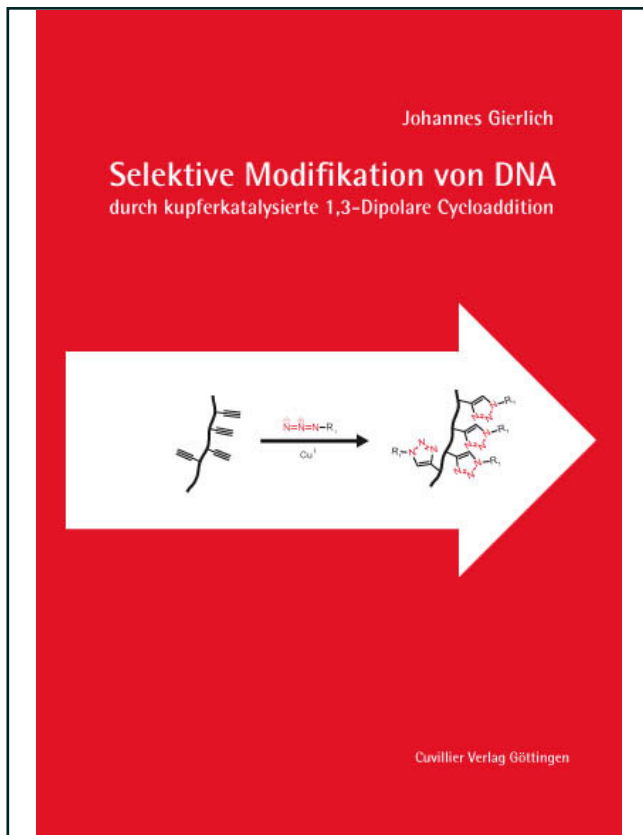




Johannes Gierlich (Autor)

## Selektive Modi\_kation von DNA durch kupferkatalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1742>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>xi</b>
<b>Summary</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Festphasensynthese . . . . .	3
1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR) . . . . .	5
1.3. Postsynthetische Modifikation . . . . .	6
<b>2. Aufgabenstellung</b>	<b>8</b>
<b>3. Modifikationen an DNA</b>	<b>10</b>
<b>4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)</b>	<b>13</b>
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 ( <b>26</b> ) . . . . .	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> ( $\mu$ CP) mit Alkin-DNA . . . . .	53
4.10.	Ausblick . . . . .	55
<b>5.</b>	<b>Polymerase Kettenreaktion mit modifizierten Triphosphaten</b>	<b>57</b>
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
<b>6.</b>	<b>Detektion von DNA</b>	<b>84</b>
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

<b>7. DNA als Templat zur Abscheidung von Metallen</b>	<b>110</b>
7.1. Einleitung . . . . .	110
7.2. Metallisierung von DNA . . . . .	113
7.3. Herstellung von partiell modifizierter DNA . . . . .	116
7.4. Ausblick . . . . .	117
<b>8. Experimenteller Teil</b>	<b>118</b>
8.1. Material und Methoden . . . . .	118
8.2. Synthese der Alkinmonomere . . . . .	122
8.2.1. Synthese von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin ( <b>6</b> ) . . . . .	122
8.2.2. Synthese von 5-(Hexa-1,5-diinyl)-2'-desoxyuridin ( <b>10</b> ) . . . . .	126
8.2.3. Synthese von 5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxyuridin ( <b>12</b> ) . . . . .	130
8.2.4. Synthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diinyl)-2'-desoxy- guanosin ( <b>26</b> ) . . . . .	134
8.2.5. Synthese von 5-((2-Cyanoethoxy)-diisopropylamino- phosphonoxy)-pent-1-in ( <b>51</b> ) . . . . .	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 ( <b>55</b> ) . . . . .	143
8.4.2. Synthese von 5-(3-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- $\alpha$ -D- galactopyranosyl)-prop-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'-des- oxyuridin ( <b>66</b> ) und 5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-pent-1-ynyl)-5'-O-triphosphat-2'- desoxyuridin ( <b>71</b> ) . . . . .	148
8.5. Sonstige Substanzen . . . . .	156
8.5.1. 1- $\alpha$ / $\beta$ -Chlor-2-desoxy-3,5-p-toluoyl-D-ribofuranose ( <b>29</b> ) . . . . .	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
<b>A. Anhang</b>	<b>179</b>
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>B. Nummerierung der Verbindungen</b>	<b>189</b>
B.1. Kleine Moleküle . . . . .	189
B.2. Oligonukleotide . . . . .	192
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>193</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>196</b>
<b>Danksagung</b>	<b>231</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>233</b>