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **2004**, 116(30), 4018–4022. *Efficiency and Fidelity in a Click-Chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper(i)-Catalyzed Ligation of Azides and Alkynes.*
- [61] M. S. Taylor, D. N. Zalatan, A. M. Lerchner, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(4), 1313–1317. *Highly Enantioselective Conjugate Additions to α,β -Unsaturated Ketones Catalyzed by a (Salen)Al Complex.*
- [62] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, 6(24), 4603–4606. *A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes.*

- [63] B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(46), 15020–15021. *Dendronized Linear Polymers via „Click Chemistry“*.
- [64] E.-H. Ryu, Y. Zhao, *Org. Lett.* **2005**, 7(6), 1035–1037. *Efficient Synthesis of Water-Soluble Calixarenes Using Click Chemistry*.
- [65] B. H. M. Kuijpers, S. Groothuys, A. B. R. Keereweer, P. J. L. M. Quaeflieg, R. H. Blaauw, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Lett.* **2004**, 6(18), 3123–3126. *Expedient Synthesis of Triazole-Linked Glycosyl Amion Acids and Peptides*.
- [66] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(16), 4686–4687. *Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition*.
- [67] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. & Biol.* **2004**, 11(4), 535–546. *Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods*.
- [68] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(28), 10018–10019. *A Tandem Orthogonal Proteolysis Strategy for High-Content Chemical Proteomics*.
- [69] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(11), 3192–3193. *Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition*.
- [70] W.-h. Zhan, H. N. Barnhill, K. Sivakumar, H. Tian, Q. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(10), 1691–1695. *Synthesis of hemicyanine dyes for 'click' bioconjugation*.
- [71] D. D. Díaz, S. Punna, P. Holzer, A. K. McPherson, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Polym. Science A* **2004**, 42(17), 4392–4403. *Click Chemistry in Materials Synthesis. 1. Adhesive Polymers from Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*.
- [72] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(39), 11782–11783. *Adding Amino Acids with Novel Reactivity to the Genetic Code of Saccharomyces Cerevisiae*.
- [73] L. D. Pachón, J. H. van Maarseveen, G. Rothenberg, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347(6), 811–815. *Click Chemistry: Copper Clusters Catalyze the Cycloaddition of Azides with Terminal Alkynes*.
- [74] H. A. Orgueira, D. Fokas, Y. Isome, P. C.-M. Chan, C. M. Baldino, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(16), 2911–2614. *Regioselective synthesis of [1,2,3]-triazoles catalyzed by Cu(I) generated in situ from Cu(0) nanosize activated powder and amine hydrochloride salts*.

- [75] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(48), 14397–14402. *Synthesis of Sugar Arrays in Microtiter Plate.*
- [76] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6(17), 2853–2855. *Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis.*
- [77] W. G. Lewis, F. G. Magallon, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(30), 9152–9153. *Discovery and Characterization of Catalysts for Azide-Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching.*
- [78] J.-c. Meng, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(27), 4543–4546. *Kinetic resolution by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.*
- [79] S. Díez-González, A. Correa, L. Cavallo, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 7558–7564. *(NHC)Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition of Azides and Mono- or Disubstituted Alkynes.*
- [80] C. Girard, E. Önen, M. Aufort, S. Beauvière, E. Samson, J. Herscovici, *Org. Lett.* **2006**, 8(8), 1689–1692. *Reusable Polymer-Supportet Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols.*
- [81] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, 94(12), 3260–3275. *Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, I.*
- [82] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(37), 11164–11165. *Cell Surface Labeling of Escherichia coli via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition.*
- [83] A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(34), 10598–10602. *Presentation and Detection of Azide Functionality in Bacterial Cell Surface Proteins.*
- [84] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(46), 15046–15047. *A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems.*
- [85] A. J. Link, M. K. S. Vink, N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, D. A. Tirrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103(27), 10180–10185. *Discovery of aminoacyl-tRNA synthetase activity through cell-surface display of noncanonical amino acids.*
- [86] A. K. Feldman, B. Colasson, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6(22), 3897–3899. *One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides.*
- [87] X. Zhang, R. P. Hsung, L. You, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4(14), 2679–2682. *Tandem azidination- and hydroazidination-Huisgen [3 + 2] cycloadditions of ynamides. Synthesis of chiral amide-substituted triazoles.*

- [88] P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin, E. Van der Eycken, *Org. Lett.* **2004**, 6(23), 4223–4225. *A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction.*
- [89] G. A. Molander, J. Ham, *Org. Lett.* **2006**, 8(13), 2767–2770. *Synthesis of Functionalized Organotrifluoroborates via the 1,3-Dipolar Cycloaddition of Azides.*
- [90] S. Chittaboina, F. Xie, Q. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(13), 2331–2336. *One-pot synthesis of triazole-linked glycoconjugates.*
- [91] B. Sreedhar, P. S. Reddy, N. S. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(18), 3055–3058. *Cu(I)-catalyzed one-pot synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via nucleophilic displacement and 1,3-dipolar cycloaddition.*
- [92] S. Chandrasekhar, D. Basu, C. Rambabu, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(18), 3059–3063. *Three-component coupling of alkynes, Baylis-Hillman adducts and sodium azide: a new synthesis of substituted triazoles.*
- [93] D. Ramachary, C. F. Barbas III, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10(21), 5323–5331. *Towards Organo-Click Chemistry: Development of Organocatalytic Multicomponent Reactions Through Combinations of Aldol, Wittig, Knoevenagel, Michael, Diels-Alder and Huisgen Cycloaddition Reactions.*
- [94] B. Gerard, J. Ryan, A. B. Beeler, J. A. Porko Jr., *Tetrahedron* **2006**, 62(26), 6405–6411. *Synthesis of 1,4,5-trisubstituted-1,2,3-triazoles by copper catalyzed cycloaddition-coupling of azides and terminal azides.*
- [95] S. Kamijo, T. Jin, Y. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45(4), 689–691. *Four-component coupling reactions of silylacetylenes, allyl carbonates, and trimethylsilyl azide catalyzed by a Pd(0)-Cu(I) bimetallic catalyst. Fully substituted triazole synthesis from seemingly internal alkynes.*
- [96] L. Zhang, C. Xinguo, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(46), 15998–15999. *Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides.*
- [97] A. Ray, K. Manoj, M. M. Bhadbhade, R. Mukhopadhyay, A. Bhattacharjya, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(16), 2775–2778. *Cu(I)-Catalyzed cycloaddition of constrained azido-alkynes: access to 12- to 17-membered monomeric triazolophanes incorporating furanosides rings.*
- [98] A. H. Yap, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(18), 3035–3038. *β -Tosylethylazide: a useful synthon for preparation of N-protected 1,2,3-triazoles via click chemistry.*

- [99] M. M. Majireck, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(22), 8680–8683. *A Study of the Scope and Regioselectivity of the Ruthenium-Catalyzed [3+2]-Cycloaddition of Azides with Internal Alkynes.*
- [100] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, 8(20), 4505–4507. *Chemoselective Formation of Successive Triazole Linkages in One Pot: Click-Click Chemistry.*
- [101] O. D. Montagnat, G. Lesseneb, A. B. Hughesa, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(39), 6971–6974. *Synthesis of azide-alkyne fragments for 'click' chemical applications; formation of oligomers from orthogonally protected trialkylsilyl-propargyl azides and propargyl alcohols.*
- [102] P. L. Golas, N. V. Tsarevesky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2006**, 39(19), 6451–6457. *Catalyst Performance in „Click“ Coupling Reactions of Polymers Prepared by ATRP: Ligand and Metal Effects.*
- [103] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114(6), 1095–1099. *Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks.*
- [104] A. Krasiński, Z. Radic, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(18), 6686–6692. *In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors.*
- [105] V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem.* **2005**, 117(1), 118–122. *In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II.*
- [106] M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* **2006**, 118(9), 1463–1467. *Inhibitors of HIV-1 Protease by Using In Situ Click Chemistry.*
- [107] C. W. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6(3), 312–324. *Combinatorial Library of Peptidotriazoles: Identification of [1,2,3]-Triazole Inhibitors against a Recombinant Leishmania mexicana Cysteine Protease.*
- [108] P. R. Loaiza, S. Löber, H. Hübner, P. Gmeiner, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8(2), 252–261. *Click Chemistry on Solid Phase: Parallel Synthesis of N-Benzyltriazole Carboxamides as Super-Potent G-Protein Coupled Receptor Ligands.*
- [109] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 278(5460), 2007–2010. *Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction.*

- [110] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(1), 19–24. *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation.*
- [111] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, 430(7002), 873–877. *Chemical remodelling of cell surfaces in living animals.*
- [112] S. S. Gupta, K. S. Raja, E. Kaltgrad, E. Strable, M. G. Finn, *Chem. Commun.* **2005**, (34), 4315–4317. *Virus-glycopolymer conjugates by copper(I) catalysis of atom transfer radical polymerization and azide-alkyne cycloaddition.*
- [113] S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconj. Chem.* **2005**, 16(6), 1572–1579. *Accelerated Bioorthogonal Conjugation: A Practical Method for the Ligation of Diverse Functional Molecules to a Polyvalent Virus Scaffold.*
- [114] K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(41), 14150–14151. *Selective Dye-Labeling of Newly Synthesized Proteins in Bacterial Cells.*
- [115] A. Deiters, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15(5), 1521–1524. *In vivo incorporation of an alkyne into proteins in Escherichia coli.*
- [116] J. P. Alexander, B. F. Cravatt, *Chem. & Biol.* **2005**, 12(11), 1179–1187. *Mechanism of Carbamate Inactivation of FAAH: Implications for the Design of Covalent Inhibitors and In Vivo Functional Probes for Enzymes.*
- [117] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nature Chem. Biol.* **2006**, 2(5), 274–286. *Proteomic Profiling of Metalloproteases with Cocktails of Active-Site Directed Probes.*
- [118] L. Ballell, K. J. Alink, M. Slijper, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2005**, 6(2), 291–295. *A New Chemical Probe for Proteomics of Carbohydrate-Binding Proteins.*
- [119] D. I. Rozkiewicz, D. Janczewski, W. Verboom, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **2006**, 118(32), 5418–5422. *Click Chemistry by Microcontact Printing.*
- [120] J. P. Collman, N. K. Devaraj, C. E. D. Chidsey, *Langmuir* **2004**, 20(4), 1051–1053. *„Clicking“ Functionality onto Electrode Surfaces.*
- [121] J. P. Collman, N. K. Devaraj, T. P. A. Eperspacher, C. E. D. Chidsey, *Langmuir* **2006**, 22(6), 2457–2464. *Mixed Azide-Terminated Monolayers: A Platform for Modifying Electrode Surfaces.*
- [122] J. K. Lee, Y. S. Chi, I. S. Choi, *Langmuir* **2004**, 20(10), 3844–3847. *Reactivity of Acetylenyl-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold: Triazole Formation.*

- [123] N. K. Devaraj, G. P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J. P. Collman, E. T. Kool, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(24), 8600–8601. *Chemo-selective Covalent Coupling of Oligonucleotide Probes to Self-Assembled Monolayers.*
- [124] X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconj. Chem.* **2006**, 17(1), 52–57. *Carbohydrate and Protein Immobilization onto Solid Surfaces by Sequential Diels-Alder and Azide-Alkyne Cycloadditions.*
- [125] Q. Wan, J. Chen, G. Chen, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(21), 8244–8249. *A Potentially Valuable Advance in the Synthesis of Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines through Extended Cycloaddition Chemistry.*
- [126] J. H. van Maarseveen, W. S. Horne, M. R. Ghadiri, *Org. Lett.* **2005**, 7(20), 4503–4506. *Efficient Route to C2 Symmetric Heterocyclic Backbone Modified Cyclic Peptides.*
- [127] S. Punna, J. Kuzelka, Q. Wang, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2005**, 117(15), 2255–2260. *Head-to-Tail Peptide Cyclodimerization by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition.*
- [128] V. D. Bock, R. Perciaccante, T. P. Jansen, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Lett.* **2006**, 8(5), 919–922. *Click Chemistry as a Route to Cyclic Tetrapeptide Analogues: Synthesis of cyclo-[Pro-Val-ψ(triazole)-Pro-Tyr].*
- [129] P. Wu, M. Malkoch, J. N. Hunt, R. Vestberg, E. Kaltgrad, M. G. Finn, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C. J. Hawker, *Chem. Commun.* **2005**, (46), 5775–5777. *Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry.*
- [130] J. W. Lee, B.-K. Kim, J. H. Kim, W. S. Shin, S.-H. Jin, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(13), 4988–4991. *Facile Approach for Diblock Codendrimers by Fusion between Fréchet Dendrons and PAMAM Dendrons.*
- [131] J. A. Johnson, D. R. Lewis, D. D. Dáz, M. G. Finn, J. T. Koberstein, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(20), 6564–6565. *Synthesis of Degradable Model Networks via ATRP and Click Chemistry.*
- [132] J. L. Mynar, T.-L. Choi, M. Yoshida, V. Kim, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.* **2005**, (41), 5169–5171. *Doubly-dendronized linear polymers.*
- [133] M. Malkoch, K. Schleicher, E. Drockenmuller, C. J. Hawker, T. P. Russell, P. Wu, V. V. Fokin, *Macromolecules* **2005**, 38(9), 3663–3678. *Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry.*
- [134] T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, 68(2), 609–612. *Click Chemistry to Construct Fluorescent Oligonucleotides for DNA Sequencing.*

- [135] R. L. Weller, S. R. Rajske, *Org. Lett.* **2005**, 7(11), 2141–2144. *DNA Methyltransferase-Moderated Click Chemistry.*
- [136] Z. Li, T. S. Seo, J. Ju, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45(15), 3143–3146. *1,3-Dipolar cycloaddition of azides with electron-deficient alkynes under mild conditions in water.*
- [137] T. S. Seo, X. Bai, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101(15), 5488–5493. *Photocleavable fluorescent nucleotides for DNA sequencing on a chip constructed by site-specific coupling chemistry.*
- [138] T. S. Seo, X. Bai, D. H. Kim, Q. Meng, S. Shi, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(17), 5926–5931. *Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides.*
- [139] H. Ruparel, L. Bi, Z. Li, X. Bai, D. H. Kim, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(17), 5932–5937. *Design and synthesis of a 3'-O-allyl photocleavable fluorescent nucleotide as a reversible terminator for DNA sequencing by synthesis.*
- [140] Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, 115(12), 1408–1413. *Two Enabling Architectures for DNA-Templated Organic Synthesis.*
- [141] R. L. Weller, S. R. Rajske, *ChemBioChem* **2006**, 7(2), 243–245. *Design, Synthesis, and Preliminary Biological Evaluation of a DNA Methyltransferase-Directed Alkylating Agent.*
- [142] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103(5), 1875–1916. *Palladium-Assisted Routes to Nucleosides.*
- [143] M. J. Robins, P. J. Barr, *J. Org. Chem.* **1983**, 48(11), 1854–1862. *Nucleic Acid Related Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides.*
- [144] D. J. Hurley, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(14), 3749–3762. *Ru(II) and Os(II) nucleosides and oligonucleotides: Synthesis and properties.*
- [145] D. Graham, J. A. Parkinson, T. Brown, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, (6), 1131–1138. *DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: synthesis and stability.*
- [146] W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Act.* **1987**, 70(1), 175–186. *21. A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules.*
- [147] A. D. Barone, J.-Y. Tang, M. H. Caruthers, *Nucl. Acids Res.* **1984**, 12(10), 4051–4061. *In situ activation of bis-dialkylaminophosphines - a new method for synthesizing deoxyoligonucleotides on polymer supports.*

- [148] S. Ohira, *Synth. Commun.* **1989**, 19(3-4), 561–564. *Methanolysis of dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)phosphonate: generation of dimethyl (diazomethyl)phosphonate and reaction with carbonyl compounds.*
- [149] S. Müller, B. Liepold, G. J. Roth, H. J. Bestmann, *Synlett* **1996**, (6), 521–522. *An improved one-pot procedure for the synthesis of alkynes from aldehydes.*
- [150] J. C. Gilbert, U. Weerasooriya, *J. Org. Chem.* **1982**, 47(10), 1837–1845. *Diazoethenes: Their Attempted Synthesis from Aldehydes and Aromatic Ketones by Way of the Horner-Emmons Modification of the Wittig Reaction. A Facile Synthesis of Alkynes.*
- [151] D. Seyferth, R. S. Marmor, P. Hilbert, *J. Org. Chem.* **1971**, 36(10), 1379–1386. *Some Reactions of Dimethylphosphono- Substituted Diazoalkanes. (MeO)₂P(O)CR Transfer to Olefins and 1,3-Dipolar Additions of (MeO)₂P(O)C(N₂)R.*
- [152] D. G. Brown, E. J. Velthuisen, J. R. Commerford, R. G. Brisbois, T. R. Hoye, *J. Org. Chem.* **1996**, 61(7), 2540–2541. *A Convenient Synthesis of Dimethyl(Diazomethyl)phosphonate (Seyferth/Gilbert Reagent).*
- [153] P. Callant, L. D’Haenens, M. Vandewalle, *Synth. Commun.* **1984**, 14(2), 155–161. *An efficient preparation and the intramolecular cyclopropanation of alpha-Diazo-beta-ketophosphonates and alpha-Diazophosphonoacetates.*
- [154] K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, 100(6), 2047–2059. *Syntheses of Nucleoside Triphosphates.*
- [155] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, 54(3), 631–635. *Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one.*
- [156] R. W. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74(7), 1672–1673. *A Re-examination of the Reaction Between Phosphorus Trichloride and Salicylic Acid.*
- [157] P. Ciuffreda, S. Casati, E. Santaniello, *Tetrahedron* **2000**, 56(20), 3239–3243. *The Action of Adenosine Deaminase (E.C. 3.5.4.4.) on Adenosine and Deoxyadenosine Acetates: The Crucial Role of the 5'-Hydroxy Group for the Enzyme Activity.*
- [158] T. Kovács, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29(36), 4525–4528. *Simple synthesis of 5-vinyl- and 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphates.*
- [159] M. M. Bio, F. Xu, M. Waters, J. M. Williams, K. A. Savary, C. J. Cowden, C. Yang, E. Buck, Z. J. Song, D. M. Tschäen, R. P. Volante, R. A. Reamer, E. J. J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **2004**, 69(19), 6257–6266. *Practical Synthesis of a Potent Hepatitis C Virus RNA Replication Inhibitor.*

- [160] M. Takeshita, C.-N. Chang, F. Johnson, S. Will, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262(21), 10171–10179. *Oligodeoxynucleotides Containing Synthetic Abasic Sites.*
- [161] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(50), 14893–14902. *Investigating Cellular Metabolism of Synthetic Azidosugars with the Staudinger Ligation.*
- [162] F. Morís-Varas, X.-H. Qian, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(33), 7647–7652. *Enzymatic/Chemical Synthesis and Biological Evaluation of Seven-Membered Iminocyclitols.*
- [163] D. C. Kong, M. y. Itzstein, *Carbohydr. Res.* **1998**, 305(3-4), 323–329. *The chemoenzymatic synthesis of 9-substituted 3,9-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acids.*
- [164] Z. Zhou, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(29), 8862–8863. *A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $^3(n,\pi^*)\text{-}^1(\pi,\pi^*)$ Inversion.*
- [165] E. F. V. Scriven, K. Turnbull, *Chem. Rev.* **1988**, 88(2), 297–368. *Azides: Their preparation and synthetic uses.*
- [166] M. C. Bryan, F. Fazio, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, A. Chang, M. D. Best, D. A. Calarese, O. Blixt, J. C. Paulson, D. Burton, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(28), 8640–8641. *Covalent Display of Oligosaccharide Arrays in Microtiter Plates.*
- [167] M. Adamczyk, J. R. Fishpaugh, K. J. Heuser, *Bioconj. Chem.* **1997**, 8(2), 253–255. *Preparation of Succinimidyl and Pentafluorophenyl Active Esters of 5- and 6- Carboxyfluorescein.*
- [168] B. Carboni, A. Benalil, M. Vaultier, *J. Org. Chem.* **1993**, 58(14), 3736–3741. *Aliphatic amino azides as key building blocks for efficient polyamine synthesis.*
- [169] L. Wen, M. Li, J. B. Schlenoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119(33), 7726–7733. *Polyporphyrin Thin Films from the Interfacial Polymerization of Mercaptoporphyrins.*
- [170] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. & Biodiv.* **2006**, 3(5), 509–514. *DNA Containing Side Chains with Terminal Triple Bonds: Base-Pair Stability and Functionalization of Alkynylated Pyrimidines and 7-Deazapurines.*
- [171] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98(3), 1109–1151. *Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission.*
- [172] Y. Jin, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(23), 8408–8415. *DNA Cleavage by Copper-ATCUN Complexes. Factors Influencing Cleavage Mechanism and Linerization of dsDNA.*

- [173] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(21), 7003–7008. *Selective DNA Strand Scission with Binuclear Copper Complexes: Implications for an Active Cu₂-O₂ Species.*
- [174] D. Pérez-Bello, V. M. Suárez, C. P. Bolaños, J. M. López, G. P. Pérez, L. López-Canovas, D. Higginson-Clarke, C. Rodríguez-Tanty, A. M. Riverón, *Prep. Biochem. Biotech.* **2003**, 33(4), 253–268. *Comparative Study of Three Methods for Non-radioactive In Vivo DNA Labeling in Escherichia coli Using Nucleoside Analogs.*
- [175] K. A. Burns, C.-Y. Kuan, *Eur. J. Neurosci.* **2005**, 21, 803–807. *Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus.*
- [176] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, 66(16), 5352–5358. *Diels-Alder Bioconjugation of Diene-Modified Oligonucleotides.*
- [177] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(12), 4174–4175. *A Simple Glycol Nucleic Acid.*
- [178] E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, *Rapid. Commun. Mass. Spect.* **1992**, 6, 771–776. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Nucleic Acids with Wavelengths in the Ultraviolet and Infrared.*
- [179] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, 63(14), 2002–2004. *Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol „ink „ followed by chemical etching.*
- [180] L. Yan, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(24), 6179–6180. *Patterning a Preformed, Reactive SAM Using Microcontact Printing.*
- [181] D. I. Rozkiewicz, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Langmuir* **2005**, 21(14), 6337–6343. *Reversible Covalent Patterning of Self-Assembled Monolayers on Gold and Silicon Oxide Surfaces.*
- [182] D. I. Rozkiewicz, Y. Kraan, M. W. T. Werten, F. A. d. Wolf, V. Subramaniam, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Chemistry* **2005**, 12(24), 6290–6297. *Covalent Microcontact Printing of Proteins for Cell Patterning.*
- [183] T. P. Sullivan, M. L. v. Poll, P. Y. W. Dankers, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2004**, 116(32), 4286–4289. *Forced Peptide Synthesis in Nanoscale Confinement under Elastomeric Stamps.*

- [184] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, eingereicht. *Transfer Printing of DNA by Click Chemistry*.
- [185] K. R. Tindall, T. A. Kunkel, *Biochemistry* **1988**, 27(16), 6008–6013. *Fidelity of DNA Synthesis by the Thermus aquaticus DNA Polymerase*.
- [186] J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe, *Nucl. Acids Res.* **1996**, 24(18), 3546–3551. *PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases*.
- [187] M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94(20), 10493–10495. *Hydrogen bonding revisited: Geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity*.
- [188] E. T. Kool, *Cur. Op. Chem. Biol.* **2000**, 4(6), 602–608. *Synthetically modified DNAs as substrates for polymerases*.
- [189] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71(1), 191–219. *Active site tightness and substrate fit in DNA replication*.
- [190] T. W. Kim, J. C. Delaney, J. M. Essigmann, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(44), 15803–15808. *Probing the active site tightness of DNA polymerase in subnanometer increments*.
- [191] E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2006**, (35), 3665–3675. *The difluorotoluene debate - a decade later*.
- [192] C. M. Joyce, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **2004**, 45(45), 14317–14324. *DNA Polymerase Fidelity: Kinetics, Structure and Checkpoints*.
- [193] J. Florián, M. F. Goodman, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(19), 6819–6824. *Computer simulations of protein functions: Searching for the molecular origin of the replication fidelity of DNA polymerases*.
- [194] Y.-C. Tsai, K. A. Johnson, *Biochemistry* **2006**, 45(32), 9675–9687. *A New Paradigm for DNA Polymerase Specificity*.
- [195] A. Chien, D. B. Edgar, J. M. Trela, *J. Bact.* **1976**, 127(3), 1550–1557. *Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile Thermus aquaticus*.
- [196] S. H. Eom, J. Wang, T. A. Steitz, *Nature* **1996**, 382(6588), 278–281. *Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site*.
- [197] W. Kanoksilapatham, J. M. González, D. L. Maeder, J. DiRuggiero, F. T. Robb, *Archaea* **2004**, 1(4), 277–283. *A proposal to rename the hyperthermophile Pyrococcus woesei as Pyrococcus furiosus subsp. woesei*.

- [198] M. Takagi, M. Nishioka, H. Kakihara, M. Kitabayashi, H. Inoue, B. Kawakami, M. Oka, T. Imanaka, *Appl. Microbiol.* **1997**, 63(11), 4504–4510. *Characterization of DNA Polymerase from Pyrococcus sp. Strain KOD1 and Its Application to PCR.*
- [199] T. Kuroita, H. Matsumura, N. Yokota, M. Kitabayashi, H. Hashimoto, T. Inoue, T. Imanaka, Y. Kai, *J. Mol. Biol.* **2005**, 351(2), 291–298. *Structural Mechanism for Coordination of Proofreading and Polymerase Activities in Archaeal DNA Polymerases.*
- [200] H. Hashimoto, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue, Y. Kai, *J. Mol. Biol.* **2001**, 306(3), 469–477. *Crystal Structure of DNA Polymerase from Hyperthermophilic Archaeon Pyrococcus kodakaraensis KOD1.*
- [201] S. Belkin, H. W. Jannasch, *Arch. Microbiol.* **1985**, 141(3), 181–186. *A new extremely thermophilic, sulfur-reducing heterophilic, marine bacterium.*
- [202] F. B. Perler, D. G. Comb, W. E. Jack, L. S. Moran, B. Qiang, R. B. Kucera, J. Benner, B. E. Slatko, D. O. Nwankwo, S. K. Hempstead, C. K. S. Carroll, H. W. Jannasch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89(12), 5577–5581. *Intervening sequences in an Archae DNA polymerase gene.*
- [203] H. Kong, R. B. Kucera, W. E. Jack, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268(3), 1965–1975. *Characterization of a DNA Polymerase from the Hyperthermophile Archae Thermococcus litoralis.*
- [204] H. W. Jannasch, C. O. Wirsen, S. J. Molyneaux, T. A. Langworthy, *Appl. Environ. Micro.* **1992**, 58(11), 3473–3481. *Comparative Physiological Studies on Hyperthermophilic Archae Isolated from Deep-Sea Hot Vents with Emphasis on Pyrococcus Strain GB-D.*
- [205] M. L. Miroshnichenko, G. M. Gongadze, F. A. Rainey, A. S. Kostyukova, A. M. Lysenko, N. A. Chernyh, E. A. Bonch-Osmolovskaya, *Int. J. Sys. Bact.* **1998**, 48(1), 23–29. *Thermococcus gorgonarius sp. nov. and Thermococcus pacificus sp. nov.: heterotrophic extremely thermophilic archaea from New Zealand submarine hot vents.*
- [206] K.-P. Hopfner, A. Eichinger, R. A. Engh, F. Laue, W. Ankenbauer, R. Huber, B. Angerer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96(7), 3600–3605. *Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from Thermococcus gorgonarius.*
- [207] G. Fiala, K. O. Stetter, *Arch. Microbiol.* **1986**, 145(1), 56–61. *Pyrococcus furiosus sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C.*

- [208] S. Dabrowski, J. Kur, *Prot. Expr. Purif.* **1998**, 14(1), 131–138. *Cloning and Expression in Escherichia coli of the Recombinant His-Tagged DNA Polymerases from Pyrococcus furiosus and Pyrococcus woesei.*
- [209] J. Ito, D. K. Braithwaite, *Nucl. Acids Res.* **1991**, 19(15), 4045–4057. *Compilation and alignment of DNA polymerase sequences.*
- [210] J. Filée, P. Forterre, T. Sen-Lin, J. Laurent, *J. Mol. Evol.* **2002**, 54(6), 763–773. *Evolution of DNA Polymerase Families: Evidences for Multiple Gene Exchange Between Cellular and Viral Proteins.*
- [211] P. M. J. Burgers, E. V. Koonin, E. Bruford, L. Blanco, K. C. Burtis, M. F. Christman, W. C. Copeland, E. C. Hanaoka, F. Hanaoka, D. C. Hinkle, C. W. Lawrence, M. Nakanishi, H. Ohmori, L. Prakash, S. Prakash, C.-A. Reynaud, A. Sugino, T. Todo, Z. Wang, J.-C. Weill, R. Woodgate, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(47), 43487–43490. *Eukaryotic DNA Polymerases: Proposal for a Revised Nomenclature.*
- [212] M. A. Greagg, M. J. Fogg, G. Panayotou, S. J. Evans, B. A. Conolly, L. H. Pearl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96(16), 9045–9050. *A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil.*
- [213] J. P. McDonald, A. Hall, D. Gasparutto, J. Cadet, J. Ballantyne, R. Woodgate, *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34(4), 1102–1111. *Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs.*
- [214] R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, R. Griffith, *Nature Biotech.* **1992**, 10(4), 413 – 417. *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.*
- [215] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, *Nature Biotech.* **1993**, 11(9), 1026–1030. *Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions.*
- [216] T. D. Schmittgen, B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer, M. W. Reed, *Anal. Biochem.* **2000**, 285(2), 194–204. *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods.*
- [217] D. V. Rebrikov, D. Y. Trofimov, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2006**, 42(5), 455–463. *Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis.*
- [218] M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, L. Dempfle, *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30(9), e36. *Relative expression software tool (REST(c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.*
- [219] J. Wilhelm, A. Pingoud, *ChemBioChem* **2003**, 4(11), 1120–1128. *Real-Time Polymerase Chain Reaction.*

- [220] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, H. R. H. Patel, *Exp. Rev. Mol. Diag.* **2005**, 5(2), 209–219. *Basic principle of real-time quantitative PCR.*
- [221] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, (44), 5487 – 5502. *Fluorescence based strategies for genetic analysis.*
- [222] S. A. E. Marras, S. Tyagi, F. R. Kramer, *Clin. Chim. Acta* **2006**, 363(1-2), 48–60. *Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes.*
- [223] C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. A. Moss, R. P. Rasmussen, *Biotechniques* **1997**, 22(1), 130–138. *Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification.*
- [224] T. B. Morrison, J. J. Weis, C. T. Wittwer, *Biotechniques* **1998**, 24(6), 954–962. *Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring during Amplification.*
- [225] S. Creighton, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(9), 4759–4774. *Gel Kinetic Analysis of DNA Polymerase Fidelity in the Presence of Proofreading Using Bacteriophage T4 DNA Polymerase.*
- [226] R. M. K. Dale, D. C. Livingston, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, 70(8), 2238–2242. *The Synthesis and Enzymatic Polymerization of Nucleotides Containing Mercury: Potential Tools for Nucleic Acid Sequencing and Structural Analysis.*
- [227] P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78(11), 6633–6637. *Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes.*
- [228] J. T. Sági, A. Szabolcs, A. Szemző, L. Ötvös, *Nucl. Acids Res.* **1977**, 4(8), 2767–2777. *Modified polynucleotides I. Investigation of the enzymatic polymerization of 5-alkyl-dUTPs.*
- [229] J. Sági, R. Nowak, B. Zmudzka, A. Szemző, L. Ötvös, *Biochim. Biophys. Act.* **1980**, 606(2), 196–201. *A study of substrate specificity of mammalian and bacterial DNA polymerases with 5-Alkyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphates.*
- [230] L. Ötvös, J. Szécsi, J. Sági, T. Kovács, *Nucl. Acids Res. Symp. Series* **1987**, (18), 125–129. *Substrate specificity of DNA polymerases. II. 5-(1-Alkynyl)-dUTPs as substrates of the Klenow DNA polymerase enzyme.*
- [231] L. Ötvös, J. Sági, T. Kovács, *Nucl. Acids Res.* **1987**, 15(4), 1763–1777. *Substrate specificity of DNA polymerases. I. Enzyme-catalysed incorporation of 5-(1-alkenyl)-2'-deoxyuridines into DNA.*

- [232] H. Yu, J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar, A. S. Waggoner, *Nucl. Acids Res.* **1994**, 22(15), 3226–3232. *Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes.*
- [233] O. Henegariu, P. Bray-Ward, D. C. Ward, *Nature Biotech.* **2000**, 18(3), 345–348. *Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labeling.*
- [234] J. G. Hacia, L. C. Brody, M. S. Chee, S. P. Fodor, F. S. Collins, *Nature Genet.* **1996**, 14(4), 441–447. *Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis.*
- [235] A. Schumacher, P. Kapranov, Z. Kaminsky, J. Flanagan, A. Assadzadeh, P. Yau, C. Vrtanen, N. Winegarten, J. Cheng, T. Gingeras, A. Petronis, *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34(2), 528–542. *Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications.*
- [236] A. Hansen, Y. Chen, J. M. Inman, Q. N. Phan, Z.-Q. Qi, C. C. Xiang, M. Palkovits, N. Cherman, S. A. Kuznetsov, P. G. Robey, E. Mezey, M. J. Brownstein, *Nature Meth.* **2007**, 4(1), 35–37. *Sensitive and specific method for detecting G protein-coupled receptor mRNAs.*
- [237] J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, *Science* **1987**, 238(4825), 336–341. *A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides.*
- [238] J. A. Latham, R. Johnson, J. J. Toole, *Nucl. Acids Res.* **1994**, 22(14), 2817–2822. *The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine.*
- [239] S. W. Santoro, G. F. Joyce, K. Sakthivel, S. Gramatikova, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122(11), 2433–2439. *RNA Cleavage by a DNA Enzyme with Extended Chemical Functionality.*
- [240] N. K. Navani, Y. Li, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2006**, 10(3), 282–289. *Aptamer therapeutics advance.*
- [241] D. Proske, M. Blank, R. Buhmann, A. Resch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 69(4), 367–374. *Aptamers - basic research, drug development, and clinical applications.*
- [242] D. M. Perrin, *Comb. Chem. High Through. Screen.* **2000**, 3(3), 243–269. *Nucleic Acids for Recognition and Catalysis: Landmarks, Limitations, and Looking to the Future.*
- [243] T. W. Wiegand, R. C. Janssen, B. E. Eaton, *Chem. Biol.* **1997**, 5(9), 675–683. *Selection of RNA amide synthases.*

- [244] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, 389(6646), 54–57. *RNA-catalysed carbon-carbon bond formation.*
- [245] T. R. Battersby, D. N. Ang, P. Burgstaller, S. C. Jurczyk, M. T. Bowser, D. D. Buchanan, R. T. Kennedy, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121(42), 9781–9789. *Quantitative Analysis of Receptors for Adenosine Nucleotides Obtained via In Vitro Selection from a Library Incorporating a Cationic Nucleotide Analog.*
- [246] M. M. Masud, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12(5), 1111–1120. *Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX.*
- [247] K. Sakthivel, C. F. Barbas III, *Angew. Chem.* **1998**, 110(20), 2998–3002. *Erweiterung der Bindungs- und Katalyse-eigenschaften von DNA: hochfunktionalisierte dUTP-Derivate als Substrate für thermostabile DNA-Polymerasen.*
- [248] S. E. Lee, A. Sidorov, T. Goullain, N. Mignet, S. J. Thorpe, J. A. Brazier, M. J. Dickman, D. P. Hornby, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29(7), 1565–1573. *Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids: a systematic study of linker length and rigidity.*
- [249] H. Sawai, A. N. Ozaki, F. Satoh, T. Ohbayashi, M. M. Masud, H. Ozaki, *Chem. Commun.* **2001**, (24), 2604–2605. *Expansion of structural and functional diversities of DNA using new 5-substituted deoxyuridine derivatives by PCR with superthermophilic KOD Dash DNA polymerase.*
- [250] H. A. Held, S. A. Benner, *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30(17), 3857–3869. *Challenging artificial genetic systems: thymidine analogs with 5-position sulfur functionality.*
- [251] M. Kuwahara, Y. Takahata, A. Shoji, A. N. Ozaki, H. Ozaki, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(21), 3735–3738. *Substrate Properties of C5-Substituted Pyrimidine 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphates for Thermostable DNA Polymerases During PCR.*
- [252] M. M. Masud, A. Ozaki-Nakamura, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *ChemBioChem* **2003**, 4(7), 584–588. *Modified DNA Bearing 5-(Methoxycarbonylmethyl)-2'-deoxyuridine: Preparation by PCR with Thermophilic DNA Polymerase and Postsynthetic Derivatization.*
- [253] A. Roychowdhury, H. Illangkoon, C. L. Hendrickson, S. A. Benner, *Org. Lett.* **2004**, 6(4), 489–492. *2'-Deoxycytidines Carrying Amino and Thiol Functionality: Synthesis and Incorporation by Vent (Exo-) Polymerase.*

- [254] T. Ohbayashi, M. Kuwahara, M. Hasegawa, T. Kasamatsu, T. Tamura, H. Sawai, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3(13), 2463–2468. *Expansion of repertoire of modified DNAs prepared by PCR using KOD Dash DNA polymerase.*
- [255] M. Kuwahara, K. Hanawa, K. Ohsawa, R. Kitagata, H. Ozakia, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14(8), 2518–2526. *Direct PCR amplification of various modified DNAs having amino acids: Convenient preparation of DNA libraries with high-potential activities for in vitro selection.*
- [256] T. Gourelain, A. Sidorov, N. Mignet, S. J. Thorpe, S. E. Lee, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29(9), 1898–1905. *Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids. II. Simultaneous incorporation of amino and imidazolyl functionalities by two modified triphosphates during PCR.*
- [257] O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, 113(21), 4112–4115. *Funktionalisierte DNA: ein neues replizierbares Biopolymer.*
- [258] S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, 116(25), 3399–3403. *Erzeugung und enzymatische Amplifikation hochgradig funktionalisierter DNA Doppelstränge.*
- [259] S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(43), 15071–15082. *A Versatile Toolbox for Variable DNA Functionalization at High Density.*
- [260] M. Kuwahara, J.-i. Nagashima, M. Hasegawa, T. Tamura, R. Kitagata, H. Kazuo, S.-i. Hososhima, T. Kasamatsu, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34(19), 5383–5394. *Systematic characterization of 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA.*
- [261] Z. Zhu, A. S. Waggoner, *Cytometry* **1997**, 28(3), 206–211. *Molecular Mechanism Controlling the Incorporation of Fluorescent Nucleotides Into DNA by PCR.*
- [262] T. Obayashi, M. M. Masud, A. N. Ozaki, H. Ozaki, M. Kuwahara, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12(8), 1167–1170. *Enzymatic Synthesis of Labeled DNA by PCR Using New Fluorescent Thymidine Nucleotide Analogue and Superthermophilic KOD Dash DNA Polymerase.*
- [263] S. Brakmann, P. Nieckchen, *ChemBioChem* **2001**, 2(10), 773–777. *The Large Fragment of Escherichia coli DNA Polymerase I Can Synthesize DNA Exclusively from Fluorescently Labeled Nucleotides.*

- [264] S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem.* **2001**, 113(8), 1473–1476. *Hochgradige Markierung von DNA: Herstellung und Charakterisierung des Substrats für eine Einzelmolekül-Sequenzierung.*
- [265] C. J. Lacenere, N. K. Garg, B. M. Stoltz, S. R. Quake, *Nucleosides, Nucleotides* **2006**, 25(1), 9–15. *Effect of a modified dye-labeled nucleotide spacer arm on incorporation by thermophilic DNA polymerases.*
- [266] T. Tasara, B. Angerer, M. Damond, H. Winter, S. Dörhöfer, U. Hübscher, M. Amacker, *Nucl. Acids Res.* **2003**, 31(10), 2636–2646. *Incorporation of reporter molecule-labeled nucleotides by DNA polymerases. II. High-density labeling of natural DNA.*
- [267] L. H. Thoresen, G.-S. Jiao, W. C. Haaland, M. L. Metzker, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4603–4610. *Rigid, Conjugated, Fluoresceinated Thymidine Triphosphates: Syntheses and Polymerase Mediated Incorporation into DNA Analogues.*
- [268] S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem.* **2002**, 114(17), 3350–3352. *Ein weiterer Schritt in Richtung Einzelmolekül-Sequenzierung: Escherichia-coli-Exonuclease III degradiert DNA mit Fluoreszenzmarkierungen an jedem Basenpaar.*
- [269] A. Castro, D. A. R. Dalvit, L. Paz-Matos, *Anal. Chem.* **2004**, 76(14), 4169–4174. *Ultrasensitive Detection of DNA Sequences in Solution by Specific Enzymatic Labeling.*
- [270] A. Krieg, S. Laib, T. Ruckstuhl, S. Seeger, *ChemBioChem* **2004**, 5(12), 1680–1685. *Fast Detection of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) by Primer Elongation with Monitoring of Supercritical-Angle Fluorescence.*
- [271] I. V. Smolina, D. I. Cherny, R. M. Nietupski, T. Beals, J. H. Smith, D. J. Lane, N. E. Broude, V. V. Demidov, *Anal. Biochem.* **2005**, 347(1), 152–155. *High-density fluorecently labeled rolling-circle amplicons for DNA diagnostics.*
- [272] J. P. Anderson, B. Angerer, L. A. Loeb, *Biotechniques* **2005**, 38(2), 257–263. *Incorporation of reporter-labeled nucleotides by DNA polymerases.*
- [273] Z. Földes-Papp, B. Angerer, W. Ankenbauer, R. Rigler, *J. Biotechnol.* **2001**, 86(3), 237–253. *Fluorescent high-density labeling of DNA: error-free substitution for a normal nucleotide.*
- [274] Z. Földes-Papp, B. Angerer, P. Thyberg, M. Hinz, S. Wennmalm, W. Ankenbauer, H. Seliger, A. Holmgren, R. Rigler, *J. Biotechnol.* **2001**, 86(3), 203–224. *Fluorescently labeled model DNA sequences for exnucleolytic sequencing.*

- [275] M. A. Augustin, W. Ankenbauer, B. Angerer, *J. Biotechnol.* **2001**, 86(3), 289–301. *Progress towards single-molecule sequencing: enzymatic synthesis of nucleotide-specifically labeled DNA.*
- [276] A. Ramanathan, L. Pape, D. C. Schwartz, *Anal. Biochem.* **2005**, 337(1), 1–11. *High-density polymerase-mediated incorporation of fluorochrome-labeled nucleotides.*
- [277] C. W. Siebert, A. Jacob, H. Köster, *Anal. Biochem.* **1996**, 243(1), 55–65. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Detection of Polymerase Chain Reaction Products Containing 7-Deazapurine Moieties.*
- [278] H. B. Gamper Jr., K. Arar, A. Gewirtz, Y.-M. Hou, *Biochemistry* **2006**, 45(22), 6978–6986. *Unrestricted Hybridization of Oligonucleotides to Structure-Free DNA.*
- [279] J. L. Wolfe, T. Kawate, D. A. Sarracino, M. Zillmann, J. Olson, V. P. Stanton Jr., G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(17), 11073–11078. *A genotyping strategy based on incorporation and cleavage of chemically modified nucleotides.*
- [280] I. Hirao, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, R. Kawai, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nature Meth.* **2006**, 3(9), 729–735. *An unnatural hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA.*
- [281] C. Yu, A. A. Henry, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, 114(20), 3997–4000. *Polymerase Recognition of Unnatural Base Pairs.*
- [282] S. A. Benner, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37(10), 784–797. *Understanding Nucleic Acids Using Synthetic Chemistry.*
- [283] G. T. Hwang, F. E. Romesberg, *Nucl. Acids Res.* **2006**, 34(7), 2037–2045. *Substituent effects ofn the pairing and polymerase recognition of simple unnatural base pairs.*
- [284] Y. Kim, A. M. Leconte, Y. Hari, F. E. Romesberg, *Angew. Chem.* **2006**, 118(46), 7973–7976. *Stability and Polymerase Recognition of Pyridine Nucleobase Analogues: Role of Minor-Groove H-Bond Acceptors.*
- [285] I. Hirao, *Cur. Op. Chem. Biol.* **2006**, 10(6), 622–627. *Unnatural base pair systems for DNA/RNA-based biotechnology.*
- [286] F. Seela, A. Röling, *Nucl. Acids Res.* **1991**, 20(1), 55–61. *7-Deazapurine containing DNA: efficiency of c7GdTP, c7AdTP and c7ldTP incorporation during PCR-amplification and protection from endodeoxyribonuclease hydrolysis.*

- [287] T. S. Godovikova, D. M. Kolpashchikov, T. N. Orlova, V. A. Richter, T. M. Ivanova, S. L. Grochovsky, T. V. Nasedkina, L. S. Victorova, A. I. Poletaev, *Bioconj. Chem.* **1999**, 10(3), 529–537. 5-[3-(E)-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzamido)propenyl-1]-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate Substitutes for Thymidine-5'-triphosphate in the Polymerase Chain Reaction.
- [288] A. Okamoto, K. Tanaka, K.-i. Nishizaa, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12(22), 5875–5880. Synthesis of an artificial hole-transporting nucleoside triphosphate, dMDATP, and its enzymatic incorporation into DNA.
- [289] F. J. Ghadessy, N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, *Nature Biotech.* **2004**, 22(6), 755–759. Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution.
- [290] Y. Weizmann, F. Patolsky, I. Popov, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, 4(5), 787–792. Telomerase-Generated Templates for the Growing of Metal Nanowires.
- [291] D. M. Perrin, T. Garestier, C. Hélène, *Nucleosides, Nucleotides* **1999**, 18(3), 377–391. Expanding the Catalytic Repertoire of Nucleic Acid Catalysts: Simultaneous Incorporation of Two Modified Deoxyribonucleoside Triphosphates Bearing Ammonium and Imidazolyl Functionalities.
- [292] H. Sawai, A. Ozaki-Nakamura, M. Mine, H. Ozaki, *Bioconj. Chem.* **2002**, 13, 309–316. Synthesis of New Modified DNAs by Hyperthermophilic DNA Polymerase: Substrate and Template Specificity of Functionalized Thymidine Analogues Bearing an sp³-Hybridized Carbon at the C5 alpha-Position for Several DNA Polymerases.
- [293] A. Pingoud, A. Jeltsch, *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29(18), 3705–3727. Structure and function of type II restriction endonucleases.
- [294] J. Kang, M. S. Lee, D. G. Gorenstein, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, 64(2), 147–151. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to in vitro combinatorial selection of aptamers.
- [295] L. J. Kricka, *Ann. Clin. Biochem.* **2002**, 39(2), 114–129. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays.
- [296] N. K. Navani, Y. Li, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2006**, 10, 272–281. Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors.
- [297] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105(4), 1547–1562. Nanostructures in Bidiagnostic.
- [298] N. C. Tansil, Z. Gao, *Nano Today* **2006**, 1(1), 29–37. Nanoparticles in biomolecular detection.

- [299] J. J. Gooding, *Electroanalysis* **2002**, 14(17), 1149–1156. *Electrochemical DNA Hybridization Biosensors*.
- [300] J. Wang, *Chemistry* **1999**, 5(6), 1681–1685. *Towards Genoelectronics: Electrochemical Biosensing of DNA Hybridization*.
- [301] R. S. Tuma, M. P. Beaudet, X. Jin, L. J. Jones, C.-Y. Cheung, S. Yue, V. L. Singer, *Anal. Biochem.* **1999**, 268(2), 278–288. *Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: A Dye Optimized for Use with 300-nm Ultraviolet Transilluminators*.
- [302] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum, *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32(12), e103. *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*.
- [303] J. Skeidsvoll, P. M. Ueland, *Anal. Biochem.* **1995**, 231(2), 359–365. *Analysis of Double-Stranded DNA by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection Using the Monomeric Dye SYBR Green*.
- [304] B. Schweitzer, S. Kingsmore, *Curr. Op. Biotechnol.* **2001**, 12(1), 21–27. *Combining nucleic acid amplification and detection*.
- [305] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2004**, 8(5), 547–553. *Molecular beacons*.
- [306] A. P. Silverman, E. T. Kool, *TRENDS in Biotech.* **2005**, 23(5), 225–230. *Quenched probes for highly specific detection of cellular RNAs*.
- [307] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96(11), 6171–6176. *Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes*.
- [308] R. Y. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, H. T. Soh, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103(11), 4017–4021. *Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor*.
- [309] C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100(16), 9134–9137. *Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA*.
- [310] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382(6592), 607–609. *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*.
- [311] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, 289(5485), 1757–1760. *Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes*.
- [312] J.-M. Nam, S. I. Stoeva, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(19), 5932–5933. *Bio-Bar-Code-Based DNA Detection with PCR-like Sensitivity*.

- [313] S. I. Stoeva, J.-S. Lee, J. E. Smith, S. T. Rosen, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(26), 8378–8379. *Multiplexed Detection of Protein Cancer Markers with Biobarcode Nanoparticle Probes.*
- [314] J. Burmeister, V. Bazilyanska, K. Grothe, B. Koehler, I. Dorn, B. D. Warner, E. Diessel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379(3), 391–398. *Single nucleotide polymorphism analysis by chip-based hybridization and direct current electrical detection of gold-labeled DNA.*
- [315] E. Diessel, K. Grothe, H.-M. Siebert, B. D. Warner, J. Burmeister, *Biosens. Bioelectr.* **2004**, 19(10), 1229–1235. *Online resistance monitoring during auto-metallographic enhancement of colloidal Au labels for DNA analysis.*
- [316] Y. Weizmann, F. Patolsky, I. Willner, *Analyst* **2001**, 126(9), 1502–1504. *Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on Au-nanoparticles.*
- [317] C.-H. Liu, Z.-P. Li, B.-A. Du, X.-R. Duan, Y.-C. Wang, *Anal. Chem.* **2006**, 78(11), 3738–3744. *Silver Nanoparticle-Based Ultrasensitive Chemiluminescent Detection of DNA Hybridization and Single-Nucleotide Polymorphisms.*
- [318] F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Nature Biotechnol.* **2001**, 19(3), 253–257. *Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction.*
- [319] Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(12), 3452–3454. *Amplified DNA Sensing and Immunosensing by the Rotation of Functional Magnetic Particles.*
- [320] Z. Cheglakov, Y. Weizmann, B. Basnar, I. Willner, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5(2), 223–225. *Diagnosing viruses by the rolling circle amplified synthesis of DNazymes.*
- [321] J. Wang, G. Liu, A. Merkoci, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(11), 3214–3215. *Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets.*
- [322] H. A. Ho, K. Doré, M. Boissinot, M. G. Bergeron, R. M. Tanguay, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(36), 12673–12676. *Direct Molecular Detection of Nucleic Acids by Fluorescence Signal Amplification.*
- [323] I. Willner, K. Eugeniev, *Angew. Chem.* **2003**, 115(38), 4724–4737. *Magnetische Kontrolle elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Prozesse.*
- [324] A.-N. Kawde, J. Wang, *Electroanalysis* **2004**, 16(1-2), 101–107. *Amplified Electrical Transduction of DNA Hybridization Based on Polymeric Beads Loaded with Multiple Gold Nanoparticle Tags.*

- [325] J. Wang, R. Polsky, A. Merkoci, K. L. Turner, *Langmuir* **2003**, 19(4), 989–991. *Electroactive Beads for Ultrasensitive DNA Detection.*
- [326] B. Liu, G. C. Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(3), 589–593. *Methods for strand-specific DNA detection with cationic conjugated polymers suitable for incorporation into DNA chips and microarrays.*
- [327] E. S. Baker, J. W. Hong, B. S. Gaylord, G. C. Bazan, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(26), 8484–8492. *PNA/dsDNA Complexes: Site Specific Binding and dsDNA Biosensor Applications.*
- [328] H. Peng, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, *Chem. Commun.* **2006**, (35), 3735–3737. *A novel cationic conjugated polymer for homogeneous fluorescencebased DNA detection.*
- [329] N. Kumar, A. Dorfman, J.-i. Hahm, *Nanotech.* **2006**, 17(12), 2875–2881. *Ultrasensitive DNA sequence detection using nanoscale ZnO sensor arrays.*
- [330] G. S. Rule, R. A. Montagna, R. A. Durst, *Clin. Chem.* **1996**, 42(8), 1206–1209. *Rapid method for visual identification of specific DNA sequences based on DNA-tagged liposomes.*
- [331] J. Liu, D. Mazumdar, Y. Lu, *Angew. Chem.* **2006**, 118(47), 8123–8127. *A Simple and Sensitive „Dipstick“ Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures.*
- [332] I. K. Litos, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, J. Traeger-Synodinos, E. Kavanakis, *Anal. Chem.* **2007**, 79(2), 395–402. *Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by Primer Extension Reaction in a Dry-Reagent Dipstick Format.*
- [333] G. Caetano-Anollés, P. M. Gresshoff, *Promega Notes Magazine* **1994**, 45, 13–. *Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling.*
- [334] T. Rabilloud, *Electrophoresis* **1990**, 11(10), 785–794. *Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: A 10-year synthesis.*
- [335] J. L. Beidler, P. R. Hilliard, F. L. Rill, *Anal. Biochem.* **1982**, 126(2), 374–380. *Ultrasensitive Staining of Nucleic Acids with Silver.*
- [336] C. R. Merrill, M. Harrington, V. Alley, *Electrophoresis* **1984**, 5(5), 289–297. *A photodevelopment silver stain for the rapid visualization of proteins separated on polyacrylamide gels.*
- [337] B. Lomholt, S. Frederiksen, *Anal. Biochem.* **1987**, 164(1), 146–149. *Detection of a Few Picograms of DNA on Polyacrylamide Gels by Silver Staining.*

- [338] L. Qu, X. Li, G. Wu, N. Yang, *Electrophoresis* **2005**, 26(1), 99–101. *Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels.*
- [339] G. M. Kolodny, *Anal. Biochem.* **1984**, 138(1), 66–67. *An Improved Method for Increasing the Resolution and Sensitivity of Silver Staining of Nucleic Acid Bands in Polyacrylamide Gels.*
- [340] S.-y. Hwang, L.-t. Jin, G.-s. Yoo, J.-K. Choi, *Electrophoresis* **2006**, 27(9), 1744–1748. *Silver staining method for DNA in polyacrylamide gels using eriochrome black T as a silver-ion sensitizer.*
- [341] J. G. Guillemette, P. N. Lewis, *Electrophoresis* **1983**, 4(1), 92–94. *Detection of subnanogram quantities of DNA and RNA on native and denaturing polyacrylamide and agarose gels by silver staining.*
- [342] D. Goldman, C. R. Merril, *Electrophoresis* **1982**, 3(1), 24–26. *Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size.*
- [343] Z.-d. Zhou, W.-y. Liu, M.-q. Li, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25(21), 1801–1804. *Chromium (III) enhanced diamine silver staining of proteins and DNA in gels.*
- [344] F. Zalazar, M. R. Baroni, D. Amato, R. Gianni, C. Mayoral, C. Ochoteco, F. Tedeschi, *Anal. Biochem.* **2001**, 291(2), 299–300. *Modified Silver Staining for RNA and DNA in Agarose Gels.*
- [345] T. Tani, *Photographic Sensitivity: Theory and Mechanisms*; Vol. 8 of *Oxford series on optical and imaging science*; Oxford University Press, New York, Oxford, **1995**.
- [346] N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Nucl. Acids Res.* **1981**, 9(12), 2971–2985. *Solution structural studies of the Ag(I)-DNA complex.*
- [347] D. F. Hochstrasser, A. Patchornik, C. R. Merril, *Anal. Biochem.* **1988**, 173(2), 412–423. *Development of Polyacrylamide Gels that Improve the Separation of Proteins and Their Detection by Silver Staining.*
- [348] G. Patras, G. G. Qiao, S. D. H., *Electrophoresis* **1999**, 20(10), 2039–2045. *On the mechanism of background silver staining during sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.*
- [349] H. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis* **1987**, 8(2), 93–99. *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.*
- [350] B. J. Bassam, G. Caetano-Anollés, P. M. Gresshoff, *Anal. Biochem.* **1991**, 196(1), 80–83. *Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels.*

- [351] B. J. Bassam, G. Caetano-Anollés, P. M. Gresshoff, *Anal. Biochem.* **1991**, 198(1), 217. Erratum: *Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels.*
- [352] C. C. Prieto, R. I. Leonardelli, F. Zalazar, *Anal. Biochem.* **1997**, 252(1), 15–18. *A Procedure of Silver Staining for Nucleic Acids in Agarose Gels without Pretreatment or Drying Steps.*
- [353] B. Tollens, *Chem. Ber.* **1883**, 15(2), 1635–1639. *Ueber ammon-alkalische Silberlösung als Reagens auf Aldehyd.*
- [354] J. A. Zoltewicz, D. F. Clark, T. W. Sharpless, G. Grahe, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92(6), 1741–1750. *Kinetics and Mechanism of the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Some Purine Nucleosides.*
- [355] J. L. York, *J. Org. Chem.* **1981**, 46(10), 2171–2173. *Acid-Catalyzed Hydrolysis of Adenine Nucleosides.*
- [356] F. Seela, H. Steker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, Seiten 2573–2576. *Synthesis and Hydrolytic Stability of 4-Substituted Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-2'-Deoxyribofuranosides.*
- [357] C. V. Miduturu, S. K. Silverman, *J. Org. Chem.* **2006**, 71(15), 5774–5777. *Synthesis and Application of a 5'-Aldehyde Phosphoramidite for Covalent Attachment of DNA to Biomolecules.*
- [358] M. Oberhuber, G. F. Joyce, *Angew. Chem.* **2005**, 117(46), 7752–7755. *A DNA-Templated Aldol Reaction as a Model for the Formation of Pentose Sugars in the RNA World.*
- [359] Z. Skrzypczynski, S. Wayland, *Bioconj. Chem.* **2003**, 14(3), 642–652. *New Reagents for the Introduction of Reactive Functional Groups into Chemically Synthesized DNA Probes.*
- [360] M. A. Podyminogin, E. A. Lukhtanov, M. W. Reed, *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29(24), 5090–5098. *Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass.*
- [361] S. K. Hurst, N. T. Lucas, M. P. Cifuentes, M. G. Humphrey, M. Samoc, B. Luther-Davies, I. Asselberghs, R. V. Boxe, A. Persoons, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 633(114-124). *Organometallic complexes for nonlinear optics* Part 23. Quadratic and cubic hyperpolarizabilities of acetylide and vinylidene complexes derived from protected and free formylphenylacetylenes.*
- [362] H. B. Mereyala, S. R. Gurralla, S. K. Mohan, *Tetrahedron* **1999**, 55(37), 11331–11342. *Study of Metal and Acid Catalysed Deprotection of Propargyl Ethers of Alcohols via their Allenyl Ethers.*

- [363] F. Santoyo-González, A. Torres-Pinedo, A. Sánchez-Ortega, *J. Org. Chem.* **2000**, 65(14), 4409–4414. *Regioselective Monoalkylation of Calixarenes. Synthesis of Homodimer Calixarenes.*
- [364] G. Shemer, O. Krichevski, G. Markovich, T. Molotsky, I. Lubitz, A. B. Kotlyar, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(34), 11006–11007. *Chirality of Silver Nanoparticles Synthesized on DNA.*
- [365] J. T. Petty, J. Zheng, N. V. Hud, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(16), 5207–5212. *DNA-Templated Ag Nanocluster Formation.*
- [366] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103(40), 8410–8426. *Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods.*
- [367] T. Jensen, L. Kelly, A. Lazarides, G. C. Schatz, *J. Clust. Sci.* **1999**, 10(2), 295–317. *Electrodynamics of Noble Metal Nanoparticles and Nanoparticle Clusters.*
- [368] L. Kvítek, R. Prucek, A. Panáček, R. Novotný, J. Hrbác, R. Zboril, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15(10), 1099–1105. *The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis.*
- [369] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(5), 1398–1399. *Directed DNA Metallization.*
- [370] N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110(23), 3408–3428. *Nanostrukturen und Topologien von Nucleinsäuren.*
- [371] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, 391(6669), 775–778. *DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire.*
- [372] A. Condon, *Nature Rev. genet.* **2006**, 7(7), 565–575. *Designed DNA molecules: principles and applications of molecular nanotechnology.*
- [373] C. Lin, Y. Liu, S. Rinker, H. Yan, *ChemPhysChem* **2006**, 7(8), 1641–1647. *DNA Tile Based Self-Assembly: Building Complex Nanoarchitectures.*
- [374] M. Taniguchi, T. Kawai, *Physica E* **2006**, 33(1), 1–12. *DNA electronics.*
- [375] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, 301(5641), 1882–1884. *DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires.*
- [376] L. Berti, A. Alessandrini, P. Facci, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(32), 11216–11217. *DNA-Templated Photoinduced Silver Deposition.*
- [377] J. Richter, R. Seidel, R. Kirsch, M. Mertig, W. Pompe, J. Plaschke, H. K. Schackert, *Adv. Mater.* **2000**, 12(7), 507–510. *Nanoscale palladium metallization of DNA.*

- [378] J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, I. Monch, H. K. Schackert, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78(4), 536–538. *Construction of highly conductive nanowires on a DNA template.*
- [379] J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, H. Vinzelberg, *Appl. Phys. A* **2002**, 74(6), 725–728. *Low-temperature resistance of DNA-templated nanowires.*
- [380] Z. Deng, C. Mao, *Nano Lett.* **2003**, 3(11), 1545–1548. *DNA-Templated Fabrication of 1D Parallel and 2D Crossed Metallic Nanowire Arrays.*
- [381] H. Nakao, H. Shiigi, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Nagaoka, S. Sugiyama, T. Ohtani, *Nano Lett.* **2003**, 3(10), 1391–1394. *Highly Ordered Assemblies of Au Nanoparticles Organized on DNA.*
- [382] J. Lund, J. Dong, Z. Deng, M. Chengde, B. A. Parviz, *Nanotech.* **2006**, 17(11), 2752–2757. *Electrical conduction in 7 nm wires constructed on λ -DNA.*
- [383] W. E. Ford, O. Harnack, A. Yasuda, J. M. Wessels, *Adv. Mater.* **2001**, 13(23), 1793–1797. *Platinated DNA as Precursors to Templated Chains of Metal Nanoparticles.*
- [384] R. Seidel, M. Mertig, W. Pompe, *Surf. Interface Anal.* **2002**, 33(2), 151–154. *Scanning force microscopy of DNA metallization.*
- [385] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, *Nano Lett.* **2002**, 2(8), 841–844. *DNA as a Selective Metallization Template.*
- [386] R. Seidel, L. C. Ciacchi, M. Weigel, W. Pompe, M. Mertig, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108(30), 10801–10811. *Synthesis of Platinum Cluster Chains on DNA Templates: Conditions for a Template-Controlled Cluster Growth.*
- [387] K. Keren, R. S. Berman, E. Braun, *Nano Lett.* **2004**, 4(2), 323–326. *Patterned DNA Metallization by Sequence-Specific Localization of a Reducing Agent.*
- [388] A. Kumar, M. Pattarkine, M. Bhadbhade, A. B. Mandale, K. N. Ganesh, S. S. Datar, C. V. Dharmadhikari, M. Sastry, *Adv. Mater.* **2001**, 13(5), 341–344. *Linear Superclusters of Colloidal Gold Particles by Electrostatic Assembly on DNATemplates.*
- [389] M. Sastry, A. Kumar, S. Datar, C. V. Dharmadhikari, K. N. Ganesh, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78(19), 2943–2945. *DNA-mediated electrostatic assembly of gold nanoparticles into linear arrays by a simple drop-coating procedure.*
- [390] F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, 114(13), 2429–2433. *Au-Nanoparticle Nanowires Based on DNA and Polylysine Templates.*

- [391] O. Harnack, W. E. Ford, A. Yasuda, J. M. Wessels, *Nano Lett.* **2002**, 2(9), 919–923. *Tris(hydroxymethyl)phosphine-Capped Gold Particles Templated by DNA as Nanowire Precursors.*
- [392] C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Lett.* **2002**, 3(3), 359–363. *DNA-Templated Construction of Copper Nanowires.*
- [393] H. A. Becerril, R. M. Stoltenberg, C. F. Monson, A. T. Woolley, *J. Mater. Chem.* **2004**, 14(4), 611–616. *Ionic surface masking for low background in single- and double-stranded DNA-templated silver and copper nanorods.*
- [394] Q. Gu, C. Cheng, D. T. Haynie, *Nanotech.* **2005**, 16(8), 1358–1363. *Cobalt metallization of DNA: towards magnetic nanowires.*
- [395] Q. Gu, C. Cheng, S. Suryanarayanan, K. Dai, D. T. Haynie, *Physica E* **2006**, 33(1), 92–98. *DNA-templated fabrication of nickel nanocluster chains.*
- [396] J. L. Coffey, S. R. Bigham, X. Li, R. F. Pinizzotto, Y. G. Rho, R. M. Pirtle, I. L. Pirtle, *Appl. Phys. Lett.* **1996**, 69(25), 3851–3853. *Dictation of the shape of mesoscale semiconductor nanoparticle assemblies by plasmid DNA.*
- [397] T. Torimoto, M. Yamashita, S. Kuwabata, T. Sakata, H. Mori, H. Yoneyama, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103(42), 8799–8803. *Fabrication of CdS nanoparticle chains along DNA double strands.*
- [398] W. U. Dittmer, F. C. Simmel, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, 85(4), 633–635. *Chains of semiconductor nanoparticles templated on DNA.*
- [399] Y. Eichen, E. Braun, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Acta Polym.* **1998**, 49(10-11), 663–670. *Self-assembly of nanoelectronic components and circuits using biological templates.*
- [400] L. Zhu, P. S. Lukeman, J. W. Canary, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(34), 10178–10179. *Nylon/DNA: Single-Stranded DNA with a Covalently Stitched Nylon Lining.*
- [401] Y. Ma, J. Zhang, G. Zhang, H. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(22), 7097–7101. *Polyaniline Nanowires on Si Surfaces Fabricated with DNA Templates.*
- [402] P. Nickels, W. U. Dittmer, S. Beyer, J. P. Kotthaus, F. C. Simmel, *Nanotech.* **2004**, 15(11), 1524–1529. *Polyaniline nanowire synthesis templated by DNA.*
- [403] Q. Gu, C. Cheng, R. Gonela, S. Suryanarayanan, S. Anabathula, K. Dai, D. T. Haynie, *Nanotech.* **2006**, 17(1), R14–R25. *DNA nanowire fabrication.*
- [404] D. S. Hopkins, D. Pekker, P. M. Goldbart, A. Bezryadin, *Science* **2005**, 308(5729), 1762–1765. *Quantum Interference Device Made by DNA Templating of Superconducting Nanowires.*

- [405] E. Braun, K. Keren, *Adv. in Phys.* **2004**, 53(4), 441–496. *From DNA to transistors.*
- [406] J. Richter, *Physica E* **2003**, 16(2), 157–173. *Metallization of DNA.*
- [407] S. R. Quake, A. Scherer, *Science* **2000**, 290(5496), 1536–1540. *From Micro- to Nanofabrication with Soft Materials.*
- [408] Z. Deng, Y. Tian, S.-H. Lee, A. E. Ribbe, C. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, 117(23), 3648–3651. *DNA-Encoded Self-Assembly of Gold Nanoparticles into One-Dimensional Arrays.*
- [409] S. Beyer, P. Nickels, F. C. Simmel, *Nano Lett.* **2005**, 5(4), 719–722. *Periodic DNA Nanotemplates Synthesized by Rolling Circle Amplification.*
- [410] C. M. Niemeyer, W. Bürger, J. Peplies, *Angew. Chem.* **1998**, 110(16), 2391–2395. *Kovalente DNA-Streptavidin-Konjugate als Bausteine für neuartige biometallische Nanostrukturen.*
- [411] W. Zhao, Y. Gao, S. A. Kandadai, M. A. Brook, Y. Li, *Angew. Chem.* **2006**, 118(15), 2469–2473. *DNA Polymerization on Gold Nanoparticles through Rolling Circle Amplification: Towards Novel Scaffolds for Three-Dimensional Periodic Nanoassemblies.*
- [412] D. H. Lee, S. J. Kim, S. Y. Heo, D.-J. Jang, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 87(23), 233103–1–3. *Nanoconjunction of DNA-retained gold nanoparticles using silver.*
- [413] M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell, *Small* **2007**, 3(6), 1049–1055. *Formation of Bimetallic Ag/Au-Nanowires by Metallization of Artificial DNA-Duplexes.*
- [414] B. H. Pfeiffer, S. B. Zimmerman, *Nucl. Acids Res.* **1983**, 11(22), 7853–7871. *Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions.*
- [415] K. Hayashi, M. Nakazawa, Y. Ishizaki, N. Hiraoka, A. Obayashi, *Nucl. Acids Res.* **1986**, 14(19), 7617–7631. *Regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol.*
- [416] M. Ailenberg, N. M. Goldenberg, M. Silverman, *BMC Biotech.* **2005**, 5, 23. *Description of a PCR-based technique for DNA splicing and mutagenesis by producing 5' overhangs with run through stop DNA synthesis utilizing ara-C.*
- [417] A. Rashtchian, *Curr. Op. Biotechnol.* **1995**, 6(1), 30–36. *Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction.*
- [418] J. Gál, R. Schnell, S. Szekeres, M. Kálmán, *Mol. Gen. Genet.* **1999**, 260(6), 569–573. *Directional cloning of native PCR products with performed sticky ends (Autosticky PCR*).*

- [419] G. Zeng, *Biotechniques* **1998**, 25(2), 206–208. *Sticky-end PCR: new method for subcloning.*
- [420] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, 106(9), 3775–3789. *Detecting RNA and DNA with Templated Chemical Reactions.*
- [421] H. G. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*; Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [422] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62(21), 7512–7515. *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities.*
- [423] J. D. Kahl, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121(4), 597–604. *Introducing Structural Diversity in Oligonucleotides via Photolabile, Convertible C5-Substituted Nucleotides.*

Danksagung

Allen voran danke ich Prof. Thomas Carell für die „guten und besseren“ Ideen und die Unterstützung während der Arbeit. Der Universität Marburg, dem Fonds der chemischen Industrie und der LMU München danke ich für die finanzielle Unterstützung. *Glenn Burley* danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, Hilfe bei Synthese der Monomere, DNA und allen anderen Fragen und Problemen und dem Zugang zur britischen Musikwelt.

Desweiteren haben noch viele andere Personen zu der Arbeit und dem Umfeld ihrer Entstehung beigetragen. Dank gebührt:

- allen „Alten“ aus Marburg.
- *Ulrich Hennecke* für gute Laboratmosphäre, bzw. -musik, Tips und Tricks.
- *Sascha Breeger* für Hilfe bei allen Fragen.
- *Carsten Pieck* für die Idee mit den Zellen und Hilfe bei allen biochemischen Problemen.
- *Matthias Ober* für Hilfe und das L^AT_EX-Templat.
- allen für die ich „rechnen“ durfte.
- *Dave Hammond* für Unterstützung bei den Aldehyd-Monomeren und viel neue Musik.
- meinem ehemaligen Betreuer *Dr. Christoph Behrens* für Einführung in die Chemie der Pyranosylflavine.
- *Frederike Grolle* und *Marcus Friedel* für die schöne Zeit im Labor in München.
- *Philipp Gramlich* für die Betreuung der letzten DesazaG-Stufe und die Synthese des Alkin-dCTP.
- *Simon Künzel* und Bachelor *Ana Varja* für die DesazaG-Synthese.
- dem Bachelor *Markus Horn* für die Synthese des DesazaAs, das es leider nicht in die Arbeit geschafft hat.
- *Katrin Gutschmiedl* für die Durchführung der letzten Experimente.
- den NMR- und Massenabteilungen der Universitäten Marburg und München.
- den AK-Mitarbeitern in Marburg für die Unterstützung und Hilfe.
- meinen Eltern, meiner Schwester, der Familie und Kerstin für ihre Unterstützung während der Arbeit.

Lebenslauf

Name	Johannes Gierlich
Geburtsdatum, -ort	11.10.1977, in Ludwigshafen/Rhein
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulische Ausbildung

1985-88	Grundschule in Freinsheim.
1989-1997	Leininger Gymnasium in Grünstadt.
1997-1998	Zivildienst in der Kläranlage der Verbandsgemeinde Freinsheim (Labor).

Studium

1998-2003	Chemiestudium an der Philipps-Universität Marburg.
2000	Vordiplom (Note 1.2).
9/2001-3/2002	Auslandsemester an der Universität von Auckland /Neuseeland in der Gruppe von <i>Prof. Schwerdtfeger</i> (Theoretische Chemie, Paritätsverletzung).
2003	Diplom (Note 1.0), Diplomarbeit in der Gruppe von <i>Prof. Carell</i> : „ <i>Synthese eines Flavin-Xylopyranosids und Versuche zu dessen Oligomerisierung zu Homo-Flavin-Pyranosylnukleosiden</i> “ .
8/2003	Beginn der Promotion bei <i>Prof. Carell</i> zum Thema der Synthese von DNA-basierenden Materialien.
2004	Umzug der Arbeitsgruppe an die Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Stipendien

1/2004-12/2005	Stipendiat des Fonds der chemischen Industrie.
2006	Römer-Stipendium der Dr. Klaus Römer-Stiftung (LMU München).

