

**Lichtinduzierbare AntimiR-Sonden zur Regulation von
miRNA in Neuronen
&
Reversible lichtgesteuerte Regulation von Nukleinsäuren
mit Azobenzol C-Nukleosiden
&
Chemo-enzymatische Synthese lichtaktivierbarer
Nukleinsäuren**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Thomas Goldau
aus Hessisch Lichtenau

Frankfurt am Main, 2018
(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Erster Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

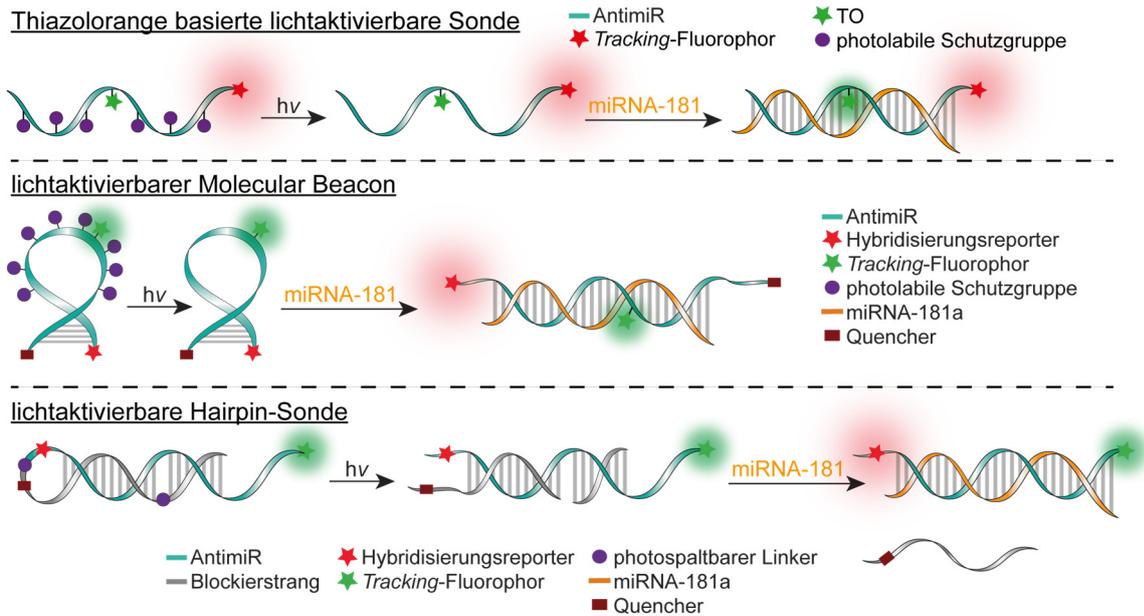
Datum der Disputation: 05.07.2018

meiner Familie

Zusammenfassung

Nukleinsäuren besitzen neben der Speicherung und Übertragung der genetischen Information weitere vielfältige Funktionen in einem komplexen und dynamischen Netzwerk von gleichzeitig ablaufenden Prozessen in der Zelle. Die gezielte Kontrolle bestimmter Nukleinsäuren kann helfen, die jeweiligen Prozesse zu studieren oder auch zu manipulieren. Photoaktive Verbindungen, wie photolabile Schutzgruppen oder Photoschalter, sind ideal dazu geeignet die Struktur und Funktion von Nukleinsäuren zu studieren. Photolabile Schutzgruppen werden dazu meistens auf die Nukleobase installiert und stören die Watson-Crick Basenpaarung. Dies verhindert die Ausbildung einer Sekundärstruktur oder die Möglichkeit einen stabilen Doppelstrang zu bilden. Licht ist ein nicht-invasives Triggersignal und kann mit hoher Orts- und Zeitauflösung angewendet werden, um selektiv die temporär geschützten Nukleinsäuren in der Zelle zu aktivieren.

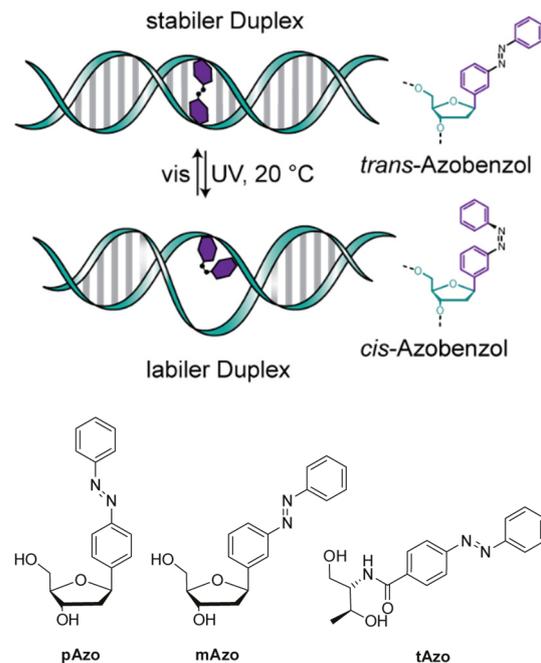
Das erste Projekt dieser Arbeit ist eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Erin Schuman (MPI für Hirnforschung) und beschäftigt sich mit der lichtgesteuerten Regulation der miR-181a Aktivität in hippocampalen Neuronen von Ratten. Die Langzeitpotenzierung (LTP) ist der primäre Mechanismus von synaptischer Plastizität und somit essentiell für Lernen und Gedächtnis. Die langfristige Aufrechterhaltung von LTP erfordert eine gesteigerte (lokale) Proteinbiosynthese, ein Prozess, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Die miR-181a reguliert die Genexpression von zwei für synaptische Plastizität wichtigen Proteinen, GluA2 und CaMKII α . Mit einem lichtaktivierbaren AntimiR sollte der Einfluss der miR-181a auf die lokale Proteinsynthese von CaMKII α und GluA2 untersucht werden. Photolabile Schutzgruppen sollen eine orts aufgelöste Aktivierung des AntimiRs in den Dendriten ermöglichen. Ein *Tracking*-Fluorophor sollte die Lokalisierung des AntimiRs und eine gezielte Lichtaktivierung ermöglichen. Die Bindung der miRNA sollte fluoreszent visualisiert werden können, um eine Korrelation zwischen der inhibierten Menge an miR-181a und den neu synthetisierten CaMKII α -Molekülen zu untersuchen. In diesem Projekt wurden drei Konzepte zur Synthese von lichtregulierbaren AntimiR-Sonden verglichen: Das erste Konzept verwendete eine Thiazolorange-basierte Hybridisierungssonde nach Seitz *et al.* Allerdings war mit diesem Konzept der Fluoreszenzanstieg zur Visualisierung der Hybridisierung zu gering. Im zweiten Konzept wurde ein dual-Fluorophor markierter Molecular Beacon entwickelt, bei dem die photolabilen Schutzgruppen in der Schleifen-Region die Hybridisierung der miR-181a vor Belichtung verhinderten. Nach Optimierung der Stammlänge, Anzahl und Position der photolabilen Schutzgruppen, sowie Auswahl des idealen Fluorophor-Quencher Paares, konnte nach UV-Bestrahlung in Anwesenheit der miR-181a ein signifikanter Anstieg des Hybridisierungsreporter-Fluorophors gemessen werden.



Das dritte Konzept untersuchte lichtaktivierbare Hairpin-Sonden, bei denen ein Gegenstrang (Blockierstrang) über einen photosplittbaren Linker mit dem AntimiR verknüpft wurde. Dabei musste die optimale Länge des Blockierstrangs und die Anzahl der photosplittbaren Linker im Blockierstrang ermittelt werden, sodass die miR-181a erst nach Photoaktivierung das AntimiR binden und den Quencher-markierten Strang verdrängen konnte. Die *in vitro* Experimente vom Arbeitskreis Schuman waren zu dem Zeitpunkt des Einreichens dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Erste Ergebnisse zeigten, dass der mRNA und Protein-Level von CaMKII α eines gesamten hippocampalen Neurons durch ein nicht-lichtaktivierbare AntimiR um den Faktor $\sim 1,5$ gesteigert werden konnte. Zudem konnte durch die lokale Bestrahlung einer lichtaktivierbaren Hairpin-Sonde die lokale Genexpression von CaMKII α in einem Dendriten deutlich gesteigert werden.

Das zweite Projekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der reversiblen Lichtregulation von DNA und RNA durch Azobenzol Photoschalter. Azobenzole eignen sich ideal für die Regulation der Duplexstabilität, denn das planare *trans*-Azobenzol kann zwischen die Basen interkalieren und somit einen Doppelstrang stabilisieren. UV-Licht überführt das *trans*-Isomer in das *cis*-Isomer. Dies ist gewinkelt, benötigt mehr Platz und stört dadurch die Stabilität eines Nukleinsäuredoppelstrangs. Entscheidend für die Effizienz der Regulation der Duplexstabilität ist der Linker, der das Azobenzol mit der Nukleinsäure verknüpft. Während vorangegangene Studien von Asanuma *et al.* unnatürliche Linker (D-Threoninol, **tAzo**) verwendeten, wurde in dieser Studie das Azobenzol mit der C1'-Position von (Desoxy-)Ribose

verknüpft, um Azobenzol C-Nukleoside (**pAzo** und **mAzo**) zu erhalten. Der Riboselinker sollte die helikale Natur der Nucleinsäure optimal nachahmen und möglichst wenig Störung des Ribose-Phosphat-Rückgrats bewirken. Thermische Stabilitätsstudien zeigten, dass UV-Licht induzierte *trans*-zu-*cis* Isomerisierung den Schmelzpunkt eines RNA- und DNA-Duplexes um 5,9 und 4,6 °C erniedrigte. Dabei führte der Austausch eines Nucleotids gegen **pAzo** oder **mAzo** zu einer effektiveren Regulation der Duplexstabilität als der zusätzliche Einbau eines Azobenzol C-Nucleosids in die Sequenz. Ein Vergleich mit dem in

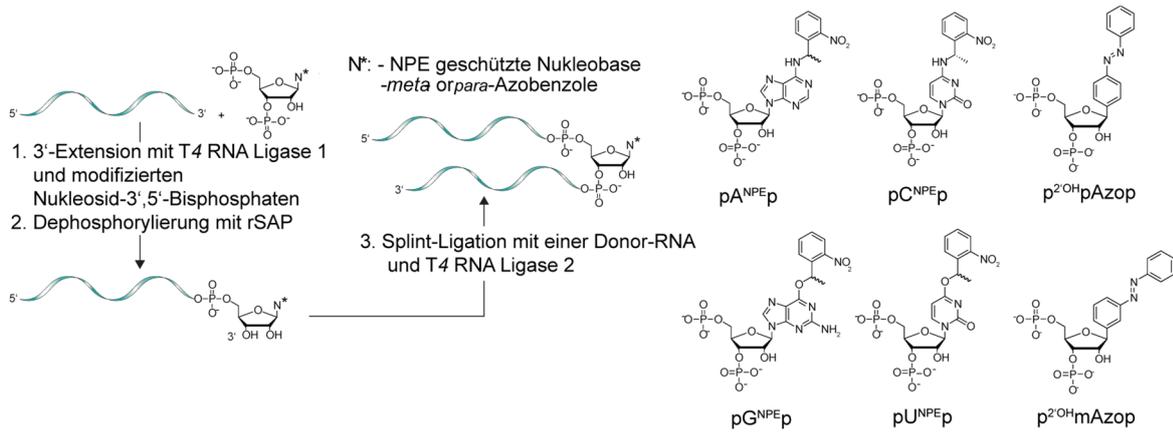


der Literatur etablierten System, **tAzo**, zeigte, dass **pAzo** und **mAzo** teilweise einen stärkeren Duplexdestabilisierungseffekt nach UV-Bestrahlung bewirkten. Besonders effektiv zeigte sich die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung im Doppelstrang bei Raumtemperatur. Bereits bei Raumtemperatur konnten **pAzo** und **mAzo** durch UV-Bestrahlung zu über 90% in die *cis*-Form überführt werden. **tAzo** isomerisierte bei Raumtemperatur nur zu 45 bis 55% und Temperaturen über 60 °C waren notwendig für eine ~90%ige Überführung in das *cis*-Isomer. QM/MM Simulationen vom Arbeitskreis Burghardt erlaubten einen mikroskopischen Blick in die molekulare Struktur von **pAzo** in RNA. Zusammen mit der hohen thermischen Stabilität des *cis*-Isomers über einen breiten Temperaturbereich, der Ermüdungsresistenz bei repetitiver Isomerisierung machen die besonderen Isomerisierungseigenschaften **pAzo** und **mAzo** zu idealen Kandidaten für die Regulation in biologischen Prozessen, bei denen auf erhöhte Temperatur verzichtet werden muss.

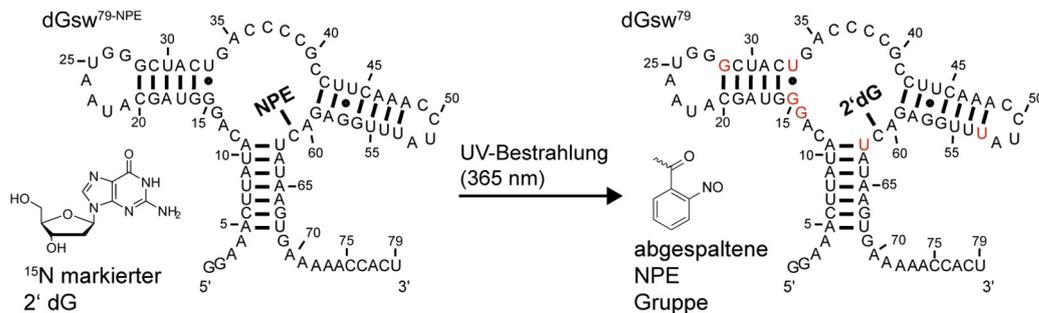
Eine notwendige Bedingung für die Einführung von photolabilen Schutzgruppen oder Photoschaltern in RNA war die Verwendung von chemischer Festphasensynthese. Die Festphasensynthese hat den Vorteil, dass eine Vielzahl von Modifikationen verwendet werden können. Allerdings ist die Länge der herstellbaren Ribonucleinsäuren stark limitiert (< 80 nt). Die enzymatische Synthese unterliegt keiner Längenbeschränkung, ist jedoch begrenzt in der positionsspezifischen Einführung von Modifikationen. Das dritte Projekt dieser Arbeit etablierte in Zusammenarbeit mit Sara Keyhani vom Arbeitskreis Schwalbe die erste chemo-enzymatische Methode, die es ermöglicht RNA an einer beliebigen Position in der Sequenz mit photolabil geschützten Nucleotiden oder photoschaltbaren Nucleotiden

IV

zu modifizieren – ohne die Verwendung von chemischer Festphasensynthese. Dazu wurden NPE-geschützte und Azobenzol-modifizierte Nucleosid-3',5'-Bisphosphate synthetisiert und sich zu Nutzen gemacht, dass die T4 RNA Ligase 1 modifizierte Nucleosid-3',5'-Bisphosphate an das 3'-Ende von RNA ligiert. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass das 3'-Phosphat den Einbau auf ein einzelnes Nucleotid beschränkt. Es wurde gezeigt, dass alle vier NPE-geschützten Nucleosid- (A, C, G, U) sowie zwei Azobenzol C-Nucleosid-3',5'-Bisphosphate in guten bis exzellenten Ausbeuten an das 3'-Ende ligiert werden konnten.



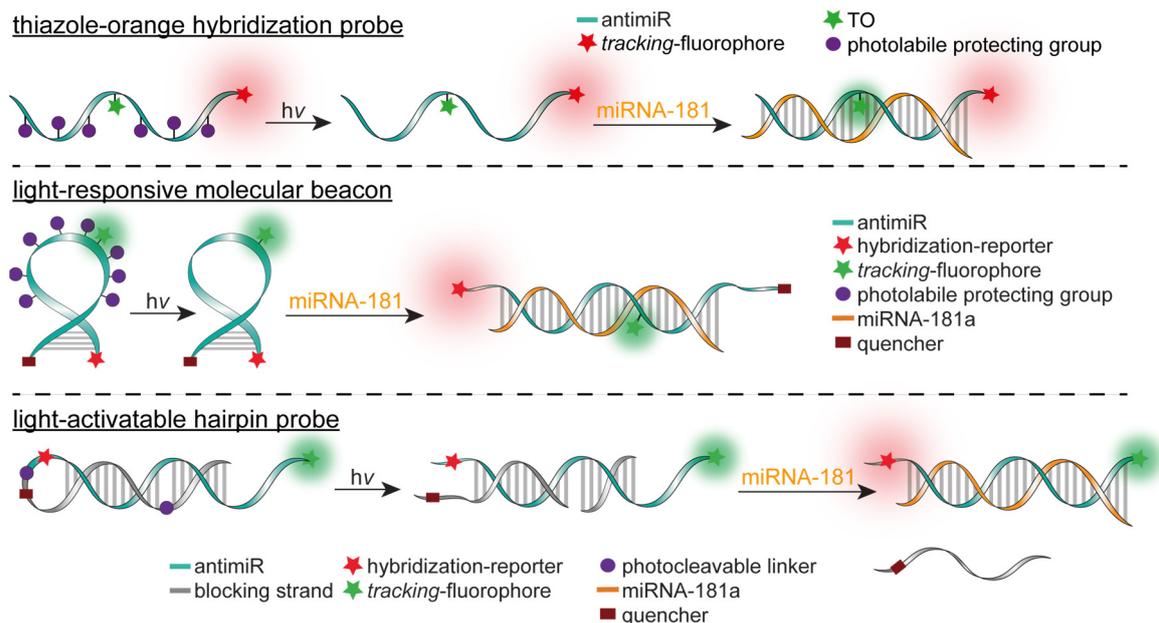
Nach der quantitativen Dephosphorylierung der RNA Stränge mittels *rSAP* wurde eine *Splint*-Ligation mit einer Donor-RNA und T4 RNA Ligase 2 durchgeführt, um so eine interne Modifikation zu erhalten. Alle photoaktivierbaren Modifikationen waren kompatibel zu jeder enzymatischen Reaktion. Diese chemo-enzymatische Methode wurde verwendet um die lichtinduzierte Ligandenbindung der Aptamerdomäne des 2'-Desoxyguanosin (2'dG) bindenden Riboschalters aus *Mesoplasma florum* NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Es zeigte sich, dass eine photolabile Schutzgruppe ausreichte, um die Ligandenbindung zu inhibieren. Nach Photoaktivierung konnte eine strukturelle Umfaltung und Ligandenbindung des 2'dG Riboschalters nachgewiesen werden. Diese Methode erlaubt den schnellen und kostengünstigen Zugang von lichtaktivierbarer RNA ohne Längenbegrenzung. Zudem benötigt diese Methode keine speziellen Geräte, wie einen Festphasen-Synthesizer, und kann in jedem Labor durchgeführt werden.



Abstract

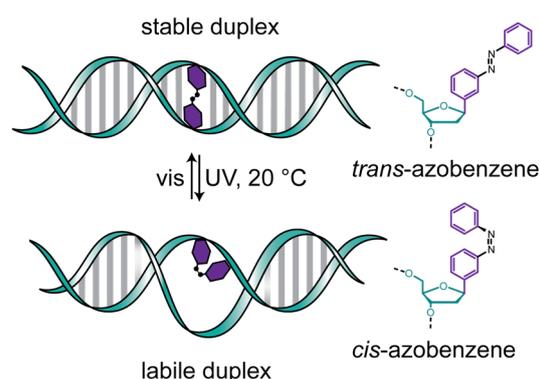
Apart from encoding and translation the genetic information, nucleic acids possess many versatile functions in the complex and dynamic network of simultaneous processes within the cell. Targeted control of certain nucleic acids would enable the study or even manipulation of such processes. Photoactive compounds, such as photolabile protecting groups and photoswitches, are highly suited for studies regarding the structure and function of nucleic acids. Photolabile protecting groups can be attached at a nucleobase to perturbate the Watson-Crick basepairing. This prevents the formation of a secondary structure or a duplex. Light as a non-invasive trigger signal can be applied in high spatial and temporal resolution to selectively activate the temporarily protected nucleic acids in the cell.

The first project of this thesis is a collaboration with the group of Prof. Erin Schuman (MPI for brain research) which focuses on the light-regulation of miR-181a activity in rat hippocampal neurons. The long-term-potentialiation (LTP), the primary mechanism of synaptic plasticity, is essential for learning and memory. The long-term maintenance of LTP requires (locally) a local increase in protein synthesis by a mechanism which has not been fully elucidated yet. The miR-181a regulates gene expression of two proteins important for synaptic plasticity, GluA2 and CaMKII α . The impact of miR-181 on the local protein synthesis of CaMKII and GluA2 was investigated using a light-activatable anti-miR. A fluorescent reporter should visualize the miR-181a sequestration to correlate the amount of knocked-down miR-181a with the newly synthesized CaMKII α molecules. Another *tracking*-fluorophore allowed for the localization of the anti-miR and enabled targeted light activation. In

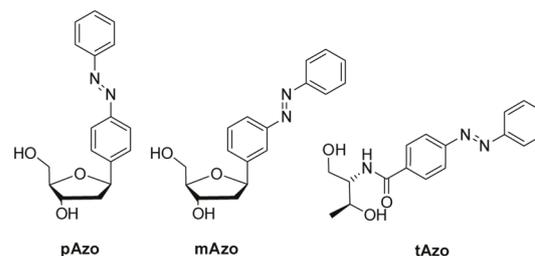


this project, three concepts for the synthesis of light-regulated anti-miR probes were compared: The first concept utilized a thiazole-orange based hybridization probe according to Seitz *et al.* However, the fluorescence increase was too low to visualize the hybridization. The second concept used a dual fluorophore labeled molecular beacon containing photolabile protecting groups in the loop region which prevented the hybridization of miR-181a before irradiation. After optimizing the stem length, number and position of the photolabile protecting groups, and the selection of the ideal fluorophore quencher pair, the UV irradiation in the presence of miR-181a resulted in a significant increase in fluorescence of the hybridization reporter. The third concept investigated the photoactivatable hairpin probes in which a complementary strand (blocking strand) was attached to the anti-miR via a photocleavable linker. The length of the blocking strand and the number of photocleavable linkers in the blocking strand were optimized to guarantee that only after the photoactivation the miR-181a can displace the quencher-labeled strand by binding to the anti-miR. The neuronal studies of the Schuman group were still ongoing at the time this thesis has been submitted. Initial results showed that the total mRNA and protein level of a hippocampal neuron of CaMKII α could be increased by a factor of ~ 1.5 by a non-photoactivatable anti-miR. In addition, spatial irradiation of a light-activated hairpin probe significantly increased the gene expression of CaMKII α in a small area of a dendrite.

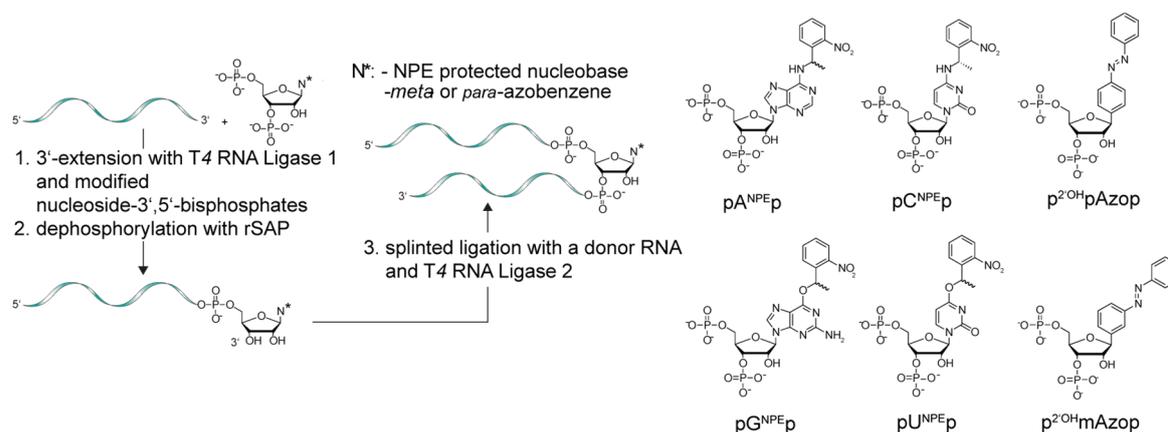
The second project focused on the reversible light-regulation of DNA and RNA utilizing azobenzene photoswitches. Azobenzene photoswitches are ideally suited for the regulation of duplex stability, since the planar *trans*-azobenzene intercalates between the nucleobases and stabilizes a duplex. UV-light switches the *trans*-isomer to the *cis*-isomer. This is helical and hence bulkier and thereby perturbs the duplex stability. The linker which connects the azobenzene with the nucleic acid is crucial for the efficiency of the regulation of the duplex stability. While the previous studies by Asanuma *et al.* used unnatural linkers (D-threosinol, **tAzo**), in this study, the azobenzene was linked to the C1'-position of a (deoxy)ribose to obtain the azobenzene C-nucleosides (**pAzo** and **mAzo**). The ribose-linkage should optimally mimic the helical nature of the nucleic acid and cause minimal perturbation of the ribose-phosphate backbone. Thermal stability studies showed that the UV-light-induced *trans*-to-*cis* isomerization decreased the melting point of an RNA and DNA duplex by 5.9 and 4.6 °C, respectively. A substitution of a nucleotide by **pAzo** or **mAzo** resulted in more



pronounced destabilization than the additional incorporation of an azobenzene C-nucleoside into the sequence. A comparison with a well-studied system, **tAzo**, showed that **pAzo** and **mAzo** partially exhibit stronger duplex destabilizing effect after UV irradiation. The *trans*-to-*cis* isomerization in a duplex at room temperature turned out to be outstandingly efficient. While **tAzo** could only be isomerized to 45 and 55% to the *cis*-state at room temperature, and temperatures above 60 °C were required for ~ 90% conversion to the *cis*-isomer, **pAzo** and **mAzo** achieved a *cis*-ratio of over 90% by UV irradiation at room temperature. QM/MM calculations in collaboration with the Burghardt group offered some microscopic insights into the structure of **pAzo** in RNA. Together with the high thermal stability of the *cis*-isomer over a broad temperature range and the fatigue resistance of the repetitive isomerization, the isomerization properties make **pAzo** and **mAzo** ideal candidates for the regulation of biological processes where an elevated temperature is not applicable.

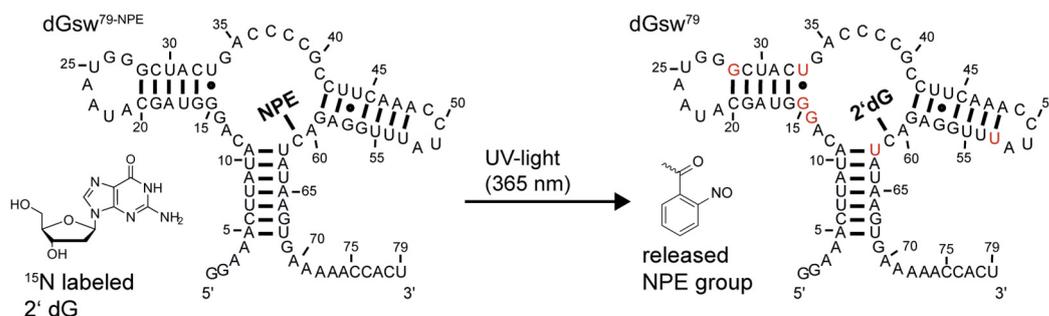


An unavoidable condition for the introduction of photolabile protecting groups or photoswitches into RNA was the application of chemical solid-phase synthesis. The solid-phase synthesis has the advantage of compatibility with a variety of modifications. However, the lengths of the synthesized ribonucleic acids were strongly restricted (<80 nt). The enzymatic synthesis is not limited by the length, but is constrained by the position-specific installation of modified nucleotides. The third project of this thesis established the first chemo-enzymatic method that allows for the modification of RNA at any position with photolabile protecting groups or photoswitches - without the use of solid-phase synthesis. For this purpose, NPE-protected and azobenzene-modified nucleoside-3',5'-bisphosphates were synthesized and incorporated at the 3'-end of an RNA using T4 RNA ligase 1, an enzyme which is known to accept modified nucleoside-3',5'-bisphosphates. An advantage of this



VIII

method is that the 3'-phosphate restricts the incorporation to a single nucleotide. It was shown that all four NPE-protected nucleoside- (A, C, G, U) and two azobenzene C-nucleoside-3',5'-bisphosphates could be ligated to the 3'-end in good to excellent yields. After quantitative dephosphorylation of the RNA strands by rSAP, splinted ligation was performed with a donor RNA and *T4* RNA ligase 2 to obtain an internal photoresponsive nucleotide. All used photoactivatable modifications were compatible with all enzymatic steps. This chemo-enzymatic method was used to study the light-induced ligand binding of the aptamer domain of the 2'dG-sensing riboswitch from *Mesoplasma florum* by NMR spectroscopy. It was shown that just one photolabile protecting group was sufficient to prevent ligand binding. After photoactivation, structural refolding and ligand binding of the 2'dG riboswitch have been detected. This method allows for rapid and cost-saving access to light-activatable RNA in any length. In addition, this method does not require any special equipment, such as a solid-phase synthesizer, and can be performed in any laboratory.



Teile dieser Doktorarbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

- [1] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, S. Steinwand, P. Mondal, M. Biswas, I. Burghardt, J. Wachtveitl, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2014**, 21, 2845-2854.
- [2] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2015**, 21, 17870-17876.
- [3] P. Mondal, M. Biswas, T. Goldau, A. Heckel, I. Burghardt, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 11275-11286.
- [4] N. Grebenovsky, T. Goldau, M. Bolte, A. Heckel, *Chem. – Eur. J.* **2018**, 24, 3425-3428.

Posterpräsentationen:

CEF/CliC Conference “*Design and Light Control*”, 30.8.-1.9.2017, Niedernberg.

VII. *Nucleinsäurechemie-Treffen* der DNG, 17.-18.9.2015, Berlin.

II. *DNG-Doktorandenseminar*, 29.-30.9.2014, Bad Herrenalb.

„*Selective regulation in nanoscaled systems*“, 08.-11.12.2013, Banz.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Synaptische Plastizität und Langzeitpotenzierung	1
1.1.1	CaMKII	3
1.1.2	Lokale Protein Synthese in LTP	5
1.1.3	microRNA in Synapsen	6
1.1.3.1	microRNA Biogenese und Genstilllegung	6
1.1.3.2	Rolle von microRNA in synaptischer Plastizität.....	7
1.1.4	Regulation von microRNA Aktivität durch AntimiRs.....	8
1.2	Detektion von Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Sonden	10
1.3	Lichtregulation mit photolabilen Schutzgruppen	14
1.3.1	Nitrobenzylartige Schutzgruppen	15
1.3.2	Photolabile Schutzgruppen zur Regulation von Nukleinsäuren	16
1.3.2.1	Regulation von miRNA mit lichtinduzierbaren AntimiRs.....	20
1.3.2.2	Lichtaktivierbare Sonden	23
1.4	Reversible Lichtregulation von Nukleinsäuren mit Photoschaltern	27
1.4.1	Photoschalter und Photochromie	27
1.4.2	Photoschaltbare Nukleotide	28
1.4.3	Azobenzol Photoschalter	30
1.4.4	Azobenzole zur Regulation von Nukleinsäuren	31
1.4.4.1	Azobenzole mit der Nukleobase verknüpft.....	33
1.4.4.2	Azobenzole als Nukleosidanaloga.....	34
1.5	Chemische Synthese von Nukleinsäuren	39
1.6	Biologische Synthese von modifizierten Nukleinsäuren	42
1.6.1	Enzymatischer Einbau von modifizierten Nukleotiden in DNA	42
1.6.2	Enzymatischer Einbau von modifizierten Nukleotiden in RNA	45
2	<i>Lichtinduzierbare AntimiR-Sonden zur Regulation von miRNA in Neuronen</i>	48
2.1	Motivation und Zielsetzung	48
2.2	Ergebnisse und Diskussion	51
2.2.1	Regulation der lokalen Proteinsynthese von CaMKII und GluA2 durch eine lichtaktivierbare AntimiR-Sonde	51
2.2.2	Thiazolorange als hybridisierungssensitiver Fluorophor.....	53
2.2.3	Dual-markierter, lichtaktivierbarer Molecular Beacon als AntimiR-Sonde	62

2.2.3.1	Synthese der NPE-geschützten 2'OMe Nukleosidphosphoramidite	68
2.2.3.1.1	Synthese des NPE-geschützten 2'OMe Adenosinphosphoramidits	68
2.2.3.1.2	Synthese des NPE-geschützten 2'OMe Cytidinphosphoramidits	70
2.2.3.1.3	Synthese des NPE-geschützten 2'OMe-Uridinphosphoramidits	71
2.2.3.2	Bestimmung von Anzahl und Position der photolabilen Schutzgruppen des dual- markierten, lichtaktivierbaren Molecular Beacons	72
2.2.3.3	Optimierung des Fluoreszenzanstieges des Molecular Beacons	76
2.2.4	Lichtaktivierbare Hairpin-Sonden	79
2.2.4.1	Zyklisierung der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden	85
2.2.4.2	Optimierung der Stammlänge der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden	91
2.2.4.3	Zusammenfassung der Optimierungen der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden	97
2.2.5	Vergleich der LHS mit den dual-Fluorophor markierten Molecular Beacons.....	99
2.2.6	Regulation von miR-181a durch lichtaktivierbare AntimiR-Sonden in hippocampalen Neuronen.....	100
2.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	106
3	<i>Reversible Lichtregulation von Nukleinsäuren mit Azobenzol C- Nukleosiden</i>	108
3.1	Motivation und Zielsetzung.....	108
3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	110
3.2.1	Synthese von Azobenzol C-Nukleosiden	110
3.2.2	Untersuchungen von pAzo und mAzo in RNA.....	111
3.2.2.1	Synthese der Azobenzol C-Nukleosid modifizierten RNA Stränge	112
3.2.2.2	Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der Azobenzol-modifizierten RNA Einzelstränge	113
3.2.2.3	Thermische Stabilität der cis Photoisomere der Azobenzol C-Nukleoside in RNA.	115
3.2.2.1	Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der Azobenzol-modifizierten RNA im Duplex	118
3.2.3	Untersuchung von pAzo und mAzo in DNA	131
3.2.3.1	Festphasensynthese und Aufreinigung von pAzo und mAzo in DNA	131
3.2.3.2	Untersuchung von pAzo und mAzo im DNA Einzelstrang.....	132
3.2.3.3	Untersuchungen von pAzo und mAzo im DNA Doppelstrang	135
3.2.4	Neue Generation von Azobenzol C-Nukleosiden	143
3.2.4.1	Syntheseübersicht von 2'OH-pAzo und 2'OH-mAzo und deren Derivatisierung	144
3.2.4.2	Synthese von 2'OH-pAzo und 2'OH-mAzo	145
3.2.4.3	Synthese von 2'OMe-pAzo und 2'OMe-mAzo und die Verwendung von 2'OMe-mAzo zur Lichtregulation von DNA Nanoarchitektur	148
3.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	152

4	Chemoenzymatische Synthese von lichtaktivierbaren Nukleinsäuren	154
4.1	Motivation und Zielsetzung.....	154
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	156
4.2.1	Synthese der photolabil-geschützten Nukleosid-3',5'-bisphosphate	156
4.2.1.1	Synthese des NPE-geschützten Adenosin-3',5'-bisphosphates (pA ^{NPEP})	156
4.2.1.2	Synthese des NPE-geschützten Cytidin-3',5'-bisphosphates (pC ^{NPEp})	159
4.2.1.3	Synthese des NPE-geschützten Guanosin-3',5'-bisphosphates (pG ^{NPEp}).....	161
4.2.1.4	Synthese des NPE-geschützten Uridin-3',5'-bisphosphates (pU ^{NPEp}).....	165
4.2.2	Einbau der NPE-geschützten Nukleosid-3',5'-Bisphosphate in RNA	167
4.2.3	Splint-Ligation der 12mer-pN ^{NPE} RNA mit der 48mer RNA.....	171
4.2.3.1	Synthese der 48mer Donor RNA.....	171
4.2.3.2	Mechanismus, Durchführung und Analytik der Splint-Ligation.....	172
4.2.3.3	Synthese einer lichtaktivierbaren Aptamerdomäne des 2'dG Riboschalters	175
4.2.4	Chemo-enzymatische Synthese von funktionalisierter RNA	180
4.2.4.1	Synthese des NPBY-geschützten Initiatornukleotides (NPBY-pG).....	182
4.2.4.2	Transkription mit dem lichtaktivierbaren Initiatornukleotid (NPBY-pG).....	184
4.2.4.3	Synthese des NPE-Alkin modifizierten Cytidin-3',5'-bisphosphates (pC ^{NPBYp}).....	185
4.2.5	Chemo-enzymatische Synthese von photoschaltbarer RNA.....	189
4.2.5.1	Synthese und Einbau von Azobenzol C-Nukleosidbisphosphaten in RNA.....	189
4.2.6	Ausblick einer Automatisierung zur chemo-enzymatischen Synthese von photoaktivierbarer RNA.....	191
4.2.7	Synthese und Einbau von Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate in DNA	194
4.2.7.1	Synthese der Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate	197
4.2.7.2	Einbau der Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate in DNA mittels Polymerasen.....	201
4.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	205
5	Experimenteller Teil.....	207
5.1	Materialien und Methoden.....	207
5.2	Oligonukleotidsynthesen	210
5.3	Chemische Synthesen.....	215
6	Anhang.....	240
6.1	Literaturverzeichnis	250
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	261
6.3	Danksagung	263
7	Lebenslauf.....	265

1 Einleitung

1.1 Synaptische Plastizität und Langzeitpotenzierung

Eine der spannendsten Fragen unserer Zeit ist, wie wir lernen und unser Gehirn Erinnerungen speichert. Lernen und Gedächtnis wird erst dadurch ermöglicht, dass sich unser Gehirn durch Erfahrungen verändert. 100 Milliarden Nervenzellen^[1], jede durch 10.000 Synapsen^[2] verknüpft, bilden ein neuronales Netzwerk, welches ideale Voraussetzungen für diese Adaption (Plastizität) mitbringt. Die Idee des sich anpassenden Gehirns wurde erstmals 1949 von Donald Hebb formuliert^[3,4] und 20 Jahre später durch die Entdeckung der Langzeitpotenzierung (LTP) bewiesen^[5,6]. Diese Arbeiten zeigten, dass die Stimulation von exzitatorischen (erregenden) Synapsen zu einer über mehrere Tage anhaltenden Verstärkung der Synapsen führen kann.^[7] Heutzutage ist anerkannt, dass LTP der primäre Mechanismus von synaptischer Plastizität ist.^[8] Synaptische Plastizität ist der wichtigste Mechanismus für Lernen und Gedächtnis und bezeichnet eine aktivitätsabhängige Verstärkung oder Schwächung der synaptischen Übertragung.^[8] Der Hippocampus ist die am häufigsten untersuchte Region im Gehirn, um Lernen und Gedächtnis zu studieren.^[9] Die besondere Bedeutung des Hippocampus wird durch einen bekannten medizinischen Fall deutlich, bei dem einem an Epilepsie erkrankten Patienten, Henry Gustav Molaison (H.M.), der Hippocampus entfernt wurde.^[10] Dadurch verlor H.M. die Fähigkeit Neues zu erlernen und litt somit an einer anterograden Amnesie.

L-Glutamat ist der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im Nervensystem von Säugtieren, weshalb auch seine Rezeptoren AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure) und NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat) sehr bedeutend für LTP sind.^[11] Der AMPA Rezeptor (AMPA) besteht aus einem Heterotetramer der GluA1, GluA2, GluA3 und GluA4 Untereinheiten.^[12] Verschiedene Studien zeigen, dass der größte Teil von AMPARs in hippocampalen Neuronen von Ratten aus den Heteromeren von GluA1 und GluA2 oder GluA2 und GluA3 besteht.^[13–15] Alle AMPARs sind permeabel für Na^+ und K^+ , wobei nur ca. 1% für Ca^{2+} -Ionen durchlässig sind.^[16] Diese Impermeabilität der meisten AMPARs resultiert aus einem Editierungsprozess, bei dem eine Aminosäure (Q/R Editierung) ausgetauscht wird. NMDA Rezeptoren (NMDARs) sind dagegen permeabel für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} .^[17]

Bei einem Aktionspotential kommt es zur Exozytose von synaptischen Vesikeln, die Glutamat enthalten (siehe **Abb. 1**).^[11,17] Das in dem synaptischen Spalt freigesetzte Glutamat kann an die Glutamat-Rezeptoren AMPA und NMDA des postsynaptischen Neurons binden. Im Ruhepotential ist der NMDAR von einem spannungsabhängigen Magnesium-Ion

blockiert, weshalb eine vorhergehende Depolarisation benötigt wird und Bindung von Glutamat an NMDARs (im Ruhepotential) zu keinem Einstrom von Ionen führt. Im Vergleich dazu können AMPARs direkt von Glutamat aktiviert werden, sodass Na^+ (und Ca^{2+}) einströmen, was zu einer Änderung des Membranpotentials des postsynaptischen Neurons führt (siehe **Abb. 1** links).^[12] Abhängig von der Anzahl und Stärke der angeregten AMPARs kann das steigende Membranpotential den Magnesiumblock der NMDARs entfernen (siehe **Abb. 1** rechts).^[17] Dadurch kommt es nach Bindung von Glutamat an NMDAR zum Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} . NMDARs sind verantwortlich für den Haupteinstrom von Ca^{2+} in postsynaptische Neuronen.^[18]

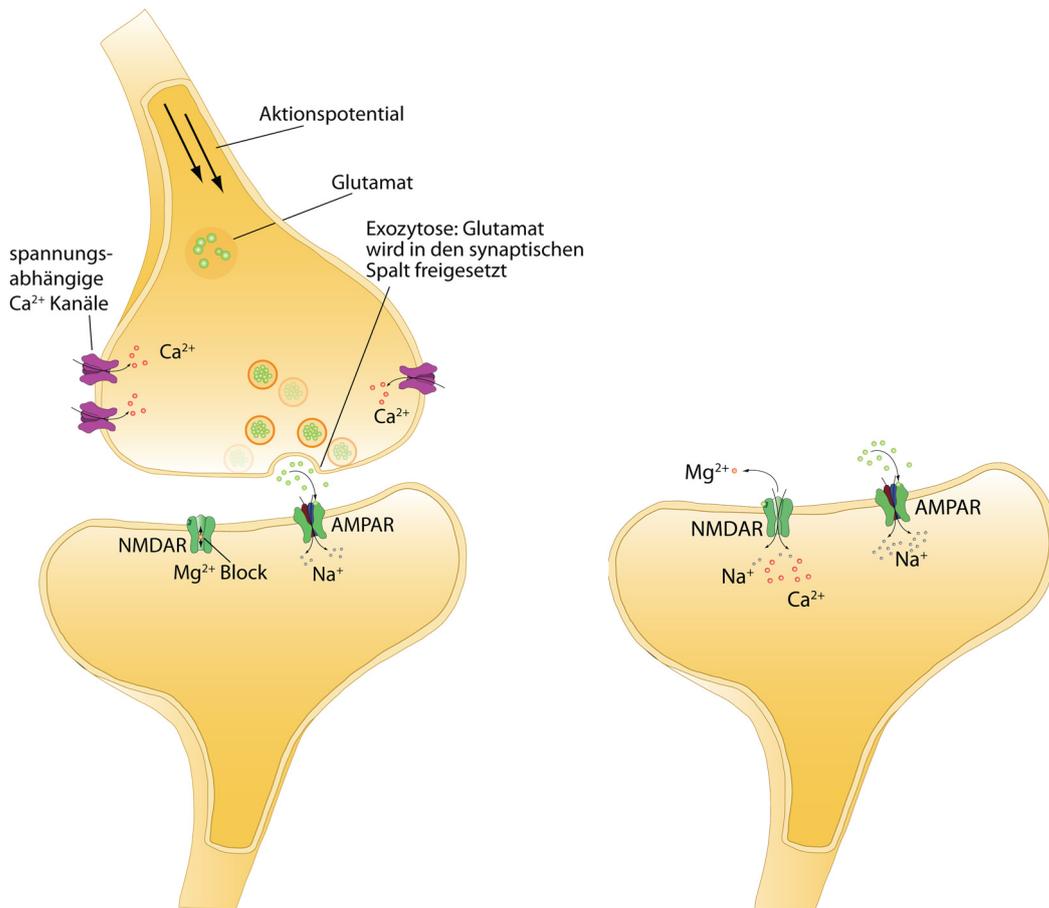


Abb. 1 Schematische Darstellung eines „feuernden“ Neurons (links). Das Aktionspotential führt zur Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle im präsynaptischen Neuron. Dadurch kommt es zur Exozytose von in Vesikeln gehülltem Glutamat in den synaptischen Spalt. Im Ruhepotential des postsynaptischen Neurons führt nur die Bindung von Glutamat an AMPARs zum Einstrom von Ionen, da der NMDAR durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert ist. Erreicht das postsynaptische Potential einen Schwellenwert, wird der Mg^{2+} -Block entfernt und Bindung von Glutamat an NMDAR führt zum Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} (rechts). Die Vorlage zur Zeichnung des Neuronen-Gerüsts wurde aus der Internetseite tea.cnx.org^[19] entnommen.

Ca^{2+} hat einzigartige Funktionen als Sekundärbotenstoff und ist entscheidend für die Induktion von LTP. Zur Induktion von LTP wird also eine präsynaptische Aktivität in Form von Freisetzung von Glutamat sowie gleichzeitig eine postsynaptische Aktivität in Form einer Depolarisation zum Entfernen des Magnesiumionblocks vorausgesetzt.^[17] Da ausschließlich die Moleküle, die nur wenige Mikrometer entfernt sind, von Ca^{2+} aktiviert werden,^[20] ist

der Prozess von LTP enorm ortsspezifisch, sodass nur aktivierte Synapsen einer Plastizität unterliegen. Zentrale Bedeutung von LTP und synaptischer Plastizität hat die Aktivierung von CaMKII durch Ca^{2+} .

1.1.1 CaMKII

Die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) ist ein Ca^{2+} -aktivierbares Enzym, welches so hoch exprimiert ist, dass es 1-2% der totalen Proteinmenge im Gehirn ausmacht.^[21] CaMKII ist besonders an Synapsen angereichert (100 μM)^[22] und das häufigste Protein der postsynaptischen Dichte^[23] (PSD; ein Bereich in postsynaptischen Nervenzellen, der besondere Bedeutung für die Organisation von vielen Rezeptoren und Effektoren hat)^[24]. Im Gehirn ist CaMKII ein großes Holoenzym aus zwölf CaMKII α und CaMKII β Untereinheiten.^[25] CaMKII verhält sich wie ein Schalter, sodass es in einer kompakten (Ca^{2+} /Calmodulin unzugänglichen) und einer erweiterten (Ca^{2+} /Calmodulin zugänglichen) Form vorliegen kann (siehe **Abb. 2**).^[26] Abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration kann sich ein Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex (CaM) bilden.^[27] CaM kann an eine Untereinheit der zugänglichen Form von CaMKII binden und diese Untereinheit aktivieren (siehe **Abb. 2**). Abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration kann CaMKII verschieden stark und lang aktiviert werden.^[28] Dabei ist die längerfristige Aktivität abhängig von der Autophosphorylierung von CaMKII. Ist die Ca^{2+} -Konzentration eher gering und es kommt nicht zur Autophosphorylierung, findet nach 0,1-0,2 Sekunden nach Abfall der Ca^{2+} -Konzentration eine Dissoziation von CaM statt und CaMKII ist inaktiv.^[21] Wenn die Ca^{2+} -Konzentration für längere Zeit oder stärker ansteigt, können die Untereinheiten durch Autophosphorylierung längerfristig aktiviert werden. Dazu müssen zwei benachbarte Untereinheiten aktiviert werden, sodass es zu einer strukturellen Änderung kommt, wodurch eine Untereinheit die benachbarte phosphoryliert (Autophosphorylierung). CaMKII funktioniert wie ein kooperativer Schalter, sodass nach der Phosphorylierung einer Untereinheit weitere Untereinheiten effektiver aktiviert werden können, auch wenn die Ca^{2+} -Konzentration niedriger ist als zur Initiation der Aktivierungskaskade. Die Enzymaktivität bleibt erhalten, auch wenn die Ca^{2+} -Konzentration auf den basalen Level sinkt. Allerdings kann CaMKII im Zeitraum von mehreren Minuten durch Phosphatasen deaktiviert werden^[29], sodass dieser Zustand als Kurzzeit Potentiation (STP; *short time potentiation*) bezeichnet wird.^[21] Studien zeigten, dass in stimulierten Synapsen die meisten CaMKII ihre Aktivität für zirka eine Minute behalten.^[30] Während dieser Zeit kann CaMKII durch mehrfache Calciumpulse längerfristig aktiviert werden und somit LTP induzieren. Persistente Langzeitaktivierung benötigt eine vorhergehende LTP Induktion. Dabei kann das aktivierte CaMKII in der speziellen Umgebung von der PSD mehr als 60 Minuten stabil sein,^[25] da dort die Autophosphorylierung schneller ablaufen kann als die Dephosphorylierung.^[21]

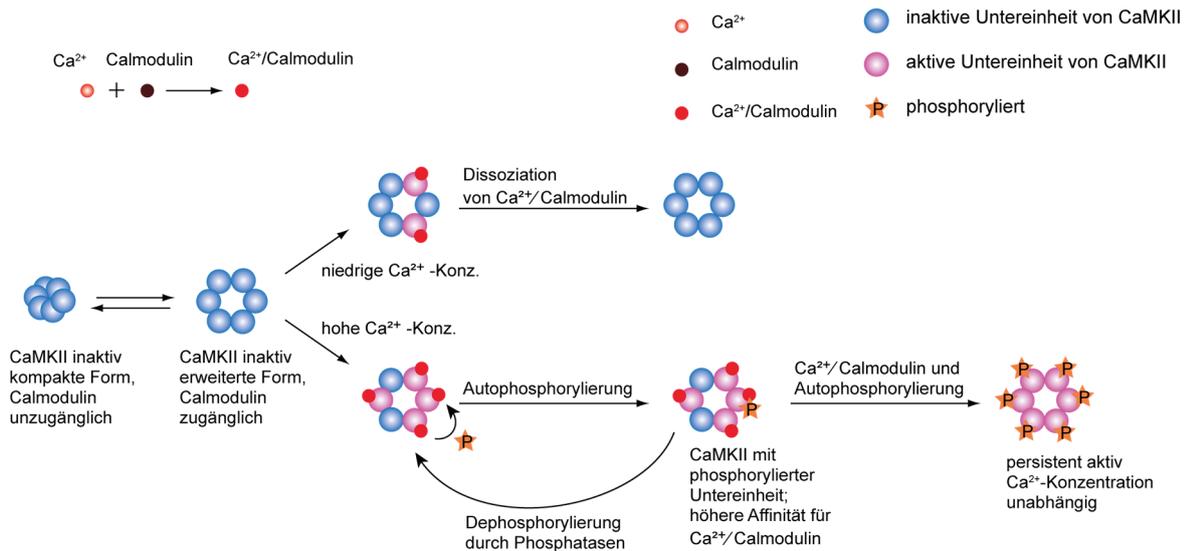


Abb. 2 Struktur und Regulation von CaMKII.^[21,25] Abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration kann Calmodulin Ca^{2+} binden (oben links). CaMKII besteht aus 12 Untereinheiten – zur Übersicht und in Anlehnung an Lisman *et al.*^[21] wurden hier nur sechs gezeigt. CaMKII liegt im Gleichgewicht zwischen einer kompakten und erweiterter Form vor. Nur die erweiterte Form kann Ca^{2+} /Calmodulin binden und dadurch die entsprechende Untereinheit aktivieren. Sind keine benachbarten Untereinheiten aktiviert, so dissoziiert CaM nach Absinken der Calcium-Konzentration. Kommt es durch eine hohe Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung von zwei benachbarten Untereinheiten, so kann eine Untereinheit die andere phosphorylieren (Autophosphorylierung). Dadurch bleibt das Enzym aktiv, auch wenn die Ca^{2+} -Konzentration auf den basalen Level sinkt. Durch Phosphatasen kann die Aktivität gesenkt werden. Ist die Autophosphorylierung schneller als die Dephosphorylierung, so kann CaMKII in eine persistent aktive Form überführt werden, deren Aktivität Stunden anhalten kann.

Wird CaMKII durch Ca^{2+} aktiviert, kommt es zu einer Translokation und Diffusion vom Cytoplasma zu den Synapsen (siehe **Abb. 3**).^[31] Aktivierte CaMKII binden an synaptische Proteine, hauptsächlich NMDARs, ein Prozess der lokal auf eine Synapse beschränkt ist.^[32] Dadurch kann CaMKII benachbarte AMPARs phosphorylieren, wodurch diese eine höhere durchschnittliche Einzelkanal-Leitfähigkeit besitzen.^[33] Dadurch wird bei der Bindung von Glutamat mehr Natrium in die Zelle einströmen und das exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP) wird verstärkt. Dies führt wiederum zu einem häufigeren Entfernen des Magnesiumblocks, wodurch mehr Calcium in die Zelle strömen kann. Die Bildung des CaMKII-AMPA-Komplexes hat besondere Bedeutung für das Aufrechterhalten von LTP, da dieser Komplex über mehrere Monate stabil sein kann,^[7,25] während die meisten CaMKII in Dornfortsätzen nur wenige Minuten^[30] oder wenige Stunden^[25] in der PSD nach synaptischer Stimulation aktiv sind. CaMKII kann aber nicht nur die Stärke von AMPARs erhöhen, sondern auch deren Anzahl. Während LTP werden durch mehrere, teils ungeklärte^[34] Reaktionskaskaden in Vesikel gehüllte AMPARs in die synaptische Membran eingebaut, ein Prozess, der als *AMPA-Trafficking* bezeichnet wird (siehe **Abb. 3**).^[35] Dies allerdings ist nicht ausreichend zur Verstärkung des synaptischen Signals. Dazu muss ein AMPAR gebundenes Hilfsprotein, Stargazin, von CaMKII phosphoryliert werden, wodurch der extrasynaptische AMPAR in der Membran durch elektrostatische Wechselwirkung mit PSD-95, ein synaptisches Gerüst-Protein, verankert wird (siehe **Abb. 3**).^[25,36] CaMKII hat also eine einzigartige Funktion im Prozess von Lernen und Gedächtnis, da es direkt verantwortlich

für das Anhalten von LTP ist, sodass dem Enzym eine Gedächtnisfunktion zugesprochen werden kann.^[21]

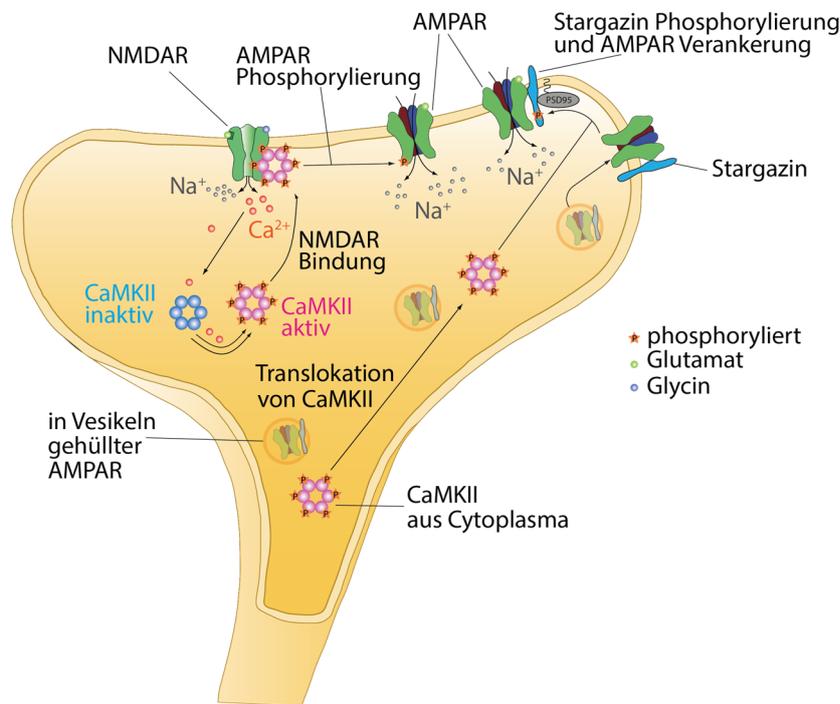


Abb. 3 Schematische Darstellung der Prozesse von LTP im postsynaptischen Neuron.

1.1.2 Lokale Protein Synthese in LTP

Eine stabile späte Phase von LTP (L-LTP, *late phase LTP*) ist assoziiert mit der Vergrößerung und Umstrukturierung der PSD, sowie Neubildung und Vergrößerung von dendritischen Dornfortsätzen.^[37,38] Um dies zu erreichen ist die Synthese von neuen synaptischen Proteinen und deren Translokation notwendig.^[39] Der zelluläre und molekulare Mechanismus von L-LTP ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint der Wachstumsfaktor BDNF (*brain-derived neurotropic factor*) eine entscheidende Rolle zu spielen.^[37,39,40] Studien zeigten, dass durch die Zugabe von BDNF die Genexpression von CaMKII α , GluA1 oder PSD-95 in stimulierten Synapsen gesteigert werden konnte.^[37,40] BDNF hat auch Einfluss auf die Stärke von präsynaptischen Neuronen und kann die Neurotransmitterfreisetzung erhöhen. Die Genexpression von BDNF ist seinerseits abhängig von der Ca²⁺-Konzentration der Synapse und korreliert somit direkt mit LTP.^[40,41] Interessanterweise ist die lokale Proteinsynthese in den Dendriten von entscheidender Bedeutung für synaptische Plastizität.^[42] Dazu müssen die mRNAs in mRNPs (*messenger ribonucleoprotein complex* auch als RNA Granula (*granules*) bezeichnet) gepackt und zu den Dendriten transportiert werden.^[43] Die Repression der Translation durch miRNA ist ein möglicher Regulationsmechanismus um die lokale Proteinsynthese abhängig von der neuronalen Aktivität zu regulieren.^[44]

1.1.3 microRNA in Synapsen

1.1.3.1 microRNA Biogenese und Genstilllegung

microRNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende, endogen transkribierte, einzelsträngige RNAs von ~22 Nukleotiden.^[45,46] miRNAs kommen in Menschen, Tieren, Pflanzen sowie Viren vor und spielen eine entscheidende Rolle in der sequenz-spezifischen Regulation der post-transkriptionellen Genexpression – dem *Gen-Silencing* (Genstilllegung).^[47] Mehr als 60% aller Säugetier-Gene werden durch miRNA reguliert^[48] und deren Dysregulation kann zu schweren Krankheiten^[49,50] oder Entwicklungsstörungen^[51] führen. Die Biogenese der regulatorisch-aktiven reifen miRNA findet in mehreren Schritten innerhalb und außerhalb des Zellkerns statt (siehe **Abb. 4**).^[52] Das Primärtranskript (pri-miRNA) wird durch die RNA-Polymerase II transkribiert,^[53,54] hat typischerweise eine Länge von über 1 Kilobasen und trägt am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz, sowie ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende.^[46] Noch im Zellkern wird die pri-miRNA durch einen Mikroprozessor-Komplex (mit *Drosha* – einer RNase III Endonuklease und dem Kofaktor DGCR8) zu einer ~60-70 Nukleotid langen RNA mit charakteristischer Stamm-Schleife-Struktur prozessiert.^[47] Diese prä-miRNA wird aktiv aus dem Nukleus durch Ran-GTP und Exportin-5 transportiert.^[55] Im Cytoplasma findet die weitere Prozessierung zur reifen miRNA mittels *Dicer*, einer RNase III Endonuklease, statt.^[47] Dabei wird die prä-miRNA in der Nähe der Schleife geschnitten, sodass eine doppelsträngige RNA (dsRNA) mit einem 5'-Phosphat und einem 3'-Überhang von zwei Nukleotiden an beiden Enden erhalten wird.^[47] Der Doppelstrang wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen. Der Strang mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende (häufig als *passenger strand* (oder miRNA*) bezeichnet) wird und aus dem RISC entlassen,^[56] was zu einem schnellen Abbau führt.^[47] Der *guide strand* bleibt im RISC an Argonaut Proteinen gebunden, sodass mRNA mit einer komplementären Sequenz an die miRNA binden kann. Für die Regulation der Translation von mRNA mittels miRNA werden prinzipiell zwei Szenarien unterschieden.^[57] Hat die 3'-UTR (untranslatierte Region) der mRNA eine hohe Komplementarität zur miRNA, kann die mRNA durch Ago-2 (ein Argonaut Protein) abgebaut werden. Ist die Komplementarität eher gering, kommt es lediglich zur Inhibierung der Translation. Die meisten miRNAs zeigen eine unvollständige Komplementarität, sodass es nur zur Inhibierung und nicht zum Abbau der mRNA kommt. Die genauen Mechanismen sind unklar^[58] und aktueller Gegenstand der Forschung.^[59] Die Regulation der Genexpression ist nicht nur durch die verschiedenen Mechanismen hoch komplex, sondern auch, weil eine einzelne miRNAs ein paar hundert mRNAs regulieren kann.^[60] Dabei ist die Regulation weniger ein AN-AUS-Zustand, sondern vielmehr eine Feinregulation der Genexpression.^[61]

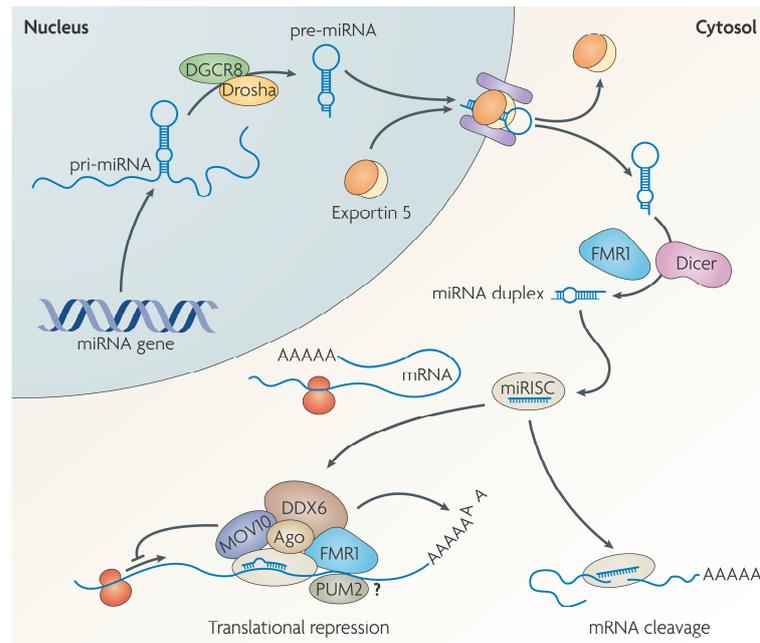


Abb. 4 Mechanismus der microRNA Biogenese und Genstilllegung. Abbildung entnommen aus Schrott *et al.*^[61]

1.1.3.2 Rolle von microRNA in synaptischer Plastizität

microRNAs sind besonders in Dendriten angereichert und haben ideale Eigenschaften für die Regulation der lokalen Proteinsynthese und somit der synaptischen Entwicklung und Plastizität^[44], obwohl ihre exakte Bedeutung und Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.^[61] Anhand von *in vivo* Experimente in Ratten konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von LTP der Level diverser miRNAs hochreguliert werden kann (obwohl andere Studien auch eine Herunterregulation beobachteten).^[62] Durch die Zugabe eines NMDAR Inhibitors wurde nach LTP-Induktion ein gesteigerter Level an miRNA beobachtet, was darauf schließen lässt, dass die NMDAR Aktivität den miRNA Level senkt.^[63] Während manche miRNAs (z.B. miR-132-3p) nach 5 h den basalen Level erreichten, waren andere miRNAs (miR-34a-5p und miR-24-3p) über 24 h hochreguliert.^[64] Die Rolle der miRNA wird bereits durch ihre aktivitätsabhängige Biosynthese deutlich, denn verschiedene Transkriptionsfaktoren sind Ca^{2+} -reguliert.^[61] Zudem wird die pri-miRNA, Drosha und DGCR8 ähnlich wie die mRNA mit Transport-Partikeln zur PSD transportiert, sodass eine lokale und aktivitätsabhängig miRNA Reifung erfolgen kann.^[65] Durch Stimulation der Synapsen konnte die *Dicer*-Aktivität gesteigert werden, was zu einer vermehrten Produktion von miRNA in den Synapsen führen kann.^[66] miRNA181a hat besondere Bedeutung, denn sie kann zwei mRNAs binden, die für Proteine kodieren, welche eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität spielen: CaMKII α ^[67] und GluA2^[68]. Heckel und Schuman *et al.*^[67] zeigten, dass die lokal beschränkte Prozessierung von miR181a durch *Dicer* in hippocampalen Neuronen mittels stimulierter Aktivität gesteigert werden konnte. Dadurch konnte eine lokal verringerte Expression von CaMKII α detektiert werden. Schrott *et al.*^[68] zeigten zudem, dass

die miRNA181a Expression über Dopamin reguliert wird und durch Kokain oder Amphetamin induziert werden kann. Andere Studien zeigten, dass die synaptische Stimulation zu einer Inaktivierung einer Komponente des RISC-Komplexes (*Armitage*) führen kann, so dass die Genexpression dynamisch und individuell an verschiedenen Synapsen ablaufen kann.^[61] Die hier genannten Beispiele sind nur eine kleine Auswahl für die bisher untersuchten Zusammenhänge. Für weitere Informationen wird an aktuelle Übersichtsartikeln^[44,62,69] verwiesen.

1.1.4 Regulation von microRNA Aktivität durch AntimiRs

Wie oben beschrieben spielen microRNAs eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression, denn über 60% aller Gene^[48] werden durch miRNAs reguliert. Das macht miRNA zu einem interessanten Ziel für diagnostische Funktionsverluststudien und therapeutische Anwendungen. Anti-micro-RNAs, kurz AntimiRs, sind chemisch hergestellte und modifizierte einzelsträngige Nucleinsäuren, die komplementär zur miRNA sind und somit um die Bindung der mRNA konkurrieren.^[70] Unmodifizierte Nucleinsäuren haben eine geringe Stabilität in der Zelle, da sie von Nucleasen (Endonucleasen und Exonucleasen) abgebaut werden. Speziell chemisch-modifizierte Nucleobasen (siehe **Abb. 5**) haben eine höhere Affinität zur Ziel-mRNA sowie eine erhöhte Stabilität. Endonucleasen-Resistenz kann durch die Substitution der 2'-OH Gruppe der Ribonucleotide erreicht werden. Meistens werden dazu 2'-Methoxy (2'-OMe), 2'-Methoxyethyl (2'-OMOE), 2'-Fluor (2'-F) oder *locked nucleic acid* (LNA) verwendet. Exonucleasenverdau kann durch die Verwendung von Phosphorothioaten oder Morpholinos verhindert werden.

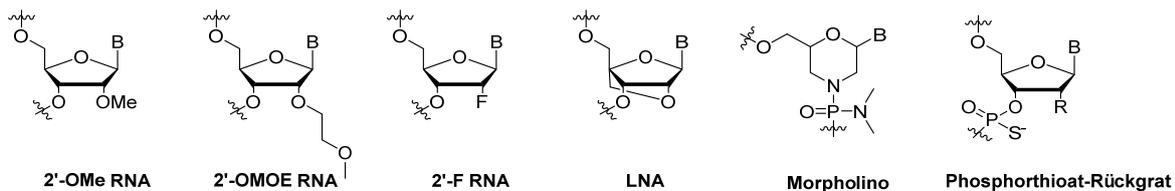


Abb. 5 Strukturen von chemisch-modifizierten AntimiR Oligonucleotide. B bezeichnet eine beliebige Nucleobase.

Besonders LNA hat eine höhere Affinität zur miRNA, sodass ein einzelnes LNA Monomer den Schmelzpunkt eines Duplex von 2 bis 8 °C erhöhen kann.^[71] Durch diese hohe Affinität können auch nur acht Nucleotide lange LNA Stränge, sogenannte *tiny LNAs*, verwendet werden.^[72] Wird ein 2'-OMe Oligonucleotid mit terminalen Phosphorothioaten und einem 3'-Cholesterin zur verbesserten Zellaufnahme verwendet, wird dies als AntagomiR bezeichnet.^[73] Der Mechanismus der miRNA Inhibierung hängt von den verwendeten modifizierten Nucleotiden ab. Während hochaffine Oligonucleotide (z.B. LNA/DNA, LNA/2'-OMe oder 2'-F/MOE Chimere) die miRNA nur hybridisieren und dadurch die Wechselwirkung mit der mRNA verhindern, führt die Bindung weniger affiner AntimiRs (2'-OMe oder 2'-

OMOE) zum Abbau der miRNA.^[70] AntimiRs werden von der pharmazeutischen Industrie als therapeutische Oligonukleotide verwendet und mehrere AntimiRs befinden sich in verschiedenen klinischen Phasen (z.B. Miravirsen gegen miR-122 (Hepatitis C) in Phase IIa, MRG-106^[74] gegen miR-155 (Anti-Tumor) in Phase I und MRG-201 der Firma *MiRagen Therapeutics Inc.* gegen miR-29b (Anti-Fibrose) in Phase I).

1.2 Detektion von Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Sonden

Nukleinsäuren sind Teil des dynamischen Systems in allen lebenden Organismen. Alleine mRNA, die nur 1-5% der totalen zellulären RNA ausmacht, hat zwischen 50.000 bis 300.000 Transkripte in einer Säugetier-Zelle.^[75] Abhängig vom Zelltyp und dem physiologischen Zustand variiert die Verteilung von Nukleinsäuren stark. Zur lokalen Detektierung von Nukleinsäuren können diese sequenzspezifisch mit fluoreszierenden Sonden markiert werden.^[76,77] Fluoreszenz hat im Vergleich zu anderen Detektierungsmethoden gewissen Vorteile:^[78] Erstens ist Fluoreszenz hoch sensitiv und selektiv, eine notwendige Bedingung für die Analyse von biologischen Proben in geringen Konzentrationen und Volumina. Zweitens ist Fluoreszenzspektroskopie nicht-invasiv und beeinflusst somit nicht die Eigenschaften der untersuchten biologischen Probe. Drittens, durch die hohe Vielfalt an verschiedenen Fluorophoren können mehrerer biologische Zielstrukturen gleichzeitig untersucht werden. Fluorogene Sonden werden nicht nur zur Detektion von Nukleinsäuren in der Zelle verwendet, sondern sind auch weit verbreitet in der molekularen Diagnostik (*Taq Man*, RT-PCR usw.).

Die hier vorgestellten fluoreszierenden Sonden bestehen aus Nukleinsäuren, die spezifisch mit einer anderen Nukleinsäure hybridisieren können und dabei ein fluoreszierendes Reportersignal generieren.^[76,77] **Abb. 6** zeigt eine Auswahl an fluorogenen Sonden, die auch in abgewandelter oder kombinierter Form für die Detektion von Nukleinsäure angewendet werden. Die FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) Sonde besteht aus zwei mit Fluorophoren modifizierten Nukleinsäuren, die komplementär zu einer Ziel-Nukleinsäure sind. Nach Hybridisierung sind Donor-Fluorophor (grün) und Akzeptor-Fluorophor (rot) in räumlicher Nähe, sodass nach Anregung des Donor Fluorophors die Energie strahlungsfrei auf den Akzeptor Fluorophor übertragen wird. Daraufhin emittiert nach Anregung des Donor Fluorophors der Akzeptor Fluorophor. Die FRET Effizienz ist im Wesentlichen abhängig von drei Faktoren: 1.) Dem Förster-Radius (R_0), definiert als der Abstand von Donor und Akzeptor, bei dem die Energieübertragung 50% beträgt. Im Beispiel von Cy3 und Cy5 ist der FRET-Radius 50 Å. 2.) Dem Überlappungsintegral des Absorptionsspektrums vom Akzeptor mit dem Emissionsspektrum des Donors. 3.) Orientierung der Fluorophore, welche eine möglichst parallele angeordnete Schwingungsebene haben sollten.

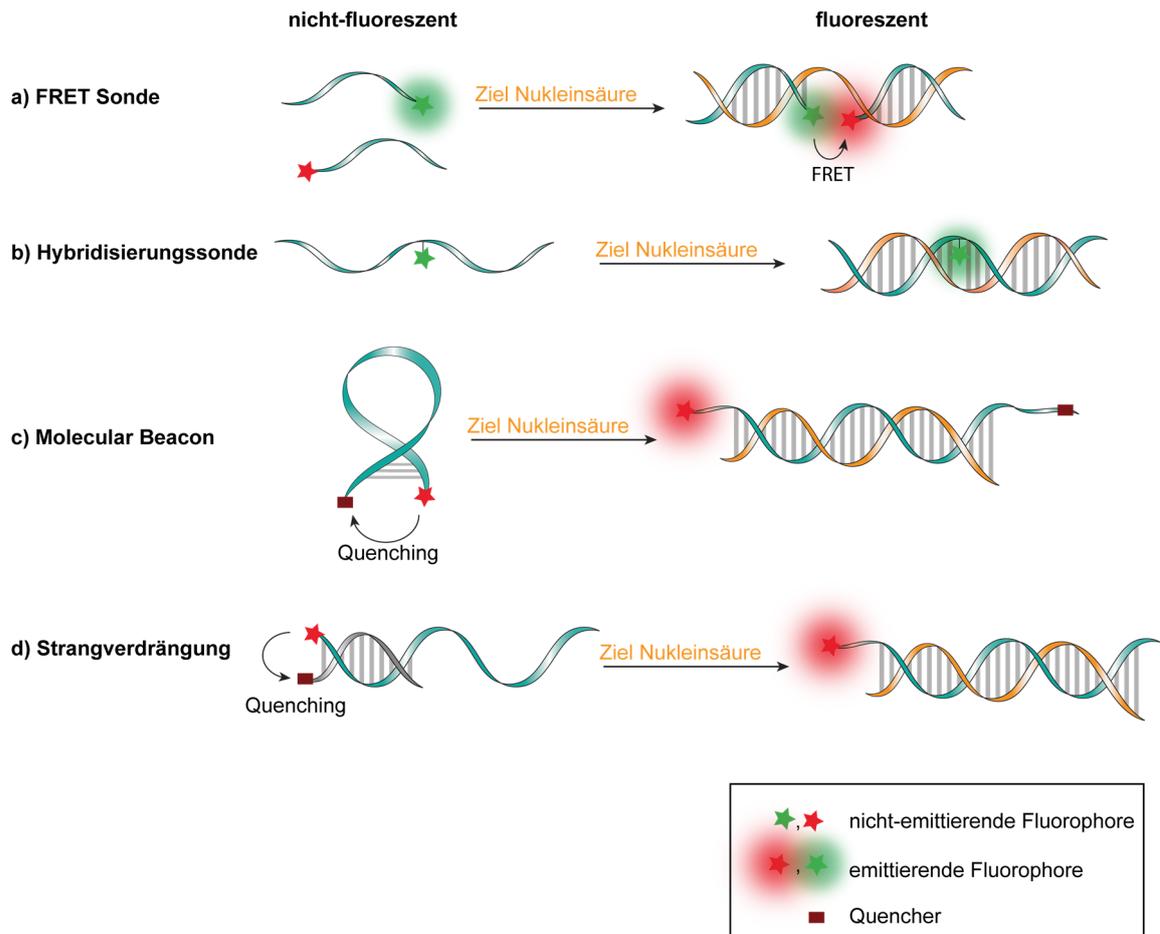


Abb. 6 Übersicht von Sonden zur Detektion von Nucleinsäuren. (a) Hybridisierung von zwei Fluorophor-markierten Nucleinsäuren (FRET Sonde) mit einer Ziel-Nucleinsäuren. Durch die räumliche Nähe nach der Hybridisierung kann ein FRET zwischen dem grünen und roten Fluorophor stattfinden. (b) Hybridisierungssonden sind Moleküle, die erst nach Interkalation, also nach Doppelstrangbildung, fluoreszieren (hier dargestellt) oder umgekehrt (siehe unten). Im Einzelstrang sind sie (idealerweise) nicht-fluoreszierend. (c) Molecular Beacon bestehen aus einer Stamm-Schleife Struktur an dessen Stamm ein Fluorophor-Quencher-Paar angefügt ist. Im geschlossenen Zustand ist der Fluorophor (rot) durch den Quencher (braun) gequencht. Durch Hybridisierung mit der Ziel-Nucleinsäure öffnet sich die Struktur, Fluorophor und Quencher werden räumlich getrennt, was zur Fluoreszenz führt. (d) Bei einer Strangverdrängungssonde ist ein Quencher-Strang mit der Sonde hybridisiert. Erst nach Bindung mit der Ziel-Nucleinsäure wird der Quencher-Strang verdrängt, was in gesteigerter Fluoreszenz resultiert.

Manche Chromophore, wie Ethidiumbromid oder SYBR Gold zeigen durch Wechselwirkung mit Nucleinsäuren einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz.^[79] Dieses Konzept wurde zur Entwicklung von Hybridisierungssonden verwendet. Hybridisierungssonden (siehe **Abb. 6**) sind Nucleinsäure, die kovalent mit Fluorophoren markiert sind, welche nur unter bestimmten Bedingungen emittieren.^[76,77,79] Eine Gruppe bilden die fluoreszierende Basenanaloga^[79] (siehe **Abb. 7**) wie 2-Aminopurin (2AP)^[80], Pteridine (**1**)^[81] und Pyrolo-dC^[82]. Diese Chromophore zeigen eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute frei in Lösung und im Einzelstrang, haben jedoch eine stark reduzierte Fluoreszenz im Doppelstrang.^[79] Ein weiterer wichtiger Vertreter von Hybridisierungssonden ist das Thiazolorange (**TO**). Anders als die fluoreszierenden Basenanaloga führt die Bildung eines Doppelstranges zu einem über 10.000-fachen Anstieg der Fluoreszenz (im Vergleich zum freien **TO**).^[83] Dabei

bindet **TO** nicht in einer Furche der Nukleinsäure, sondern interkaliert in den Basenstapel.^[83,84] In freier Lösung oder im Einzelstrang kann im angeregten Zustand die Energie durch Rotation um die Methin-Brücke strahlungslos verwendet werden (siehe **Abb. 7**).^[85,86]

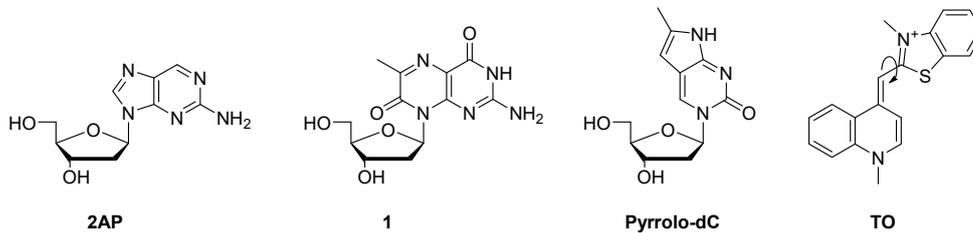


Abb. 7 Chemische Strukturen von fluoreszierenden Basenanaloga: 2-Aminopurin (2AP), Pteripine (**1**) und Pyrrolo-dC. Struktur von Thiazolorange (TO) (rechts). In Lösung oder im Einzelstrang kann die absorbierte Energie durch Rotation um die Methinbindung strahlungslos abgegeben werden.

Interkaliert **TO** jedoch im Basenstapel eines Doppelstranges, wird die Rotation verhindert und es kommt zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Der Anstieg der Fluoreszenz ist stark sequenzabhängig^[87,88] und konnte sogar zur Detektion von Einzelbasen-Polymorphismus verwendet werden.^[85,89] Seitz *et al.*^[90] verknüpften TO mit einem Serinol-Linker, insertierten dies mittels Festphasensynthese in Nukleinsäuren und bezeichnet es als *FIT (Forced Intercalation)-Probes*. Bei der Modifikation einer Nukleinsäure mit einer oder zwei *FIT Probes* konnte die Fluoreszenzquantenausbeute nach Hybridisierung um das 10 und 12,5-fach gesteigert werden.^[91]

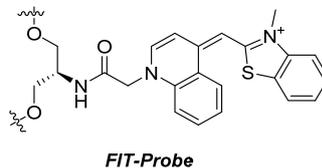


Abb. 8 *FIT-Probe* nach Seitz *et al.*^[90] Thiazolorange (TO) wurde über ein Serinol-Linker in Nukleinsäuren eingebaut.

Molecular Beacons wurden 1996 von Tyagi und Kramer^[92] eingeführt und sind die am weitest verbreiteten^[76] und am besten untersuchtesten^[77] Hybridisierungs sonden. Sie bestehen aus einer 15-30 Nukleotid langen Schleife, die komplementär zur Ziel-Nukleinsäure ist und aus einem Stamm von 5-8 Nukleotiden, welcher sich nach Hybridisierung öffnet.^[76] Ein Fluorophor und Quencher Paar befindet sich terminal am 5'- und 3'-Ende des Stammes, sodass der Molecular Beacon im geschlossenen Zustand nicht fluoresziert. Erst nach Bindung der Ziel Nukleinsäure, Öffnung des Stammes und somit Distanzierung von Fluorophor und Quencher, steigt die Fluoreszenz an.

Eine weiteres Konzept einer fluoreszierenden Sonde beruht auf der Verdrängung eines Quencher-markierten Stranges und wird deswegen hier als Strangverdrängungs-Sonden bezeichnet (in der Literatur auch als Ying-Yang-Sonde bezeichnet; siehe **Abb. 6**).^[93] Bei

diesem Konzept ist die zur Ziel-Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäure mit einem Fluorophor markiert. Vor der Strangverdrängung ist ein kurzer Gegenstrang mit einem Quencher hybridisiert, sodass der Fluorophor nicht emittiert. Da die Ziel-Nukleinsäure einen stabileren Doppelstrang ausbilden kann, wird der Quencher-Strang verdrängt. Dadurch wird die Hybridisierung mit der Ziel-Nukleinsäure durch Fluoreszenz visualisiert.

1.3 Lichtregulation mit photolabilen Schutzgruppen

Viele chemische und biologische Systeme besitzen ein komplexes und hoch dynamisches Netzwerk von gleichzeitig ablaufenden Prozessen. Eine wissenschaftliche Herausforderung ist die Aufklärung und Regulation dieser Systeme durch Kontrolle der simultanen Prozesse. Dazu können Schutzgruppen verwendet werden, die selektiv installiert werden können und dadurch bestimmte Prozesse temporär verhindern. Erst nach der Abspaltung der Schutzgruppe kann der zu untersuchende Prozess wieder ablaufen. Häufig in der organischen Synthese verwendete Schutzgruppen (z.B. Silyl, Acetyl) benötigen zur Abspaltung eine Änderung des pH-Wertes, der Temperatur oder die Zugabe von Reagenzien (z.B. Oxidations-/Reduktionsmittel, Fluorid). Dadurch kann jedoch das zu untersuchende System verändert werden. Eine Alternative bieten photolabile Schutzgruppen (*PPGs: photoremovable protecting groups*), die durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge selektiv entfernt werden können.^[94] Wird eine photolabile Schutzgruppe auf einer funktionellen chemischen Gruppe installiert, kann diese nicht mehr in einer Reaktion oder anderen (biologischen) Wechselwirkung teilnehmen. Nach Bestrahlung und somit Abspaltung der Schutzgruppe, wird die Funktion des temporär geschützten Moleküls wiederhergestellt. Besonders für biologische Anwendungen besitzen photolabile Schutzgruppen entscheidende Vorteile gegenüber konventionellen Schutzgruppen.^[95,96] Photolabile Schutzgruppen können mit einer hohen Orts- und Zeitaufösung abgespalten werden. Moderne Lasermethoden ermöglichen die Freisetzung in geringen Volumina, sodass einzelne Zellen und sogar Zellbereiche von Organismen selektiv untersucht werden können. Durch die Dauer der Bestrahlung lässt sich effizient die freigesetzte Dosis kontrollieren. Zusätzlich ist die Lichtaktivierung ein nicht-invasiver Prozess. Im Vergleich zu konventionellen Schutzgruppen ist die Zugabe von weiteren Reagenzien, die das System verändern könnten, somit nicht notwendig. Durch die Wahl einer geeigneten Wellenlänge (langwelliges UV oder vis Licht) wird das biologische System im Regelfall nicht beeinträchtigt. Einige Modellorganismen, wie Fadenwürmer (*C.elegans*) oder Zebrafische sind (zumindest teilweise in manchen Entwicklungsstadien) transparent und eignen sich somit ideal für eine Lichtregulation.^[97] Äußere Anwendungen wie z.B. dermal oder im Auge sind auch in höheren Organismen möglich. Durch Weiterentwicklung von photolabilen Schutzgruppen, die im nahem-Infrarotbereich abspaltbar sind, kann auch eine Penetration in tieferes Gewebe erreicht werden.^[98]

Die erste Verwendung von photolabilen Schutzgruppen für biologisch aktive Moleküle wurde von Engels *et al.*^[99] 1977 publiziert. Sie synthetisierten ein *ortho*-Nitrobenzyl-geschütztes zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) (siehe **Abb. 9**, oben). Im Jahre 1978 schützten Kaplan *et al.*^[100] ein Adenosin Triphosphat (ATP) mit *ortho*-Nitrobenzyl-Derivaten und untersuchten damit die Na⁺/K⁺-ATPase (siehe **Abb. 9**, unten). In dieser Publikation

wurde auch der Begriff *caged compounds* zur Bezeichnung von photolabil-geschützten Biomolekülen geprägt.

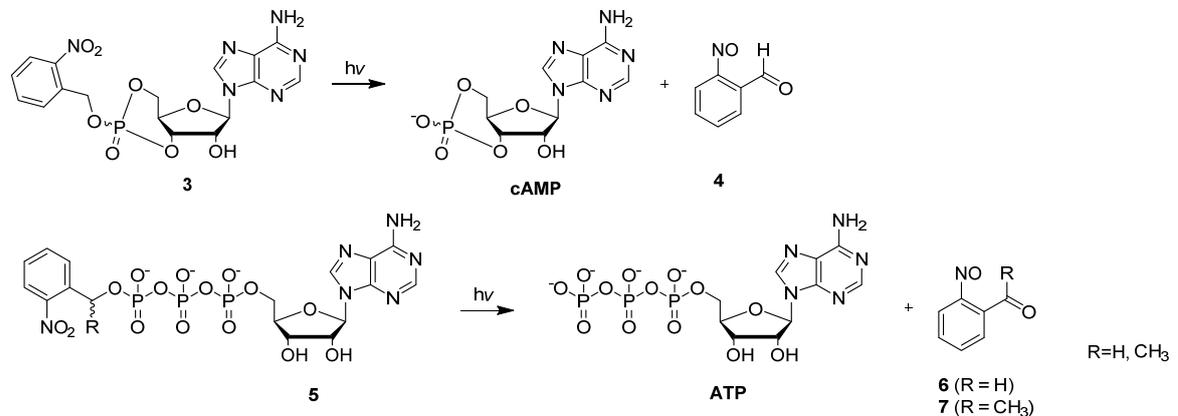


Abb. 9 Photolabil geschütztes cAMP (oben) nach Engels *et al.*^[99]. Nach Belichtung wird die *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe abgespalten und cAMP und *ortho*-Nitrosoaldehyd **4** werden erhalten. Photolabil geschütztes ATP nach Kaplan *et al.*^[100] (unten). Die *ortho*-Nitrobenzyl (R = H) oder *ortho*-Nitrophenylethyl (R = CH₃) Schutzgruppen sind am γ -Phosphat angebracht. Nach Photolyse ($\lambda = 340$ nm) entstehen Nitrosoaldehyd **6** (R = H) oder Nitrosoketon **7** (R = CH₃).

Photolabile Schutzgruppen müssen diverse Anforderungen erfüllen, um in biologischen Systemen effektiv zu sein.^[95] Die Installation der photolabilen Schutzgruppe sollte einfach und selektiv erfolgen. Für weitere chemische Umsetzungen muss die Schutzgruppe eine gewisse Stabilität aufweisen. Sie sollte löslich und unter den Bedingungen des zu untersuchenden Systems (z.B. in der Zelle) stabil sein. Die Entschützung sollte schnell, effizient und möglichst ohne Bildung von toxischen Nebenprodukten ablaufen. Zudem darf die Wellenlänge zur Belichtung das biologische System nicht beeinflussen.

1.3.1 Nitrobenzylartige Schutzgruppen

Eines der am häufigsten verwendeten und am besten untersuchten photolabilen Schutzgruppen ist vom Typ *ortho*-Nitrobenzyl **8**.^[94] Der Mechanismus der Photolyse beginnt mit einem Hydrogentransfer von der benzylicischen Position des *ortho*-Alkyl Substituenten und formt ein *aci*-Nitro-Tautomer **9**, was zum Benzoxazolidin **10** zyklisiert (siehe **Abb. 10**).^[101–103] Nach Bildung des Halbacetals **11** wird schließlich die Abgangsgruppe und Nitrosoaldehyd **12** freigesetzt. Ein Nachteil des unmodifizierten *ortho*-Nitrobenzyls (*o*NB) **8** ist, dass das Nebenprodukt der Photolyse, der Nitrosoaldehyd **12**, eine reaktive und toxische Verbindung ist.^[94,103]

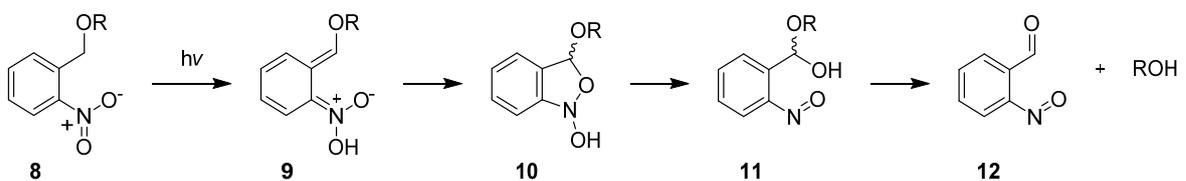


Abb. 10 Photolysemechanismus einer *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe.^[103]

Durch die Einführung einer Methylgruppe an der benzylichen Position wird *ortho*-Nitrophenylethyl (NPE) erhalten. Im Vergleich zum unsubstituierten *ortho*-Nitrobenzyl, lässt sich dies effizienter photolysieren und das Nebenprodukt (Nitrosoketon) ist nicht toxisch. Weitere bekannte Vertreter von photolabilen Schutzgruppen sind Cumarine, *para*-Hydroxyphenacyl (ρ HP), NDBF und BODIPY.^[94,95,103,104]

Photolabile Schutzgruppen können nahezu auf allen Molekülen installiert werden. Für die Regulation von biologischen Prozessen wurden sie bereits auf Proteine, Peptide, Neurotransmitter, Metabolite, Fettsäuren, Steroide, Hormone, Ionen und Nukleinsäuren installiert.^[95,105] Da sich diese Arbeit thematisch mit der Regulation von Nukleinsäuren befasst, wird im Folgenden ausführlicher darauf eingegangen.

1.3.2 Photolabile Schutzgruppen zur Regulation von Nukleinsäuren

Abgesehen von der Speicherung von Informationen, haben Nukleinsäuren weitere vielfältige Funktionen. Die Regulation der Struktur der Nukleinsäure und damit dessen Funktion wäre ein mächtiges Werkzeug, um diese Funktionen zu erforschen und zu regulieren. Die Lichtregulation von Nukleinsäure kann prinzipiell in verschiedene Bereiche (siehe **Abb. 11**) gegliedert werden:

a.) Durch die Einführung von photolabilen Schutzgruppen kann die lokale Struktur der Nukleinsäure gestört werden (siehe **Abb. 11a**).^[106–108] Eine genau definierte Struktur ist essentiell für die Erkennung^[108–110] (z.B. von Metaboliten oder Proteinen) und /oder für katalytische Funktionen^[111,112] einer Nukleinsäure. Erst nach Bestrahlung wird die native Struktur erhalten und die Funktion wiederhergestellt. Photolabile Schutzgruppen können dazu entweder an den exozyklischen Funktionen der Nukleobasen, der 2'-OH Gruppe oder dem Phosphordiester^[110,113–115] installiert werden (siehe **Abb. 11** rechts oben).^[105,106,116] Bei diesem Konzept sind genaue Informationen über die Struktur essentiell, damit die Schutzgruppe an der effektivsten Stelle eingeführt werden kann.

b.) Befinden sich ausreichend photolabile Schutzgruppen auf einer Nukleinsäure, so kann die Hybridisierung mit einem Gegenstrang vollständig inhibiert werden (siehe **Abb. 11b**).^[117–119] Erst nach Abspaltung der Schutzgruppen kann ein Duplex erhalten werden. Mehrere Schutzgruppen sind notwendig, aber es ist keine genaue Information über Funktion-Struktur-Beziehung erforderlich.

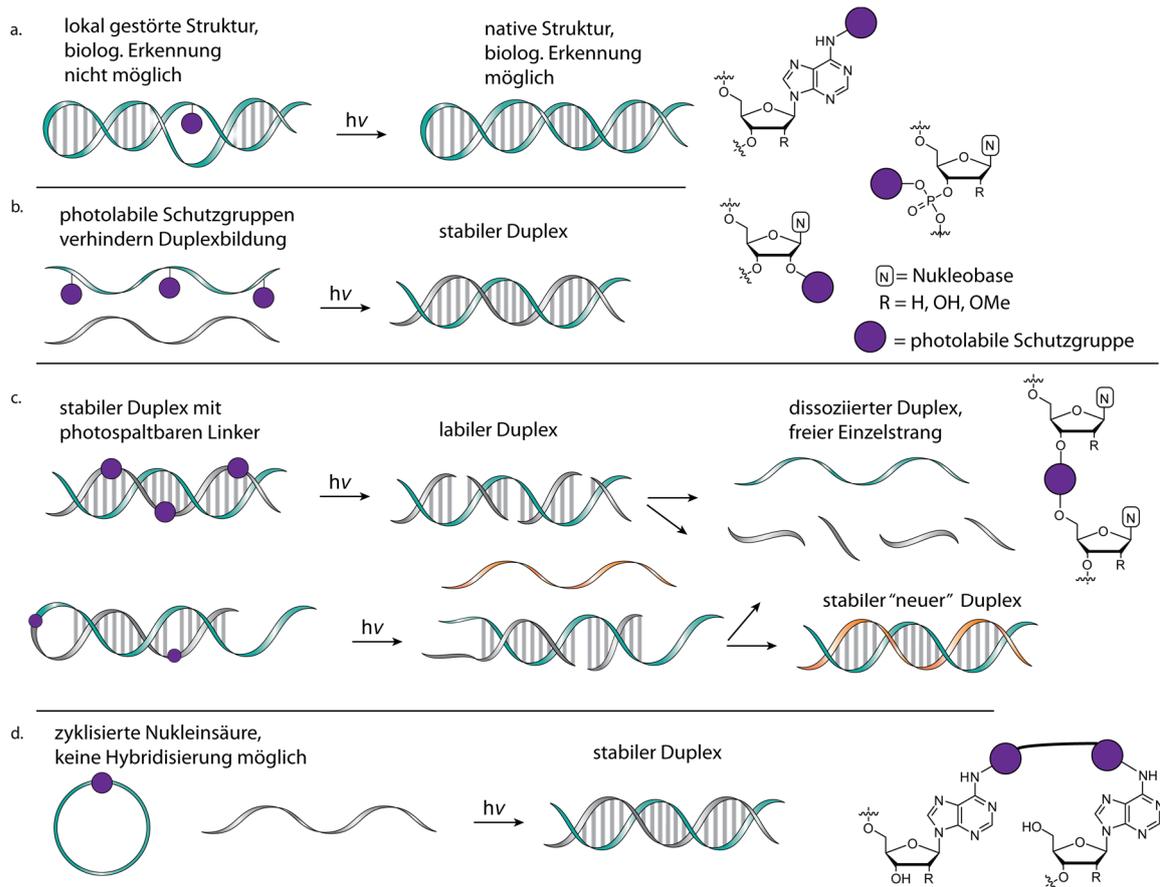


Abb. 11 Schematische Darstellung der verschiedenen Konzepte zur Lichtregulation von Nucleinsäuren. Photolabile Schutzgruppen können an den exozyklischen Funktionen, der 2'-OH Gruppe oder dem Phosphordiester installiert werden, um die lokale Struktur (a) oder die vollständige Hybridisierung (b) zu regulieren. Photospaltbare Linker im Phosphatrückgrat können eine Nucleinsäure in mehrere kleine Teile spalten (c). Dadurch kann ein Doppelstrang oder Haarnadelschleife aufgelöst und ein Einzelstrang erhalten werden. Photolabil-zyklisierte Nucleinsäuren können erst nach Belichtung einen stabilen Duplex bilden. Die Zyklisierung kann über photolabile Schutzgruppen im Rückgrat oder auf der Nucleobase erfolgen.

c.) Der dritte Bereich unterscheidet sich von den ersten beiden, da hier nicht die Wechselwirkungen von Doppelstränge oder Sekundärstrukturen mit photolabilen Schutzgruppen auf den Nucleobasen verhindert werden. Durch die Installation von photospaltbaren Linkern in das Phosphatrückgrat einer Nucleinsäure kann durch Bestrahlung ein stabiler Duplex oder eine Sekundärstruktur aufgelöst werden (siehe **Abb. 11c**).^[97,120–127] Dadurch kann deren Funktion ausgeschaltet werden oder der entstehende Einzelstrang kann eine andere Nucleinsäure binden. Die photospaltbare Nucleinsäure kann im intermolekularen oder intramolekularen Duplex vorliegen. Beim intramolekularem Duplex (Hairpin) ist der teilkomplementäre Gegenstrang (grau; siehe **Abb. 11c**) durch einen photolabilen Linker verknüpft und verhindert die Hybridisierung mit einer weiteren Nucleinsäure.^[97,123,124] Belichtung destabilisiert den Duplex stark, sodass durch Strangverdrängung mit einer vollständig komplementären Nucleinsäure ein thermodynamisch stabilerer Duplex gebildet werden kann. Im Vergleich zu b) werden weniger photolabile Schutzgruppen benötigt, um eine Duplexbildung zu verhindern. Allerdings muss die Länge des intramolekularen Duplex

aufwändig ermittelt werden, um einerseits einen stabilen Doppelstrang im geschützten Zustand und andererseits eine effiziente und schnelle Umhybridisierung (Strangverdrängung) nach Belichtung zu gewährleisten.^[123]

d.) Eine Alternative zum temporären Verhindern der Hybridisierung bietet die photolabile Zyklisierung von Nukleinsäuren.^[97,128,129] Zyklisierte Strukturen besitzen eine „ungünstige“ oder gespannte Konformation und verhindern dadurch die Hybridisierung. Erst nach Belichtung wird ein linearer Strang erhalten, der eine weitere Nukleinsäure binden kann. Die Zyklisierung kann durch photolabile Schutzgruppe im Rückgrat^[97,129] (Vergleich Konzept c) oder mittels funktionellen Gruppen (z.B. über Click-Chemie) von photolabilen Schutzgruppen auf der Nukleobase^[128] (vergleich Konzept a) erzielt werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass wenig photolabile Schutzgruppen notwendig sind, um sogar große Nukleinsäuren an der Hybridisierung zu hindern. Allerdings muss die Anzahl und Position der Veknüpfsstellen experimentell ermittelt werden. Es zeigte sich, dass für größere Nukleinsäuren (90mer DNA) mehrfache Zyklisierungen notwendig waren.^[128]

Photolabile Schutzgruppen können auf diverse Weise in Nukleinsäure eingeführt werden. Die am häufigsten verwendete Strategie zur Synthese von photolabil geschützten Nukleinsäuren ist über die Festphasensynthese (siehe Kapitel 1.5). Dabei werden die zuvor chemisch hergestellten photolabil-geschützten Phosphoramidite spezifisch in die Sequenz eingeführt. Viele photolabile Schutzgruppen wie NPE, NPP, Cumarin, NDBF, pHP und deren Derivate wurden bereits auf diesem Weg erfolgreich installiert. Die Schutzgruppen müssen dafür allerdings unter den Festphasen- und Aufreinigungsbedingungen stabil sein.

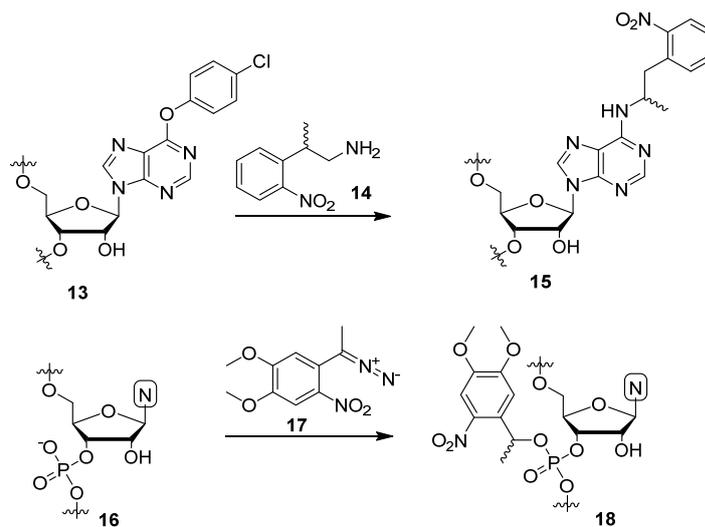


Abb. 12 Reaktionsschemata von Beispielen zur postsynthetischen Einführung von photolabilen Schutzgruppen auf Nukleinsäuren. *Convertible nucleosides* können eine chemische Gruppe aktivieren, sodass diese von photolabilen Schutzgruppen (hier NPP-NH₂ **14**) substituiert werden kann (oben). Der Phosphordiester **16** kann statistisch mit Diazo-Derivaten **17** modifiziert werden (unten).

Alternativ können photolabile Schutzgruppen postsynthetisch eingeführt werden. Die Einführung kann mit *convertible nucleosides* durchgeführt werden (siehe **Abb. 12**).^[130] Eine durch Festphasensynthese hergestellte Nukleinsäure besitzt spezielle funktionelle Gruppen (z.B. *para*-Chlorbenzol **13**), die durch photolabile Schutzgruppen substituiert werden können. Allerdings ist die Ausbeute stark von der Nukleophilie der Schutzgruppe abhängig und konnte nur für primäre Amine wie NPP-NH₂ **14** gezeigt werden.^[130] Friedman *et al.* zeigte mittels postsynthetischer Einführung von photolabilen Schutzgruppen **17** am Phosphatrückgrat die Regulierung von siRNA (siehe **Abb. 12** unten).^[114,115] Die Installation erfolgte statistisch und es konnte kein An/Aus-Verhalten beobachtet werden. Auch durch die Verwendung von Phosphorthioaten können photolabile Schutzgruppen am Phosphatrückgrat eingeführt werden.^[111,112]

In den meisten Anwendungen von lichtaktivierbaren Nukleinsäuren wurde die Genexpression reguliert.^[95] Deiters *et al.*^[131] regulierten die Transkription mit einem lichtaktivierbaren *Decoy* (siehe **Abb. 13** oben). *Decoys* sind kurze Nukleinsäuren, die eine Haarnadelstruktur besitzen und Transkriptionsfaktoren (hier: NF- κ B) binden, wodurch die Transkription nicht initiiert werden kann. Drei photolabile Schutzgruppen im *Decoy* verhinderten die Bindung von NF- κ B. Stattdessen band NF- κ B an die endogene Bindungsstelle und initiierte die Transkription.^[131] Nach Belichtung und Freisetzung des „aktiven“ *Decoys* wurde die Transkription inhibiert.

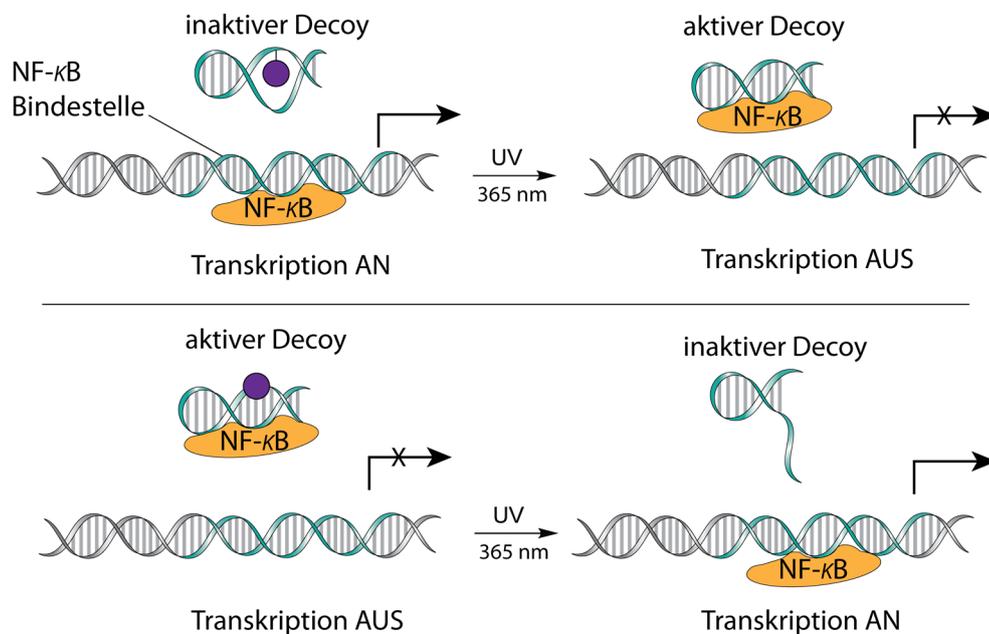


Abb. 13 Photochemische Kontrolle der Genexpression mit NF- κ B nach Deiters *et al.*^[131] und Heckel *et al.*^[122]. Oben: Photolabile Schutzgruppen im Decoy verhindern die Bindung von NF- κ B mit dem Decoy (Zur Vereinfachung ist hier nur eine anstatt drei photolabile Schutzgruppen gezeigt). NF- κ B bindet an die genomische Bindestelle und initiiert die Transkription. Nach UV-Bestrahlung kann sich die Haarnadelschleife des Decoys bilden und NF- κ B bindet den Decoy. Die Transkription wird inhibiert. Unten: NF- κ B bindet den Decoy, die Transkription findet nicht statt. UV-Belichtung spaltet den Decoy in zwei Nukleinsäuren. Dadurch kann keine Haarnadelschleife ausgebildet werden. NF- κ B kann den Decoy nicht mehr binden und die Transkription findet statt.

Heckel *et al.*^[122] führten einen photospaltbaren Linker vom Cumarin-Typ in den Decoy ein. Vor Belichtung kann NF- κ B den Decoy binden und die Transkription wird nicht initiiert. Belichtung spaltet den Decoy, sodass NF- κ B an die genomische Bindestelle bindet und die Transkription initiiert wird.

1.3.2.1 Regulation von miRNA mit lichtinduzierbaren AntimiRs

Ein interessantes Thema ist die Lichtregulation der Genexpression durch miRNA Stilllegung (siehe Kapitel 1.1.3.1 zur Einführung von miRNA und AntimiRs). Viele miRNAs werden ubiquitär exprimiert und können je nach zellulärem Umfeld verschiedene, sogar gegensätzliche Effekte bewirken.^[47] Eine systemische Applikation von AntimiRs könnte zu erheblichen Nebenwirkungen führen. Zumal der Effekt häufig langanhaltend ist.^[73] Durch Bestrahlung kann ein AntimiR mit hoher Orts- und Zeitspezifität aktiviert werden.^[97,117,118,132] Heckel *et al.*^[118] synthetisierten ein lichtaktivierbares AntagomiR gegen miR-92a zur Regulation der Angiogenese in humanen Zellen (siehe **Abb. 14**). Ein *Screening* ergab, dass sechs photolabile Schutzgruppen (NPE) auf einem 21mer 2'OMe-RNA notwendig waren, um eine Hybridisierung mit der miR-92a zu verhindern. Nach Belichtung wurde die miR-92a Expression um 90% reduziert, was zu einem Anstieg der ITG α 5 mRNA Expression von ca. 200% führte. Die Wundheilung (bzw. das *Spheroid sprouting*) nach lichtinduzierter Aktivierung des AntimiRs zeigte einen vergleichbaren Effekt, wie die nicht lichtaktivierbare Positivkontrolle und deutlich bessere Wundheilung als die Negativkontrolle (siehe **Abb. 14** rechts). Die Regulation von Angiogenese könnte beispielsweise nach einem Herzinfarkt die Neubildung von Blutgefäßen und somit den Blutfluss deutlich verbessern bzw. wiederherstellen.^[133]

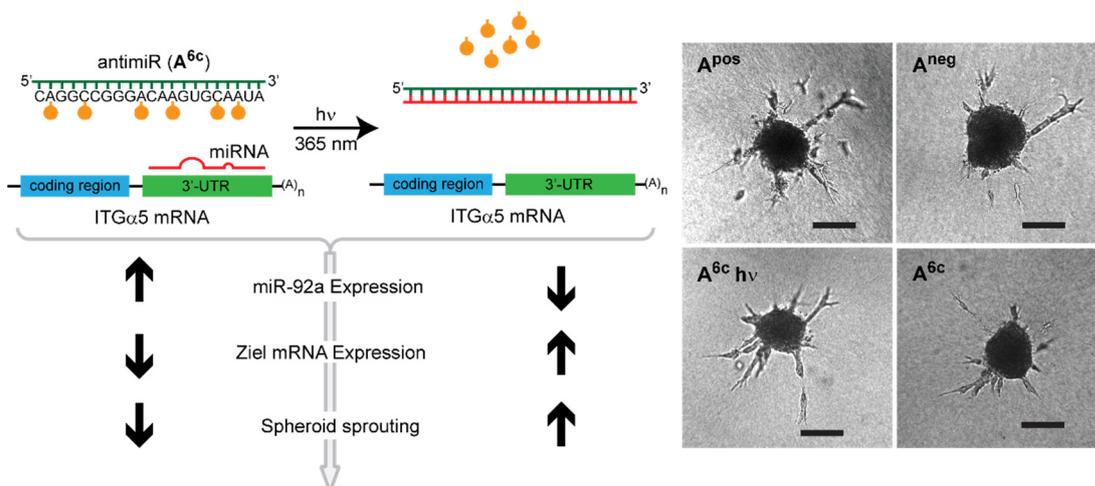


Abb. 14 Regulation der Angiogenese mit lichtinduzierbaren AntimiRs nach Heckel *et al.*^[118] Nach Belichtung kann das AntimiR die miR-92a binden, was zu einer gesteigerten Ziel-mRNA Expression führt und dadurch die Wundheilung beschleunigt. Nachgewiesen wurde die beschleunigte Heilung anhand des *Spheroid sprouting*. Abbildungen entnommen und modifiziert aus der Dissertation von Florian Schäfer.^[134]

Deiters *et al.* zeigten 2012 als erstes die Regulation von miRNA mit lichtaktivierbaren AntimiRs.^[132] Dazu synthetisierten sie ein AntimiR mit drei bis vier photolabilen Schutzgruppen (NPOM). Sie regulierten *Luciferase* und EGFP (enhanced GFP, *green fluorescent protein*) Reportergene mit einem lichtaktivierbaren AntimiR gegen miR-21 in humanen Zellen. Dazu transfizierten sie ein Plasmid mit dem *Luciferase* Gen und einer Bindungsstelle (die komplementäre Sequenz) der miR-21. Bindet die miRNA an die komplementäre Sequenz, wird das *Luciferase* Gen nicht exprimiert. Nach Belichtung bindet das AntimiR die miRNA und die Genexpression von *Luciferase* konnte um den Faktor drei gesteigert werden.

Li *et al.*^[123] regulierten die miRNA *lys-6* in dem transparenten Modellsystem *C. elegans* mit einem lichtaktivierbaren AntimiR. Die miRNA *lys-6* ist nur in einem Neuron exprimiert und dort Verantwortlich für die Zellentwicklung. Zum Nachweis der miRNA Regulation wurde ein GFP Reportergen verwendet. Sie verwendeten einen photospaltbaren Linker (von *ortho*-Nitrobenzyl-Typ) neben einem Cumarin, um einen Gegenstrang (Blockierstrang) kovalent mit einem AntimiR zu verknüpfen (siehe **Abb. 11c** und **Abb. 15**).^[123] Dadurch sollte vor Belichtung die Hybridisierung mit der miRNA verhindert werden. Durch Anregung des Cumarins mit UV-Licht oder Zweiphotonen-Anregung, konnte die Energie auf die Nitrobenzyl-Photoschutzgruppe übertragen werden.^[135] Dadurch wurde die *uncaging cross section* (Produkt von *uncaging Quantenausbeute* und Extinktionskoeffizient) vom Nitrobenzyl-Linker enorm erhöht. Zusätzlich konnte das Entschützen visualisiert werden, da die Fluoreszenz des Cumarins nach Abspaltung des photolabilen Linkers deutlich anstieg.^[123] Bei diesem Konzept ist zu beachten, dass es sich nicht um eine lichtaktivierbare fluorogene Sonde (vergleich Kapitel 1.3.2.2), sondern um einem photolabil geschützten Fluorophor, handelt. Das AntimiR wurde so konstruiert, dass nach Belichtung der Gegenstrang bei Raumtemperatur dissoziierte, sodass der AntimiR-Strang (siehe **Abb. 15** gelb) frei vorlag und die miRNA den freien Strang binden konnte.^[123] Somit fand bei diesem Konzept keine Verdrängung des Gegenstranges durch miRNA Bindung statt. Haben die Gegenstränge eine Länge von 13 oder 14 Nukleotiden, dissoziierten diese bei Raumtemperatur nicht. Der intermolekulare Duplex war dann so stabil, dass die miRNA selbst nach Belichtung den AntimiR Strang nicht binden konnte. Folglich konnte mit Gegensträngen der Längen von 13 und 14 Nukleotide kein biologischer Effekt nachgewiesen werden (siehe *canti_lys-6_13* und *canti_lys-6_14* in **Abb. 15**). War der Gegenstrang nur neun Nukleotide lang, konnte die miRNA auch vor Belichten binden, wodurch eine hohe Hintergrundaktivität erhalten wurde (siehe *canti_lys-6_9* in **Abb. 15**). Einen ausbalancierten Effekt konnte Li *et al.*^[123] mit einer Gegenstranglänge von zehn bis zwölf Nukleotiden erzielen. Mit diesen Längen konnte erst nach Belichtung der biologische Effekt signifikant gesteigert werden.

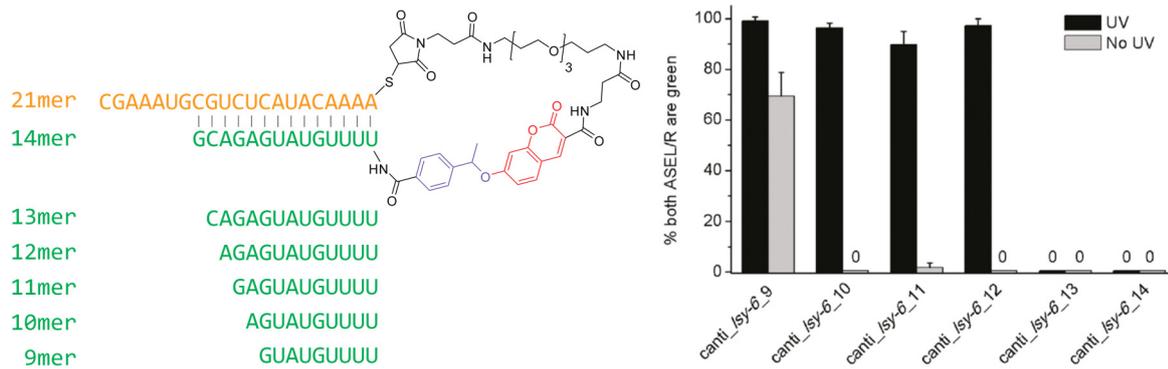


Abb. 15 Lichtaktivierbares AntimiR nach Li *et al.*^[136] Das AntimiR (gelb) ist über einen Cumarin (rot) benachbarten photospaltbaren Nitrobenzyl-Linker (lila) mit einem Blockierstrang (grün) verknüpft. Die Länge des Blockierstrangs wurde variiert, um keinen Effekt vor Belichtung und einen maximalen Effekt nach Bestrahlung zu erzielen. Rechts ist die Auswertung der Fluoreszenz des GFP-Reportergens vor und nach Belichtung in den Neuronen gezeigt. Die rechte Abbildung wurde aus Li *et al.*^[136] entnommen.

Dmochowski *et al.*^[97] synthetisierten ein lichtaktivierbares AntimiR zur Regulation der *let-7* miRNA in Zebrafisch Embryonen. Sie verwendeten eine Haarnadelstruktur, bei dem der Gegenstrang über einen photospaltbaren Linker intramolekular verbunden ist (siehe **Abb. 16**). Im ersten Ansatz benutzen sie ein 12mer Gegenstrang, welcher über ein Nitrobenzyl-basierten photospaltbaren Linker mit einem 22mer AntimiR verknüpft ist. Vor Belichtung

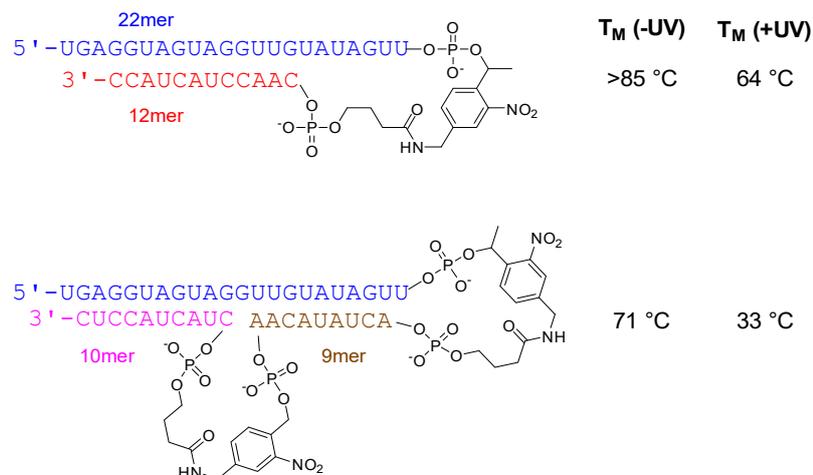


Abb. 16 Lichtaktivierbares AntimiR nach Dmochowski *et al.*^[97] Das 22mer 2'OMe-AntimiR (blau) ist mit einem photospaltbaren Linker (*ortho*-Nitrobenzyl) mit einem 12mer Gegenstrang (rot) verknüpft (oben). Zur Steigerung der Effizienz wurde der Gegenstrang auf ein 19mer (10mer (pink) + 8mer (braun)) verlängert, in dessen Mitte ein weiterer photospaltbarer Linker eingefügt wurde.

lag der Schmelzpunkt über 85 °C und nach UV-Licht Bestrahlung sank dieser auf 64 °C. *In vivo* Studien zeigten allerdings eine Hintergrundaktivität von 20% im geschützten Zustand. Zur Senkung der Hintergrundaktivität wurde der Gegenstrang auf 19 Nukleotide verlängert. Damit nach Photolyse eine effiziente Bindung der miRNA erfolgen konnte, wurde in die Mitte des 19mer Gegenstranges ein weiterer photospaltbarer Linker eingefügt. Dadurch wurde der Gegenstrang in zwei kleine Nucleinsäuren gespalten, die entweder bei Raumtemperatur dissoziieren oder von der miRNA verdrängt werden können. Schmelzpunktstudien zeigten, dass die Haarnadelstruktur mit zwei photospaltbaren Linker einen Schmelzpunkt von 71 °C hatte, welcher nach Belichtung auf 33 °C sank. Interessanterweise war

der Schmelzpunkt des Konstruktes mit dem 19mer Gegenstrang und zwei photospaltbaren Linker deutlich niedriger als der Schmelzpunkt des Konstruktes mit einem 12mer Gegenstrang. Die Lücke des photospaltbaren Linkers, der das 10mer mit dem 9mer verknüpft scheint die Stabilität deutlich zu senken. Das macht deutlich, dass die thermische Stabilität alleine kein Kriterium für die Verhinderung der Hybridisierung mit einer Haarnadelstruktur ist.

Zwei weitere Beispiele für lichtinduzierte Regulation von miRNA Stilllegung verwenden Sonden und werden im Kapitel 1.3.2.2 beschrieben.

1.3.2.2 Lichtaktivierbare Sonden

Durch die Verwendung von lichtaktivierbaren Sonden, können Zielnukleinsäure reguliert und gleichzeitig die Hybridisierung visualisiert werden. Dies gibt Informationen darüber, ob die Ziel-Nukleinsäure am Ort der Photolyse vorhanden ist.

Okamoto *et al.*^[137] verwendeten eine lichtaktivierbare, dual Thiazolorange-markierte Sonde. Dazu installierten sie zusätzlich auf der N^4 -Position von Thymidin eine photolabile *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (siehe **Abb. 17**) und bauten dies in ein 13mer poly-T Sequenz ein. Nach Zugabe der komplementären RNA konnte nur eine sehr geringe Fluoreszenz beobachtet werden, die nach Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe signifikant gesteigert werden konnte. Schmelzpunktstudien ergaben, dass die photolabile Schutzgruppe die Stabilität des Doppelstranges von 54 °C auf 22 °C reduzierte und somit eine Ausbildung des Doppelstranges bei Raumtemperatur zum Teil verhindert.

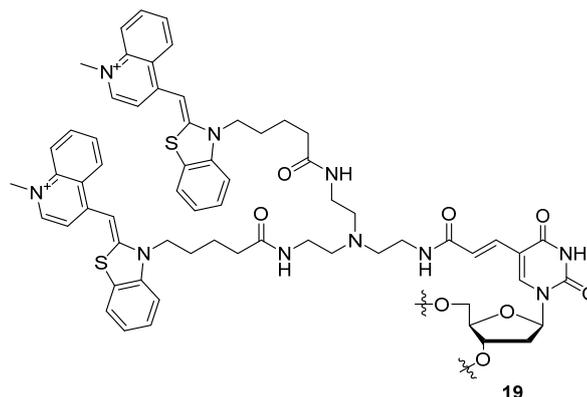


Abb. 17 Dual-Thiazolorange markierte ECHO-Sonde **19** mit einer photolabilen Schutzgruppe nach Okamoto *et al.*^[137]

Dmochowski *et al.*^[125] entwickelten eine lichtaktivierbare Nukleinsäure, um RNA aus hippocampalen Neuronen zu isolieren und bezeichneten dies als *TIVA tag (transcriptome in vivo analysis)*. Dazu synthetisierten sie ein 18mer 2'-Fluor poly-U RNA, welche über einen photospaltbaren Linker mit einem 14mer poly-A Gegenstrang verknüpft war, welcher in der Mitte einen zusätzlichen photospaltbaren Linker enthält (siehe **Abb. 18**). Am 5'-Ende des

Poly-U Stranges wurde ein Cy3 und am 3'-Ende ein Cy5 Fluorophor installiert, sodass in der intakten Haarnadelschleife ein FRET-Paar gebildet wird. Belichtung führt zur Dissoziation der Poly-A Gegenstränge, sodass bei Anregung von Cy3 keine Fluoreszenz von Cy5 mehr gemessen werden kann. An die Poly-U Sequenz kann dann der Poly-A-Schwanz von mRNA hybridisieren. Ein Biotin am 5'-Ende ermöglicht die Aufreinigung der gebundenen RNA durch Affinitätschromatographie. Zusätzlich wurde am 3'-Ende ein zellpenetrierendes Peptid (CPP) installiert, was eine nicht-invasive Aufnahme des Konstruktes ermöglicht. Der Vorteil diese Methode ist, dass die Zelle unter nativen Bedingungen bleibt und zudem die RNA durch die selektive Bestrahlung aus einzelnen Zellen isoliert werden kann. Ihre Ergebnisse zeigten, dass in einer einzigen Zelle des humanen Gehirns 5000 verschiedene Gene exprimiert werden, während über alle Zellen ~12500 verschiedene Gene exprimiert werden. Bei dieser Studie sei zu beachten, dass die Abnahme des FRET Effektes durch die Photolyse resultiert und nicht durch Bindung einer mRNA. Daher ist die Einordnung in die Kategorie der lichtaktivierbaren Sonden nicht korrekt, aber aufgrund der begrenzten Beispiele trotzdem hier aufgeführt.

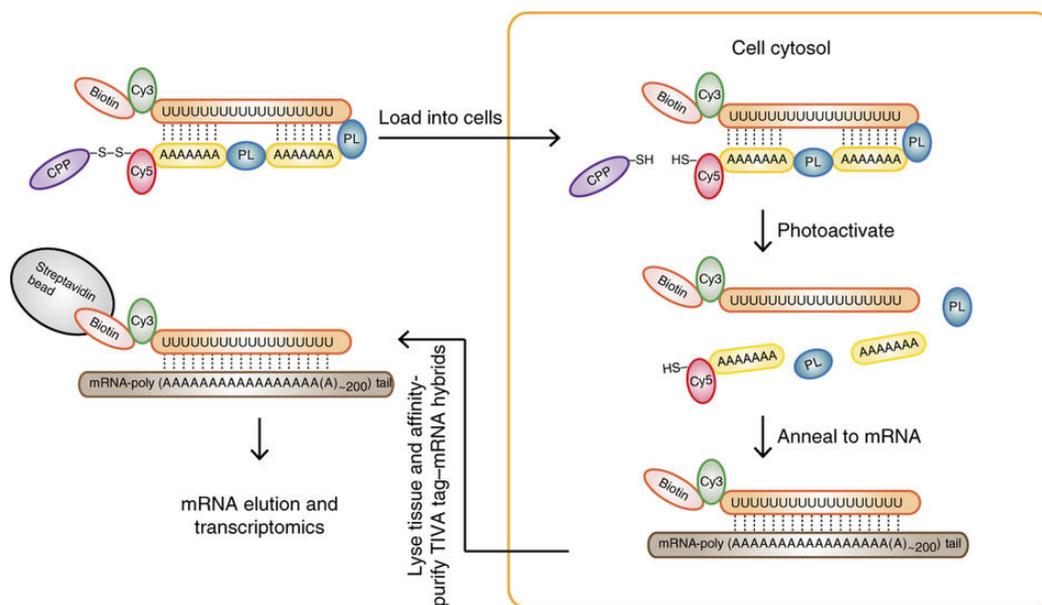


Abb. 18 Schematische Darstellung der Struktur und Funktion des *TIVA tag* nach Dmochowski *et al.*^[125] Das Konstrukt besteht aus einem 2'-Fluoro Poly-U Strang, der über einen photospaltbaren Linker (PL) mit einem Poly-A-Gegenstrang verbunden ist, der durch einen weiteren PL geteilt wird. Am 3'-Ende befinden sich ein Cy5 Fluorophor und ein zellpenetrierendes Peptid (CPP). Am 5'-Ende befindet sich ein Cy3 Fluorophor und ein Biotin. In der Zelle wird die Disulfid-Bindung, die das CPP mit dem Fluorophor verknüpft gespalten. Nach UV-Belichtung dissoziieren die Poly-A Gegenstränge und der Poly-A-Schwanz einer mRNA kann an die Poly-U Sequenz binden. Die mRNA kann mithilfe von Biotin über Affinitätschromatographie isoliert werden. Die Abbildung wurde entnommen aus Dmochowski *et al.*^[125]

Die am häufigsten verwendeten lichtaktivierbaren Sonden sind Molecular Beacons (MB, siehe **Abb. 6** und **Abb. 19**). Tan *et al.*^[138] publizierten 2011 als erstes einen lichtaktivierbaren Molecular Beacon (MB). Ein photospaltbarer Linker zwischen Fluorophor und Quencher wurde verwendet, um den Stamm mittels Click-Chemie zu zyklisieren (siehe **Abb. 19** oben). Durch die Zyklisierung sollte die Stamm-Schleife Struktur stabilisiert werden, sodass

erst nach Belichtung und Ziel-Nukleinsäure Bindung der MB geöffnet werden sollte. Allerdings zeigte der photogeschützte Molecular Beacon in Anwesenheit von der Ziel-Nukleinsäure bereits eine um Faktor ~ 6 gesteigerte Fluoreszenz. Nach Belichtung konnte die Fluoreszenz weiter um den Faktor ~ 3 gesteigert werden. Dies lässt vermuten, dass die Zyklisierung des Stamms nicht vollständig die Hybridisierung mit der Ziel-Nukleinsäure verhindert.

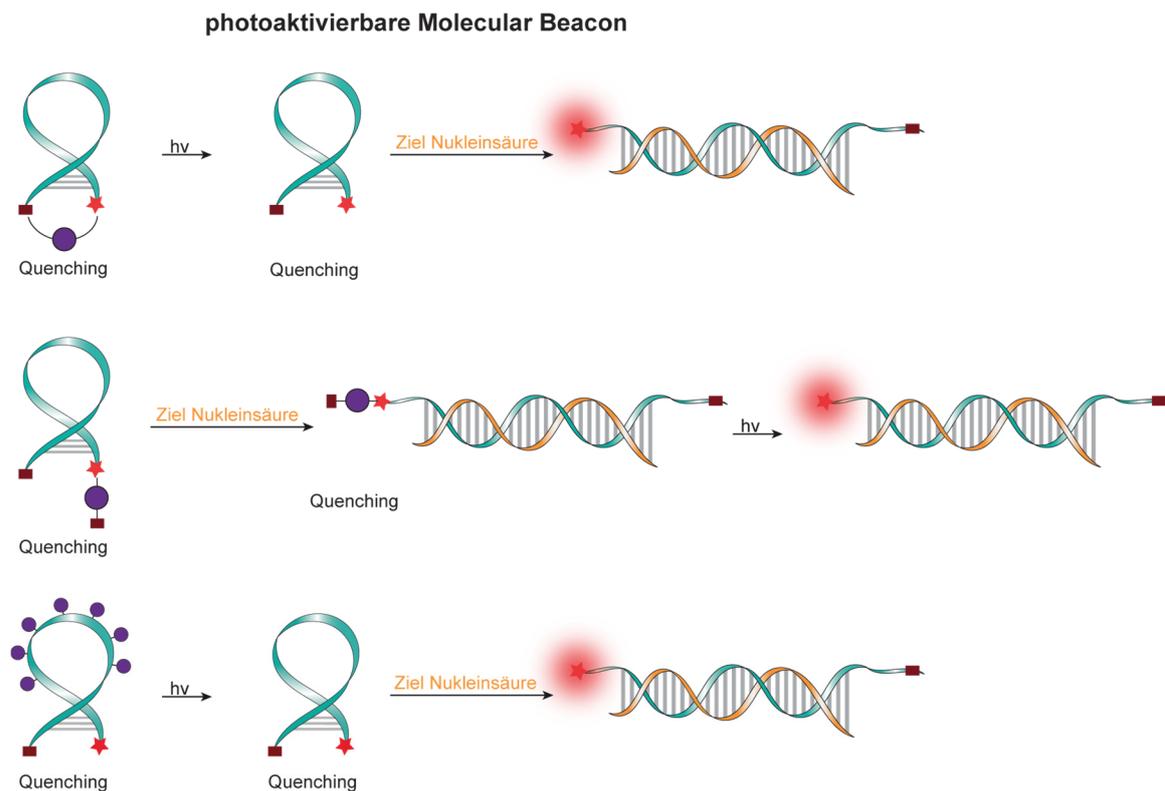


Abb. 19 Übersicht von Konzepten von lichtaktivierbaren Molecular Beacons.

Ein lichtaktivierbarer Molecular Beacon mit photolablen Schutzgruppen in der Schleifen-Region wurde von Heckel *et al.*^[119] 2012 publiziert (siehe **Abb. 19** unten). Ein Screening ergab, dass sieben photolabile Schutzgruppen des *ortho*-Nitrobenzol-Typs (NPE und NPP) auf den Nucleobasen notwendig waren, um die Hybridisierung der Schleifen-Region (19mer Schleife + 5mer Stamm) mit der Ziel-Nukleinsäure zu verhindern. Nach Belichtung bei 366 nm konnte in Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure die Fluoreszenz um den Faktor ~ 10 gesteigert werden. Der Vorteil dieses Konzeptes ist, dass die Hybridisierung mit der Ziel-Nukleinsäure vollständig verhindert wurde. Zudem wurde die Hybridisierung und nicht die Abspaltung der Schutzgruppen visualisiert.

In einer weiteren Studie verknüpften Heckel *et al.* einen zweiten Quencher über einen photospaltbaren Linker mit dem Fluorophor am Stamm eines Molecular Beacons (siehe **Abb. 19** Mitte).^[139] Im Vergleich zu einem Molecular Beacon mit photolablen Schutzgruppen in der Schleifen-Region, zeigt der MB ein effizienteres Quenching (Faktor

ca. 9). Nach Belichtung konnte ein 167-facher Fluoreszenzanstieg beobachtet werden. Bei diesem Konzept ist jedoch zu beachten, dass die Ziel-Nukleinsäure immer mit dem Molecular Beacon hybridisieren kann und den MB öffnen kann – auch ohne vorhergehende Belichtung. Dieses Konzept kann vielmehr dazu verwendet werden, den Einschützungsprozess zu visualisieren.

1.4 Reversible Lichtregulation von Nukleinsäuren mit Photoschaltern

1.4.1 Photoschalter und Photochromie

Photochromie bezeichnet die reversible Umwandlung einer chemischen Verbindung zwischen zwei Isomeren durch Bestrahlung mit Licht.^[140,141] Dabei ändern sich die Absorptionsspektren und die physikalischen Eigenschaften. Die Rückisomerisierung photochromer Moleküle (Photoschalter) kann durch Bestrahlung (P-Typ) oder auch durch thermische Energie (T-Typ) erfolgen.^[142] Bekannte photochrome Verbindungen, wie Azobenzole, Stilbene und Hemithioindigostilbene können zwischen *cis* und *trans* (bzw. *E/Z*) Isomeren geschaltet werden (siehe **Abb. 20**).^[106,142,143] Diarylethene, Spiropyrane, Fulgide und Fulgimide können zwischen einer offenen und geschlossenen Form isomerisiert werden.

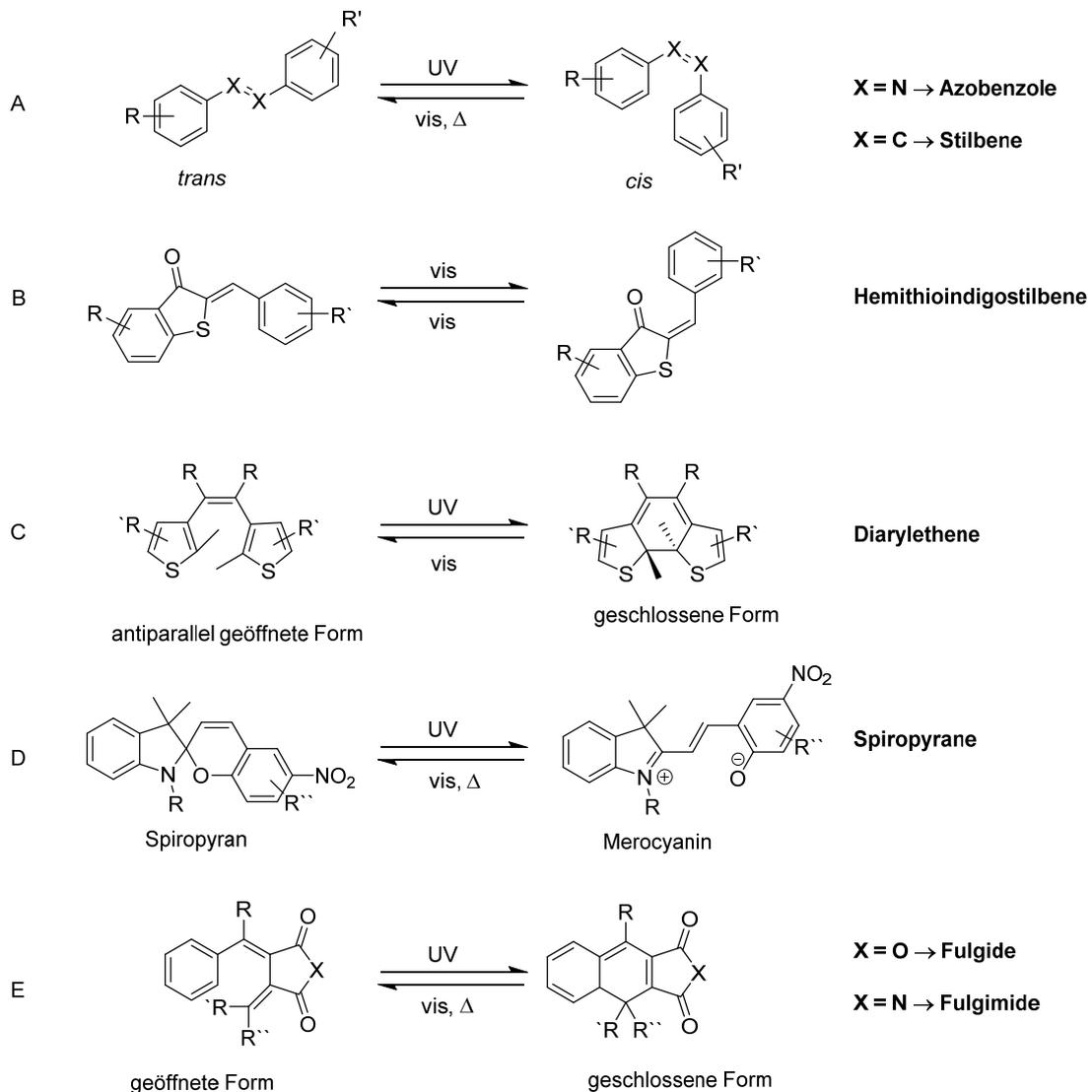


Abb. 20 Übersicht von Photoschaltern und deren Isomere.^[143] Azobenzole, Stilbene und Hemithioindigostilbene unterliegen einer lichtinduzierten *cis-trans* Isomerisierung, während Diarylethene, Spiropyrane, Fulgide und Fulgimide zwischen der geöffneten und geschlossenen Form geschaltet werden können.

Die isomeren Formen der einzelnen Photoschalter unterscheiden sich in ihrer Absorption, thermischen Stabilität, Größe, Polarität, Löslichkeit und chemischer Stabilität. 2016 wurde unter anderem B. L. Feringa mit dem Nobelpreis in Chemie für die Entwicklung molekularer Maschinen ausgezeichnet. Feringa *et al.* ^[144] verwendeten Photoschalter (*overcrowded alkenes*), um durch Bestrahlung mit Licht von Molekülen gerichtete Bewegung zu erzeugen.

Photoschalter können für die Regulation von Nucleinsäuren verwendet werden, um biologische Prozesse zu studieren oder manipulieren. Dabei kann ein Isomer die Bildung von Nucleinsäure Doppelsträngen oder Wechselwirkungen mit Proteinen verhindern bzw. fördern. Licht dient als Treibstoff für die Bewegung der Photoschalter, ist orthogonal zu den meisten Prozessen in der Zelle und kann mit hoher Zeit- und Ortsauflösung appliziert werden. Besonders Photoschalter, die mit Licht einer Wellenlänge über 300 nm angeregt werden sind kompatibel mit biologischen Systemen. Im Gegensatz zu photolabilen Schutzgruppen entstehen bei Belichtung von Photoschaltern keine abgespaltenen Produkte, die das zu untersuchende System beeinflussen können. Zudem kann durch die Reversibilität die Dynamik von Prozessen analysiert werden. Im Folgenden werden verschiedene Ansätze für die Regulation von Nucleinsäuren mit Photoschaltern beschrieben.

1.4.2 Photoschaltbare Nucleotide

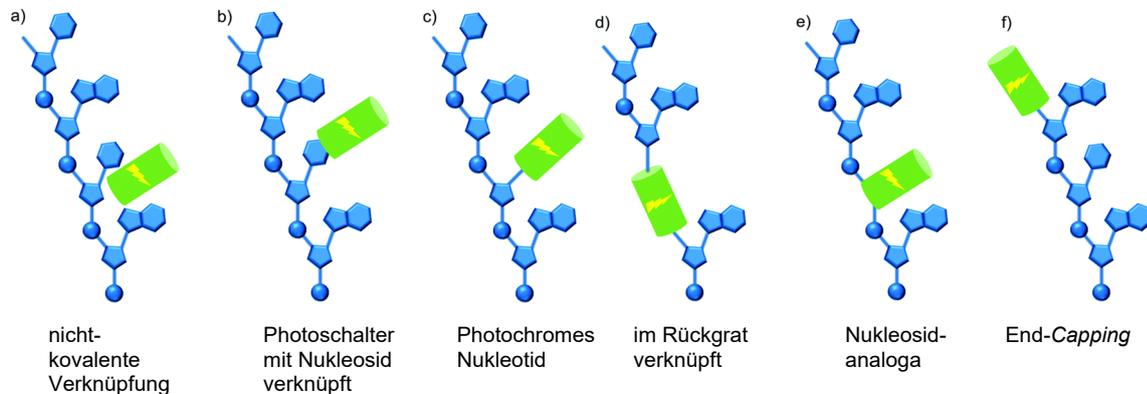


Abb. 21 Verschiedene Ansätze zur Lichtregulation von Nucleinsäuren mit Photoschaltern. Der Photoschalter kann eine Nucleinsäure durch nicht-kovalente Interkalation (a), Verknüpfung an einer Nucleobase (b), Substitution einer Nucleobase (c), Verknüpfung in das Rückgrat (d), Substitution eines (Desoxy-)Ribonucleotids (e) oder End-Capping (f) regulieren. Die Abbildung wurde entnommen aus Feringa *et al.* ^[145]

Es gibt viele Ansätze bei denen die Nucleobase Teil des Photoschalters ist. Ogasawara und Maeda erweiterten ein Desoxyguanosin an der C8-Position des Guanosins mit Alkenen, um eine photoschaltbare Nucleobase zu erhalten (siehe **Abb. 22**). ^[146–149] Sie synthetisierten Phenylvinyl-, Naphthylvinyl-, Fluorenylvinyl modifizierte Desoxyguanosine. Das C8-Phenylvinyl-Derivat zeigte die höchste Duplex Destabilisierung nach *trans*-zu-*cis* Isomerisierung. ^[147] Allerdings waren Wellenlängen von 254 nm zur Isomerisierung notwendig, was eine Anwendung im biologischen Kontext stark einschränkt. Die Vergrößerung des Chromophores zu Naphthylvinyl- und 8-Fluorenylvinyl-modifizierten Desoxyguanosinen

führte zu einer Rotverschiebung der Anregungswellenlänge, erniedrigte aber die Destabilisierungseffizienz. Letztere beide wurden verwendet um die GFP-mRNA-Translation^[149] oder die Faltung von einem G-Quadruplex^[148] zu regulieren.

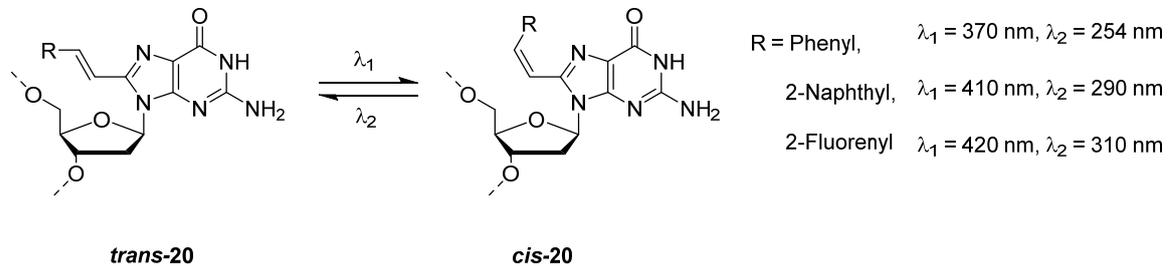


Abb. 22 Photoschaltbare Nucleobase nach Maeda *et al.*^[146] Die C8-Position von Desoxyguanosin wurde mit Phenylvinyl, Naphthylvinyl und Fluorenylvinyl substituiert, um einen Photoschalter des Stilben-Typs zu erhalten. **cis-20** kann auch in der *syn*-Konformation vorliegen (nicht gezeigt).

Cahová und Jäschke modifizierten 2'-Desoxyuridin an Position C5, um einen Diarylethenartigen Photoschalter zu erhalten (siehe **Abb. 23**), und insertierten zwei davon in die Promotorregion der T7 RNA Polymerase.^[150] Mit UV-Licht induziertem Ringschluss **22** steigerten sie die Transkriptionseffizienz im Vergleich zur geöffneten Form **21**. Eine Quantifizierung der Transkriptionsrate wurde nicht angegeben. Schmelzpunktstudien zeigten jedoch, dass ein 15mer DNA Duplex nur um 1,6 °C nach UV Bestrahlung destabilisiert werden konnte, wenn **21** terminal am 3'-Ende eines DNA Stranges eingebaut wird. Bei interner Einführung konnte durch Bestrahlung keine Änderung der Stabilität beobachtet werden. Dies schließt die Möglichkeit der lichtinduzierten, reversiblen Duplex Dissoziation und Assoziation aus.

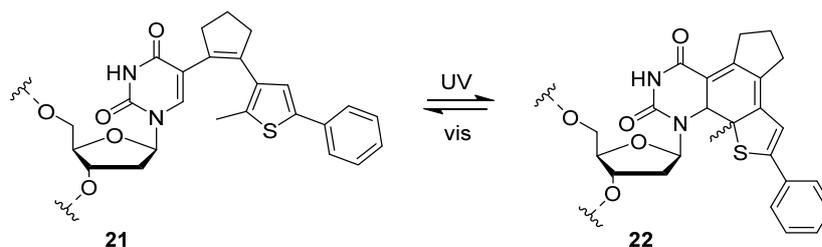


Abb. 23 Isomerisierung eines C5-Diarylethen modifizierten 2'-Desoxyuridin nach Cahová und Jäschke.^[151] Die geöffnete Form **21** hat ein Absorptionsmaximum bei 254 nm, kann aber auch durch Belichtung bei 366 nm in die geschlossene Form **22** überführt werden. Die geschlossene Form hat ein Absorptionsmaximum bei 507 nm.

Wagenknecht *et al.* verknüpften ein Diarylethen-Photoschalter über einen Alkin-Linker mit der 5'-Position von Desoxyuridin **23**.^[152] Bestrahlung mit UVB-Licht (310 nm) überführte die offene in die geschlossene Form. Die Rückisomerisierung erfolgte bei 450 nm. Im Kontext eines 17mer DNA Duplex zeigt, im Vergleich zur offenen Form, die geschlossene Form einen 3,8 °C niedrigeren Schmelzpunkt. Eine Erklärung für diese Beobachtung fehlt jedoch. Das-

selbe Konzept wurde für Spiropyrane **24** verwendet. Allerdings verloren diese ihre Schaltbarkeit, was ein häufig beobachtetes Phänomen von Spiropyranen in wässrigem Medium^[153,154] und an Nukleinsäuren konjugiert ist.^[155,156]

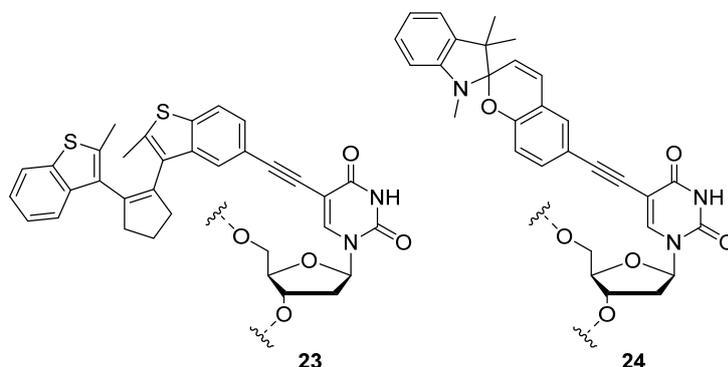


Abb. 24 Strukturen von C5-Photoschalter-modifizierten Pyrimidin-Basen nach Wagenknecht *et al.*^[152] Die linke Struktur zeigt ein Diarylethen-modifiziertes 2'-Desoxyuridin und die rechte Struktur zeigt ein Spiropyran-modifiziertes Desoxyuridin.

Verknüpfung von Photoschaltern an der C5-Position einer Pyrimidin-Base hat den Nachteil, dass der Photoschalter vermutlich in die große Furche zeigt und somit nur einen geringen Einfluss auf die Duplexstabilität ausübt, besonders wenn ein starrer Linker verwendet wird.^[145,157,158] Zudem können aromatische Substituenten an dieser Stelle den Duplex destabilisieren.^[159]

1.4.3 Azobenzol Photoschalter

Azobenzole sind die bekanntesten und am besten untersuchten Photoschalter.^[160–162] Sie bestehen aus zwei Phenylringen, die über eine Azo-Brücke miteinander verbunden sind (siehe **Abb. 25**). Im thermodynamischen Gleichgewicht liegt das unsubstituierte Azobenzol in der ($\sim 10\text{-}12 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) stabileren *trans*-Form vor.^[163–165] Die *trans* Form hat eine planare und unpolare Struktur mit einer Länge (Abstand C4-C4') von 9 Å.^[166,167] Das Absorptionsspektrum des *trans*-Isomers besitzt eine charakteristische Bande für einen Symmetrie-erlaubten $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergang bei 318 nm und eine schwächere Bande für einen Symmetrie-verbotenen $n\text{-}\pi^*$ Übergang bei 440 nm (siehe **Abb. 25**).^[163] Bestrahlung bei 320 nm überführt die *trans*-Form in das *cis*-Isomer. Das *cis*-Isomer ist gewinkelt (7° Diederwinkel CNNC)^[166], hat eine geringere Länge von 5,0 Å (Abstand C4-C4') und eine höhere Polarität (3 Debye).^[163,166] Die Rückisomerisierung zum *trans*-Isomer kann thermisch oder durch Bestrahlung in die $n\text{-}\pi^*$ -Absorptionsbande bei 430 nm erfolgen.^[168] Aufgrund der überlappenden Absorptionsspektren kann das Azobenzol durch Bestrahlung nicht vollständig in die *cis*- oder *trans*-Form überführt werden.^[160] Das unsubstituierte Azobenzol kann durch UV-Bestrahlung zu 80% in die *cis*-Form überführt werden, während Bestrahlung mit sichtbarem Licht bis zu 95% die *trans* Form anreichert. Durch thermische Energie kann eine vollständige *cis*-zu-*trans* Isomerisierung erreicht werden. Die Halbwertszeit bei Raumtemperatur

liegt bei zwei Tagen.^[162] Die photochemischen und physikalischen Eigenschaften können durch Substitution stark verändert und somit an die entsprechenden Anforderungen angepasst werden.^[162,169] Woolley *et al.* und Hecht *et al.* z.B. zeigten, dass durch *ortho*-Methoxy oder *ortho*-Fluor Substituenten eine Rotverschiebung der Absorptionsmaxima erzielt werden konnte, sodass vollständig auf UV-Licht verzichtet werden konnte.^[170–173]

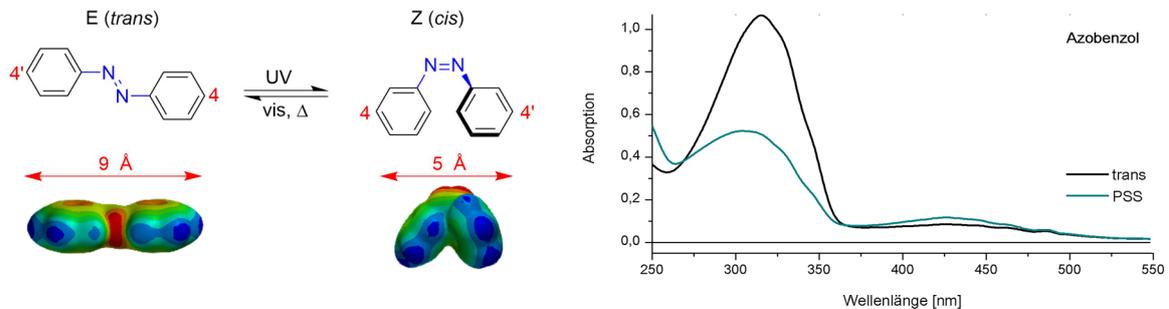


Abb. 25 Isomerisierung von Azobenzol (links) von *E* (*trans*) nach *Z* (*cis*) durch Bestrahlung mit UV-Licht (links unten). Die Rückisomerisierung kann durch Belichtung mit sichtbarem Licht oder mit thermischer Energie erfolgen. Die Berechnung der Elektronendichte (mit Spartan HF 3-21G*) zeigt, dass das *trans* Azobenzol eine planare und unpolare Struktur hat, während das *cis* Azobenzol leicht verdreht ist und dadurch ein höheres Dipolmoment hat (für die Berechnung der Elektronendichte des *cis* Isomers wurde der Diederwinkel auf 7° fixiert). Die charakteristischen Absorptionsspektren der *cis* (PSS) und *trans* Isomere sind rechts gezeigt. Das UV/vis Absorptionsspektrum wurde in Methanol und von Dr. Sabrina Steinwand aufgenommen.

1.4.4 Azobenzole zur Regulation von Nukleinsäuren

Azobenzole sind aufgrund ihrer einfachen Darstellbarkeit, der hohen Isomerisierungsquantenausbeute, der hohen Photostabilität und des schnellen Isomerisierungsprozesses bei weitem, die am meisten verwendeten, Photoschalter für die Regulation von Biomolekülen.^[145,160] Neben der Lichtregulation von Peptiden,^[143,160,174] Proteinen^[143,160] und Lipiden,^[160] werden Azobenzole vorwiegend für die Regulation von Nukleinsäuren auf verschiedenste Arten (siehe **Abb. 21**) verwendet.

In den meisten Ansätzen wird sich dabei zu Nutzen gemacht, dass das *trans*-Azobenzol planar und unpolar ist und somit effizient in den Basenstapel eines Nukleinsäuredoppelstrangs interkalieren und diesen durch π - π -Wechselwirkungen stabilisieren kann. Das *cis*-Azobenzol ist helikal verdreht, kann somit nicht mehr interkalieren und hat einen höheren sterischen Anspruch. Dadurch stört es die Watson-Crick-Basenpaarung und π - π -Wechselwirkungen der benachbarten Nukleotide.

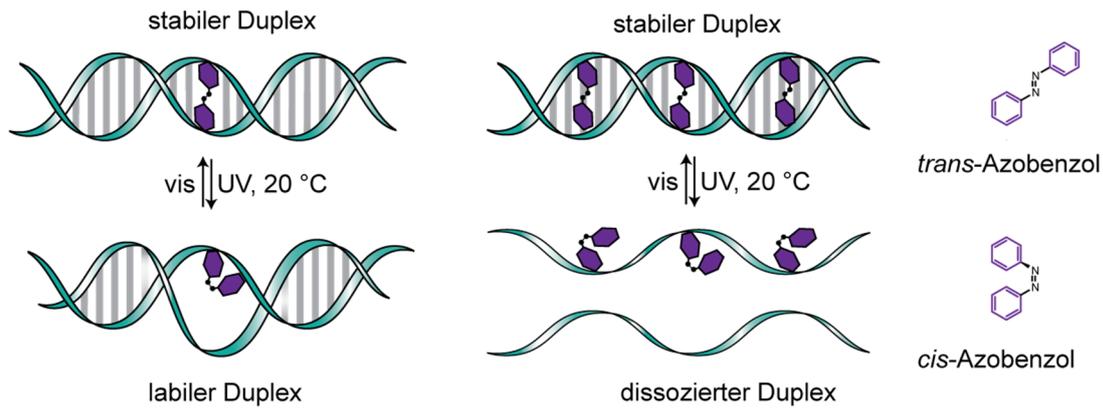


Abb. 26 Schematische Darstellung der reversiblen, lichtinduzierten Doppelstrang (De-)Stabilisierung (links) und Duplex Dissoziation/Assoziation (rechts) mit Azobenzolen. Das unpolare und planare *trans*-Azobenzol kann in den Basenstapel interkalieren und durch π - π -Wechselwirkungen mit den benachbarten Basen den Doppelstrang stabilisieren. Bestrahlung mit UV-Licht isomerisiert das Azobenzol in die *cis*-Form. Dies ist gewinkelt, benötigt mehr Raum und destabilisiert dadurch den Duplex. Mehrere Azobenzole sind notwendig, um einen Duplex bei Raumtemperatur reversibel zu dissoziieren und assoziieren. Andere Wechselwirkungen von Azobenzolen mit einem Doppelstrang sind auch möglich.

Azobenzole können zum Beispiel durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mittels Interkalation ein Duplex stabilisieren. Es wurde gezeigt, dass ein Guanidinium-modifiziertes Azobenzol (**AzoDiGua 25**) die Duplexstabilität einer DNA reversibel mit Licht regulieren kann (siehe **Abb. 27** links).^[175] Im *trans*-Zustand können die Guanidinium-Reste an gegenüberliegende Seiten des Phosphatrückgrats binden. Durch die Interkalation des Azobenzols wird der Duplex stabilisiert. Nach *trans*-zu-*cis* Isomerisierung kann das Azobenzol nicht mehr interkalieren und der Doppelstrang wird destabilisiert. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie sequenzunspezifisch ist, was eine Anwendung im biologischen Kontext sehr stark einschränkt.

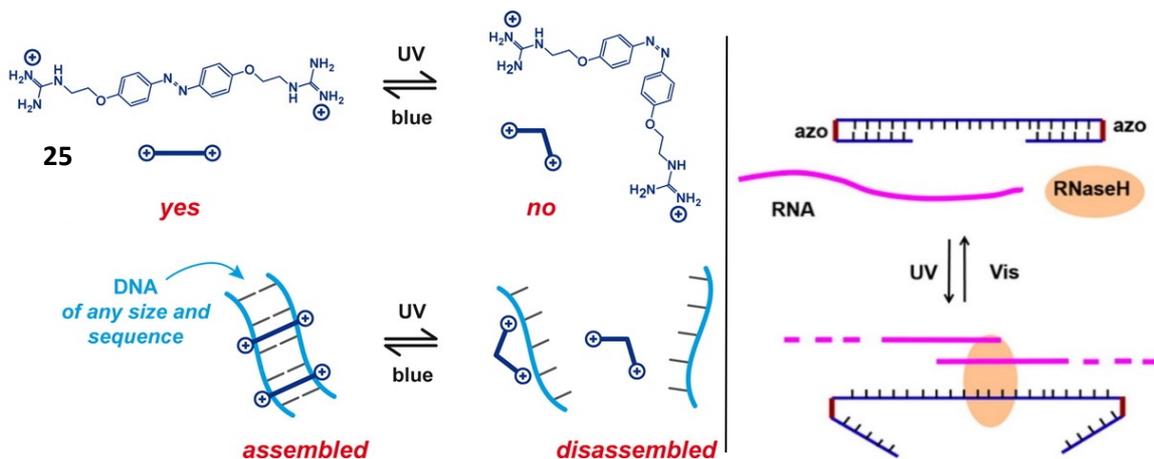


Abb. 27 Struktur von Azobenzol bis-Guanidinium (**AzoDiGua 25**) als Ligand zur Regulation der Duplexstabilität von DNA (links).^[175] Die Guanidinium-Reste binden an das Phosphatrückgrat. Das *trans*-Azobenzol kann interkalieren und somit den Duplex stabilisieren, während das *cis*-Azobenzol nicht interkalieren kann. Abbildung entnommen aus Baigl *et al.*^[175] Lichtregulation von RNA Verdau mit 4,4'-bis(Hydroxymethyl)-Azobenzol (rechts) im Rückgrat einer DNA Hantel.^[176] Im *trans*-Zustand kann eine stabile Haarnadelschleife ausgebildet werden. Durch UV-Licht induzierte *trans*-zu-*cis* Isomerisierung wird die Schleife geöffnet und ein RNA Strang kann nach Hybridisierung mit der DNA durch RNaseH verdaut werden. Die Abbildung wurde entnommen aus Tang *et al.*^[176]

Die meisten Ansätze zur reversiblen lichtgesteuerten Duplex (De-)Stabilisierung verknüpfen Azobenzole kovalent mit der Nukleinsäure. Azobenzol Photoschalter können z.B. in das Phosphat-Rückgrat eingebaut werden (siehe **Abb. 21** und **Abb. 27** rechts). Für die Regulation eines intermolekularen Doppelstranges ist die Modifizierung am Rückgrat ungeeignet.^[177] Haarnadel-Strukturen können dadurch allerdings effektiv reguliert werden, indem das Azobenzol in die Schleife eingebaut wird.^[176,178,179] Während im *trans*-Zustand eine stabile Haarnadelschleife ausgebildet werden kann, ist die Stabilität der Sekundärstruktur im *cis*-Zustand stark reduziert. Tang *et al.*^[176] regulierten mit diesem Ansatz den Verdau von RNA mit einer photoschaltbaren Hantel (siehe **Abb. 27** rechts). Heckel *et al.*^[180] zeigten, dass neben Haarnadelstrukturen auch G-Quadruplexstrukturen mit Azobenzolen im Rückgrat reguliert werden können. Der Vorteil von Rückgrat verknüpften Azobenzolen ist, dass wenige Azobenzole eine Struktur stark destabilisieren können. Der Nachteil ist jedoch, dass die Anwendung auf spezielle Sekundärstrukturen beschränkt ist.^[145]

1.4.4.1 Azobenzole mit der Nukleobase verknüpft

Azobenzole können direkt mit der Nukleobase oder der (Desoxy)ribose auf verschiedene Arten verknüpft werden (siehe **Abb. 28**). Dadurch wird die spezifische Sequenz nicht manipuliert. Ein Nachteil kann jedoch sein, dass das Azobenzol in die große oder kleine Furche zeigt^[145,157,158] und dadurch wenig Einfluss auf die Duplexstabilität ausübt.

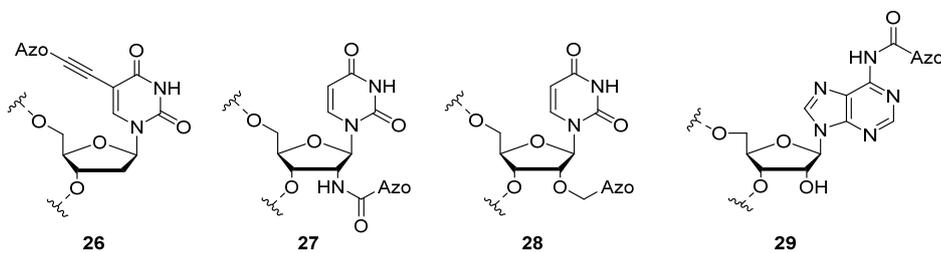


Abb. 28 Strukturen von Azobenzol-modifizierten Nucleotiden. Das Azobenzol kann mit verschiedenen Linkern mit der (Desoxy-)Ribose oder mit der Nukleobase verknüpft werden.

Obika *et al.*^[181–183] nutzen diesen Effekt und verknüpften ein Azobenzol an der C5-Position von 2'-Desoxyuridin **26** (siehe **Abb. 28**). Im *trans*-Zustand sollte das unpolare Azobenzol die Hydratisierung der großen Furche, sowie die Kation-Wechselwirkung zwischen den Strängen stören und somit den DNA Doppelstrang destabilisieren. Die mehr polare und kompaktere *cis*-Form sollte dagegen den Doppelstrang nicht destabilisieren.^[181–183] Der Einbau von **26** führte generell zu einer Destabilisierung eines 12mer DNA Doppelstranges um 3 °C, die im *trans*-Zustand um zusätzliche 2 °C erniedrigt werden konnte.

Keiper und Vyle^[184] verknüpften ein Azobenzol über eine Amidbindung an der 2'-Position einer Ribose (**27**, siehe **Abb. 28**) und konnten durch Bestrahlung mit Licht die Aktivität eines Desoxyribozyms um 50% reduzieren. Asanuma *et al.*^[185] verknüpften das Azobenzol

an die 2'-OH Gruppe von Uridin **28** und zeigten damit lichtinduzierte Duplex(de)stabilisierung. Ein photoschaltbares Aptamer konnte durch Verknüpfung eines Azobenzols an das exozyklische Amin eines Adenosin **29** erreicht werden.^[186] Dies wurde sogar (als entsprechendes Triphosphat) in der Transkription anstelle von ATP als Substrat akzeptiert.

1.4.4.2 Azobenzole als Nukleosidanaloga

Für die meisten Anwendungen von photoschaltbaren Nukleinsäuren wurden Azobenzole mit azyklischen Linker mit der Nukleinsäure verknüpft. Eine Übersicht der verschiedenen Linker ist in **Abb. 29** dargestellt.

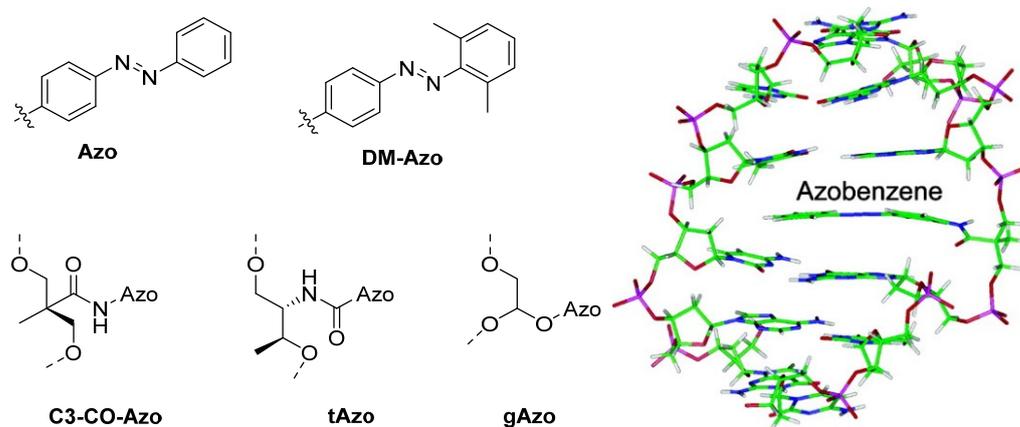


Abb. 29 Übersicht verschiedener Linker für den Einbau von Azobenzolen in Nukleinsäuren (links).^[187] Struktur von (**R**)-**C3-CO-Azo** im 6mer DNA Duplex mit 5'-CGAXGTC-3' mit dem „wedge Motiv“ (Vorwärtsstrang: 5'-CGAXGTC-3'; Rückwärtsstrang: 5'-GACTCG-3') (rechts).^[188] Das *trans*-Azobenzol interkaliert zwischen die benachbarten Basen. Die Struktur wurde mittels NMR Spektroskopie aufgeklärt. Abbildung entnommen aus Asanuma *et al.*^[188]

Die Pionierarbeit zu diesem Thema wurde 1998 von Asanuma und Komiyama *et al.*^[189] geleistet. Sie verwendeten 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionsäure als Linker (**C3-CO**; siehe **Abb. 29**) zum Einbau eines Azobenzols in DNA und zeigten damit effiziente Duplex (De-)Stabilisierung mit Licht.^[189–192] Das unpolare und planare *trans*-Azobenzol interkaliert in den Basenstapel und kann durch π - π -Wechselwirkungen einen DNA Duplex stabilisieren (siehe **Abb. 25**). Das *cis*-Azobenzol ist dagegen gewinkelt und stört durch den sterischen Anspruch die umliegenden Basenpaarungen, wodurch die Duplexstabilität erniedrigt wird.

Ein entscheidender Nachteil von C3-CO als Linker ist, dass bei der Synthese ein Diastereomerenmisch erhalten wird, welches aufwändig per HPLC getrennt werden musste.^[189,193] Da eine rechtsgängige B-DNA Struktur chiral ist, muss der Linker auch die passende Konfiguration besitzen, um effektiv in den Basenstapel zu interkalieren und nicht in die große oder kleine Furche zu zeigen.^[187] Deswegen wurde ein neuer und bislang der am häufigsten verwendete Linker D-Threoninol (**tAzo**) entwickelt.^[145,194]

Das Azobenzol kann mit verschiedenen Motiven in einen Doppelstrang eingebaut werden (siehe **Abb. 30**).^[187,195,196]

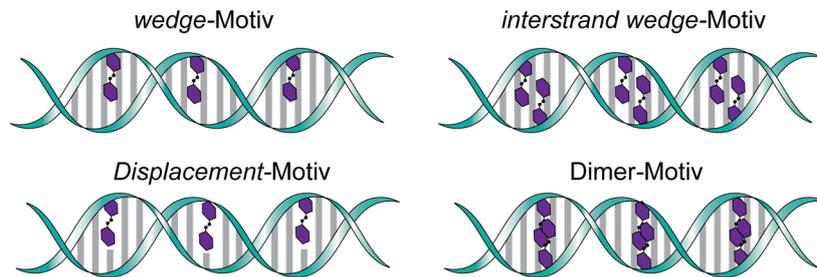


Abb. 30 Motive zum Einbau von Linker-Azobenzol Systemen. Im „*wedge* Motiv“ ist das Azobenzol zusätzlich in den Doppelstrang eingebaut. Im „*Displacement* Motiv“ ersetzt das Azobenzol eine Nukleobase. Sind Azobenzole in beiden Strängen zusätzlich eingebaut wird unterschieden, ob sie direkt benachbart sind („*Dimer* Motiv“) oder ob zwischen den Azobenzolen ein natürliches Basenpaar ist („*interstrand wedge* Motiv“).

Das „*wedge* Motiv“ bezeichnet den zusätzlichen Einbau des Azobenzols in einen Strang eines Doppelstrangs. Der Azobenzol-modifizierte Strang ist dadurch länger ($N+1$) als der unmodifizierte Gegenstrang. Das Azobenzol schiebt sich dabei wie ein Keil (engl. *wedge*) zwischen die natürliche Basenpaarung und kann im *trans*-Zustand durch π - π -Wechselwirkungen ein Duplex stabilisieren. Lichtinduzierte *trans*-zu-*cis* Isomerisierung reduziert die Stabilität des Doppelstranges stark. Das „*wedge* Motiv“ ist das am häufigsten verwendete Motiv mit **tAzo**. Für ein 8mer DNA Duplex konnte durch *trans*-zu-*cis* Isomerisierung eine Destabilisierung von 14,3 °C erzielt werden.^[194] Im Vergleich zum nativen Duplex erhöht der *trans*-Zustand den Schmelzpunkt um 4,3 °C. Eine reversible Assoziierung und Dissoziierung bei Raumtemperatur scheint mit diesem Motiv allerdings nicht möglich zu sein. Selbst neun **tAzo**-Modifikationen in einem 20mer DNA konnte nach *trans*-zu-*cis* Isomerisierung den Schmelzpunkt nur auf 32 °C senken. Der Einbau weiterer Azobenzole ist nicht möglich, da zwischen jedem **tAzo** zwei natürliche Basenpaare vorhanden sein müssen, um signifikante Destabilisierung (im *trans*-Zustand) zu vermeiden.^[197,198]

Befindet sich das Azobenzol gegenüber einer natürlichen Base und formt somit ein *mis-match* (zu Deutsch: Fehlbasenpaarung), wird das Konstrukt als „*Displacement* Motiv“ bezeichnet. In diesem Fall haben beide Stränge dieselbe Länge des Rückgrats. Im Falle von **tAzo** wird dieses Motiv nur selten verwendet, da der Effekt der reversiblen Doppelstrang (De-)Stabilisierung geringer als beim „*wedge* Motiv“ ist.^[199]

Für den Fall, dass keine nativen Gegenstränge gebunden werden soll, können Azobenzole in beide Stränge des Duplexes eingebaut werden:

Der Einbau von gegenüberliegenden, aber nicht nebeneinanderliegenden Azobenzolen im „*wedge* Motiv“ wird als „*interstrand wedge* Motiv“ bezeichnet (siehe **Abb. 30**). Im Falle von

trans-tAzo ist der modifizierte Doppelstrang dabei deutlich stabiler als ein nativer Doppelstrang mit gleicher Sequenz.^[200,201] NMR- und CD-spektroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass die Struktur einem nativen Duplex gleicht. Interessanterweise ist sogar die Duplexspezifität erhöht und Fehlbasenpaarungen führen zu einer erhöhten Stabilitätsniedrigung.^[201] UV-Bestrahlung führt (je nach Anzahl der Azobenzole) zu einer starken Duplex-Destabilisierung, sodass lichtinduziert ein 6mer Doppelstrang mit sechs **DM-tAzo** (insgesamt 12mer; siehe **Abb. 29** und **Abb. 32**) vollständig assoziiert und dissoziiert werden konnte.^[200] Dazu musste allerdings die UV-Bestrahlung bei 70 °C durchgeführt werden. Bei 37 °C dissoziierten die Doppelstränge nur zu 59%. **DM-tAzo** ist im Vergleich zu **tAzo** effektiver in der Doppelstrang (De-)Stabilisierung und besitzt eine höhere thermische Stabilität des *cis*-Zustands.^[202]

Liegen die Azobenzole aus beiden Strängen nebeneinander dimerisiert vor, wird das Konstrukt als „Dimer Motiv“ bezeichnet. Dabei können die gegenüberliegenden Azobenzole *stacking* Wechselwirkungen ausbilden und somit einen Duplex enorm stabilisieren.^[187,195] Aufgrund der zusätzlichen Wechselwirkung zwischen den Azobenzolen, kann mit diesem Motiv der stabilste Duplex erreicht werden.

Asanuma *et al.*^[203] verwendeten **tAzo** um die Transkriptionsrate der T7 RNA Polymerase mit Licht zu regulieren. Durch den Einbau von zwei D-Threoninol verknüpften Azobenzolen (**tAzo**, im „wedge Motiv“) in die Protomorregion der T7 RNA Polymerase, konnte nach UV-Bestrahlung die Transkriptionsrate um den Faktor 6-10 gesteigert werden.^[203] Im *trans* Zustand interkalieren die Azobenzole und führen dadurch zu einer kleinen strukturellen Änderung, welche die Bindungseffizienz der Polymerase erniedrigt (siehe **Abb. 31**).^[203,204]

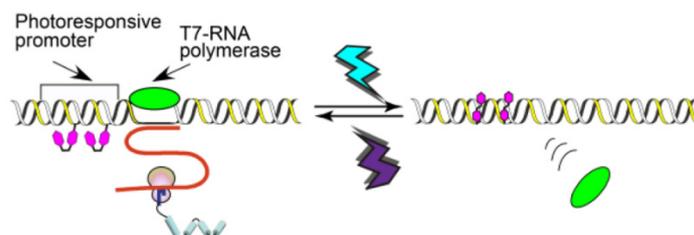


Abb. 31 Illustration der reversibel photoschaltbaren Genexpression mit zwei **tAzo** (bzw. **S-DM-tAzo**) in der Promotorregion der T7 RNA Polymerase. Im *trans*-Zustand interkalieren die Azobenzole und die Polymerase kann nicht an die Promotorregion binden. Im *cis*-Zustand sind die Azobenzole außerhalb des Duplexes, die RNA wird transkribiert und GFP exprimiert. Die Abbildung wurde entnommen aus Asanuma *et al.*^[205]

In der *cis*-Form dreht sich das Azobenzol aus dem Duplex, sodass die Struktur sehr ähnlich zu einer nativen ist. Folglich kann die Transkription stattfinden. Bei der Genexpression von GFP (*green fluorescent protein*) erwies sich die Bestrahlung bei 360 nm zur *trans*-zu-*cis* Isomerisierung als Nachteil.^[205] Durch Substitution der *para*-Position des distalen Rings des Azobenzols mit Methylthio-Gruppen, wurde ein *push-pull* System erhalten, welches bathochrom verschobene Anregungswellenlängen ($\lambda > 400$ nm) hat. Allerdings wurde

dadurch auch die thermische Stabilität des *cis*-Isomers stark erniedrigt. Durch Einführung von Methyl-Substituenten an der *ortho*-Position des distalen Rings konnte diese thermische Destabilisierung kompensiert werden. Mit dem modifizierten **S-DM-tAzo** (siehe **Abb. 32**) konnte eine effiziente lichtregulierbare Genexpression von GFP gezeigt werden.

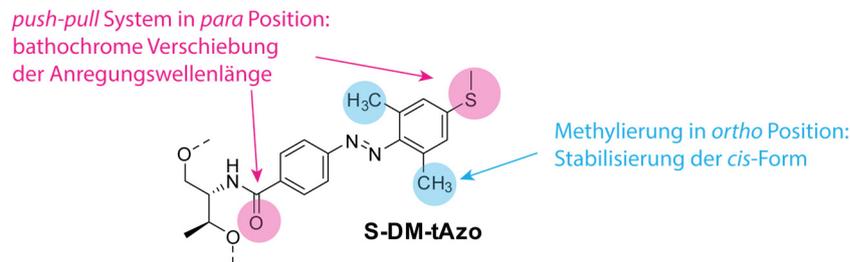


Abb. 32 Struktur von **S-DM-tAzo**. Die Einführung eines *push-pull* Systems führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsspektrums.^[160,173,205] Um die reduzierte thermische Stabilität nach Einführung des *push-pull* Systems zu kompensieren, wurden in *ortho*-Position Methylgruppen eingeführt.^[202,205] Abbildung nachgezeichnet von Liang et al.^[187] und Asanuma et al.^[195]

In weiteren Studien wurde **tAzo** verwendet um RNaseH Aktivität,^[206] Ligationseffizienz^[207] und RNA Verdau^[208,209] mit Licht zu regulieren. Auch im Bereich der DNA Nanoarchitektur wurde **tAzo** mehrfach erfolgreich verwendet.^[145,187,195,210] Photoschalter haben den Vorteil, dass keine zusätzlichen Stränge oder Reagenzien benötigt werden, sondern Licht allein als „Treibstoff“ für molekulare Bewegungen dient.

Ein Nachteil von **tAzo** im „*wedge* Motiv“ ist, dass die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung im Duplex bei Raumtemperatur nur zu 20-55% abläuft.^[187,198,199,203,204,206,211,212] Dies erfordert einen mehrfachen Einbau von **tAzo**, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Mit erhöhter Temperatur, nahe des Schmelzpunktes des Duplex, kann eine vollständige Isomerisierung stattfinden. Häufig erlauben biologische Anwendungen jedoch nicht die Veränderung der Temperatur. Interessanterweise, erfolgt die Rückisomerisierung zum *trans*-Isomer annähernd quantitativ nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht.^[187,199,211] Eine mögliche Erklärung dazu liefert Ginger *et al.*^[212,213], indem er die Sequenz- und Temperaturabhängigkeit der Isomerisierung-Quantenausbeuten bestimmt. Er folgerte, dass die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung nach dem Rotations- oder *Hula-Twist*-Mechanismus abläuft (siehe **Abb. 33**).^[213] Die Isomerisierungen mit diesen Mechanismen benötigen mehr freien Raum, sodass die benachbarten Nukleobasen die Rotation der Phenylringe behindern. Durch Erhöhung der Temperatur nahe des Schmelzpunktes steigt die Quantenausbeute der *trans*-zu-*cis* Isomerisierung stark an. Die thermische Energie führt zum Aufschmelzen des Duplexes und die erhöhte thermische Bewegung der benachbarten Basen (im Einzelstrang) generiert zusätzlich freien Raum. Die thermische *cis*-zu-*trans* Rückisomerisierung kann über den Inversionsmechanismus ablaufen. Dieser Mechanismus benötigt weniger freien Raum, weshalb die *cis*-zu-*trans* Isomerisierungs-Quantenausbeute nicht sequenzabhängig ist. Eine

weitere Erklärung ist, dass die sterisch anspruchsvolle *cis*-Form den Duplex bereits lokal auflockert, sodass eine Isomerisierung ungehinderter ablaufen kann.

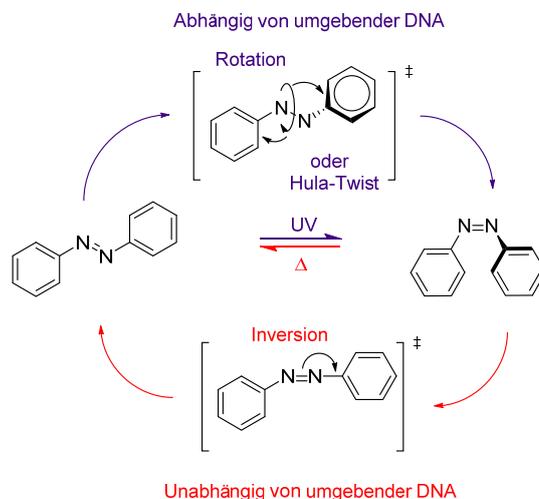


Abb. 33 Schematische Darstellung des Rotations- und *Hula-Twist*-Mechanismus zur *trans*-zu-*cis*-Isomerisierung, sowie der Inversions-Mechanismus zur thermischen *cis*-zu-*trans* Isomerisierung.^[213] Im Rotationsmechanismus findet eine Drehung der Phenylringe um die N-N-Bindung statt. Die Torsion benötigt freien Raum und ist dadurch abhängig von der umgebenden Struktur. Im Inversions-Mechanismus findet eine Inversion in der Ebene des NNC Winkels statt. Die Phenylringe bewegen sich in einer Ebene aufeinander zu. Abbildung nachgezeichnet von Ginger *et al.*^[213]

Liang *et al.* verwendeten ein Glycerol verknüpftes Azobenzol (**gAzo** bzw. **DM-gAzo** siehe **Abb. 29**) in DNA und zeigten damit effiziente Duplex (De-)Stabilisierung sowie Strangverdrängung bei Raumtemperatur.^[214,215] Die flexiblere Ether-Bindung und der kürzere Linker sollen der Grund für die bessere Isomerisierung sein. Allerdings führt der Einbau von **gAzo** generell, also auch im *trans*-Zustand, zu einer Destabilisierung des Doppelstranges.

1.5 Chemische Synthese von Nukleinsäuren

Viele biologische Prozesse beruhen auf der Wechselwirkung von Nukleinsäuren. Dies kann durch die Erkennung einer definierten Struktur oder der Hybridisierung mit weiteren Nukleinsäuren erfolgen. Zur Untersuchung, Kontrolle und Manipulation dieser Funktionen können Nukleinsäure modifiziert werden. Neben dem Einbau von modifizierten Nukleotiden mit enzymatischen Methoden, spielt die Festphasensynthese von Oligonukleotiden eine entscheidende Rolle. Die Festphasensynthese hat den Vorteil, dass Reagenzien im starken Überschuss eingesetzt werden können, da diese in einem Waschschrift entfernt werden können. Die Festphasensynthese geht zurück auf Merrifield, der 1963 die Synthese von Polypeptiden an Trägermaterial etablierte.^[216] Letsinger publizierte 1965 die erste Festphasensynthese von Oligonukleotiden nach der Phosphordiester-Methode.^[217] Eine einzelne Kupplung dauerte allerdings mehrere Tage. 1975 verbesserte Letsinger *et al.*^[218] die Kupplungseffizienz durch die Verwendung einer Phosphor(III)-Spezies. Ein Nachteil dieser Methode war, dass das reaktive Chlorphosphit sauerstoff- und hydrolyseempfindlich ist. Beaucage und Caruthers entwickelten 1981 die Phosphoramidit-Methode, die bis heute die häufigste verwendete Methode ist.^[219] Phosphoramidite (siehe **Abb. 34**) sind gegen Luft und Hydrolyse stabil und haben nach Aktivierung eine hohe Reaktivität. Um Nebenreaktionen auszuschließen, benötigen die Nukleotide an der 5'-Position eine säurelabile Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) und für RNA^[220] noch eine Silyl-basierte Schutzgruppe an der 2'-Position. Zusätzlich sind die exozyklischen Amine der Nukleobasen basenlabil geschützt. Die verschiedenen Schutzgruppen (säurelabil, basenlabil, fluorid-labil) ermöglichen dabei eine selektive bzw. sequentielle Abspaltung.

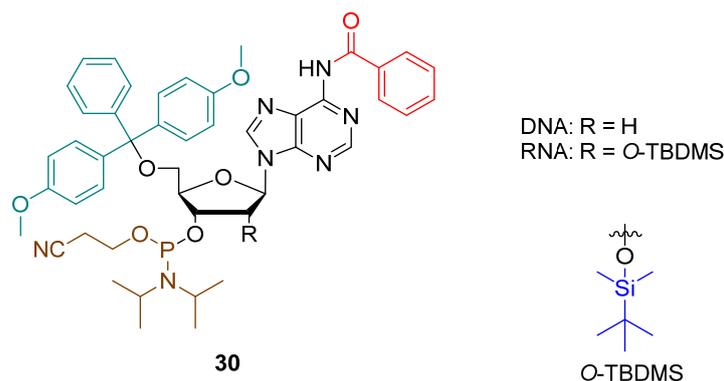


Abb. 34 Geschütztes Phosphoramidit **30** zur Verwendung in der Festphasensynthese nach dem Phosphoramidit-Verfahren.

Der vollständige Zyklus der Phosphoramiditsynthese ist in **Abb. 35** dargestellt. Das erste Nukleotid ist am 3'-Ende mit der festen Phase (CPG^[221] „*controlled pore glas*“ oder Polystyrol^[222]) verknüpft. Im ersten Schritt wird die 5'-O-DMTr-Schutzgruppe mit Dichloressigsäure

in Dichlormethan entfernt. Das zu kuppelnde Phosphoramidit wird mit einem Tetrazol-Derivat aktiviert. Häufig verwendete Aktivatoren sind Ethylthio-Tetrazol (ETT) oder Benzylthio-Tetrazol (BTT). Nach der Reaktion des aktivierten Nukleotides mit der freien 5'-OH Gruppe des Oligonukleotides auf der festen Phase findet ein *Capping* Schritt statt. Dabei wird z.B. Essigsäureanhydrid verwendet, um die nicht reagierten 5'-OH Gruppen zu schützen. Dadurch können diese nicht weiter in der Verlängerung des Oligonukleotides teilnehmen. Die neu geknüpfte Phosphor(III)-Bindung wird mit Iod zum Phosphat oxidiert. Der Zyklus beginnt von vorne mit der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe. Das dabei entstehende Trityl-Kation ist orangefarben, weshalb die Kupplungsausbeute spektroskopisch oder konduktometrisch bestimmt werden kann. Der Zyklus wird so lange wiederholt bis die gewünschte Länge erreicht ist. DNA kann bis zu einer Länge von ~120 Nukleotiden^[223] synthetisiert werden, während im Falle von RNA nur 70-96 Nukleotide^[224-228] möglich sind. Der limitierende Schritt ist die Kupplung des Phosphoramidits, welcher im Falle von RNA aufgrund der sterisch anspruchsvollen 2'-Schutzgruppe nicht so effizient wie für DNA ablaufen kann. Dies kann auch nicht durch Verlängerung der Kupplungszeit (10 s für DNA vs. 12 min für RNA) vollständig kompensiert werden. Selbst wenn ein Zyklus mit einer Ausbeute von 98% abläuft, ist vor Aufreinigung die Gesamtausbeute bei einem 100mer nur 13% ($0,98^{99}$; 99 Kupplungen für ein 100mer). Zwei Faktoren sind entscheidend für die effiziente Aktivierung des Phosphoramidites. Zum einen muss die Nukleophilität des Aktivators hoch sein zum andern muss er eine ausreichende Azidität besitzen, um die Abgangsgruppe (Diisopropylammonium) zu protonieren. ETT und BTT sind im Vergleich zu 1*H*-Tetrazol azider. Dadurch konnte auch die Kupplungszeit von RNA von 12 min auf 3 min verkürzt werden. Bei der Synthese großer Mengen oder langer Oligonukleotide kann die hohe Azidität von ETT oder BTT problematisch werden, da die erforderlichen längeren Kupplungszeiten zur Abspaltung der 5'-O-DMTr-Schutzgruppe führen können.^[229] Dadurch können bei einer Kupplung Dimere entstehen. Hersteller von Reagenzien für die Festphasensynthese wie *Link Technology Ltd.* oder *GlenResearch* empfehlen die Verwendung von dem weniger azider, aber nukleophileren Dicyanoimidazol (DCI) als Aktivator.^[230,231]

Die Abspaltung vom Festphasenmaterial, das Entfernen der Cyanoethyl-Schutzgruppen (CEO) und den Schutzgruppen auf den Nukleobasen wird im basischen z.B. mit Ammoniak oder Methylamin durchgeführt. Das Produkt der Abspaltung der Cyanoethyl-Schutzgruppe ist Acrylnitril, welches an die N³-Position von Thymidin oder Uridin addieren kann.^[232] Um dies zu vermeiden kann vor der eigentlichen Abspaltung das Festphasenmaterial mit Diethylamin (DEA, 20% in MeCN) gewaschen werden. DEA besitzt eine ausreichende Basizität um Cyanoethyl zu entfernen, ohne dabei das Oligonukleotid von dem Trägermaterial zu spalten. Im Falle von RNA muss zusätzlich die 2'-O-Silyl-Schutzgruppe mit fluoridhaltigen Reagenzien wie HF oder TBAF entfernt werden.^[220] Die Aufreinigung des Oligonukleotides

kann über HPLC oder Gelelektrophorese erfolgen.^[233] Besonderen Vorteil hat die Aufreinigung von Oligonukleotiden, die im DMTrON Modus hergestellt wurden. Da in diesem Modus die letzte DMTr-Schutzgruppe nicht abgespalten wird, ist das Volllängenprodukt weniger polar und wird bei der Aufreinigung per RP-HPLC später eluiert. Die DMTr-Schutzgruppe kann im Anschluss durch Inkubation mit Essigsäure (80% in Wasser) abgespalten werden.

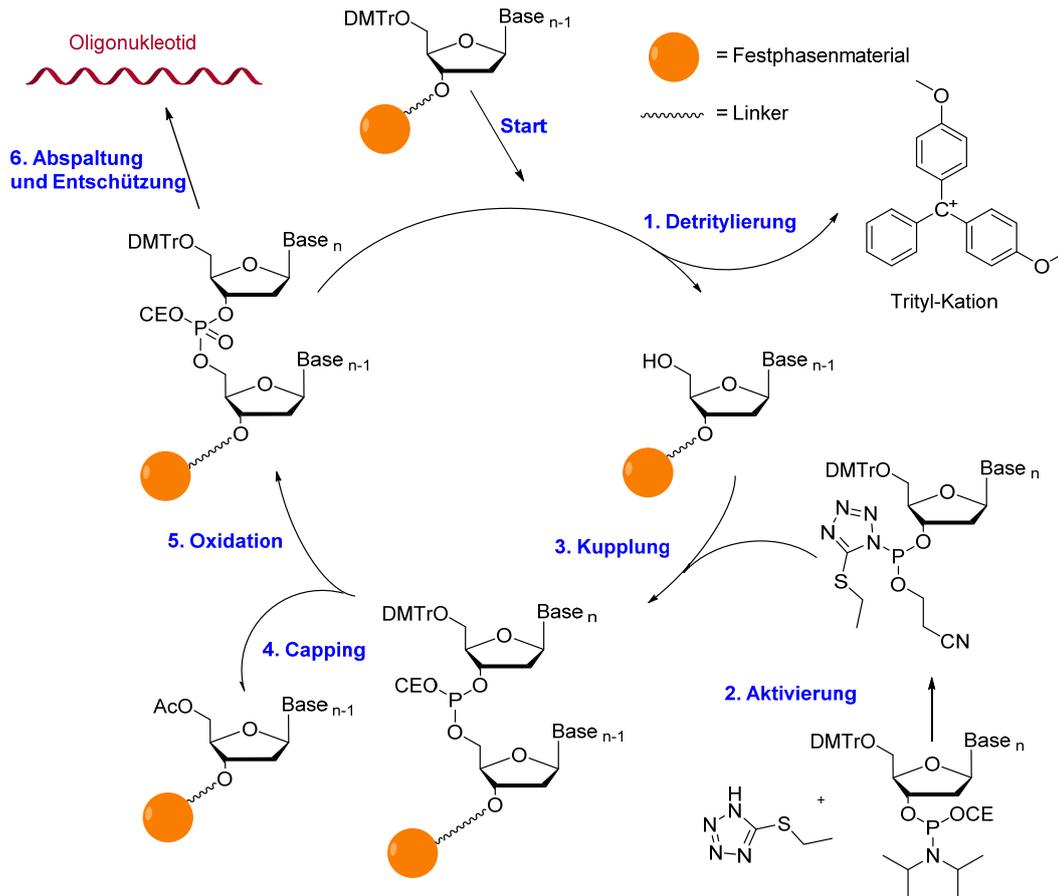


Abb. 35 Syntheszyklus der Phosphoramiditsynthese zur Darstellung von Oligonukleotiden an fester Phase am Beispiel von DNA.

Die Phosphoramiditmethode zur Herstellung von Nucleinsäure ist so weit etabliert, dass hunderte modifizierte Phosphoramidite (Fluorophore, Linker, photoaktivierbare Modifikationen, funktionalisierende Modifikationen) kommerziell erhältlich sind.

1.6 Biologische Synthese von modifizierten Nukleinsäuren

Neben der in Kapitel 1.5 beschriebenen Synthese von Nukleinsäuren mittels Festphasensynthese können Nukleinsäuren auch enzymatisch synthetisiert werden. Ein Nachteil der Festphasensynthese ist, dass eine effiziente Synthese nur bis zu einer Länge von 70-96 Nukleotiden im Falle von RNA^[224–226,234] und bis zu 120 Nukleotiden im Falle von DNA^[223] durchgeführt werden kann. Eine biologische Synthese hat den Vorteil, dass längere Nukleinsäuren problemlos hergestellt werden können. Dies ist nur möglich, da die enzymatischen Schritte mit einer enorm geringen Fehlerrate ablaufen. Die hohe Substratselektivität schafft jedoch gleichzeitig eine Barriere zur Modifizierung der biologisch hergestellten Nukleinsäuren.

1.6.1 Enzymatischer Einbau von modifizierten Nukleotiden in DNA

DNA-Polymerasen sind Enzyme, die einen Templatstrang erkennen und dessen genetische Information exakt kopieren, wobei die Genauigkeit von diversen Polymerasen stark variiert. Über fünf DNA-Polymerasen in *E. coli* und über zwölf humane DNA-Polymerasen sind bislang, wobei alle mit unterschiedlicher Genauigkeit arbeiten.^[235–237] Replikative DNA Polymerasen haben eine enorm hohe Genauigkeit. Im Falle von *E. coli* ist die Fehlerrate *in vivo* bei 10^{-7} - 10^{-8} pro Nukleotid und wird durch 3'-5'-Exonuklease Aktivität (Korrekturlesen) auf 10^{-8} - 10^{-10} erniedrigt.^[235,238,239] Die *Translasion DNA Polymerase*, die zuständig für die Reparatur von DNA Replikation ist, hat eine deutlich höhere Fehlerrate mit 10^{-1} - 10^{-4} Fehler pro Nukleotid.^[237] Polymerasen müssen zwischen einem komplementären Basenpaar und einer Fehlpaarung unterscheiden, wobei mehrere Faktoren eine Rolle spielen. Ein Faktor ist die Stabilisierung des korrekten Basenpaares durch die Watson-Crick Wechselwirkung (siehe **Abb. 36** a. und b.). Auf diesem Designprinzip wurden unnatürliche Basenpaare entwickelt, um das genetische Alphabet zu erweitern. Ein Beispiel bildet das **isoG-isoC** Basenpaar (siehe **Abb. 36** d.), welches mit einer Selektivität von 93% mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingebaut werden konnte.^[240,241] Mit dem unnatürlichen **Z-P** Basenpaar (siehe **Abb. 36** c.) konnte sogar eine PCR-Selektivität mit ~99,8% erreicht werden.^[240,242] Wasserstoffbrückenbindungen alleine können jedoch nicht für die hohe Genauigkeit verantwortlich sein, denn der Unterschied der freien Energie zwischen einer Watson-Crick Basenpaarung und einer Fehlbasenpaarung ist mit 0,2-0,4 kcal·mol⁻¹ zu gering und würden nur eine Fehlerrate von 10^{-2} ergeben.^[235,243–245]

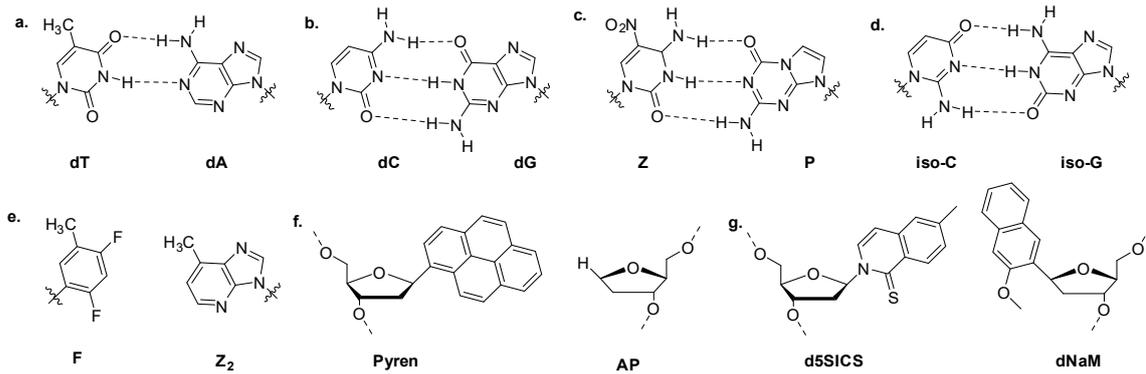


Abb. 36 Strukturen von (un)natürlichen Basenpaaren, die als Substrate von Polymerasen akzeptiert werden. Neben Wasserstoffbrückenbindungen sind sterische Effekte besonders wichtig. Es wurde gezeigt, dass isosterische, Wasserstoffbrückenbindungs-freie Basenpaare mit einer ähnlich hohen Genauigkeit von Polymerasen akzeptiert werden. Kool *et al.*^[246] zeigten, dass das zu einem dA-dT-Basenpaar sterisch ähnlich, aber Wasserstoffbrückenbindungs-freie Basenpaar 2,4-Difluorotoluol (**F**) und 4-Methylbenzimidazol (**Z₂**) (siehe **Abb. 36 e.**) effizient in DNA eingebaut werden. Des Weiteren zeigten Kool *et al.*^[247] 1999, dass die DNA Polymerase I von *E. Coli* ein Pyren C-Nucleosid gegenüber einer abasischen Stelle (**AP**) einbaute (siehe **Abb. 36 f.**). Dabei wird der größere sterische Anspruch vom Pyren von der kleinen AP-Stelle kompensiert, sodass die Gesamtlänge des Basenpaars erhalten bleibt.

Aus diesen (und weiteren) Ergebnissen wurde ein Modell einer Bindungstasche (*consensus pocket*; siehe **Abb. 37**) entwickelt, welche den geometrischen Rahmen beschreibt.^[236] Abweichungen sind hauptsächlich in der großen (*major groove*) und kleinen Furche (*minor groove*) möglich, während die Länge (*constant length*; siehe **Abb. 37**) nicht variabel ist.^[236,245] Es wird angenommen, dass hoch-selektive Polymerasen weniger flexibel sind, als welche mit niedriger Genauigkeit.^[248]

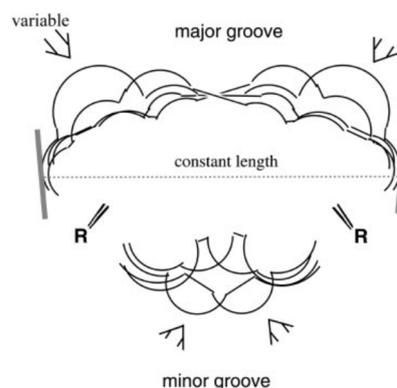


Abb. 37 Schematische Darstellung der überlagerten Strukturen der vier kanonischen Basenpaare. Besonders variabel ist die Bindungstasche in der großen und kleinen Furche (*major* und *minor groove*), während die Länge konstant ist. Die Abbildung wurde entnommen aus Kool *et al.*^[236]

Besonders Position 5 von Pyrimidinbasen **31-32** oder Position 7 von Purinbasen **33-34** werden häufig modifiziert (siehe **Abb. 38**), da diese Modifikationen in die große Furche

zeigen und somit das modifizierte Nukleotid weiterhin von der Polymerase als Substrat akzeptiert wird.^[235,249–251]

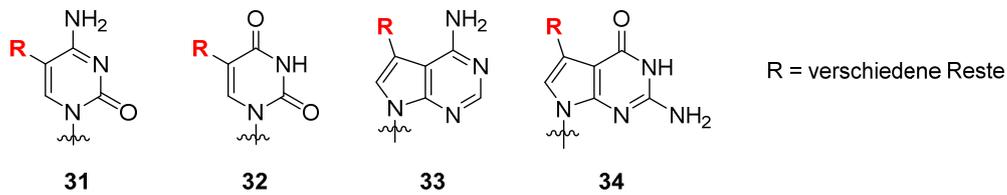


Abb. 38 Positionen von Nukleotiden an denen Modifikationen eingebaut werden können. Die Modifikation an der Position **R** zeigt in die große Furche, weshalb das Nukleotid von der Polymerase akzeptiert wird.

Ein weiterer Faktor für die Genauigkeit von Polymerasen ist das sogenannte *minor groove scanning*, was auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureseitenketten der Polymerase und dem N^3 von Purinen oder dem O^2 von Pyrimidinen beruht.^[252,253] Die Bedeutung von *minor groove scanning* ist jedoch abhängig von der Polymerase und kann stark variieren.^[235] Auch *stacking* Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle; besonders für den Einbau von unnatürlichen Basenpaaren, die keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können.^[254,255] Durch diese hydrophoben π - π -Wechselwirkungen kann das einzubauende Nukleotid in der Bindungstasche stabilisiert werden.

Ein weiteres Ziel bei Entwicklung eines unnatürlichen Basenpaares ist es, neben der Funktionalisierung von DNA, einen semi-synthetischen Organismus zu erschaffen, der durch ein weiteres Basenpaar mehr Informationen als ein „normaler“ Organismus speichern kann. Romesberg *et al.*^[256] zeigten 2014 die Amplifikation mit dem **d5SICS-dNaM** Basenpaar (siehe **Abb. 36** (g)) in *E. Coli* mit einer Genauigkeit von 99,4%. Nach Untersuchungen von 135 unnatürlichen Basenpaaren *in vivo* konnte evaluiert werden, dass die Effizienz des Einbaus nicht mit den *in vitro* gewonnenen Daten korreliert.^[257] Das unnatürliche **d5SICS-dNaM** Basenpaar kann zusätzlich mit dem entsprechenden Ribonukleotid und der T7 RNA Polymerase auch in RNA transkribiert werden.^[258]

Ein Nachteil bei der Einführung von Modifikationen mittels DNA Polymerasen ist, dass die modifizierten Nukleotide statistisch oder willkürlich eingebaut werden, sodass keine bzw. nur teilweise eine seitenspezifische Markierung möglich ist. Für die Modifizierung einer einzelner Nukleobase muss der Templatstrang entsprechend aufwändig modifiziert und über Festphasensynthese hergestellt werden.

Eine Alternative zur Modifizierung von Nucleinsäuren bieten Nucleotidyl-Transferasen. Jäschke *et al.*^[259] führten modifizierte Nucleosidtriphosphate (hauptsächlich Alkin- und Azid-Modifikationen) am 3'-Ende von DNA mittels Desoxyribonucleotidyltransferase (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT)) ein (siehe **Abb. 39**). Dabei werden allerdings mehrere Nucleotide angehängt, sodass diese Methode nicht zur positionsspezifischen

Markierung von DNA verwendet werden kann. Durch Ligation oder *Primer Extension* können die terminalen Modifikationen auch zu Internen umgewandelt werden.

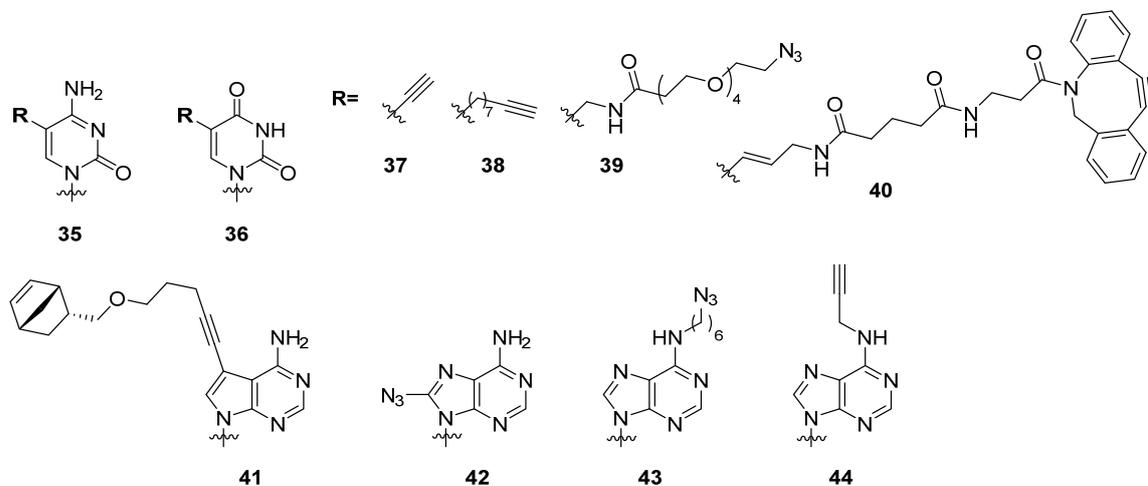


Abb. 39 Auswahl von modifizierten Nucleosidtriphosphaten, die das selektive Markieren des 3'-Ende von DNA mittels Desoxyribonucleotidyltransferasen ermöglichen.^[259]

1.6.2 Enzymatischer Einbau von modifizierten Nucleotiden in RNA

Analog zu DNA kann auch RNA mittels Polymerasen modifiziert werden. Dabei werden modifizierte Nucleosidtriphosphate (z.B. 8-Azido-ATP^[260], 2'-Fluoro^[261] und 2'-Amino NTPs^[262]) statistisch oder willkürlich in RNA eingebaut. Für eine positionsspezifische Modifizierung muss der DNA-Matrizenstrang mit einem unnatürlichen, dritten Basenpaar modifiziert sein.^[240,258,263,264] Dazu muss der DNA-Matrizenstrang chemisch mittels DNA-Festphasensynthese positionsspezifisch modifiziert hergestellt werden. Fluoreszierende Nucleobasen, Fluorophore, Biotin-, Azid- und Amin-modifizierte Nucleobasen wurden mit unnatürlichen Basenpaaren in RNA eingebaut.^[264–266]

Entsprechend zu DNA können am 3'-Ende von RNA mit Desoxyribonucleotidyltransferase modifizierte Nucleotide eingebaut^[267,268] und mittels Ligation zu internen Modifikationen umgewandelt werden. Jäschke *et al.*^[269] testeten mehrere Desoxyribonucleotidyltransferasen für den Einbau von 2'-Azido-NTPs, 3'-Azido-NTPs und 8-N₃ ATP in RNA. Allerdings waren Optimierungen notwendig und die Möglichkeit nur ein einzelnes Nucleotid anzuhängen war nicht immer gegeben.

Das 5'-Ende von RNA kann während der Transkription durch Initiatornucleotide funktionalisiert werden. Die T7 RNA Polymerase akzeptiert 5'-modifizierte Guanosin-^[270,271] oder Adenosin-^[272,273] (Monophosphat-) Derivate **45** in der Initiation, aber nicht in der Elongation der RNA Synthese. Neben funktionalen Alkin-^[274] **46**, Alkylamino-^[270,275] **47**, Aminophosphoramidat-^[276] **48** und Thiol-Gruppen^[270,277,278] **49** konnten auch diverse Guanosin-Cap^[279,280], Biotin^[273,276,281] und Fluorophor^[276,282] modifizierte Initiatornucleotide (siehe **Abb.**

40) in moderater bis exzellenter Effizienz (20-95%)^[270,274–276] eingebaut werden. Dayie *et al.* und Famulok *et al.* verwendeten ein Biotin, welches über einen *ortho*-Nitrobenzyl-artigen photospaltbaren Linker **50** mit dem 5'-Phosphat des Initiatornucleotides verknüpft wurde, um die Aufreinigung von RNA zu erleichtern.^[281,283] Über einen Streptavidin-Biotin-Komplex konnte die transkribierte RNA immobilisiert werden, sodass Enzyme und NTPs in einem Waschschritt entfernt werden konnten. Anschließende UV-Belichtung führte zur Freisetzung der RNA.

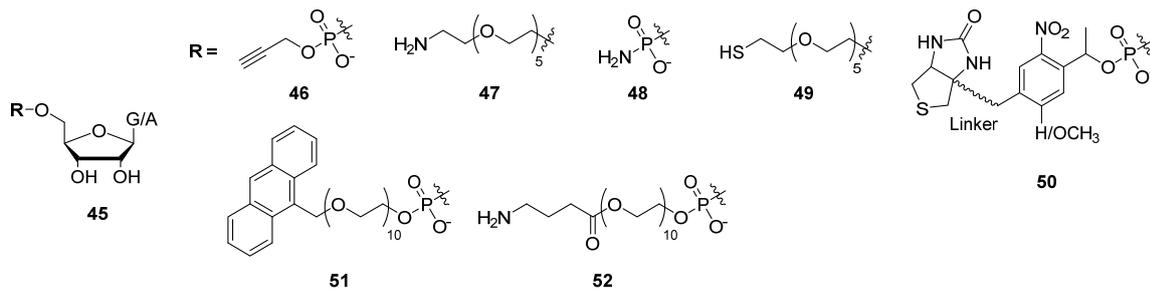


Abb. 40 Strukturen von Initiatornucleotiden zur Modifizierung der 5'-Position von RNA während der Transkription.

Normalerweise wird die *T4* RNA Ligase (Rnl1) für die Ligation von einzelsträngiger RNA verwendet.^[284–286] Die *T4* RNA Ligase 1 kann auch verwendet werden, um selektiv das 5'- oder 3'-Ende von Nucleinsäuren zu modifizieren. Es wurde gezeigt, dass das 5'-Ende von RNA (Akzeptor-Substrat) mit einem modifizierten ATP-Derivat, wie 2-Aminopurin und 3'-NH₂-ATP markiert werden kann.^[287] Dabei wird das modifizierte ATP-Derivat anstelle von ATP in der Ligrationsreaktion verwendet. Allerdings entstehen bei der Reaktion zyklische Nebenprodukte.

Uhlenbeck *et al.*^[288–290] zeigten 1978, dass die *T4* RNA Ligase 1 zur Modifizierung des 3'-Ende von RNA mittels modifizierten Nucleosid-3',5'-Bisphosphaten verwendet werden kann.^[288–295] Nucleosid-3',5'-Bisphosphate werden als Donor-Substrate erkannt und können in einer ATP-abhängigen Reaktion an das 3'-OH von RNA geknüpft werden.^[286,295] Die Reaktion ist auf ein einziges Nucleotid beschränkt, da die 3'-Phosphatgruppe des Bisphosphates die Reaktion mit einem weiteren Nucleosid-Bisphosphat nicht erlaubt.^[295] Als kleinste Akzeptor-Nucleinsäure wird ein Trinucleotid benötigt. Neben den natürlichen (Desoxy)-Ribonucleosiden (p(d)Np) und [5'-³²P]pNp markierten^[290] wurden auch zum Beispiel 5-¹²⁵Iodocytidin^[290], 5-Fluoruridin^[296], 5-Ioduridin^[286], 5-Bromuridin^[296], 3-Methyluridin^[296], Deazauridin, 1-*N*⁶-Ethenoadenosine **55**, *lin*-Benzoadenosin^[288] **56**, 4-Thiouridin^[293] **57**, 6-Thioinosin^[293] **59**, 6-Thioguanosine^[293] **58**, 5-Alkinuridin^[274] **53**, 2-Azidoadenosin^[297] **54**, Aminopurin^[296] **60** und 8-(6-Aminohexylamino)adenosin 3'-5'-Bisphosphate (kommerziell erhältlich von *Jena Bioscience*) für das selektive markieren des 3'-Ende von RNA verwendet.

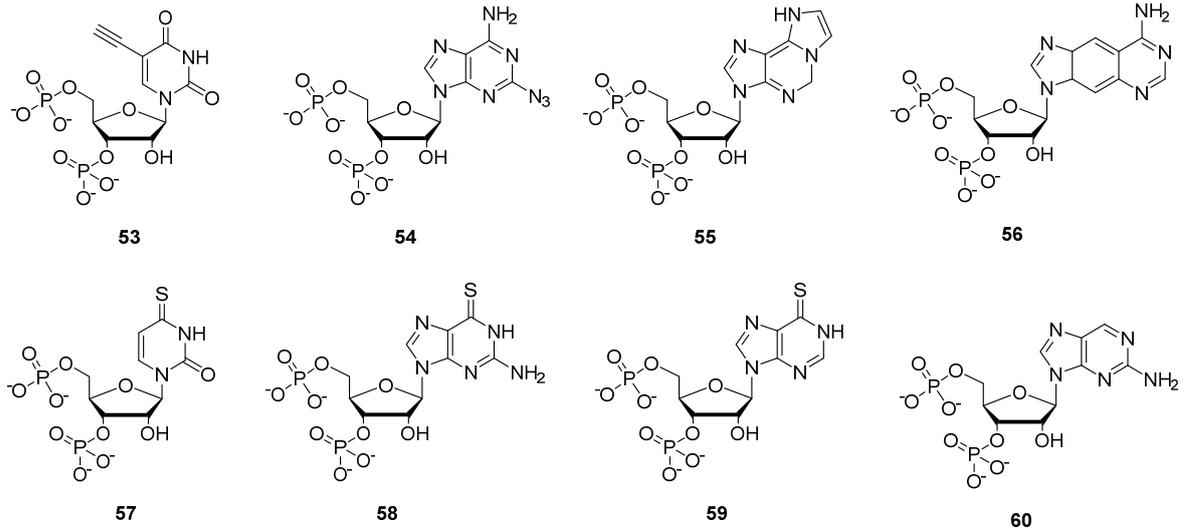


Abb. 41 Strukturen von modifizierten Nucleosid-3',5'-Bisphosphaten, die als Substrate von der T4 RNA Ligase 1 als Substrate akzeptiert werden, wodurch das 3'-Ende einer RNA modifiziert werden kann.

Arenz *et al.*^[274] kombinierten zwei chemo-enzymatische Methoden zur Markierung des 5'- und 3'-Endes einer prä-miRNA (siehe **Abb. 42**). Zuerst markierten sie das 5'-Ende mit einem Alkin-modifizierten Initiator-nucleotid **53**, an welches sie einen Quencher mittels Click-Chemie konjugierten. Anschließend markierten sie das 3'-Ende mit einem Fluorophor-modifizierten Uridin-3',5'-Bisphosphat. Durch die Reifung der miRNA mittels *Dicer* wurde die Schleife und der terminale Teil der prä-miRNA entfernt, sodass die Prozessierung durch einen Fluoreszenzanstieg beobachtet werden konnte.

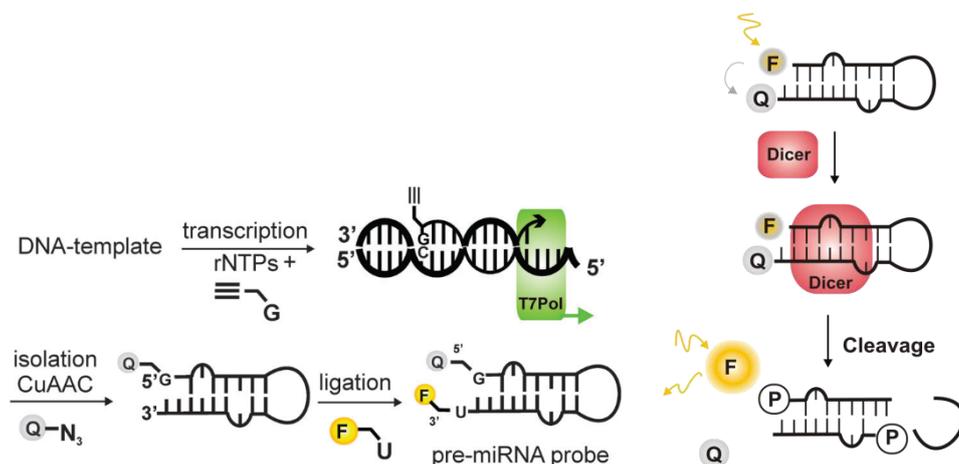


Abb. 42 Chemo-enzymatisches Markieren einer prä-miRNA mit einem Fluorophor-Quencher-Paar (links) und das Prinzip der Fluoreszenzdetektion während der miRNA Reifung durch Prozessierung der prä-miRNA mit *Dicer*. Abbildungen entnommen aus Arenz *et al.*^[274]

2 Lichtinduzierbare AntimiR-Sonden zur Regulation von miRNA in Neuronen

2.1 Motivation und Zielsetzung

Das Speichern von Informationen ist eine zentrale Eigenschaft aller höher entwickelten Spezies. Die Langzeitpotenzierung ist der primäre Mechanismus der synaptischen Plastizität, der wichtigste Mechanismus von Lernen und Gedächtnis (siehe Kapitel 1.1). Die späte Phase der Langzeitpotenzierung kann Stunden bis mehrere Monate anhalten und bedarf einer gesteigerten Proteinbiosynthese, welche auf einzelne Synapsen beschränkt sein kann. miRNAs sind ideal geeignet die Genexpression zu regulieren, allerdings ist deren Einfluss auf die lokale Proteinsynthese weitestgehend unerforscht. Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses von miR-181a auf die lokale Proteinsynthese von zwei wichtigen Proteinen für synaptische Plastizität, CaMKII α und GluA2. Dazu soll ein lichtaktivierbares AntimiR synthetisiert werden, welches nach Photoaktivierung spezifisch die miR-181a inhibieren kann. Die Lichtaktivierung eignet sich ideal zur Untersuchung des lokalen Einflusses von miRNA, da diese mit einer enorm hohen Orts- und Zeitauflösung erfolgen kann. Die Bindung von miR-181a mit dem AntimiR soll nach der Photoaktivierung mit einem hybridisierungssensitiven Fluorophor visualisiert werden. Nach der Photolyse, aber vor der Bindung der miRNA darf der Hybridisierungsreporter nicht fluoreszieren, sodass selektiv die Hybridisierung und nicht die Photolyse visualisiert wird. Voraussetzung ist zudem, dass die Hybridisierung von der miR-181a mit dem AntimiR möglichst schnell und quantitativ abläuft. Zudem soll ein zweiter Fluorophor (*Tracking*-Fluorophor) die Lokalisierung des AntimiRs in der Zelle erlauben. Dies soll eine Optimierung der Transfektion, sowie eine gezielte Photoaktivierung ermöglichen. Durch die Verwendung der zwei Fluorophore kann die Menge an hybridisierten AntimiR und somit die lokal inhibierte miR-181a Konzentration analysiert werden. Dies ermöglicht eine Korrelation zwischen inhibierter Menge an miR-181a und neu-synthetisierten CaMKII α und GluA2 Proteinen. Dies ist besonders bedeutend, da die Verteilung der miR-181a in Neuronen sehr heterogen und die lokale miRNA Reifung ebenso abhängig von der synaptischen Aktivität ist. Bei der Auswahl der photolabilen Schutzgruppen und Fluorophore muss auf eine selektive Anregbarkeit geachtet werden. Zudem müssen die verwendeten AntimiRs resistent gegen Endo- und Exonukleaseverdau in den Neuronen sein. In diesem Projekt sollen drei Designkonzepte zur Synthese von lichtaktivierbaren AntimiR-Sonden optimiert und verglichen werden: Die Verwendung von Thiazolorange als hybridisierungssensitiven Fluorophor, dual Fluorophormarkierte Molecular Beacons, sowie lichtaktivierbare Hairpin-Sonden (siehe **Abb. 43**). Thiazolorange ist eine Hybridisierungssonde, welche nicht im Einzelstrang, jedoch im Doppelstrang fluoresziert. Dabei muss die optimale Position von Thiazolorange in der Sequenz

experimentell bestimmt werden, da der Fluoreszenzanstieg nach Hybridisierung stark sequenzabhängig ist. Zusätzlich müssen die Positionen und notwendige Anzahl der photolabilen Schutzgruppen bestimmt werden.

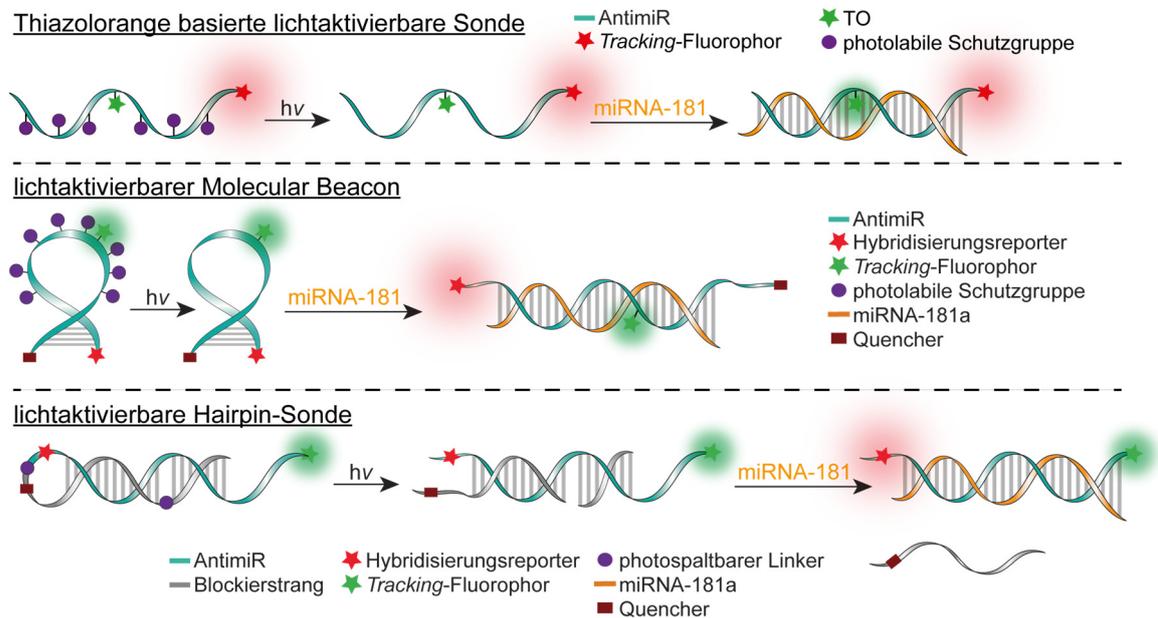


Abb. 43 Designkonzepte zur Synthese einer lichtaktivierbaren AntimiR-Sonde.

Molecular Beacons bestehen aus einer zur miRNA komplementären Schleifen-Region und einem mit Fluorophor und Quencher markierten Stamm. Erst die Bindung der miRNA soll zur Öffnung des Stammes und zum Anstieg der Fluoreszenz führen. Die Synthese eines lichtaktivierbaren Molecular Beacons erfordert eine Optimierung der Stammlänge: Während ein zu kurzer, instabiler Stamm zur Öffnung des Molecular Beacons in Abwesenheit der miRNA führen kann, kann es ein zu langer, zu stabiler Stamm die Bindung der miRNA verhindern. Zudem müssen Position und Anzahl der notwendigen photolabilen Schutzgruppen in der Schleifen-Region optimiert werden, um vor Photoaktivierung die Bindung der miRNA vollständig zu verhindern. Fluorophore und Quencher müssen optimal gewählt werden, damit ein möglichst großer Fluoreszenzanstieg nach Hybridisierung mit der miRNA erzielt werden kann.

Bei einer lichtaktivierbaren Hairpin-Sonde soll ein intramolekularer Gegenstrang (Blockierstrang) über einem photospaltbaren Linker mit dem AntimiR verknüpft werden. Der Blockierstrang soll die Hybridisierung mit der miR-181a verhindern. Das optimale Design erfordert eine Optimierung der Länge des Blockierstrangs, der Schleife, sowie die Untersuchung ob weitere photospaltbare Linker im Blockierstrang notwendig sind, um diesen nach Photoaktivierung stärker zu destabilisieren. Nach der Photolyse muss die Hybridisierung mit dem Blockierstrang so stark destabilisiert werden, dass die miRNA schnell und quantitativ den Blockierstrang verdrängen kann und vom AntimiR gebunden wird. Zusätzlich müssen die idealen Positionen von Fluorophor und Quencher experimentell bestimmt

werden, um möglichst wenig Fluoreszenz vor Photoaktivierung und Bindung der miR-181 zu garantieren. Die drei Konzepte sollen auf ihr Potential zur Regulation der miR-181a und Visualisierung der Hybridisierung außerhalb von Zellen sowie *in vitro* untersucht und verglichen werden.

Die Untersuchung des Einflusses auf die lokale miR-181a Aktivität soll in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung durchgeführt werden. Ziel ist es die Menge an neu-synthetisierten CaMKII α und GluA2 vor und nach Photoaktivierung der AntimiRs mittels *Proximity ligation amplification* Methoden zu analysieren.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 Regulation der lokalen Proteinsynthese von CaMKII und GluA2 durch eine lichtaktivierbare AntimiR-Sonde

Wie in Kapitel 1.1 ausführlich beschrieben sind CaMKII^[25] und GluA2^[12] (eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors) wichtige Proteine für die Langzeitpotenzierung^[8], der primäre Mechanismus von synaptischer Plastizität. Entscheidend für das Anhalten der späten Phase der Langzeitpotenzierung (<8 h) ist eine gesteigerte dendritische Proteinsynthese.^[42] Weitestgehend unerforscht ist der Einfluss der miRNA-Regulation auf die lokale Proteinsynthese.^[298] Studien von Schuman *et al.*^[67] und Schrott *et al.*^[68] zeigten, dass die miR-181a die Genexpression von CaMKII und GluA2 reguliert. Schuman *et al.*^[67] demonstrierten, dass nach Transfektion von prä-miRNA-181a und Rezeptorstimulation die Proteinsynthese von CaMKII lokal gesteigert werden konnte. Schrott *et al.*^[68] zeigten, dass durch Überexpression von miR-181a in kortikalen Neuronen eine Verringerung des GluA2-mRNA-Levels (*Gria2*-Level) um 12(±5)% erzielt werden konnte. Zusätzlich verwendeten sie ein LNA-basiertes AntimiR zur Regulation der miR-181a in hippocampalen Neuronen und konnten eine vollständige Reduzierung des miR-181a-Levels, sowie einen gesteigerten *Gria2*-Level um den Faktor 1,4 beobachten. Der Einfluss der mRNA Expression von CaMKII wurde nicht untersucht. Allerdings konnten Schrott *et al.*^[68] keine Änderung des GluA2-Proteinlevels nach Transfektion des AntimiRs feststellen. Bei der Studie wurde die gesamte Proteinmenge von GluA2 in den Neuronen mittels *Western Blot* analysiert. Der lokale Proteinlevel in Neuronen ist sehr heterogen, da die Proteine, abhängig von der Aktivität der Synapsen, lokal stärker oder schwächer exprimiert werden können.^[42] Eine Auswertung des Gesamtproteinlevels der Zelle kann somit zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen führen. Moderne PLA-Techniken^[299] (FUNCAT-PLA oder Puro-PLA) ermöglichen eine orts aufgelöste Markierung von ausschließlich neu-synthetisierten Proteinen. Dadurch sollte im Rahmen dieser Studie eine exaktere Quantifizierung des lokalen Proteinlevels erreicht werden.

Diese Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss der miR-181a auf die lokale Proteinsynthese von CaMKII und GluA2. Dazu sollte eine lichtaktivierbare AntimiR-Sonde hergestellt werden, die besondere Anforderungen erfüllen musste: Das photoaktivierbare AntimiR sollte vor Belichtung inaktiv sein und die miRNA nicht binden (siehe Stufe 1 in **Abb. 44**). Ein *Tracking*-Fluorophor sollte die Verfolgung des AntimiRs in der Zelle sowie die Bestimmung und Optimierung der Transfektionseffizienz ermöglichen. Zusätzlich sollte der *Tracking*-Fluorophor (grüner Stern in **Abb. 44** und **Abb. 45**) Aufschluss darüber geben, ob das AntimiR lokal akkumuliert vorliegt, wie es z.B. in RNA Granula der Fall ist. Zudem erlaubte die Positionsbestimmung des AntimiRs eine gezielte Photoaktivierung. Erst durch orts- und

zeitaufgelöste Bestrahlung (siehe Stufe 2 in **Abb. 44**) sollten die photolabilen Schutzgruppen bzw. Linker entfernt und eine Bindung der miR-181a durch das AntimiR ermöglicht werden (siehe Stufe 3b in **Abb. 45**).

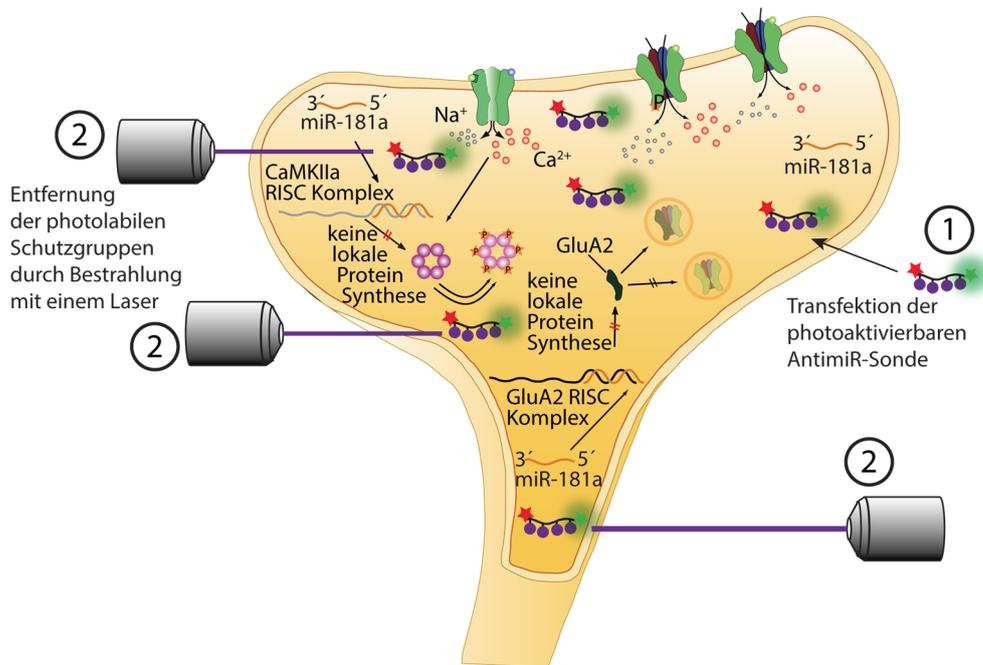


Abb. 44 Regulation der miR-181a Aktivität durch eine lichtaktivierbare AntimiR-Sonde. Im ersten Schritt findet eine Transfektion in hippocampale Neuronen statt. Orts- und zeitaufgelöste Bestrahlung führt zur Abspaltung der Schutzgruppen (2. Schritt).

Ein hybridisierungssensitiver Fluorophor soll die Hybridisierung des AntimiRs mit der miRNA visualisieren (siehe Stufe 3b in **Abb. 45**). Im unhybridisierten Zustand soll der Hybridisierungsreporter nicht fluoreszieren (siehe Stufe 3a in **Abb. 45**). Dadurch könnte bestimmt werden, ob miR-181a an dem Ort der Photolyse vorhanden ist und in welchen Konzentrationen. Zusätzlich erlaubt diese Methode eine einfache und direkte Bestimmung der erforderlichen Belichtungszeit zum Entfernen der photolabilen Schutzgruppen. Dafür muss das Design eine schnelle und vollständige Bindung der miRNA ermöglichen. Das AntimiR konkurriert mit der mRNA um die Bindung der miR-181a, sodass nach der Photoaktivierung mehr freie mRNA von GluA2 (Gria2) und CaMKII vorhanden sein sollte, wodurch eine erhöhte Genexpression beobachtet werden sollte. Zudem muss das AntimiR während der Transfektion, sowie während der Dauer der Experimente stabil gegen Endo- und Exonukleaseverdau sein. Im Folgenden werden drei Designkonzepte einer lichtaktivierbaren AntimiR-Sonde beschrieben und verglichen.

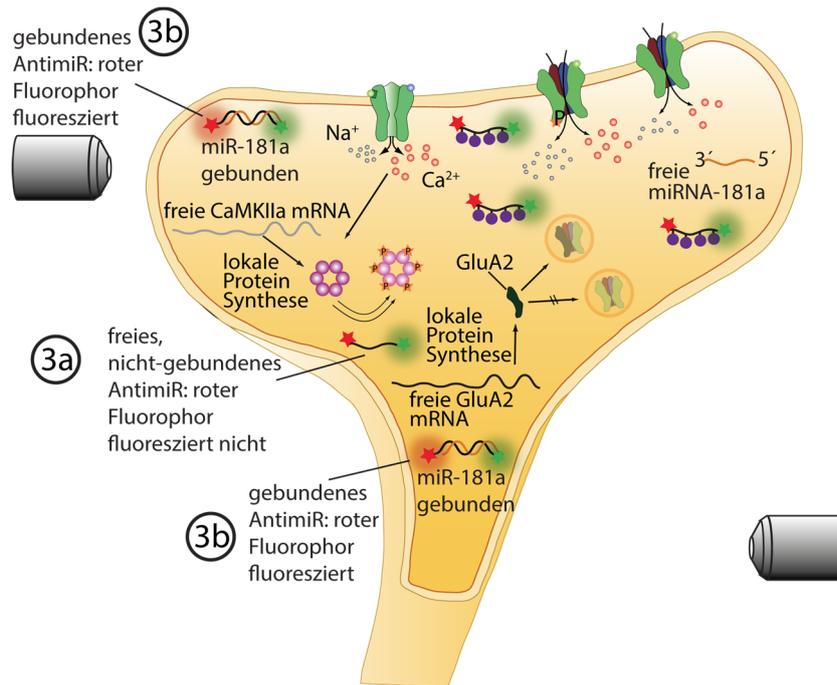


Abb. 45 Regulation der miR-181a Aktivität durch eine lichtaktivierbare AntimiR-Sonde. Nach der Photolyse liegt das AntimiR geschützt vor (Schritt 3a). Die Hybridisierung des AntimiRs mit miR-181a wird durch die steigende Fluoreszenz detektiert (Schritt 3b).

2.2.2 Thiazolorange als hybridisierungssensitiver Fluorophor

Wie in Kapiteln 1.2 und 1.3.2.2 ausführlich beschrieben, kann Thiazolorange (TO) als hybridisierungssensitiver Fluorophor verwendet werden. Im Einzelstrang kann die absorbierte Energie durch Rotation um die Methinbindung abgegeben werden. Im Doppelstrang liegt TO interkaliert zwischen den Nucleobasen vor. Dies verhindert eine Rotation, sodass nach Anregung von TO die Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben wird. Der Vorteil bei der Verwendung solcher Interkalationssonden ist, dass kein zusätzlicher Quencher benötigt wird, um die Fluoreszenz im Einzelstrang zu verhindern. Seitz *et al.*^[90] führten ein Serinol-verknüpftes TO (**Ser-TO**, siehe **Abb. 46**), eine sogenannte FIT-Sonde (*forced intercalation*), ein und zeigten damit einen effizienten Anstieg der Fluoreszenz nach Duplexbildung.

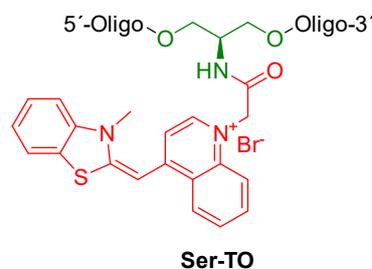


Abb. 46 Struktur einer TO-markierten Nucleinsäure. Das TO (rot) ist über einen Serinol-Linker (grün) kovalent mit der Nucleinsäure (schwarz) verknüpft.

In **Abb. 47** ist die Funktion einer potentiellen TO-markierten, lichtaktivierbaren AntimiR-Sonde dargestellt. Im Ausgangszustand blockieren photolabile Schutzgruppen an dem AntimiR die Hybridisierung mit der miRNA. Das AntimiR ist einzelsträngig, wodurch TO nicht fluoresziert. Der *Tracking*-Fluorophor (Cy5, rot) erlaubt die Verfolgung des AntimiRs in der Zelle. Bestrahlung mit UV-Licht führt zur Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen. Ist am Ort der Photolyse keine miRNA vorhanden, bleibt TO nicht-fluoreszent. Kommt es zur Hybridisierung mit der miRNA, sollte ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden.

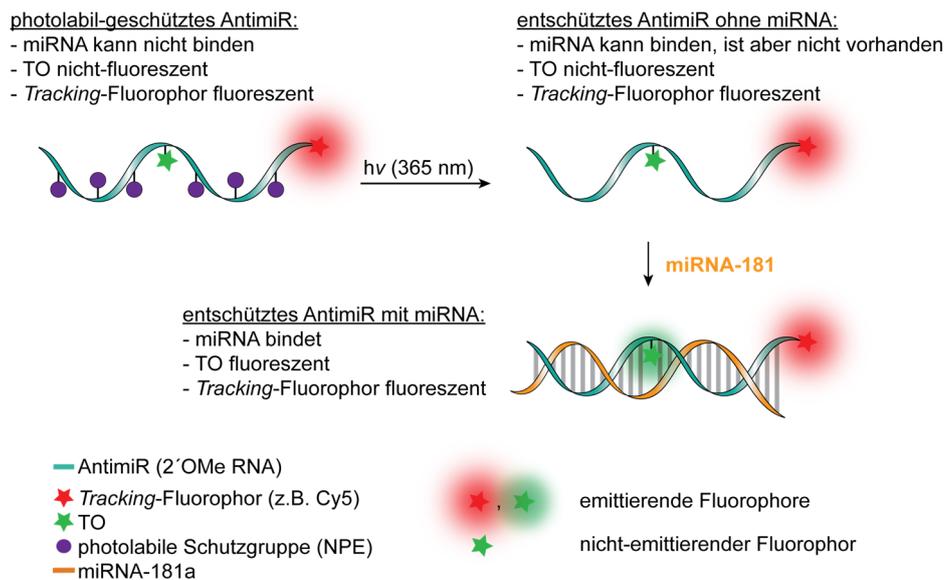


Abb. 47 Funktion einer TO-markierten und lichtaktivierbaren AntimiR-Sonde. Im Ausgangszustand verhindern die photolabilen Schutzgruppen an dem AntimiR die Hybridisierung der miRNA. Im Einzelstrang fluoresziert TO nicht (bzw. wenig). Der *Tracking*-Fluorophor (rot) erlaubt die Verfolgung des AntimiRs in der Zelle. UV-Licht führt zur Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen. Ist am Ort der Photolyse keine miRNA vorhanden, bleibt TO nicht-fluoreszent. Erst nach Bindung der miRNA kann ein Fluoreszenzanstieg gemessen werden.

Eine Voraussetzung für die lichtaktivierbaren AntimiR-Sonden war die spektrale Kompatibilität der verwendeten Chromophore. Dabei musste garantiert werden, dass die Fluorophore und photolabilen Schutzgruppen orthogonal anregbar und kompatibel zu dem Mikroskopie-Setup waren.

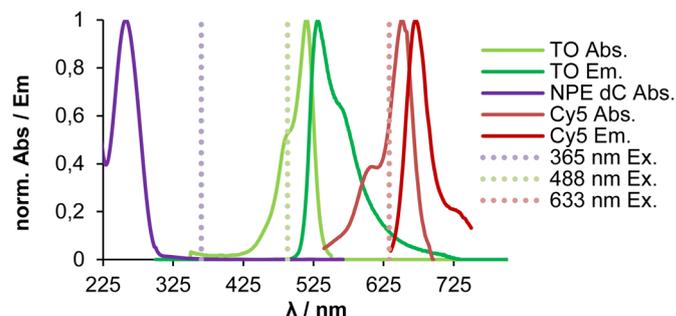


Abb. 48 Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Chromophore mit den entsprechenden Anregungswellenlängen (gepunktete Linien). NPE dC bezeichnet ein 15mer DNA Strang mit einer NPE-Schutzgruppe auf einem 2'-Desoxycytidin in der Mitte der Sequenz. Die Spektren (außer NPE dC Abs.) wurden aus dem *spectra viewer* der Firma *ThermoFisher Scientific* und *Chroma* entnommen.

Bei Betrachtung der Absorptions- und Emissionswellenlängen in **Abb. 48** ist zu erkennen, dass das Emissionsspektrum von TO mit dem Absorptionsspektrum von Cy5 überlappt. Dies kann zu FRET führen, wodurch weniger Fluoreszenz von TO-Fluoreszenz detektiert werden könnte. Aus diesem Grund war eine möglichst distanzierte Installation der Fluorophore ideal.

Die Einführung von TO in Nukleinsäuren kann sowohl durch die Synthese des Ser-TO-Phosphoramidits **61** und dem direkten Einbau (siehe **Abb. 49** links), als auch durch eine postsynthetische Kupplung (siehe **Abb. 49** rechts) von des Serinol-Linkers in der Nukleinsäure mit **TO-COOH**, erfolgen.

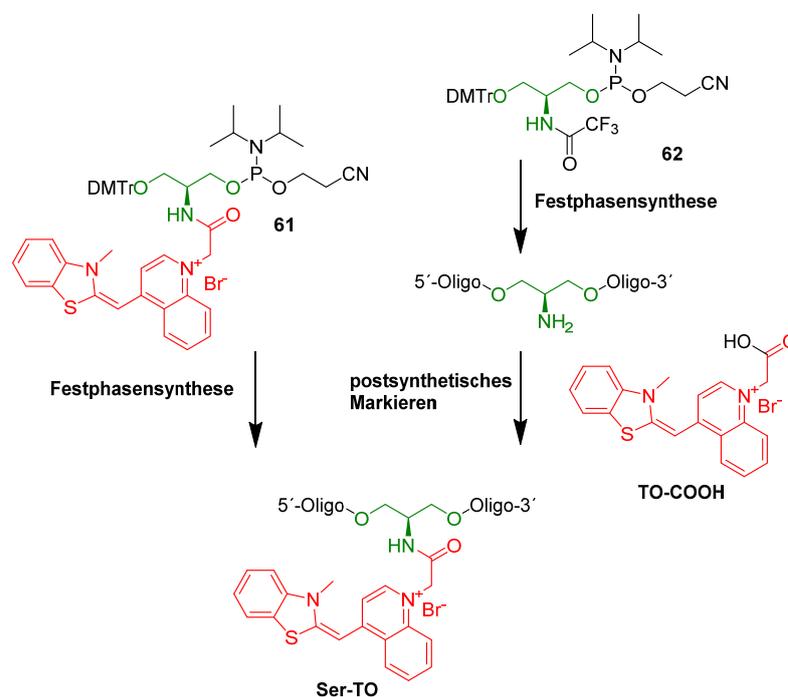


Abb. 49 Mögliche Synthesewege zur Einführung von TO in Nukleinsäuren. Entweder kann das **Ser-TO** Phosphoramidit **61** (links) durch Festphasensynthese direkt in die Nukleinsäure eingeführt werden. Alternativ kann der Linker per Festphasensynthese eingeführt und **TO-COOH** anschließend mit dem Linker gekuppelt werden (rechts).

Da postsynthetische Modifizierungen häufig nicht quantitativ ablaufen, wurde zuerst versucht TO direkt, also per Festphasensynthese, in das AntimiR eingebaut. Vergleichende Studien von Seitz *et al.*^[90] zeigten, dass ein (L)-Serinol-Linker am besten geeignet ist, um TO in Nukleinsäuren einzuführen. Ausgehend von (L)-Serinmethylesterhydrochlorid **63** wurde nach Literaturvorschrift^[300] eine TFA-Schutzgruppe am Amin mit Trifluoressigsäureethylester eingeführt, sodass Verbindung **64** in 64% Ausbeute erhalten wurde. Die Einführung der DMTr-Schutzgruppe an die OH-Gruppe unter Standardbedingungen verlief quantitativ.^[301] Die Reduktion des Methylesters **65** zum Alkohol **66** bei gleichzeitiger Abspaltung der TFA-Schutzgruppe erfolgte mit NaBH₄ und LiCl in 65% Ausbeute. Die

TBDMS-Schätzung der OH-Gruppe von **66** unter Standardbedingungen verlief in 92% Ausbeute.

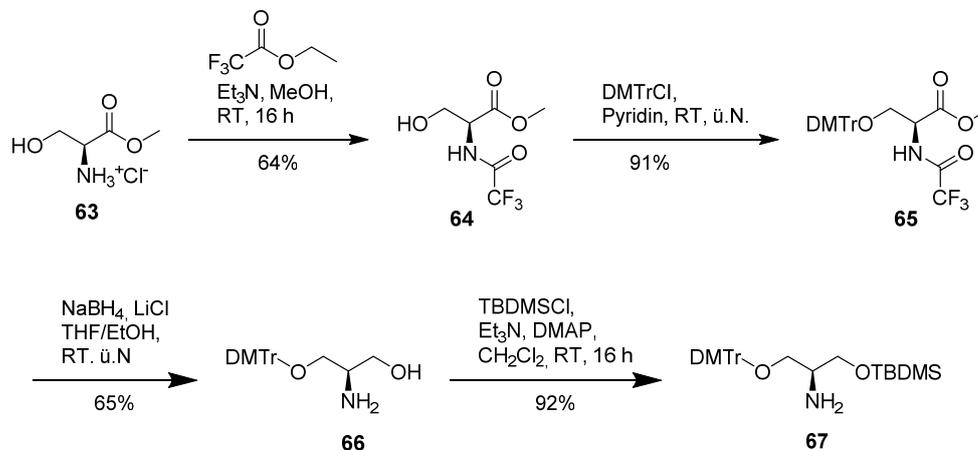


Abb. 50 Syntheseübersicht zur Darstellung des Linker **67** zur Kupplung von Thiazolorange nach Literaturvorschriften^[300,301].

Die Synthese von **TO-COOH** erfolgte nach Literaturvorschrift von Seitz *et al.*^[302] Lepidin **70** wurde mit Bromessigsäure zu **71** in 49% Ausbeute umgesetzt. 2-Methylthiobenzothiazol **68** wurde nach Literaturvorschrift^[302] mit *para*-Toluolsulfonsäuremethylester umgesetzt und nach Fällung ohne weitere Analyse in der nächsten Stufe verwendet.

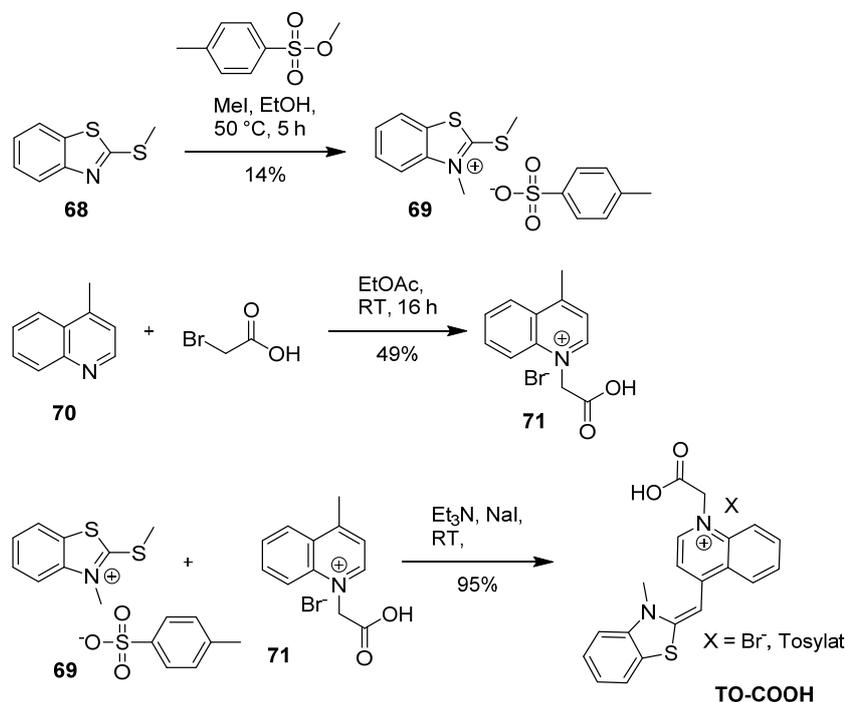


Abb. 51 Syntheseübersicht zur Darstellung von Thiazolorange, welches mit dem Serinol-Linker **67** nach Seitz *et al.*^[302] gekuppelt werden soll, um TO in Nukleinsäuren einzuführen.

Die Synthese von **TO-COOH** erfolgte durch Reaktion von **69** mit **71** unter basischen Bedingungen, sodass **TO-COOH** in 95% Ausbeute erhalten wurde. Die Kupplung von **TO-COOH** mit dem Serinol-Linker **67** wurde nach Literaturvorschrift^[302] durchgeführt (siehe **Abb. 52**). Allerdings konnte nach mehrfacher Durchführung kein Produkt isoliert werden.

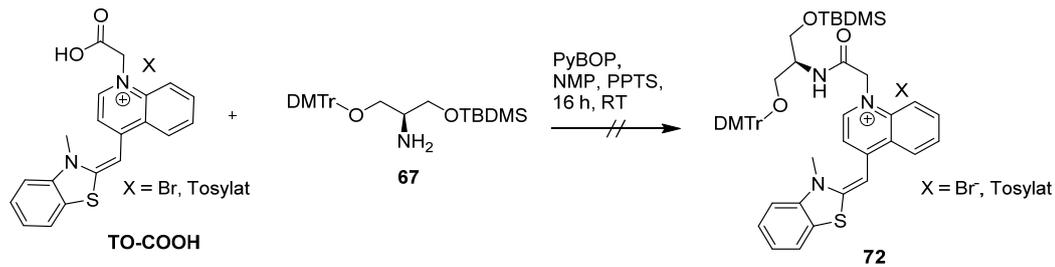


Abb. 52 Reaktionsschema zur Darstellung von DMTr- und TBDMS-geschützten TO-Serinols **72**. Die Synthese wurde nach Literaturvorschrift durchgeführt, jedoch konnte das gewünschte Produkt nicht erhalten werden.

Da der direkte Einbau aufgrund der nicht-funktionierenden Synthese nicht getestet werden konnte, wurde der postsynthetische Ansatz verfolgt. Dazu musste der Serinol-Linker **67** entsprechend modifiziert werden (siehe **Abb. 53**). Das Amin musste mit Trifluoressigsäure geschützt werden, da die Schutzgruppe unerwünschte Nebenreaktionen während der Festphasensynthese verhindert. Die TFA-Schutzgruppe wird bei der basischen Abspaltung der exozyklischen Schutzgruppen entfernt, sodass kein zusätzlicher Abspaltungsschritt notwendig ist. Die TFA-Schätzung des Amins von Verbindung **67** erfolgte mit Trifluoressigsäureethylester in 93% Ausbeute. Die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe von **73** erfolgte unter Standardbedingungen mit TBAF in 87% Ausbeute. Die Umsetzung zum Phosphoramidit **62** wurde nach einer leicht abgewandelten Vorschrift von Seitz *et al.*^[88] durchgeführt. Dabei wurden die Äquivalente des Phosphoramidit-Reagenzes von 2 auf 1,2 reduziert, da der Überschuss häufig nur schlecht säulenchromatographisch entfernt werden kann und Rückstände zu verringerten Kupplungsausbeuten in der Festphasensynthese führen.

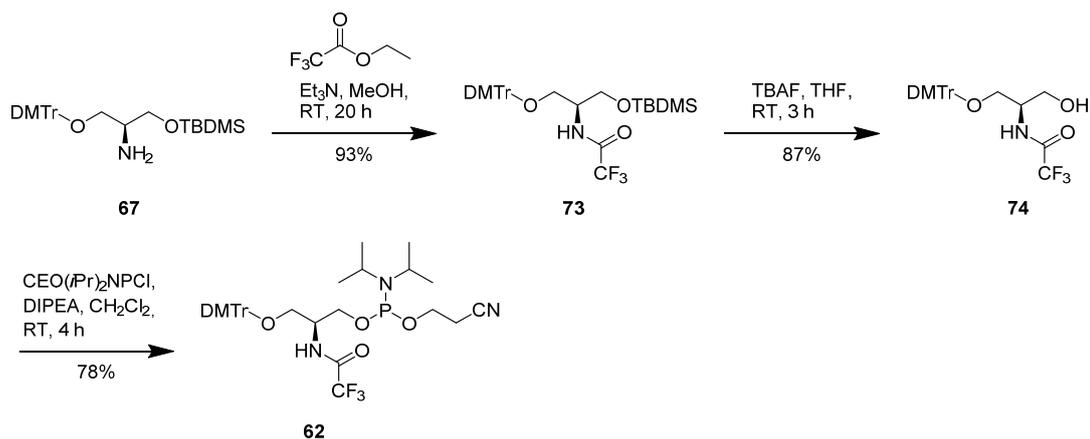


Abb. 53 Reaktionsschema zur Darstellung des TFA-geschützten Serinol-Phosphoramidits **62** zum postsynthetischen Markieren von TO-COOH.

Bei dem Design der Serinol-Linker modifizierten Stränge mussten folgende Faktoren beachtet werden: Die Position des Linkers und damit die Position des TO-Chromophores muss experimentell bestimmt werden. Studien von Seitz *et al.*^[91] zeigten, dass die Intensität des Fluoreszenzanstieges stark von der Umgebung abhängt. Allerdings sind keine allgemein gültigen Kriterien bekannt, mit denen die perfekte Position vorhergesagt werden

kann. In den Studien von Seitz *et al.*^[88,90,91] wurde ausschließlich DNA-Stränge (und DNA/LNA Chimera) im „*Displacement* Motiv“ markiert. Bei diesem Motiv wird eine Nukleobase von TO ersetzt. Da der Einfluss von 2'OMe-RNA auf den Fluoreszenzanstieg von TO nicht untersucht wurde, wurden in dieser Studie neben dem „*Displacement* Motiv“ auch der zusätzliche Einbau von TO, das sogenannte „*wedge* Motiv“, analysiert (siehe Kapitel 1.4.4 zur ausführlichen Erklärung der verschiedenen Motive). Dabei wurden zu jedem Motiv drei verschiedene Positionen ausgewählt (siehe **Abb. 54**). Der *Tracking*-Fluorophor (oder eine Modifizierung zur postsynthetischen Kupplung eines Fluorophors) wurde am 5'-Ende installiert, sodass nach der Festphasensynthese nur das Vollängenprodukt den Fluorophor (oder die Modifikation) enthält. Dies sollte die Aufreinigung per RP-HPLC signifikant vereinfachen. Um einen möglichen FRET zwischen TO und dem *Tracking*-Fluorophor zu vermeiden, wurde TO nicht in die Nähe des 5'-Endes platziert. Um die Komplexität gering zu halten, wurde bei diesen Voruntersuchungen auf die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen verzichtet. Eine Voraussetzung bei der Verwendung von AntimiRs ist die Stabilität gegen Endo- und Exonukleaseverdau in der Zelle. Studien zeigten, dass 2'OMe-RNA effizient den Verdau durch Endonukleasen verhindert.^[303,304] Häufig werden Phosphorthioate verwendet, um eine Exonuklease-Resistenz zu erreichen, was allerdings mehrere Nachteile hat:^[305] Erstens bedeutet die Einführung von sechs Phosphorthioaten, drei an jedem Ende, zusätzliche Schritte in der Festphasensynthese, die häufig nicht vollständig ablaufen. Zweitens entsteht bei der Synthese ein Diastereomeregemisch, sodass $2^6=64$ verschiedene Verbindungen erhalten werden. Jede Verbindung kann eine unterschiedliche Affinität zur miRNA sowie eine verschiedene Toxizität aufweisen. Drittens könnte die Aufreinigung erschwert werden, da die Diastereomere häufig unterschiedliche Retentionszeiten in der RP-HPLC zeigen. Behlke *et al.*^[303] zeigten, dass die Verwendung von unnatürlichen Linkern (unter anderem C3-Linker, *n*-Propanol; siehe **Abb. 54**) am 3'- und 5'-Ende von 2'OMe-RNA der Endo- und Exonukleaseverdau verhindern werden konnte. Im Vergleich zu Phosphorthioaten müssen dazu nur zwei Modifikationen installiert werden. Zudem sind Alkyl-Linker für hohe Kupplungsausbeuten in der Festphasensynthese bekannt. Es wurde angenommen, dass ein Fluorophor genauso effektiv den Exonukleaseverdau verhindern kann, da dieser sogar sterisch anspruchsvoller ist und zudem auch über einen Alkyl-Linker in die Nukleinsäure eingeführt wird. Bei allen Strängen wurde das 3'-Ende mit einem C3-Linker (*n*-Propanol) modifiziert. Bei zwei Strängen im „*Displacement* Motiv“ wurde das 5'-Ende mit einem Cy5 *Tracking*-Fluorophor markiert. Eine Disulfid-Modifikation sollte das postsynthetische Markieren eines Tracking-Fluorophors (z.B. mit Cy5-Maleimide) bei den Strängen im „*wedge* Motiv“ ermöglichen.

	Sequenz	Bezeichnung
"Displacement Motiv"	3'-LUU GUX AGU UGC GAC AGC CAC UCA F-5'	d-Ser1
	3'-LUU GUA AGU XGC GAC AGC CAC UCA F-5'	d-Ser2
	3'-LUU GUA AGU UXC GAC AGC CAC UCA-5'	d-Ser3

"wedge Motiv"	3'-LUU XGU AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ-5'	w-Ser1
	3'-LUU GXU AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ-5'	w-Ser2
	3'-LUU GUX AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ-5'	w-Ser3

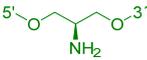
X = Serinol-Linker	
L = C3-Linker	
F = Cy5	
Z = Disulfid-Linker	

Abb. 54 Sequenzen der Serinol-Linker-modifizierten AntimiR-Sonden im „wedge Motiv“ und „Displacement Motiv“, die postsynthetisch mit **TO-COOH** markiert wurden.

Die Festphasensynthese wurde unter sogenannten *UltraMild*-Bedingungen durchgeführt. Dabei wird anstatt Essigsäureanhydrid (Ac_2O) Phenoxyessigsäureanhydrid (Pac_2O) als *Capping*-Reagenz verwendet. Dies ist notwendig, da es bei *Capping* zu einer Umacylierung kommen kann. Wird die TFA-Schutzgruppe auf dem Amin des Serinol-Linkers durch Acetyl ersetzt, kann diese nicht mehr unter den Standard-Abspaltungsbedingungen (aq. NH_3 (32%), RT) entfernt werden. Harschere Bedingungen hätten zur Zersetzung des Cy5-Fluorophors führen können. Die Aufreinigung erfolgte unter Standardbedingungen per RP-HPLC (siehe **Tabelle 20** für die massenspektrometrischen Analysen der synthetisierten Oligonukleotide). Die postsynthetische Markierungsprozedur wurde nach Seitz *et al.*^[88] durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt **TO-COOH** zum Aktivester **TO-NHS** umgesetzt, welches anschließend mit der Nukleinsäure gekuppelt wurde (siehe **Abb. 55**). Allerdings konnte unter diesen Bedingungen kein Produkt erhalten werden. Durch Verringerung der Äquivalente des Amid-Kupplungsreagenzes *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) von 2 auf 0,8 Äquivalente konnte ein postsynthetisches Markieren erfolgreich durchgeführt werden. Die Kupplung von TO-NHS mit dem Amino-Linker der Nukleinsäuren erfolgte analog zu der Anleitung von Seitz *et al.*^[88] mit 0,1 M NaHCO_3 aber 80 anstatt 100 Eq. Äquivalenten von TO-NHS (Reaktionsgemisch/Rohprodukt) in Bezug auf die Serinol-modifizierte Nukleinsäure. Zur Abtrennung der überschüssigen Reagenzien wurde eine Fällung der Nukleinsäuren mit Isopropanol durchgeführt.

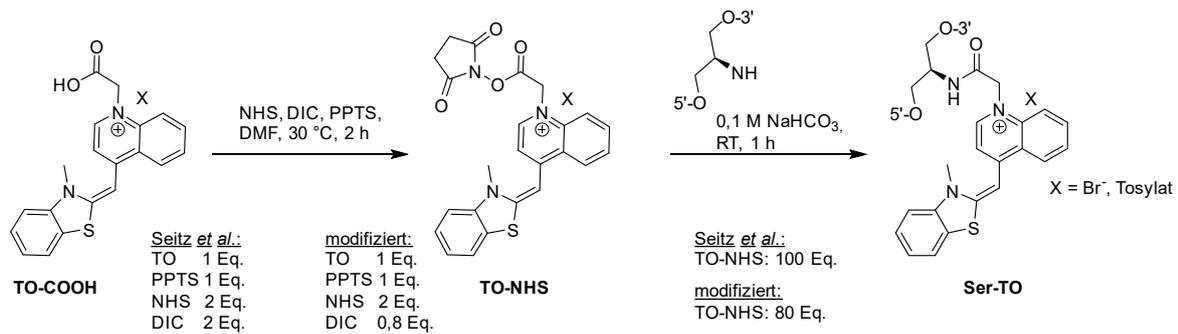


Abb. 55 Synthese des TO-NHS-Esters zum postsynthetischen Markieren einer Serinol-modifizierten Nukleinsäure. Die Äquivalente von NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) und PPTS (Pyridinium-*para*-Toluolsulfonat) waren bei beiden Durchführungen identisch. Nur die Äquivalente des Amid-Kupplungsreagenzes DIC (*N,N*-Diisopropylcarbodiimid) wurde von 2 auf 0,8 gesenkt.

Die Aufreinigung der TO-markierten Stränge erfolgte per RP-HPLC (siehe **Abb. 56**). Die Ausbeuten der Kupplung von TO variierten stark im Bereich von ~40% für **w-Ser2-TO** und <10% für **w-Ser1-TO**. Ein signifikantes Problem bei der Aufreinigung war, dass bei den Strängen mit einem Cy5-Fluorophor (**d-Ser1-TO** und **d-Ser2-TO**) keine vollständige Abtrennung der unmarkierten von den markierten Strängen erzielt werden konnte.

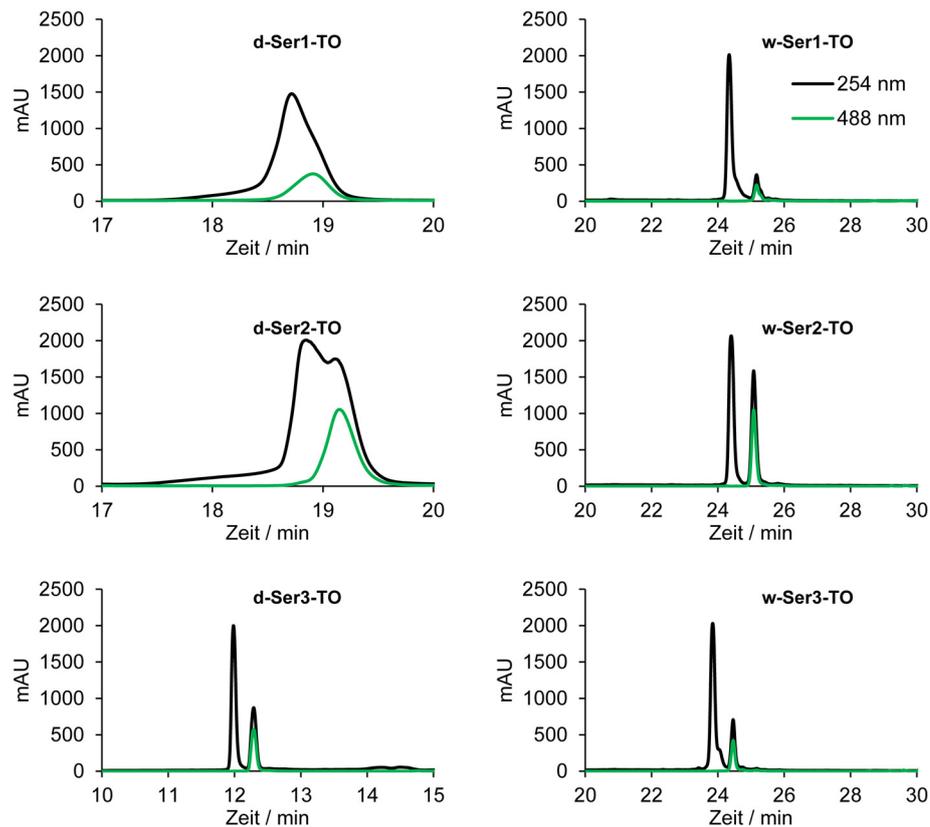


Abb. 56 RP-HPLC Chromatogramme zur Aufreinigung der TO-markierten AntimiRs.

Wird berücksichtigt, dass dies nur eine Test-Variante des AntimiRs ohne photolabile Schutzgruppen war und dass die Aufreinigung von photolabil-geschützten Nukleinsäure gewöhnlicherweise schwieriger ist, ist es fragwürdig, ob diese überhaupt in der benötigten Reinheit für die *in vitro* Studien erhalten werden könnten. In diesen Voruntersuchungen

war das Auftrennungsproblem von untergeordneter Bedeutung, da nur der relative Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe der miRNA gemessen wurde und die absolute Fluoreszenzintensität eine untergeordnete Rolle spielte. Zur Analyse des überlappenden HPLC-Signals von **d-Ser1-TO** in **Abb. 56** ist eine Überlagerung der UV/vis Absorptionsspektren am Anfang, in der Mitte und am Ende des Signals in **Abb. 57** gezeigt.

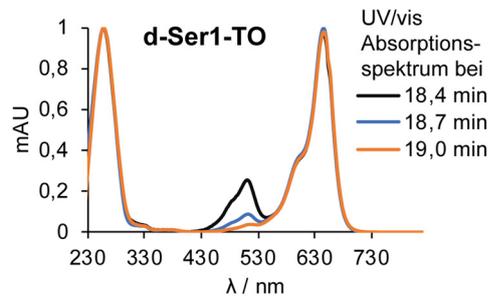


Abb. 57 Überlagerte UV/vis Absorptionsspektren zur Analyse des HPLC-Signals von **d-Ser1-TO** in **Abb. 56**. Die Spektren wurden während der RP-HPLC (0,1 M TEAA, MeCN) aufgenommen.

Die Fluoreszenz wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von 0,5 Eq., 1 Eq. und 2 Eq. miR-181a für **w-Ser3-TO** und 0,5 Eq., 1 Eq. und 20 Eq. miR-181a für die restlichen AntimiRs gemessen (Eq. sind bezogen auf die AntimiR Konzentration). Die Anregung des TO-Fluorophores erfolgte bei 490 nm. Dies ist ähnlich zu den Studien von Seitz *et al.* bei denen TO bei 495^[90] und 485^[91] nm angeregt wurde. Allgemein konnten bei den TO-modifizierten Strängen im „Displacement Motiv“ ein höherer Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden, als im Falle des „wedge Motives“ (siehe **Abb. 58**). Der größte Anstieg der Fluoreszenz konnte bei **d-Ser2-TO** um den Faktor 3,3 beobachtet werden. Die anderen „Displacement Motive“ **d-Ser1-TO** und **d-Ser3-TO** zeigten einen Fluoreszenzanstieg um den Faktor 2,4 und 2,8. Das „wedge Motiv“ zeigte durchgehend nur einen geringen Anstieg der Fluoreszenz (1,2-1,9-fach). Obwohl die Größenordnung der Ergebnisse dieser Studie mit der von Seitz *et al.*^[90,306] übereinstimmt, ist der Fluoreszenzanstieg zu gering für eine regulierende Anwendung in Zellen. Anders als bei den Voruntersuchungen in dieser Studie (siehe **Abb. 58**) und den Studien von Seitz *et al.*^[90,306] kann bei einer Regulation in Neuronen die miRNA nicht äquivalent oder im Überschuss zum AntimiR vorliegen. Da eine möglichst quantitative Inhibierung der miRNA erfolgen sollte, müsste das AntimiR im Überschuss zugegen werden. Dies hätte jedoch zu einer Erhöhung der Fluoreszenz im Einzelstrang geführt, wodurch der Fluoreszenzanstieg nach Hybridisierung prozentual geringer ausfallen würde. Dadurch, dass die Aufreinigung problembehaftet war und der Anstieg der Fluoreszenz zu niedrig für die Anforderungen des Projektes war, wurde dieses Konzept verworfen.

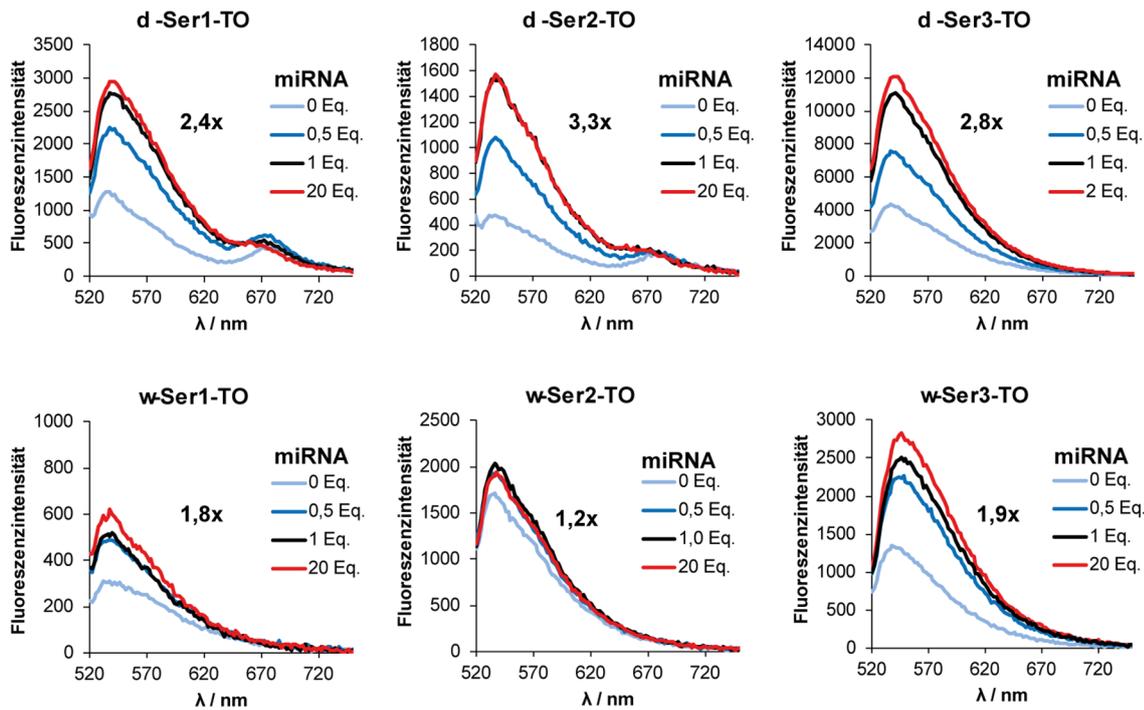


Abb. 58 Fluoreszenzstudien der TO-markierten AntimiRs. Die Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Äquivalenten der miRNA gemessen. Die Messung erfolgte bei 37 °C in PBS-Puffer (pH 7,4) mit einer 1 μ M Konzentration der TO-modifizierten Stränge. Das Volumen von **d-Ser3-TO** betrug 100 μ L, das Volumen der anderen Messungen 50 μ L.

2.2.3 Dual-markierter, lichtaktivierbarer Molecular Beacon als AntimiR-Sonde

Wie in Kapitel 1.2 und 1.3.2.2 ausführlich beschrieben, können Molecular Beacons (MB) zur fluorogenen Detektion von Nucleinsäuren verwendet werden. Die verschiedenen Ansätze zur Lichtregulation von MBs sind ausführlich in Kapitel 1.3.2.2 beschrieben. Dabei zeigte sich, dass das von Heckel *et al.*^[119] eingeführte Konzept, bei dem die photolabilen Schutzgruppen auf den Nucleobasen in der Schleifen-Region installiert wurden, als besonders effizient erwies (siehe **Abb. 59**). Nach experimenteller Bestimmung von Anzahl und Position der photolabilen NPE-Schutzgruppen, konnte die Bindung der zur Schleifen-Region komplementären Nucleinsäure verhindert werden. Nach Photolyse und Hybridisierung der komplementären Nucleinsäure konnte ein \sim 10-facher Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Dabei wurde ein DNA-basierter MB entworfen, der aus einer „perfekten“ (sekundärstrukturfreien) Schleifen-Region bestand (siehe **Abb. 60a**).

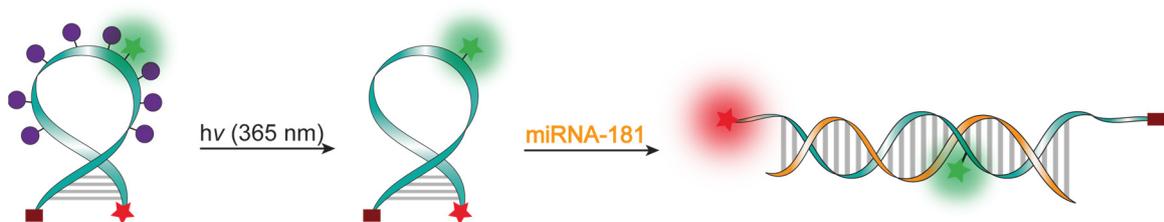


Abb. 59 Funktion eines lichtaktivierbaren Molecular Beacons. Photolabile Schutzgruppen verhindern die Hybridisierung mit der miRNA. Der Stamm bleibt geschlossen und der rote Fluorophor bleibt dunkel. Nach UV-Licht induzierter Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen kann der MB eine miRNA binden. Der Stamm wird geöffnet, Fluorophor und Quencher räumlich getrennt und der rote Fluorophor fluoresziert.

In dieser Studie muss die Schleifenregion komplementär zu miRNA sein und kann nicht verändert werden. Zudem muss zum Schutz vor Endonukleaseverdau 2'OMe RNA verwendet werden. Die **Abb. 60b** und **Abb. 60c** zeigen eine simulierte Sekundärstruktur des AntimiRs ohne zusätzlichen und mit einem zusätzlichen fünf Basenpaar langen Stamm. Im Vergleich zum MB aus der Studie von Heckel *et al.*^[119] in **Abb. 60a** ist eindeutig zu erkennen, dass das Design wesentlich herausfordernder ist und die Länge des Stammes experimentell bestimmt werden muss. Der Stamm muss lang genug sein, damit der MB im unhybridisierten Zustand geschlossen bleibt, jedoch in Anwesenheit von miRNA sofort hybridisiert (siehe **Abb. 59**).

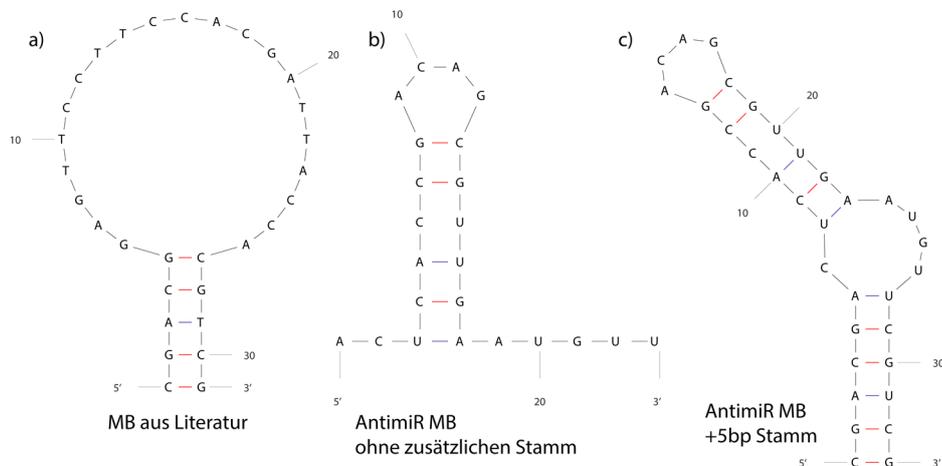


Abb. 60 Simulierte Sekundärstrukturen von einem Molecular Beacon aus der Literatur^[119] (a), sowie von dem AntimiR ohne Stamm (b) und mit einem 5bp langem Stamm (c). Die Strukturen wurde mit *Mfold*^[307] (*DNA fold* für a) und *RNA fold* für b) und c)) simuliert.

Insgesamt müssen bei der lichtaktivierbaren MB-Sonde folgende Aspekte berücksichtigt werden:

- Länge des Stammes
- Auswahl des Fluorophor-Quencher Paares
- (spektrale) Kompatibilität des Fluorophor-Quencher-Paares mit *Tracking*-Fluorophor
- (spektrale) Kompatibilität mit photolabilen Schutzgruppen
- (spektrale) Kompatibilität zu dem experimentellen Setup (Mikroskopie und Fluoreszenzmarkierung von Proteinen und mRNA)
- Anzahl und Position der photolabilen Schutzgruppen

Als hybridisierungssensitiver Fluorophor wurde Cy5 and als Quencher BBQ-650 gewählt, da beide Chromophore kommerziell als Phosphoramidite erhältlich sind. Dies erleichterte die Einführung, da kein zusätzlicher postsynthetischer Schritt notwendig ist. BBQ-650 wurde gegenüber BHQ-3 bevorzugt, da BBQ-650 chemisch stabiler ist. BHQ-3 kann einer Zersetzung während der Festphasensynthese, sowie während der Entschützung der Oligonukleotide, unterliegen.^[308] Der *Tracking*-Fluorophor Atto488 sollte postsynthetisch an

ein Amin-modifiziertes 2'OMe Uridin **75** (siehe **Abb. 63**) in der Schleifen-Region gekoppelt werden. Im Vergleich zu Fluorescein zeigt Atto488 eine hellere Fluoreszenz und besitzt eine höhere Photostabilität.^[309] Allerdings ist Atto488 nicht als Phosphoramidit erhältlich und muss postsynthetisch eingeführt werden.

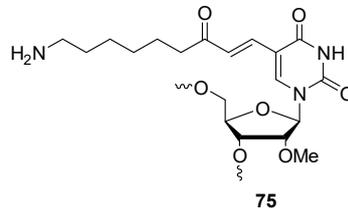


Abb. 61 Chemische Struktur des Amin-modifizierten 2'OMe Uridins zum postsynthetischen Markieren mit Atto488-NHS. Das entsprechende Phosphoramidit von **75** wurde von *ChemGenes* bezogen.

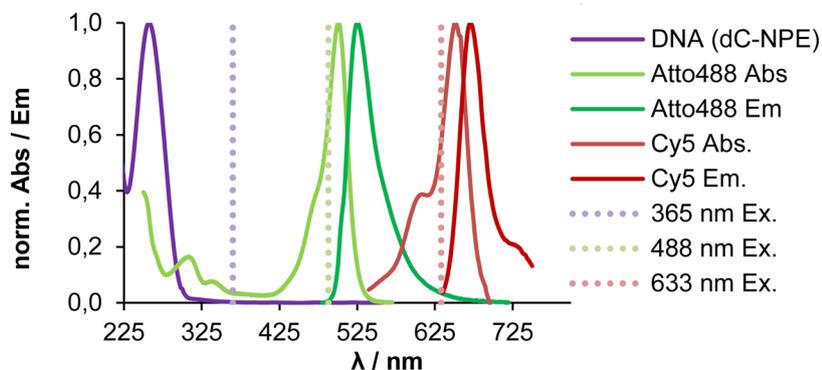


Abb. 62 Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Chromophore mit den entsprechenden Anregungswellenlängen (gepunktete Linien). NPE dC bezeichnet ein 15mer DNA Strang mit einer NPE-Schutzgruppe auf einem dC in der Mitte der Sequenz. Die Spektren (außer NPE dC Abs.) wurden aus dem *spectra viewer* der Firma *ThermoFisher Scientific* und *Chroma* entnommen.

Im ersten Schritt wurde die Stammlänge des MB experimentell bestimmt. Dazu wurden drei MBs (**MB1**, **MB2**, **MB3**) mit einem Cy5 am 5'-Ende und einem BBQ-650 am 3'-Ende, sowie einem Amino-Linker in der Schleifen-Region zum postsynthetischen Markieren des Tracking Fluorophores, synthetisiert. 2'OMe RNA basierende Molecular Beacon zeigen etwas andere thermodynamische Eigenschaften als gewöhnliche DNA basierende, weshalb besondere Designparameter berücksichtigt werden müssen:^[310] So hybridisieren 2'OMe-MBs schneller und mit einer höheren Affinität als DNA-MBs. Trotzdem ist der Stamm von 2'OMe-MBs deutlich stabiler. Allerdings kommt es durch die höhere Affinität zur Ziel-Nukleinsäure zu einer geringeren Selektivität zwischen der perfekt-komplementären Ziel-Nukleinsäure und einer, die eine Fehlbasenpaarung enthält. Um einen möglichst breiten Bereich zu untersuchen, wurden drei MBs hergestellt, die durch einen drei- (**MB1**), fünf- (**MB2**) und sieben-Basenpaaren (**MB3**) langen Stamm erweitert wurden (siehe **Abb. 63**).

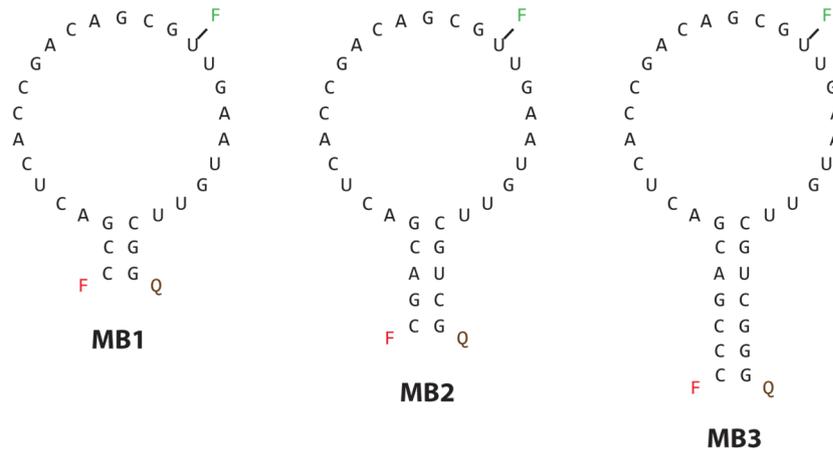


Abb. 63 Sequenzen der MBs zur Bestimmung der optimalen Stammlänge. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde die zur miRNA komplementäre Schleifen-Region unhybridisiert dargestellt (vgl. **Abb. 60**). **MB1**, **MB2** und **MB3** wurden um drei, fünf und sieben Basenpaare verlängert, um einen stabilen Stamm zu bilden.

Die Festphasensynthese erfolgte unter *UltraMild*-Bedingungen. Der Quencher wurde über die feste Phase (BBQ-650 CGPII, *Linktech Co.*, siehe **Abb. 64**) eingeführt. Cy5 wurde an das 5'-Ende der Sequenz gekuppelt. Dazu wurde keine klassische 5'-Modifizierung verwendet, sondern ein MMTr-geschütztes Cy5 (siehe **Abb. 64**), welches zur internen Modifizierung verwendet werden kann. Die unpolare MMTr-Schutzgruppe sollte eine signifikante Verschiebung der Retentionszeit in der RP-HPLC verursachen, was die Aufreinigung des Vollängenproduktes erleichtern sollte.

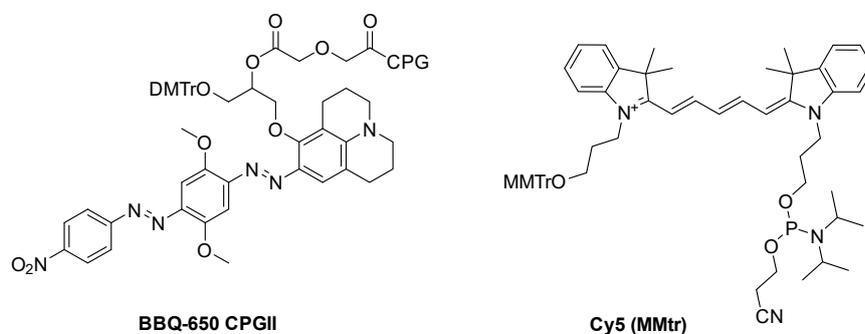


Abb. 64 Chemische Strukturen von BBQ-650 CPGII und Cy5 (MMTr).

Die Abspaltung vom Festphasenmaterial, sowie die Entfernung der Schutzgruppen auf den Nucleobasen erfolgte durch Inkubation mit Ammoniak (32%_{aq.}). Die DMTrON RP-HPLC Aufreinigung (siehe **Abb. 65**) erfolgte über eine Säule von *Macherey Nagel* (300 Å, 5 µm, C4ec, 4,6x250 mm), da sich in vorausgegangenen Studien gezeigt hat, dass bei der Verwendung von Säulen des Herstellers *MultroKrom* (100-5 C18) eine signifikante Verschleppung der Proben beobachtet wurde. Selbst nach fünfzig Waschprozeduren der *MultroKrom*-Säule konnte die Spuren der vorher gereinigten Proben nicht entfernen. Diese Probleme traten hauptsächlich bei hoch-modifizierten Proben (meist unpolare Modifikationen) auf. Zur Abspaltung der MMTr-Schutzgruppe wurden die getrockneten Fraktionen mit Essig-

säure (80%) bei Raumtemperatur inkubiert. Gewöhnlicherweise werden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch per HPLC aufgereinigt. Allerdings kann es bei dem Einengen zu einer Rekombination des MMTr-Kations and die primäre OH-Gruppe von Cy5 kommen. Um dies zu vermeiden wurden die Proben vor dem Einengen mit einem Überschuss an Ethanol versetzt, welches anstelle der OH-Gruppe von Cy5 mit MMTr-Kation reagieren sollte. Die anschließende Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC unter denselben Bedingungen wie für die DMTrON-Aufreinigung (siehe **Abb. 65**). Ein exemplarisches Chromatogramm von **MB1** zur Aufreinigung und Analytik ist in **Abb. 65** gezeigt. Bei der analytischen RP-HPLC wurde eine Säule der Firma *Waters* verwendet. Diese zeigte eine bessere Auftrennungsleistung, sodass Verunreinigungen detektiert werden konnten, die über die präparative Säule von *Macherey Nagel* nicht abgetrennt werden konnten (siehe **Abb. 65**). **MB1** und **MB2** konnten massenspektrometrisch identifiziert werden (siehe **Tabelle 21**).

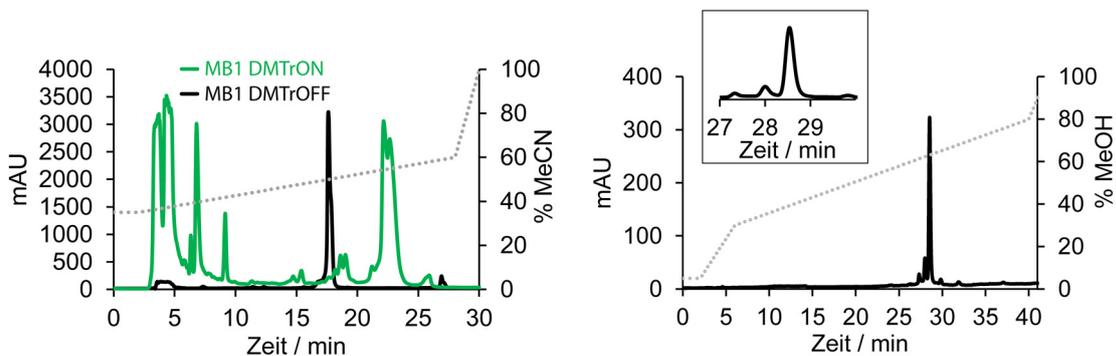
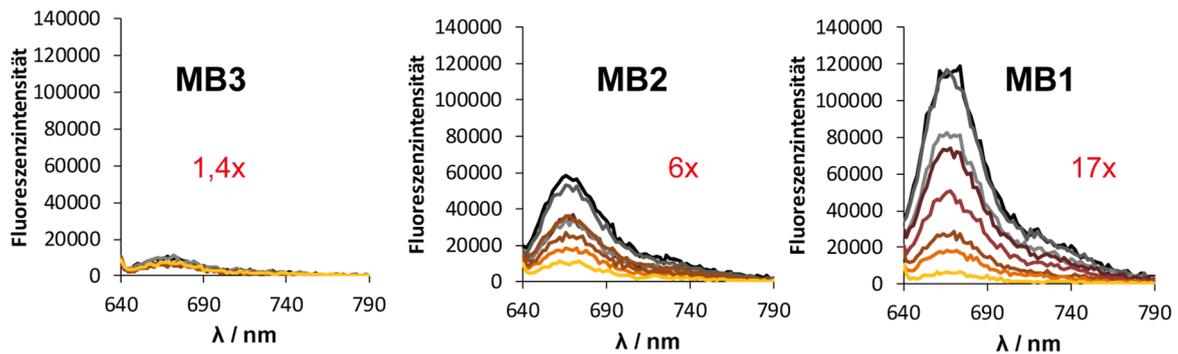


Abb. 65 RP-HPLC Chromatogramm von **MB1** vor (grün) und nach (schwarz) der DMTr-Schutzgruppen Abspaltung (link). Säule: Der *Macherey Nagel* 300 Å C4ec; 4,6 x 250 mm. Eluenten: HFIP (400 mM HFIP, 16,3 mM TEA, pH 8) und MeOH. Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt. Analytisches RP-HPLC Chromatogramm von **MB1** (rechts). Säule: *Waters XBridge BEH300* 3,5 µm, 4,6 x 250 mm. Eluenten: HFIP (400 mM HFIP, 16,3 mM TEA, pH 8) und MeOH. Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt.

Zur Untersuchung der idealen Stammlänge wurden Fluoreszenzstudien mit den MBs und der miRNA (von 0 bis 2 Eq.) durchgeführt. Durch den Anstieg der Fluoreszenz des hybridisierungssensitiven Fluorophor (Cy5) sollte bestimmt werden, welche Stammlänge zu kurz ist, sodass der MB Hintergrundfluoreszenz zeigt und welche Stammlänge zu lang ist, sodass kein starker Anstieg der Fluoreszenz der MB gemessen werden kann. Im Vergleich der drei MBs in **Abb. 66** zeigte sich, dass **MB3** mit einem Stamm von sieben Basenpaaren zu stabil war und in Gegenwart von der miRNA nicht hybridisierte, da kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden konnte. **MB2** mit einem Stamm von fünf Basenpaaren zeigt einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz. **MB1** mit einem Stamm von nur drei Basenpaaren zeigt den größten Anstieg der Fluoreszenz. Interessanterweise zeigt **MB1** sogar die geringste Fluoreszenz in Abwesenheit der miRNA.



2. Eq. – 1 Eq. – 0.8 Eq. – 0.6 Eq. – 0.4 Eq. – 0.2 Eq. – 0.1 Eq. – 0 Eq. miRNA

Abb. 66 Fluoreszenzmessungen von **MB1**, **MB2** und **MB3** in Anwesenheit von verschiedenen Äquivalenten an miRNA. Die Anregung von Cy5 erfolgte bei 610 nm. Die Messungen wurden an dem *PlateReader* Gerät der Firma *Tecan* bei einer MB Konzentration von 1 μ M in PBS Puffer (pH 7,4) durchgeführt.

Im Vergleich zu den TO-modifizierten AntimiRs (maximal 3,3-facher Anstieg der Fluoreszenz) zeigte sich, dass das Signal-Rausch Verhältnis bei den MBs (maximal 17-facher Anstieg der Fluoreszenz) deutlich besser war.

Zum postsynthetische Markieren mit Atto488-NHS wurden die MBs in Borax-Puffer (pH 8,3) auf 80 °C zum Denaturieren erwärmt und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte allerdings nur ca.10% Umsatz beobachtet werden. Deswegen wurde in einem zweiten Versuch der pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M NaHCO_3 -Lösung auf 8,6 eingestellt und die Reaktionstemperatur auf 65 °C erhöht. Dies sollte mögliche Sekundärstrukturen teilweise auflösen und somit die „Zugänglichkeit“ des Amins erhöhen. Ein Nachteil bei der hohen Temperatur des postsynthetischen Markierens bei pH 8,6 ist, dass unter diesen Bedingungen photolabile Schutzgruppen abgespalten werden können. Besonders die NPE-Schutzgruppe auf Uridin neigt zu einer Hydrolyse unter basischen Bedingungen. Zur Entfernung von Überschüssigem Atto488-NHS wurden die MBs mit NaOAc in Ethanol gefällt. Die Aufreinigung der markierten MBs erfolgte per RP-HPLC (siehe **Abb. 67** links für ein exemplarisches Chromatogramm von **MB1**).

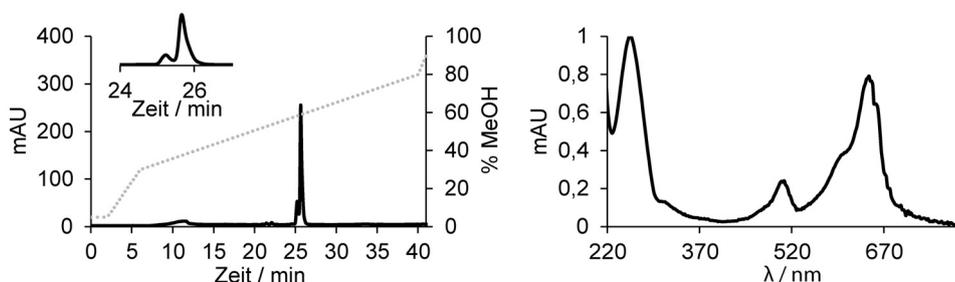


Abb. 67 RP-HPLC Chromatogramm nach dem Markieren von **MB1** mit Atto488 (links) und das in der HPLC aufgenommene UV/vis Absorptionsspektrum (rechts). Das kleinere Signal im Chromatogramm bei Minute 25,2 ist kein (nicht-markiertes) Edukt. Selbst nach Abtrennung dieses Signals konnte es erneut im HPLC-Chromatogramm detektiert werden. Deshalb wird angenommen, dass es sich um eine Sekundärstruktur oder Isomer (von Quencher oder Fluorophoren) handelt. Bedingungen: Säule: *Macherey Nagel* 300Å, C4ec; 4,6 x 250 mm. Eluenten: HFIP (400 mM, 16,3 mM TEA, pH 7) und MeOH. Der Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt. Die HPLC erfolgte bei 60 °C.

Das UV/vis Absorptionsspektrum (siehe **Abb. 67** rechts) zeigt die charakteristische Absorption von Atto488 bei 488 nm.

Im nächsten Schritt der Studie musste die Anzahl und Position von photolabilen Schutzgruppen evaluiert werden, die notwendig sind, um eine Hybridisierung der miRNA vor Belichtung zu verhindern. Dabei musste allerdings berücksichtigt werden, dass bei einer zu hohen Anzahl an photolabilen Schutzgruppen die Photolyse mehr Licht benötigt oder nicht vollständig ablaufen kann. Als photolabile Schutzgruppen wurde aufgrund der spektralen Kompatibilität NPE gewählt und die entsprechend geschützten 2'OMe Nucleosidphosphoramidite nach Literaturvorschrift^[118] hergestellt. Um den synthetischen Aufwand zu verringern, wurde darauf verzichtet das NPE-modifizierte 2'OMe Guanosinphosphoramidit zu synthetisieren.

2.2.3.1 Synthese der NPE-geschützten 2'OMe Nucleosidphosphoramidite

2.2.3.1.1 Synthese des NPE-geschützten 2'OMe Adenosinphosphoramidits (**82**)

Die Synthese des 2'OMe Adenosinphosphoramidits **82** (siehe **Abb. 68**) erfolgte nach Literaturvorschrift^[118].

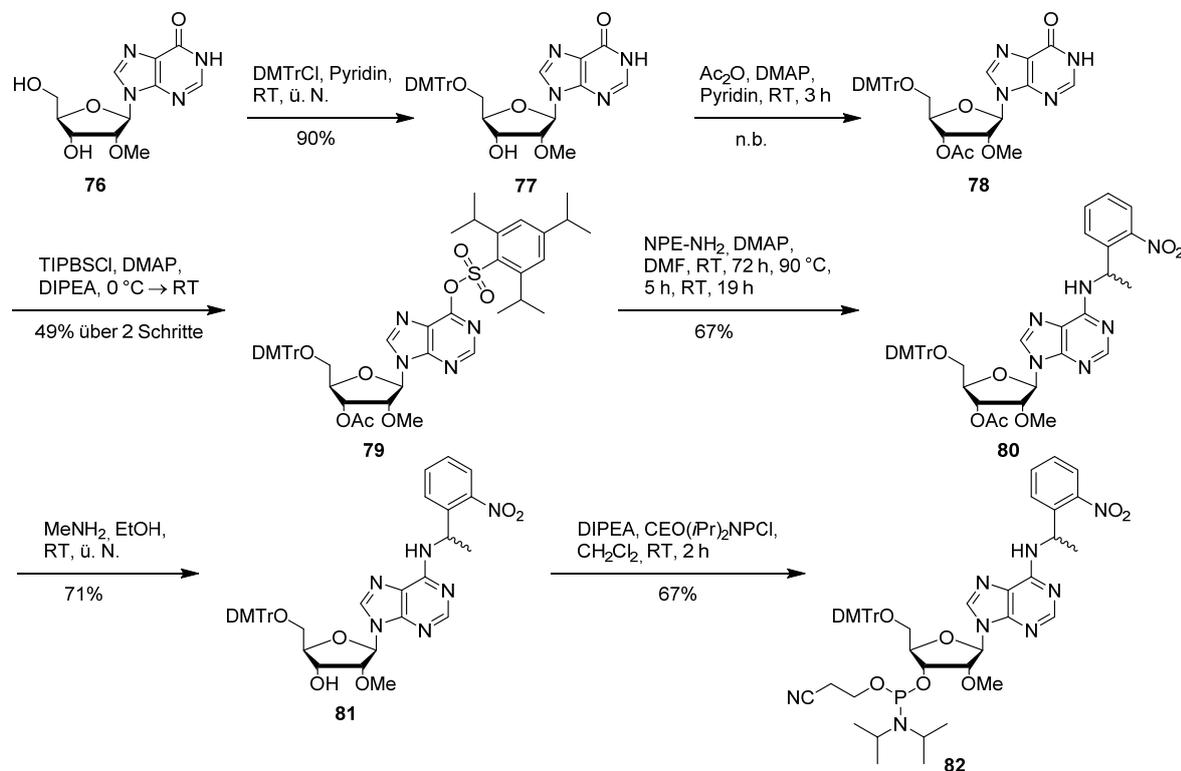


Abb. 68 Syntheseübersicht zur Darstellung des NPE-geschützten 2'OMe Adenosinphosphoramidits **82**.

Ausgehend von 2'OMe Inosin **76** wurde die 5'-OH Gruppe mit der, in der Festphasensynthese standardgemäß verwendeten, säurelabilen DMTr-Schutzgruppe versehen. Dazu wurde 2'OMe Inosin mit DMTrCl in Pyridin umgesetzt. Pyridin war sowohl Lösungsmittel,

als auch Base und konnte die während der Reaktion entstandene Salzsäure neutralisieren, sodass eine säurekatalysierte Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe verhindert wurde. 5'-O-DMTr-2'-O-methylinosin **77** konnte in 81% Ausbeute erhalten werden. Im zweiten Schritt erfolgte die Acetyl-Schützung der 3'-OH Gruppe. Die basenlabile Acetylgruppe konnte in späteren Reaktionen orthogonal zur DMTr-Schutzgruppe abgespalten werden, sodass die 3'-OH Gruppe zum Phosphoramidit umgesetzt werden konnte. Die Einführung der Acetyl-schutzgruppe erfolgte mit Essigsäureanhydrid (3,3 Eq.) und katalytischen Mengen DMAP in Pyridin. Da nach dreistündiger Reaktion keine vollständige Umsetzung beobachtet werden konnte, wurden weitere 2,2 Eq. Acetylchlorid zugegeben. Das Produkt **78** wurde ohne weitere Aufreinigung und Analyse in der nächsten Stufe verwendet. Zur Installation der NPE-Schutzgruppe musste die Position 6 von Verbindung **78** zuvor aktiviert werden. Dies erfolgte durch Reaktion von Verbindung **78** mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TIP-BSCI), DIPEA und katalytischen Mengen DMAP. Bei der Reaktion entstand ein Regioisomergemisch aus dem gewünschten *O*⁶-sulfonylierten Produkt **79** und dem *N*¹-sulfonylierten Nebenprodukt. Die beiden Regioisomere konnten säulenchromatographisch getrennt werden, sodass **79** in 49% Ausbeute erhalten werden konnte. Die NPE-Schutzgruppe wurde in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit **79** und NPE-NH₂ eingeführt. Verbindung **80** wurde in 67% Ausbeute erhalten. Die Abspaltung der 3'-O-Acetyl-Schutzgruppe erfolgte mit Methylamin in Ethanol, sodass nach säulenchromatographischer Aufreinigung von Verbindung **81** in 71% Ausbeute erhalten werden konnte. Die Umsetzung zum Phosphoramidit **82** wurde nach einer leicht abgewandelten Prozedur durchgeführt. Dabei wurde das Lösungsmittelvolumen um die Hälfte verringert, da das konzentriertere Reaktionsgemisch schneller umgesetzt wird, was eine Zersetzung des Produktes verhindern. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung zeigte das Produkt im ³¹P-NMR Spektrum noch das Vorhandensein einer Spezies des Phosphoramidit Reagenzes 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, welches ein typisches Signal bei ~12ppm aufweist. Auch eine erneute säulenchromatographische Aufreinigung konnte diese Verunreinigung nicht entfernen. Die Entfernung dieser Verunreinigung ist notwendig, da es ansonsten zu geringeren Kupplungsausbeuten bei der Festphasensynthese kommen kann. Dies musste speziell bei diesen hoch-modifizierten MBs vermieden werden, da das synthetisierte Oligonukleotid ansonsten nicht in der benötigten Menge oder Reinheit erhalten werden könnte. Zur Entfernung der Verunreinigung wurde die Verbindung in wenig Aceton gelöst und mit *n*-Hexan bei -20 °C für 2 h gefällt. Durch anschließende Zentrifugation konnte das saubere Produkt **82** (siehe **Abb. 69** für den Vergleich der ³¹P-NMR-Spektren vor und nach der Fällung) pelletiert werden.

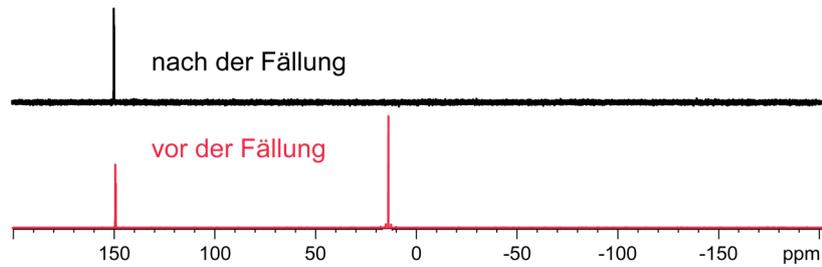


Abb. 69 ^{31}P -NMR Spektrum (202 MHz, DMSO-d_6) von **82** vor und nach der Fällung mit Aceton/*n*-Hexan. Die Verunreinigung mit dem charakteristischen Signal bei $\sim 12\text{ppm}$ konnte durch die Fällung entfernt werden.

2.2.3.1.2 Synthese des NPE-geschützten 2'OMe Cytidinphosphoramidits (**89**)

Die Synthese des 2'OMe Cytidinphosphoramidits **89** (siehe **Abb. 70**) erfolgte nach Literaturvorschrift^[118].

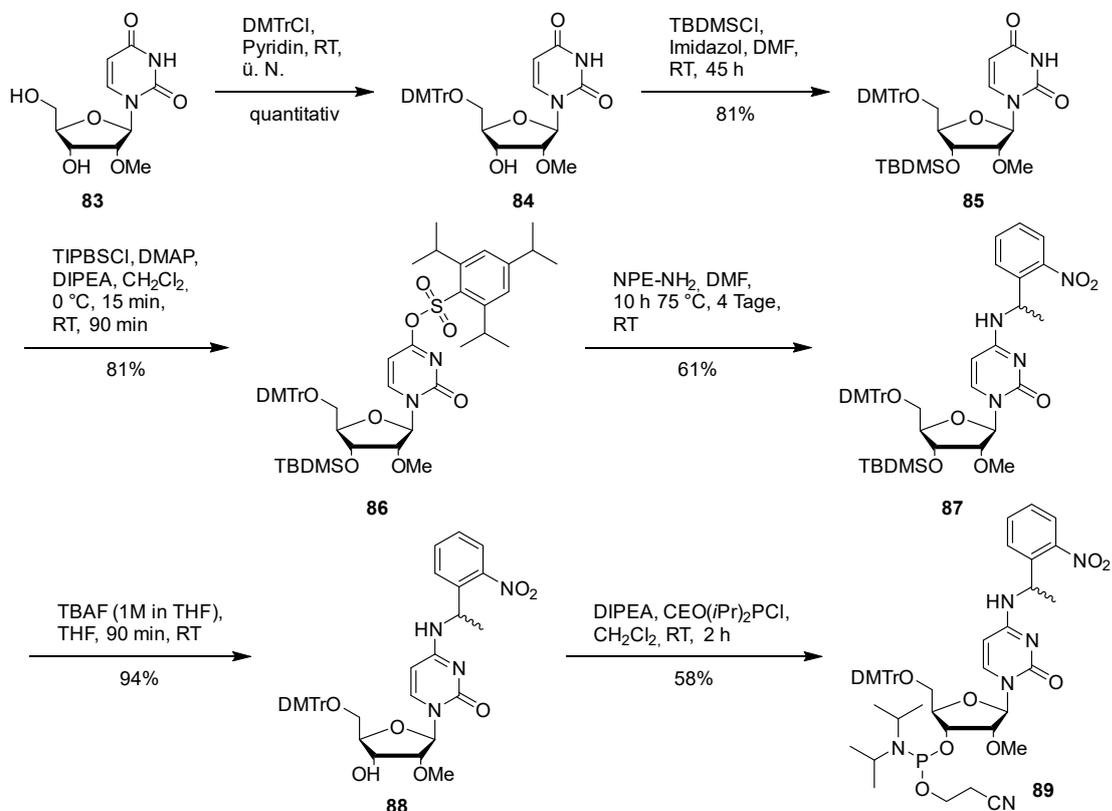


Abb. 70 Syntheseübersicht zur Darstellung des NPE-geschützten 2'OMe Cytidinphosphoramidits **89**.

Ausgehend von 2'OMe Uridin **83** wurde die 5'-OH Gruppe mit DMTrCl geschützt. Da die 5'-OH Gruppe die einzige primäre OH-Gruppe ist und DMTrCl ein sterisch anspruchsvolles Elektrophil ist, lief die Schützung selektiv und quantitativ ab (\rightarrow **84**). Die Einführung der 3'-OH Schutzgruppe erfolgte unter Standardbedingungen mit TBDMSCl und Imidazol in 87% Ausbeute (\rightarrow **85**). Zur Installation der photolabilen Schutzgruppe musste die O^4 -Position mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TIPBSCl) aktiviert werden. Die Reaktion erfolgte mit TIPBSCl, DIPEA und katalytischen Mengen DMAP, sodass **86** in 81% Ausbeute erhalten werden konnte. Die Einführung der NPE-Schutzgruppe erfolgte mit NPE-NH₂ in 61%

Ausbeute. Die 3'-O-TBDMS-Schutzgruppe von Verbindung **87** wurde unter Standardbedingungen mit TBAF entfernt (\rightarrow **88**). Die Umsetzung zum Phosphoramidit **89** wurde, wie im Falle von Adenosin (siehe Kapitel 2.2.3.1.1), nach einer leicht abgewandelten Prozedur durchgeführt. Analog zu der Synthese des NPE-geschützten 2'OMe-Adenosinphosphoramidites **82** konnte auch hier nach zweifacher säulenchromatographischer Aufreinigung kein sauberes Produkt isoliert werden. Durch einen Fällungsschritt mit Aceton und *n*-Hexan konnte die Verunreinigung entfernt werden.

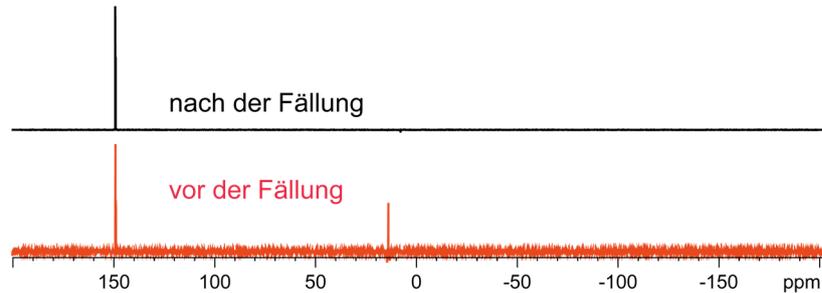


Abb. 71 ^{31}P -NMR Spektrum (202 MHz, DMSO-d_6) von **89** vor und nach der Fällung mit Aceton/*n*-Hexan. Die Verunreinigung mit dem charakteristischen Signal bei $\sim 12\text{ppm}$ konnte durch die Fällung entfernt werden.

2.2.3.1.3 Synthese des NPE-geschützten 2'OMe-Uridinphosphoramidits (**92**)

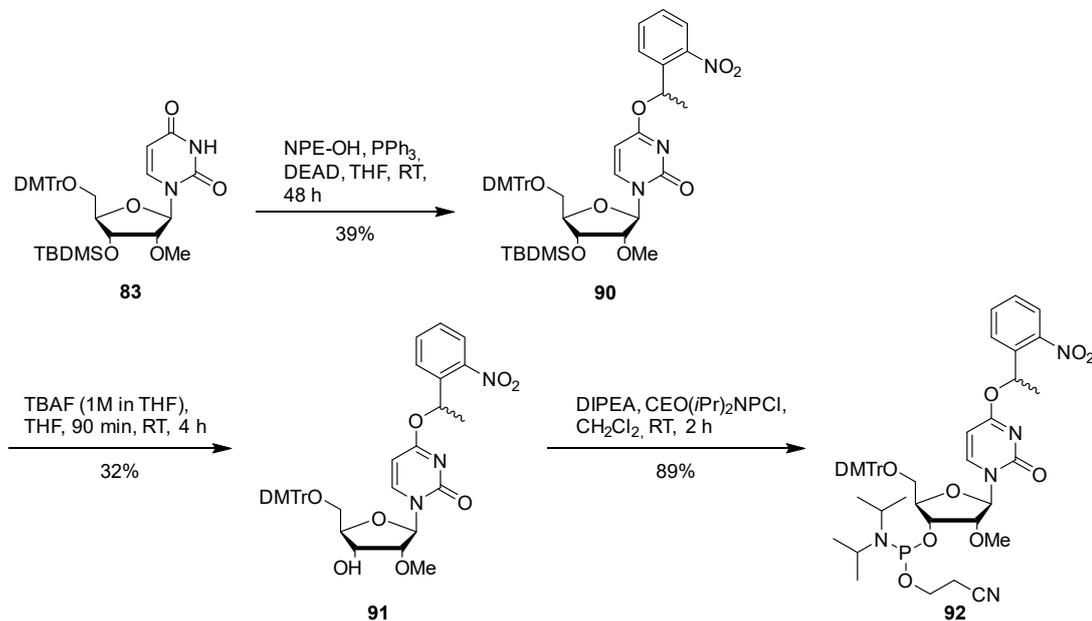


Abb. 72 Syntheseübersicht zur Darstellung des NPE-geschützten 2'OMe Uridinphosphoramidits **92**.

Die Synthese des 2'OMe Uridinphosphoramidits **92** erfolgte nach Literaturvorschrift^[118] und startete ausgehend von dem in Kapitel 2.2.3.1.2 synthetisierten 5'-O-DMTr-3'-O-TBDMS-2'-O-Methyluridin **83**, welches in einer Mitsunobu-Reaktion^[311] mit Triphenylphosphin, DEAD und NPE-OH umgesetzt wurde. Dabei wurde ein N^{β} - und O^4 -Regioisomeregemisch erhalten. Säulenchromatographische Aufreinigung konnte das gewünschte O^4 -alkylierte Isomer isolieren, sodass **90** in 39% Ausbeute erhalten werden konnte. Die

Abspaltung der 3'-O-TBDMS-Schutzgruppen erfolgte unter Standardbedingungen mit TBAF in 92% Ausbeute (\rightarrow **91**). Die Umsetzung zum Phosphoramidit **92** erfolgte analog zu der Synthese des NPE-geschützten 2'OMe-Cytidins und verlief in 89% Ausbeute. Bei diesem Syntheseschritt war anders als bei dem Cytidin- und Adenosin-Derivat kein zusätzlicher Fällungsschritt notwendig, da alle Verunreinigungen säulenchromatographisch entfernt werden konnten (siehe **Abb. 73**).

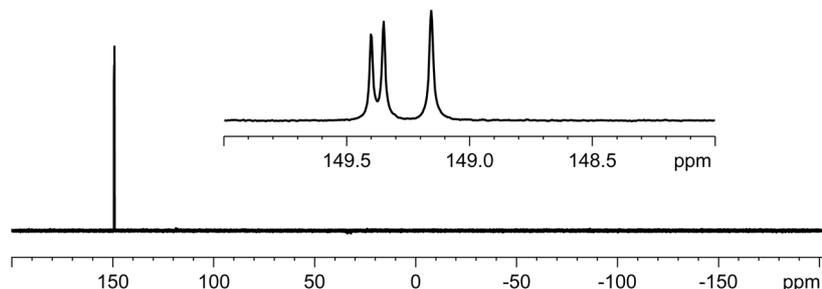


Abb. 73 ^{31}P -NMR Spektrum (202 MHz, DMSO-d_6) von **92**. Die drei Signale sind zurückzuführen auf die Phosphor- und NPE-Diastereomere (Überlagerung von eigentlich vier Signalen)

2.2.3.2 Bestimmung von Anzahl und Position der photolabilen Schutzgruppen des dual-markierten, lichtaktivierbaren Molecular Beacons

Heckel *et al.*^[119] publizierten, nach Recherche des Autors dieser Arbeit, als einzige einen lichtaktivierbaren MB, bei dem die Schleifen-Region durch photolabile Schutzgruppen vor Hybridisierung geschützt wurde. Die Studie zeigte, dass sieben photolabile Schutzgruppen auf den Nukleobasen des *ortho*-Nitrobenzol-Typs (NPE und NPP) notwendig waren, um die Hybridisierung der Schleifen-Region (19mer) mit der Ziel-Nukleinsäure zu verhindern. Die Schleifen-Region in der hier untersuchten Studie beträgt 23 Nukleotide, somit müssten mehr photolabile Schutzgruppen eingebaut werden. Jedoch besitzt der MB in dieser Studie stärkere Sekundärstrukturen, was den MB zusätzlich stabilisiert (siehe **Abb. 60**). Es wurden drei photoaktivierbare Molecular Beacon (cMB, für *caged Molecular Beacon*) hergestellt (siehe **Abb. 74**). Zwei cMBs wurden mit sieben photolabilen Schutzgruppen, die unterschiedlich verteilt wurden, synthetisiert. Eine gleichmäßige Verteilung, wie in **c^{7b}MB1** sollte effizienter die Hybridisierung der miRNA verhindern. Allerdings könnten die photolabilen Schutzgruppen in der Nähe des Stammes diesen destabilisieren, sodass erhöhte Hintergrundfluoreszenz gemessen werden könnte. Deswegen wurde ein weiterer cMB mit sieben photolabilen Schutzgruppen (**c^{7a}MB1**) synthetisiert, wobei erst vier Basen vom Stamm entfernt eine photolabile Schutzgruppe installiert wurde. Um zu überprüfen, ob mehr photolabile Schutzgruppe notwendig sind, um die Hybridisierung mit der miRNA vollständig zu inhibieren, wurde zusätzlich noch ein **cMB** mit acht photolabilen Schutzgruppen (**c⁸MB1**) hergestellt. Auch bei diesem Konstrukt wurde auf einem Abstand der NPE-Gruppen zu dem Stamm geachtet.

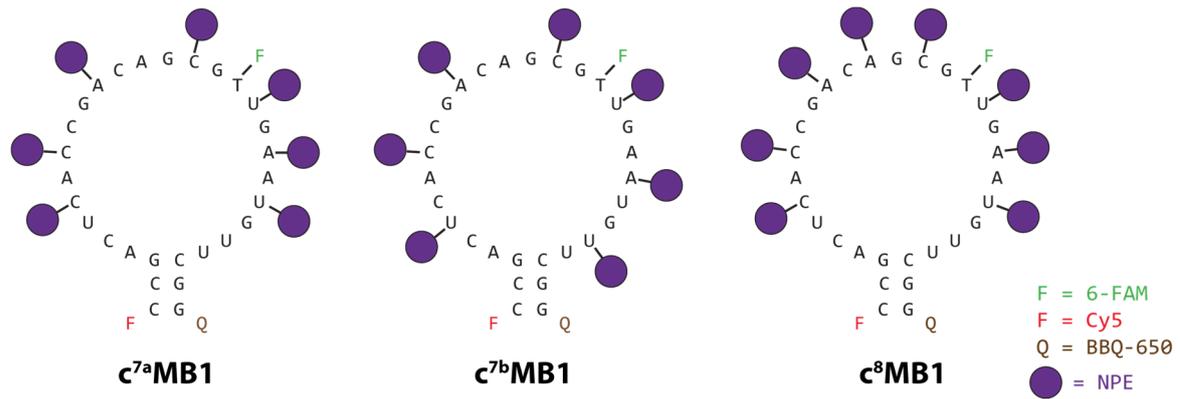


Abb. 74 Strukturen der photoaktivierbaren Molekular Beacons (**cMB**) mit sieben (**c^{7a}MB1** und **c^{7b}MB1**) und acht (**c⁸MB1**) photolabilen Schutzgruppen.

Da sich in den vorausgehenden Studien (siehe Kapitel 2.2.3) gezeigt hatte, dass erhöhte Temperaturen für das postsynthetische Markieren von Atto488 notwendig waren und dies nicht kompatibel zu den NPE-Schutzgruppen sein könnte, wurde ein Fluorescein Fluorophor in der Festphasensynthese eingeführt. Da dieser *Tracking*-Fluorophor möglichst weit entfernt vom hybridisierungssensitiven Fluorophor sein soll, musste dieser in der Schleifen-Region installiert werden. Um die perfekte Komplementarität der Schleifen-Region mit der miRNA zu gewährleisten, wurde ein Fluorescein-(6-FAM)-modifiziertes Thymin **93** (siehe **Abb. 75**) eingebaut. Im Vergleich zu dem „normalen“ Fluorescein (FITC, Fluorescein-5,6-isothiocyanat) zeigt 6-FAM weniger Photobleichen^[312] und die chemische Einführung ist robuster.^[313] FITC ist zudem ein Regioisomergemisch, während 6-FAM nur ein einziges Isomer ist, was eine Aufreinigung per HPLC erleichtern kann.

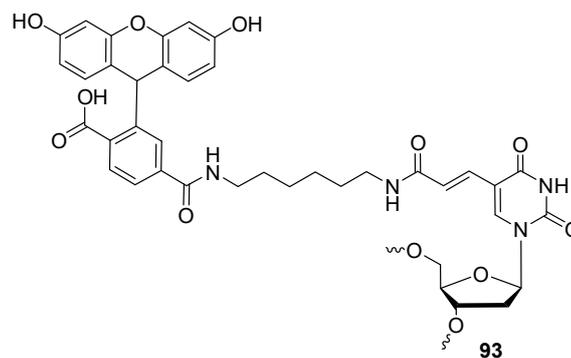


Abb. 75 Chemische Struktur des Fluorescein-modifizierten (6-FAM) Thymidins **93**.

Anders als in der Literatur^[118] beschrieben, war es nicht möglich die in Kapitel 2.2.3.1 hergestellten NPE-geschützten Adenosin- und Cytidinphosphoramidite in MeCN zu lösen. Erst in einem Mischungsverhältnis von 80% CH₂Cl₂ und 20% MeCN konnten die Amidite gelöst werden. Da der verwendete Oligonukleotid-Synthesizer (ABI392 der Firma *Applied Biosystems*) die Lösungen mit Überdruck befördert, ist ein hoher Anteil an CH₂Cl₂ ungünstig, da dies durch den Überdruck verdunstet. Dies könnte zur Fällung der Amidite führen, was wiederum den *Synthesizer* verstopfen könnte. Die Synthese erfolgte analog zu den in Kapitel

2.2.3 beschriebenen Molecular Beacons unter *UltraMild*-Bedingungen im DMTrON-Modus. Die Standard-Kupplungszeit von sechs Minuten für 2'OMe Phosphoramidite wurde nicht für die NPE-geschützten Amidite verlängert. Lediglich die Fluorophor-Amidite (Fluorescein und Cy5) wurden für 15 Minuten gekuppelt. Vor der eigentlichen Abspaltung der Schutzgruppen und der Spaltung vom Festphasenmaterial, wurde das Festphasenmaterial mit 20% Diethylamin in MeCN gespült. Unter diesen mild-basischen Bedingungen wurden selektiv die Cyanoethyl-Schutzgruppen am Phosphatrückgrat abgespalten. Durch das Spülen wird die Addition von Acrylnitril an Amine verhindert, ein Problem was häufig bei Ureichen Sequenzen auftritt. Nachdem das Festphasenmaterial mit MeCN gespült und getrocknet wurde, wurde die Abspaltung mit NH_3 (33% wässrige Lösung) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nachdem die Konstrukte per RP-HPLC aufgereinigt wurde, wurden die MMTr-Schutzgruppen abgespalten. Analog zu der Beschreibung in 2.2.3 wurde durch die Zugabe von Ethanol eine nachträgliche Addition des MMTr-Kations an die frei 5'-OH Gruppe verhindert. Massenspektrometrische Analyse (siehe **Tabelle 21** im Anhang) zeigte das Vorhandensein eines geringen Anteils (<10%) an Konstrukten, die eine NPE-Gruppe weniger aufweisen. Im nächsten Schritt wurde analysiert, welches Konstrukt im geschützten Zustand die miRNA Bindung effizient verhinderte und nach UV-Licht Bestrahlung einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz zeigte. Dazu wurde die Fluoreszenz von **c^{7a}MB1**, **c^{7b}MB1** und **c⁸MB1** mit verschiedenen Äquivalenten an miR181a (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; und 2,0) vor und nach unterschiedlicher Belichtungszeit (0, 20, 40 und 60 min) bei 365 nm gemessen (siehe **Abb. 76**). Alle Konstrukte verhinderten im geschützten Zustand die Hybridisierung mit der miRNA und zeigten wenig Fluoreszenz. **c⁸MB1** mit acht NPE-Gruppen verhinderte am effizientesten die miRNA Bindung und zeigte die geringste Fluoreszenz, welche zudem nicht bei höheren Äquivalenten von miRNA anstieg. Im Vergleich dazu zeigten **c^{7a}MB1** und **c^{7b}MB1** im geschützten Zustand einen sehr geringen Anstieg der Fluoreszenz in Anwesenheit der miRNA (2,8-facher und 2,6-facher Anstieg). Die UV-Licht (365 nm) Bestrahlung erfolgte mit einem selbstgebauten Gerät, was eine gleichmäßige Bestrahlung der Proben in einer Mikrotiterplatte (96-well) erlaubte. Nach 20 min konnte bei allen Konstrukten ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz (13 bis 14-fach) gemessen werden.

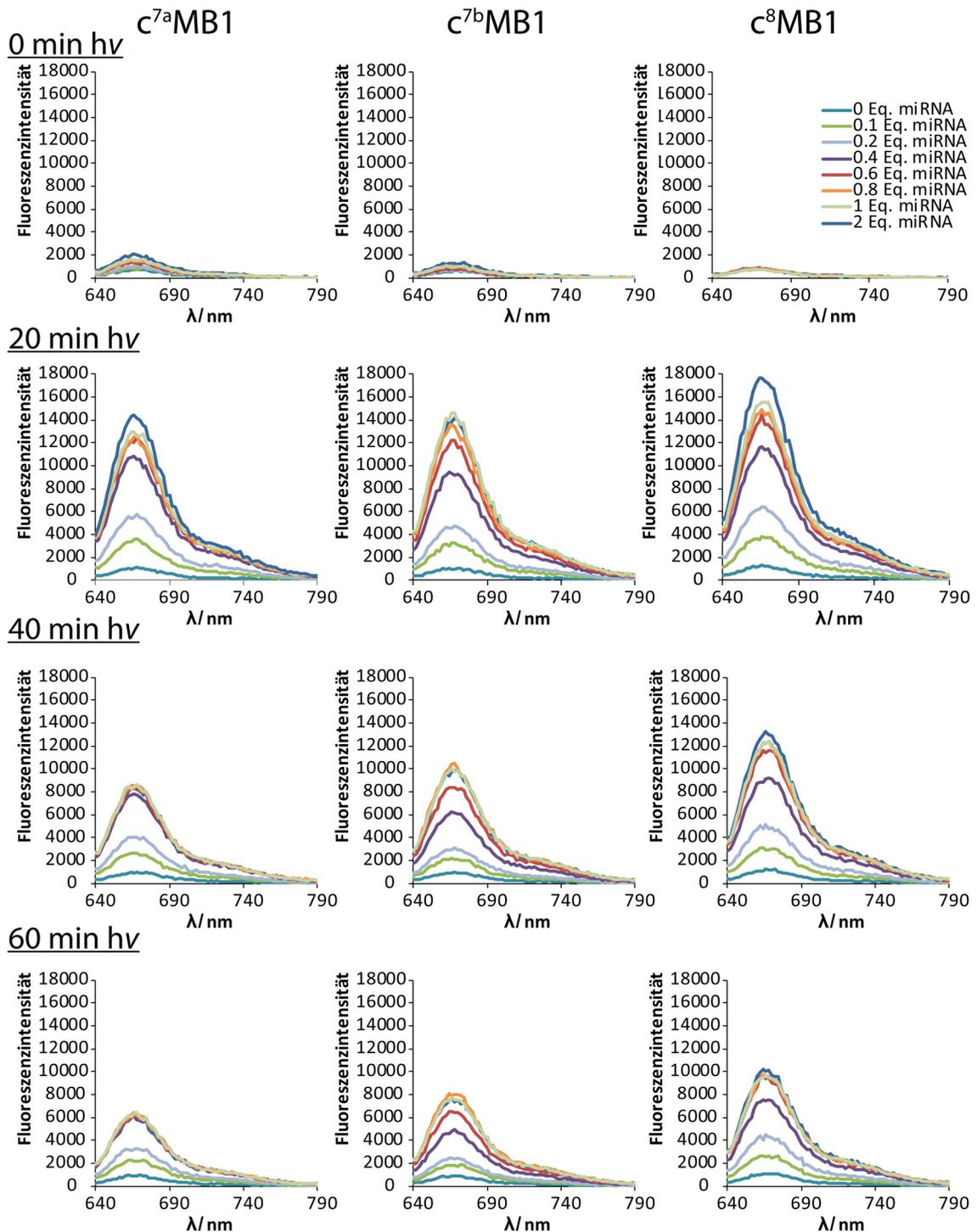


Abb. 76 Messung der Fluoreszenz der cMBs mit verschiedenen Äquivalenten an miR-181a ohne Belichtung bei 365 nm und nach 20, 40 und 60 min UV-Licht Bestrahlung. Die Konzentrationen von $c^{7a}MB1$, $c^{7b}MB1$ und c^8MB1 betragen 1 μM in PBS Puffer (pH 7,4). Anregung von Cy5 erfolgte bei 630 nm.

Weitere UV-Licht Bestrahlung (siehe **Abb. 76** 40 und 60 min) führte zu einer geringeren Fluoreszenz, was durch UV-Licht induziertes Photobleichen erklärt werden kann oder durch mehrfache Fluoreszenzmessung verursacht wurde. Dadurch sank die Effizienz und der Fluoreszenzanstieg betrug nur noch 9- bis 10-fach für 40 min und 7- bis 9-fach für 60 min UV-Licht Bestrahlung (dritte Messung). In **Abb. 77** ist die Fluoreszenz von Cy5 in

Abhängigkeit der Bestrahlungszeit dargestellt. Für die optimale Durchführung der Zellexperimente müsste die ideale Bestrahlungszeit, um eine vollständige Bindung der miRNA zu ermöglichen und gleichzeitig minimal Photobleichen zu induzieren, experimentell bestimmt werden.

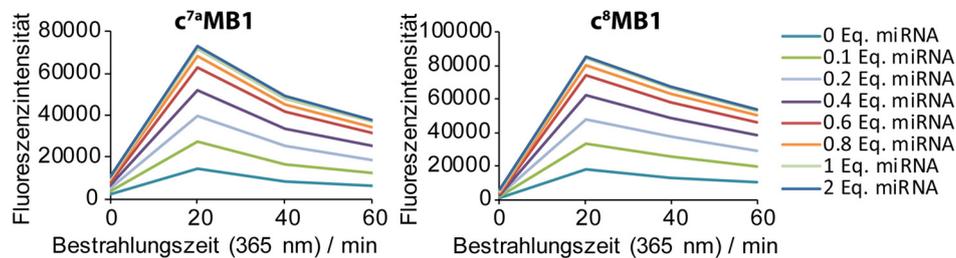


Abb. 77 UV-Bestrahlungszeitabhängige Abnahme der Fluoreszenz von Cy5.

2.2.3.3 Optimierung des Fluoreszenzanstieges des Molecular Beacons

Der maximale Fluoreszenzanstieg um den Faktor 13 nach Hybridisierung könnte allerdings zu gering sein für die zellulären Experimente. Da der MB im Überschuss zur miRNA für eine effektive Regulation vorhanden sein muss, ist eine geringe Fluoreszenz im geschlossenen Zustand Voraussetzung. Aus diesem Grund wurde eine neue Version des **c⁸MB1** synthetisiert, bei dem der Cy5 Fluorophor gegen einen Cy5.5 ausgetauscht und zwei Quencher anstatt eines Quenchers verwendet wurden, um einen sogenannten Super-Quencher^[314] zu erhalten (siehe **Abb. 74**). Studien^[314,315] zeigten, dass mit einem Super-Quencher-System die Fluoreszenz im geschlossenen Zustand eines MBs deutlich verringert werden konnte.

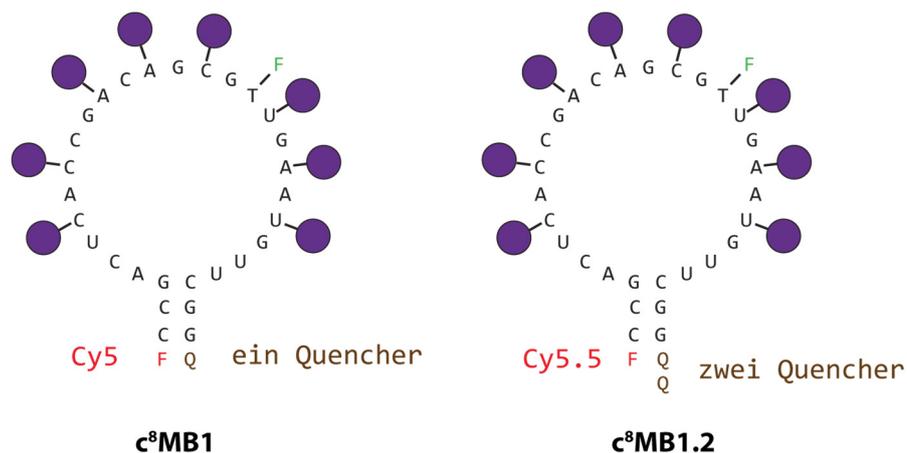


Abb. 78 Sequenzen der photoaktivierbaren MBs mit einem Cy5 Fluorophor und einem BBQ-650 Quencher (links) und einem Cy5.5 Fluorophor und zwei BBQ-650 Quencher (rechts).

Die Festphasensynthese des **c⁸MB1.2** erfolgte analog zu der von **c⁸MB1**. Der Quencher am 3'-Ende wurde über die feste Phase eingeführt und der interne Quencher und Cy5.5 über das entsprechenden Phosphoramidit (siehe **Abb. 79**).

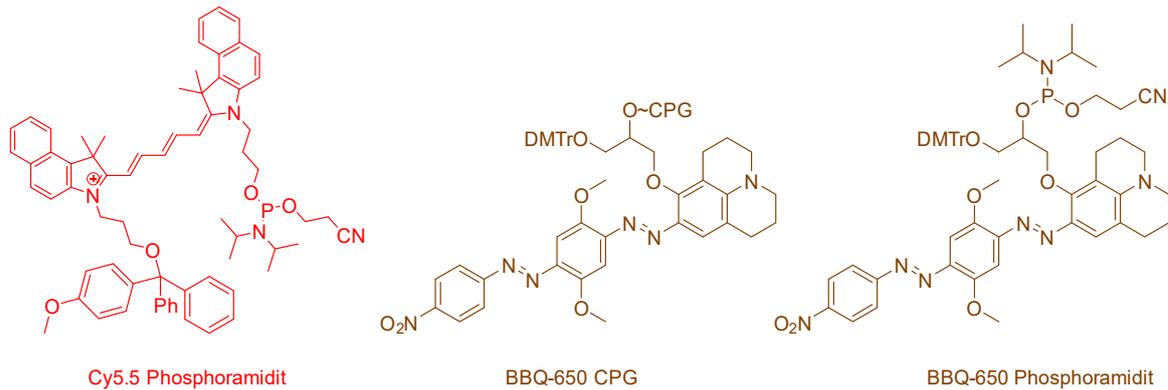


Abb. 79 Chemische Strukturen des Cy5.5 Phosphoramidits, BBQ-650 CPG, und BBQ-650 Phosphoramidit. Die BBQ-Quencher wurden von der Firma *Link Technologies Ltd.* und das Cy5.5 Amidit von *Glen Research* bezogen.

Das analytische RP-HPLC Chromatogramm und eine gelelektrophoretische Analyse zeigten, dass **c⁸MB1.2** sauber erhalten werden konnte (siehe **Abb. 231** im Anhang). Zusätzlich wurde die Identität per Massenspektrometrie identifiziert (siehe **Tabelle 21** und **Abb. 231** im Anhang).

Analog zu den Studien von **c⁸MB1**, **c^{7a}MB1** und **c^{7b}MB1**, wurde die Fluoreszenz von **c⁸MB1.2** in Abhängigkeit von der miRNA Konzentration vor und nach UV-Licht Bestrahlung gemessen (siehe **Abb. 80**). Vor Belichtung war (fast) keine Fluoreszenz detektierbar, auch nicht bei 2 Äquivalenten miRNA. Nach 20 min Bestrahlung mit UV-Licht konnte ein starker Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Der Faktor des Fluoreszenzanstiegs nach miRNA Hybridisierung kann aufgrund der unruhigen Basislinie nicht exakt bestimmt werden und liegt im Bereich zwischen 200 und 9000.

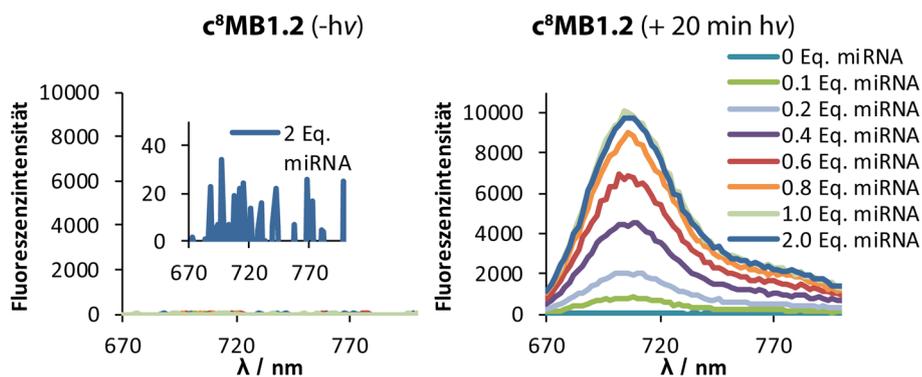


Abb. 80 Fluoreszenzmessung von **c⁸MB1.2** vor (links) und nach Bestrahlung (rechts) mit UV-Licht (365 nm, 20 min) in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von miR-181a. Die Konzentration von **c⁸MB1.2** betrug 1 μ M in PBS Puffer (pH 7,4). Anregung erfolgte bei 630 nm.

Dies waren optimale Voraussetzung für die Regulation von miR-181a, selbst bei einem Überschuss des AntimiRs. Im letzten Schritt wurde untersucht, ob Cy5.5 und FAM durch UV-Licht Bestrahlung oder wiederholten Messungen Photobleichen zeigen. Während Cy5.5 kein Photobleichen durch wiederholte Messungen zeigte, konnte bei 6-FAM ein stetiger Abfall der Fluoreszenz beobachtet werden (siehe **Abb. 81** oben). Allerdings konnte

bei Cy5.5 ein Abfall der Fluoreszenzintensität durch UV-Bestrahlung detektiert werden (siehe **Abb. 81** unten).

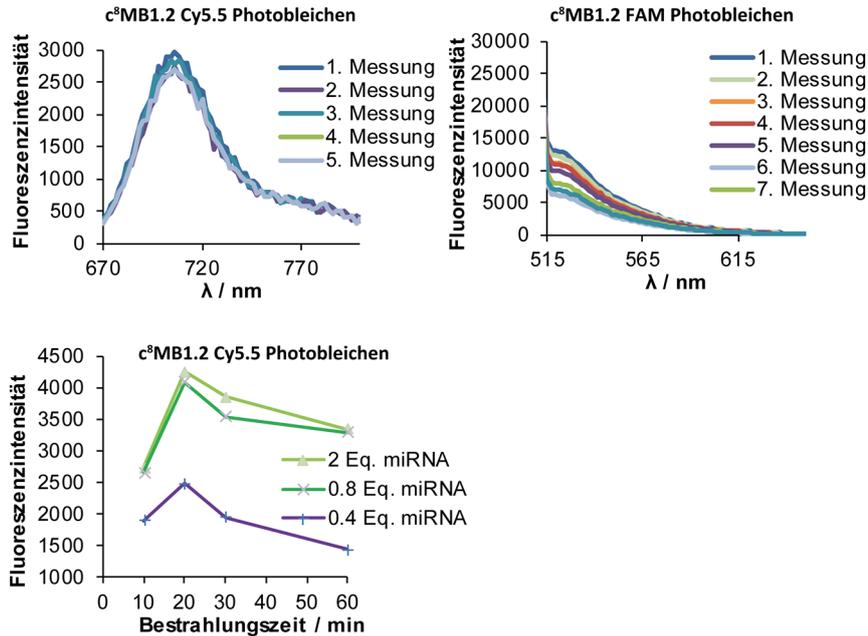


Abb. 81 Fluoreszenzmessung zur Untersuchung von Photobleichen durch wiederholte Messungen (oben). Die Fluoreszenz von Cy5.5 (links) und FAM (rechts) wurde wiederholt gemessen. Unten ist das UV-Bestrahlungszeitabhängige Photobleichen von Cy5.5 gezeigt.

Zusammengefasst wurde die optimale Stammlänge des MB mit drei Basen, die ideale Anzahl der photolabilen Schutzgruppen mit acht, das optimale Fluorophor-Quencher-Paar als Cy5.5 und zwei BBQ-650 und die Positionierung des -Fluorophores 6-FAM in der Schleife, bestimmt. Die Struktur und Funktion des optimierten Molecular Beacons ist in **Abb. 82** dargestellt.

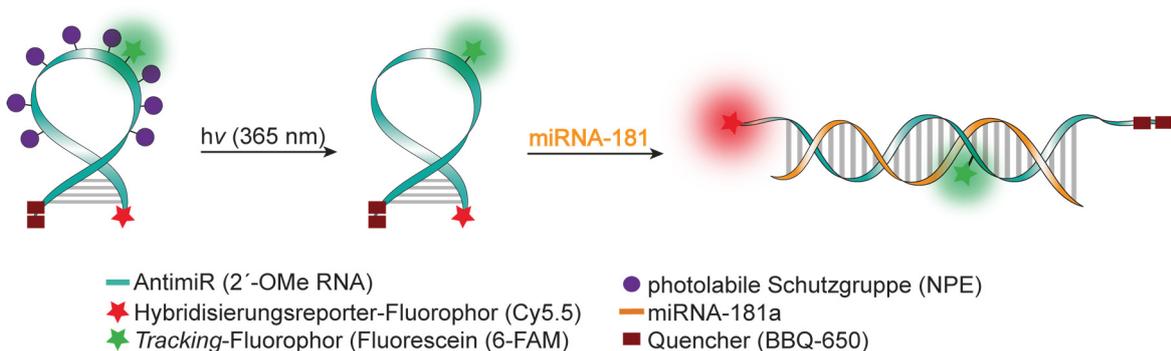


Abb. 82 Finales Konzept und Mechanismus eines dual Fluorophor-markierten, lichtaktivierbaren Molecular Beacons.

2.2.4 Lichtaktivierbare Hairpin-Sonden

Lichtaktivierbare Nucleinsäuren mit einer Haarnadelstruktur (engl. Hairpin) besitzen einen (teil-)komplementären intramolekularen Gegenstrang (hier als Blockierstrang bezeichnet), welcher über einen photospaltbaren Linker (z.B. in der Haarnadelschleife) mit der zur Ziel-nucleinsäure (hier miR-181a) komplementären Nucleinsäure (AntimiR) verknüpft ist (siehe **Abb. 83**). Mehrere Beispiele aus der Literatur von lichtaktivierbaren Haarnadelstrukturen wurden ausführlich in den Kapiteln 1.3.2.1 und 1.3.2.2 beschrieben. Vor der Spaltung der photospaltbaren Linker (PC-Linker, *photocleavable* Linker), soll der intramolekulare Doppelstrang des Hairpins (AntimiR + Blockierstrang) stabiler sein, als der intermolekulare Duplex des Hairpins mit der miR-181a. Durch Photolyse, wird aus dem intramolekularen Duplex aus AntimiR und Blockierstrang (grau, siehe **Abb. 83**) ein intermolekularer, was die Stabilität deutlich senken soll. Da die miR-181a vollständig komplementär zum AntimiR ist, sollte die miR-181a nach Photoaktivierung den Blockierstrang verdrängen und den thermodynamisch stabileren Doppelstrang bilden. Bei einer lichtaktivierbaren Hairpin-Sonde (LHS) muss der hybridisierungssensitive Fluorophor und der zugehörige Quencher so angeordnet sein, dass erst durch die Bindung der miRNA der Quencher Strang verdrängt wird. Nach Photolyse, aber vor Hybridisierung der miRNA muss der (Teil-)Strang mit dem Quencher an dem AntimiR hybridisiert bleiben, da ansonsten die Photolyse und nicht die Hybridisierung detektiert wird.

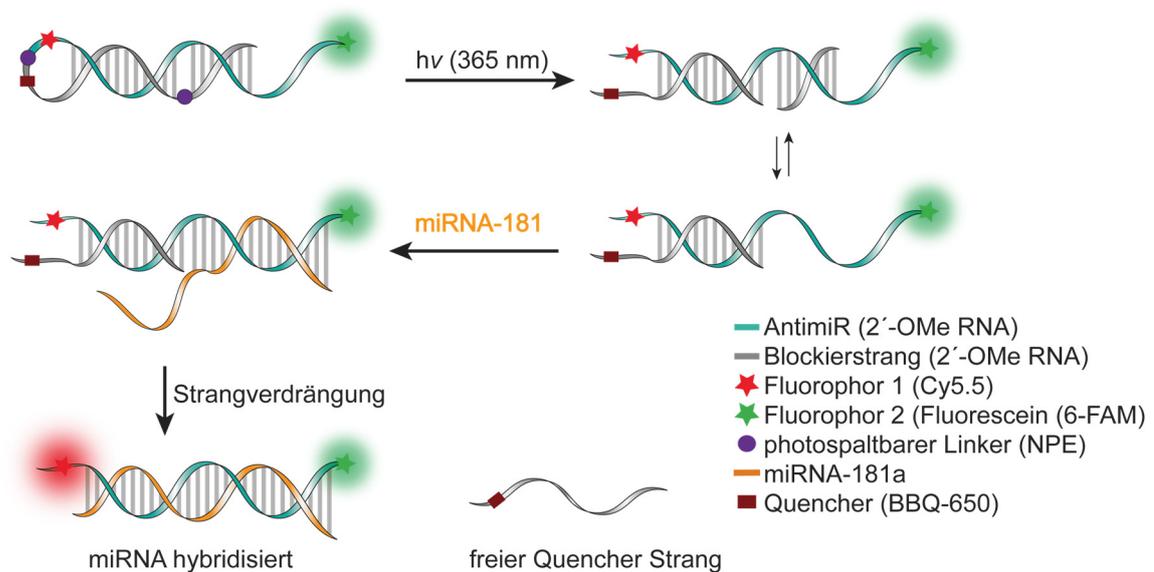


Abb. 83 Konzept und Funktion einer lichtaktivierbaren Hairpin-Sonde (LHS) zur Regulation von miRNA.

Zur photoinduzierten Strangspaltung wurde ein kommerziell erhältlicher, photospaltbarer Linker^[20] verwendet, der auf *ortho*-Nitrobenzyl basiert (siehe **Abb. 84**). Im ersten Schritt

der Strangspaltung wird das 3'-Ende der gespaltenen Nucleinsäure mit einer Phosphatgruppe freigesetzt.^[120] Anschließende Eliminierung setzt das 5'-phosphorylierte Ende der Nucleinsäure frei.

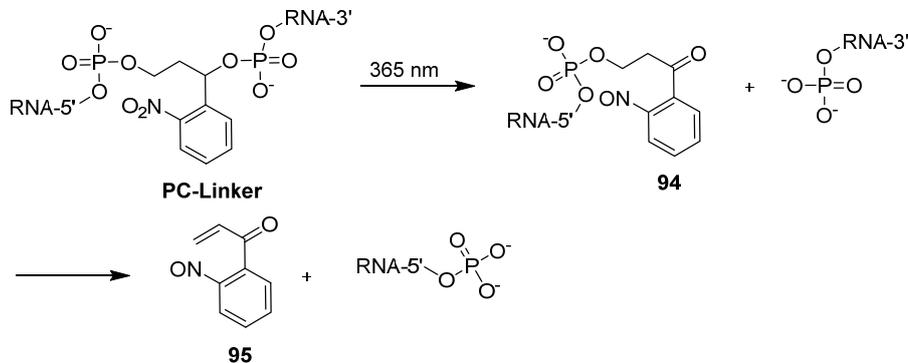


Abb. 84 Reaktionsschema^[120] der Strangspaltung von Nucleinsäuren durch Photolyse eines photospaltbaren Linkers des Nitrobenzyl-Typs (**PC-Linker**).

Bei dem Design der LHS müssen mehrere Faktoren beachtet werden: Die optimale Auswahl und Position von Fluorophor und Quencher, um ein möglichst effizientes Quenching vor miRNA Bindung zu garantieren. Essenziell ist auch die ideale Länge des Blockierstrangs und die Anzahl der photospaltbaren Linker im Blockierstrang. Ein zu stabiler AntimiR-Blockierstrang-Duplex kann selbst nach Photolyse die miRNA nicht binden. Ein zu labiler AntimiR-Blockierstrang-Duplex bindet die miRNA auch vor Belichtung oder zeigt Hintergrundfluoreszenz. Mindestens der Teil des Blockierstrangs, der den Quencher enthält, muss nach der Photolyse an dem AntimiR hybridisiert bleiben, um vor der Bindung von miR-181a keinen Fluoreszenzanstieg zu erhalten. Zusätzlich muss die Strangverdrängung durch die miRNA nach Photolyse möglichst schnell und quantitativ bei der entsprechenden Temperatur ablaufen. Durch die Installation von mehreren PC-Linkern kann die Hybridisierung des Blockierstrangs nach Photolyse stärker destabilisiert werden. Da der PC-Linker anstatt einer Nucleobase eingebaut wird, kann an dieser Stelle keine Basenpaarung stattfinden, sodass zu viele PC-Linker auch die Hybridisierung des Blockierstrangs vor Photolyse destabilisieren könnten und eine Strangverdrängung mit der miR-181a ermöglichen. Wie bei den Konzepten zuvor, muss ein zweiter, spektral kompatibler und orthogonal anregbarer Fluorophor für die Lokalisierung des AntimiRs in Neuronen installiert werden. Um FRET mit dem hybridisierungssensitiven Fluorophor oder Fluoreszenzlöschung durch den Quencher zu vermeiden, sollte der *Tracking*-Fluorophor möglichst distanziert platziert werden. Analog wie bei den Konzepten zuvor und in Kapitel 2.2.2 ausführlich beschrieben, sollte durch die Verwendung von 2'OMe RNA und unnatürlichen Modifikationen am 3'- und 5'-Ende des AntimiRs (bzw. des LHS) eine Endo- und Exonuklease-resistenz erzielt werden. Ein weiteres Argument gegen die Verwendung von Phosphorthioaten ist, dass mit Phosphorthioaten die Geschwindigkeit einer Strangverdrängung deutlich reduziert wird.^[316] Bei den Beispielen von LHS aus der Literatur^[125,136] (siehe Kapitel

1.3.2.1 und 1.3.2.2) ist zum Teil unklar, ob der Blockierstrang nach der Photolyse hybridisiert bleibt oder dissoziiert. Das hier angestrebte Konzept ist, nach Recherche des Autors dieser Arbeit, das erste, welches vollständig die Hybridisierung und nicht die Photolyse visualisiert. Die folgenden drei LHS (**LHS-1**, **LHS-2** und **LHS-3**) wurden von Robin Klimek in einer vom Autor dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit synthetisiert und analysiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden hier dargestellt. Die drei synthetisierten LHS unterscheiden sich in der Länge des Blockierstrangs, der Schleife, der Anzahl der photospaltbaren Linker und der verwendeten Fluorophor-Quencher-Paare (siehe **Abb. 85**). **LHS-1** hatte einen Blockierstrang von 13 Nukleotiden, welcher über einen photospaltbaren Linker mit dem AntimiR verknüpft war. Zusätzlich wurde ein Cy3-Tracking-Fluorophor am 3'-Ende, sowie ein Cy5.5 - BBQ-650 Hybridisierungsfluorophor-Quencher-Paar in der Schleife installiert (siehe **Abb. 85**). Die Schleife bestand aus fünf Nukleotiden bzw. Modifikationen. **LHS-2** hatte ein ähnliches Design, jedoch einen Blockierstrang mit einer Länge von 19 Nukleotiden mit einem weiteren photospaltbaren Linker in der Mitte des Blockierstrangs. Zudem wurde bei **LHS-2** eine Schleife aus vier Nukleotiden bzw. Modifikationen (*Tetra*loop) verwendet. **LHS-3** unterscheidet sich maßgeblich, denn in diesem Konzept wurde ein terminales Cy3-BHQ-2 Hybridisierungsfluorophor-Quencher-Paar verwendet und der Tracking-Fluorophor (Cy5) wurde in die Schleife installiert. Der Blockierstrang war so lang wie die AntimiR-Sequenz selbst, 23 Nukleotide, und besaß in der Mitte einen weiteren photospaltbaren Linker. Bei den Konstrukten wurde darauf geachtet, dass nach der Photoaktivierung der Teil-Blockierstrang, der den Quencher enthält, der längste Strang ist. Dies sollte eine Dissoziation des Quencher-Stranges vor der Bindung von miR-181a vermeiden. **LHS-1** und **LHS-2** hatten Quencher-Teilstränge mit zehn Nukleotiden. Bei **LHS-3** war der Quencher-Teilstrang zwölf Nukleotide lang.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Länge des Blockierstranges</u>	
LHS-1	$ \begin{array}{l} \text{U} \overset{\text{F}}{\text{C}} \text{ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUF-3'} \\ \text{X} \text{U} \underset{\text{Q}}{\text{Q}} \text{UGA GUG GCU GUC G-5'} \end{array} $	13 nt	F = Cy5.5 F = Cy3 Q = BBQ-650 X = PC-Linker
LHS-2	$ \begin{array}{l} \text{X} \overset{\text{F}}{\text{C}} \text{ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUF-3'} \\ \text{U} \underset{\text{Q}}{\text{Q}} \text{UGA GUG GCU GXC GCA ACU U-5'} \end{array} $	19 nt	F = Cy5 F = Cy3 Q = BHQ-2 X = PC-Linker
LHS-3	$ \begin{array}{l} \text{X} \overset{\text{F}}{\text{C}} \text{ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUF-3'} \\ \text{U} \underset{\text{Q}}{\text{Q}} \text{UGA GUG GCU GXC GCA ACU UAC AAQ-5'} \end{array} $	23 nt	F = Cy5 F = Cy3 Q = BHQ-2 X = PC-Linker

Abb. 85 Bezeichnung, Sequenz und Anzahl der Nukleotide des Gegenstranges von **LHS-1**, **LHS-2** und **LHS-3**. **LHS-3** besitzt den längsten Blockierstrang und sollte deswegen die Bindung der miRNA vor Photoaktivierung am stärksten verhindern. Zudem ist durch die terminale Installation eines Fluorophor-Quencher-Paares die Hybridisierung der miRNA vor Photolyse fluoreszenzspektroskopisch messbar. Die Installation von Fluorophor und Quencher in der

Schleife (wie in **LHS-1** und **LHS-2**) sollte eine starre räumliche Nähe erzeugen und somit die Quenching-Effizienz erhöhen. Kommt es allerdings vor der Photolyse zur Bindung der miRNA, weil der intramolekulare Duplex aus AntimiR und Blockierstrang nicht stabil genug wäre, dann könnte trotzdem kein fluoreszentes Signal des Hybridisierungsfluorophors detektierbar sein (siehe **Abb. 86** und **Abb. 87**). In diesem Falle wären Fluorophor und Quencher auch nach Bindung von miR-181a noch in räumlicher Nähe. Zur Untersuchung der miRNA-Bindung vor und nach UV-Belichtung wurden, analog zu den in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Experimenten, Fluoreszenzstudien mit der miR-181a durchgeführt (siehe **Abb. 86**).

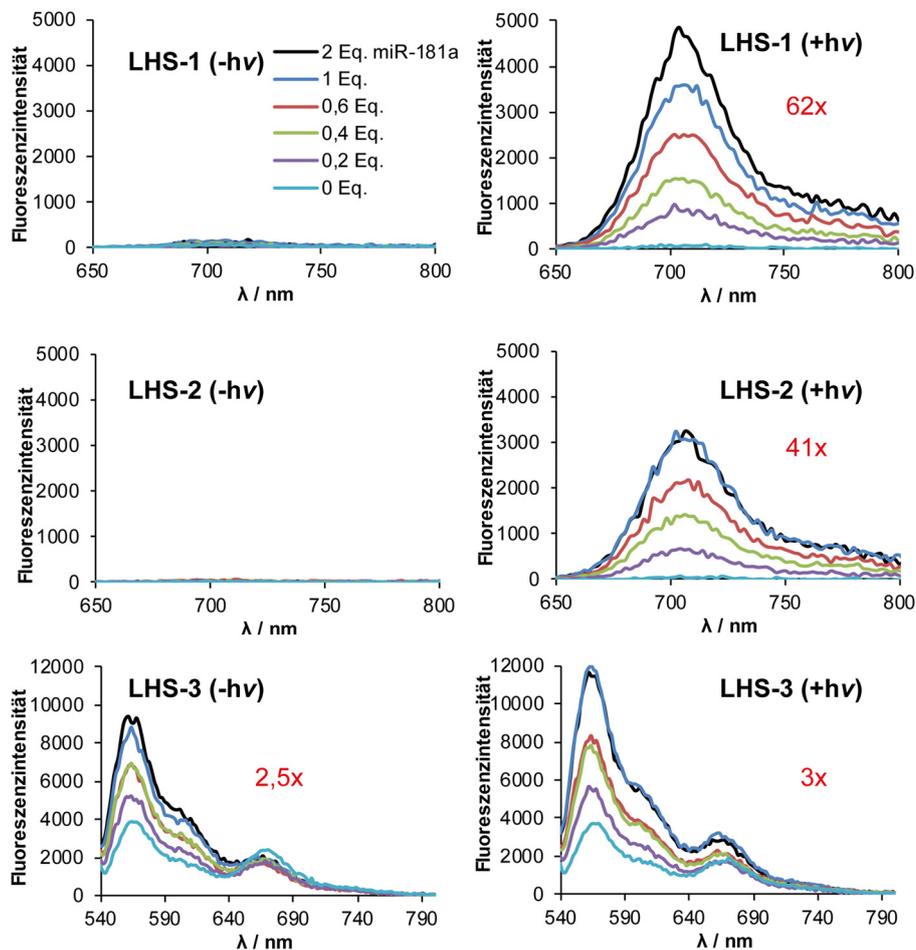


Abb. 86 Fluoreszenzmessungen vor und nach Bestrahlung mit UV-Licht, sowie Zugabe (0 bis 2 Eq.) der miR-181a. Die Konzentrationen von **LHS-1**, **LHS-2** und **LHS-3** betragen 1 μM in PBS-Puffer (pH 7,4). Anregung von **LHS-1** und **LHS-2** erfolgte bei 610 nm und bei 510 nm für **LHS-3**. Die Emissionsmaxima liegen bei 704 und 702 nm für **LHS-1** und **LHS-2**, sowie bei 562 nm für **LHS-3**. UV-Belichtung erfolgte bei 365 nm.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Quenching bei der Verwendung von Fluorophor und Quencher in der Schleife (**LHS-1** und **LHS-2**) deutlich effizienter war, als die terminale Installation bei **LHS-3**. Während nach Photolyse und Zugabe der miR-181a bei **LHS-1** ein 62-facher und bei **LHS-2** ein 41-facher Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden konnte, stieg die Fluoreszenz bei **LHS-3** nur um den Faktor drei an. Terminale Nukleobasen besit-

zen häufig eine höhere Flexibilität,^[317] besonders wenn schwächere A-U-Basenpaare verwendet wurden,^[318] was bei **LHS-3** der Fall ist. Analog wie bei dem Designprinzip von Molecular Beacons (siehe Kapitel 2.2.3), sind G-C-reiche Sequenzen besser dazu geeignet die Fluktuation von terminalen Fluorophor-Quencher-Paaren zu reduzieren. Um die zur miR-181a komplementäre Sequenz nicht zu verändern, wurde darauf in diesem Ansatz verzichtet. Die Fluoreszenzstudie zeigte zudem, dass das Quenching von Cy5.5 mit BBQ-650 im Falle von **LHS-1** etwas effizienter war, als bei **LHS-2**. Dies könnte durch eine verschiedene Orientierung von Fluorophor und Quencher in den unterschiedlichen Schleifen begründet werden.

Da bei den Konstrukten **LHS-1** und **LHS-2** der hybridisierungssensitive Fluorophor und Quencher in der Schleife installiert wurden, konnte die Bindung der miRNA vor der Photolyse nicht fluoreszenzspektroskopisch analysiert werden. Um dies zu untersuchen wurden *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) durchgeführt. Sollte die miRNA vor der Photolyse mit dem AntimiR hybridisieren, sollte dies das Migrationsverhalten des AntimiRs und der miRNA verändern. Die gelelektrophoretische Analyse (EMSA) zeigte, dass sowohl **LHS-1** als auch **LHS-2** die miR-181a vor Photolyse binden (Daten nicht gezeigt; vgl. mit **Abb. 92**). Dies bedeutet, dass die Blockierstränge zu kurz waren und die miR-181a den Blockierstrang verdrängen konnte. Ein möglicher Mechanismus^[319] dazu könnte ein *toehold strand displacement* sein (siehe **Abb. 87**). Die miR-181a könnte teilweise am 3'-Ende des AntimiRs hybridisieren (siehe **Abb. 87-1a.**) und dadurch die benötigte Aktivierungsenergie erlangen, um schrittweise (siehe **Abb. 87-1b-c.**) den Blockierstrang zu verdrängen (*branch migration*). Selbst bei vollständiger Hybridisierung der miR-181a bleiben Fluorophor und Quencher in räumlicher Nähe, sodass der Hybridisierungsreporter (Cy5.5) nicht fluoresziert (siehe **Abb. 87-1c.**). Studien mit RNA zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit einer *toehold* Strangverdrängung um die Größenordnung von sechs gesteigert werden kann, wenn der *toehold* sechs anstatt eine Nukleasebase lang ist.^[320] **LHS-1** und **LHS-2** besitzen einen *toehold* von 4 und 10 Nukleotide. Bei **LHS-3** ist der Blockierstrang vollständig komplementär zum AntimiR, was die Hybridisierung mit der miR-181a am 3'-Ende verhindern sollte. Die in die Schleife eingebauten Modifikationen könnten eine Spannung verursachen, welche die Schleife destabilisiert (siehe **Abb. 87-2**). Zusätzlich könnten der hydrophobe Cy5-Fluorophor und der PC-Linker eine Repulsion mit den Nukleobasen verursachen. Ein Beispiel aus der Literatur^[321] zeigte, dass Modifikationen (Glycol-Linker), im Vergleich zu kanonischen Nukleobasen, eine RNA-Schleife destabilisieren können. Die instabile Schleife könnte die benachbarten Basenpaarungen schwächen, sodass ein Gleichgewicht mit einer entspannten, aber dadurch größeren (weiter geöffneten) Schleife vorliegen könnte (siehe **Abb. 87-2a-b**). Die miR-181 könnte in der weiter geöffneten Schleife hybridisieren (siehe **Abb. 87-2b**) und eine *toehold* Strangverdrängung (siehe **Abb. 87-2c-d**)

durchführen. Die vollständige Hybridisierung der miR-181a führt zur räumlichen Trennung von Hybridisierungsfluorophor und Quencher.

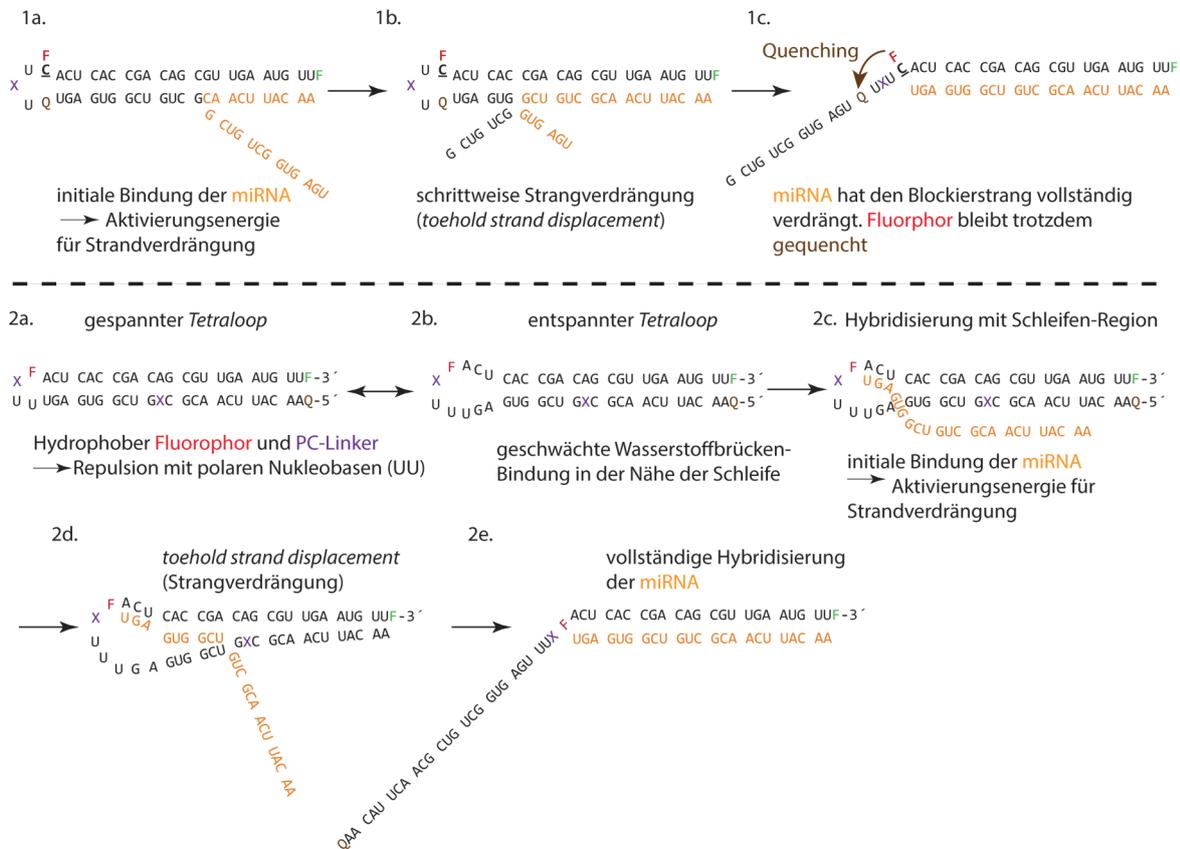


Abb. 87 Mögliche Mechanismen der Strangverdrängung (*toehold strand displacement*) der miR-181a am Beispiel von **LHS-1** (1a-c) und **LHS-3** (2a-e).

Da die Fluoreszenzexperimente nicht unter zellulären Bedingungen durchgeführt werden konnten, wurde untersucht, ob das Verhalten von **LHS-3** in primären hippocampalen Neuronen von Ratten (*rattus norvegicus*) identisch ist. **LHS-3** wurde dazu gewählt, weil die Hybridisierung der miRNA vor und nach Photolyse eindeutig durch Messung der Fluoreszenz bestimmt werden konnte. Die Experimente wurden von Dr. Irena Vlatkovic (MPI für Gehirnforschung, Arbeitsgruppe E. Schumann, Frankfurt am Main) durchgeführt. Aufgrund der unpolaren Modifikationen konnte, analog zu der Verwendung von Cholesterol, eine Transfektion ohne die Verwendung eines Transfektionsreagenzes durchgeführt werden. Die Transfektion erfolgte für 20 Minuten in primären hippocampalen Neuronen von Ratten (*rattus norvegicus*). Die Mikroskopieexperimente (siehe **Abb. 88**) zeigten, dass auch in Neuronen keine Änderung der Fluoreszenz des Hybridisierungsreporters (Cy3, grüner Kanal in **Abb. 88**) vor und nach Photolyse (365 nm) beobachtet werden konnte. Somit verhält sich **LHS-3** in Neuronen analog zu Experimenten außerhalb von Zellen.

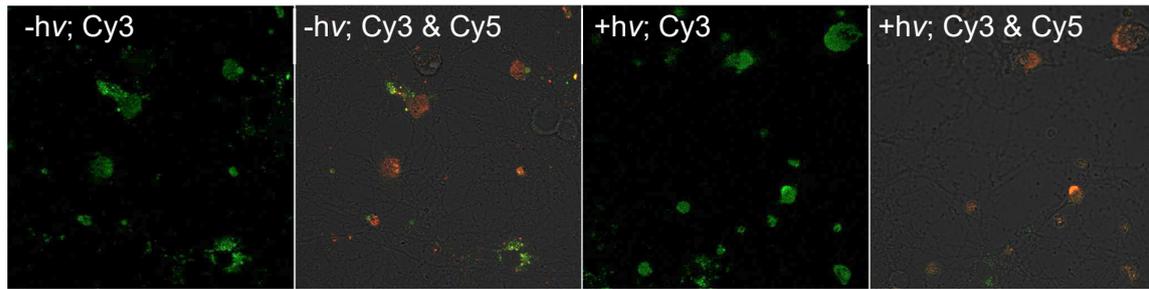


Abb. 88 Fluoreszenzmessungen von **LHS-3** vor und nach UV-Licht Bestrahlung (365 nm, 400 mW) in hippocampalen Neuronen. Die Transfektion erfolgte ohne die Verwendung eines Transfektionsreagenzes für 20 min. Die Inkubationszeit betrug ~18 h. Die Messungen erfolgten an einem *Zeiss LSM780* konfokalen Laser-Fluoreszenzmikroskop und wurden von Dr. Irena Vlatkovic durchgeführt.

Als nächstes wurde die Nukleaseresistenz am Beispiel von **LHS-1** und **LHS-3** getestet. Dazu wurde **LHS-3** für 24 h bei 37 °C in Zelllysat von primären hippocampalen Neuronen (3 mio. Zellen/mL bereitgestellt von Dr. Irena Vlatkovic) inkubiert. Gelelektrophoretische Analysen (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass kein Abbau stattfand. Die Detektion zur Auswertung des Gels erfolgte fluoreszent über den *Cy5 Tracking*-Fluorophor.

Da alle synthetisierten LHS auch vor der Photolyse mit der miRNA hybridisierten, wurde im Folgenden versucht modifizierte Versionen von **LHS-1** und **LHS-2** zu zyklisieren. Vorausgegangene Studien zeigten, dass die Zyklisierung von Nukleinsäuren eine effiziente Methode ist, um die Hybridisierung einer komplementären Nukleinsäure zu verhindern.^[97,128]

2.2.4.1 Zyklisierung der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden

Da die Position von Hybridisierungsfluorophor und Quencher in der Schleife das bessere Quenching vor Photolyse und miRNA-Bindung zeigte, wurde dieses Konzept für die Zyklisierung von **LHS-4** und **LHS-5** gewählt (siehe **Abb. 89**).

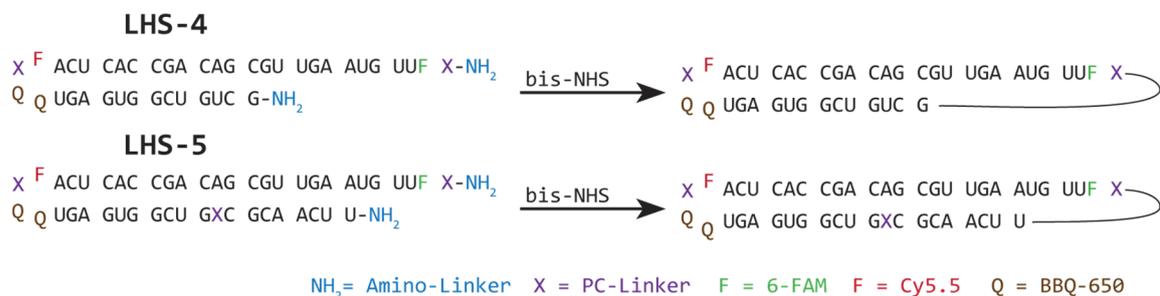


Abb. 89 Sequenzen von **LHS-4** und **LHS-5** zur Zyklisierung.

Die Zyklisierung sollte postsynthetisch erfolgen, um Linker mit verschiedenen Längen testen zu können. Dafür wurden die Oligonukleotide am 3'- und 5'-Ende mit einem Amin modifiziert, welches über einen Bis-NHS-Linker zyklisiert werden sollte (siehe **Abb. 89** und

Abb. 90). Als Linker wurden Polyethylenglycol-Derivate (PEG5 und PEG9) mit einer Linkerlänge von 22 – 36 Å, sowie ein kurzer Korksäure-Linker mit einer Länge von 12 Å verwendet (siehe **Abb. 90**). Am 3'-Ende wurde das Amin über ein Hydroxyprolinol-Derivat und am 5'-Ende über ein Serinol-Derivat (siehe **Abb. 90** für die Strukturen nach der Zyklisierung (blau)) eingeführt.

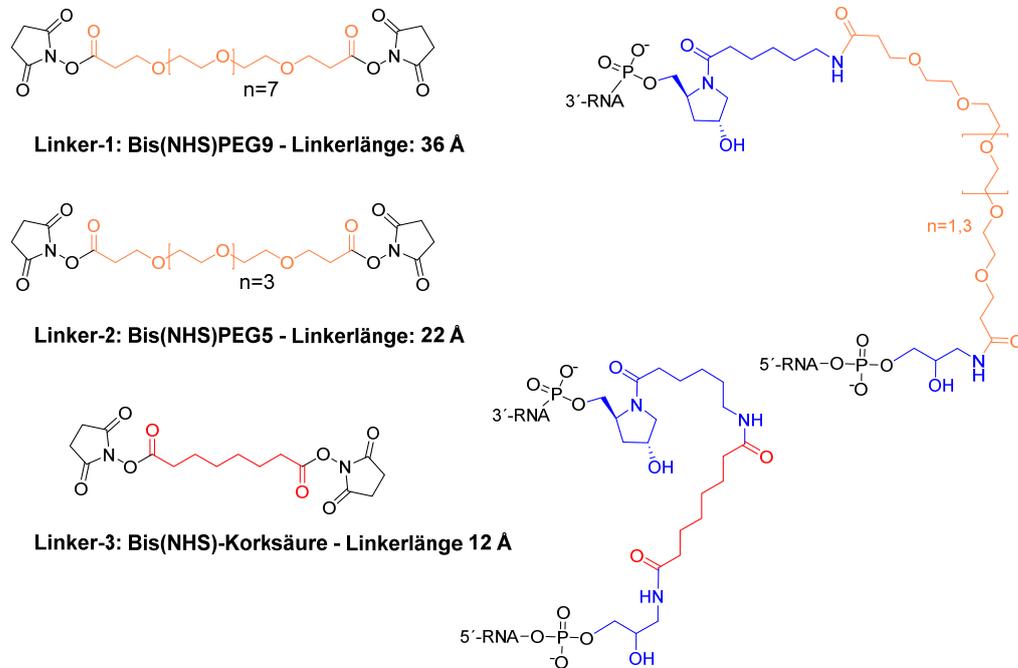


Abb. 90 Verwendete Bis-NHS-Linker zur Zyklisierung von **LHS-4** und **LHS-5** (links). Rechts ist ein Ausschnitt von **LHS-4** und **LHS-5** nach der Zyklisierung gezeigt.

Die Festphasensynthese und Aufreinigung erfolgte analog zu den vorhergehenden Synthesen. Während eine massenspektrometrische Analyse nicht erfolgreich für **LHS-5** verlief, konnte **LHS-4** mit der Verwendung von HFIP/Hexylamin (50 mM HFIP, 12 mM Hexylamin, pH 8) und Methanol als Eluenten massenspektrometrisch nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 22** im Anhang). Die Reinheit von **LHS-4** wurde zudem gelelektrophoretisch und über RP-HPLC nachgewiesen (siehe **Abb. 92** und **Abb. 232** im Anhang).

Fluoreszenzmessungen zeigten, dass Cy5.5 und BBQ-650 in einer optimalen Weise angeordnet wurden, sodass vor UV-Belichtung keine Fluoreszenz gemessen werden konnte (siehe **Abb. 91** links). Nach UV-Bestrahlung (365 nm) steigt die Fluoreszenz am Maximum (704 nm) um den Faktor ~500 bis ~1000 an (siehe **Abb. 91** rechts). Analog zu den Messungen von **LHS-1** und **LHS-2** ist auch hier zu beachten, dass vor Belichtung miR-181a binden kann, was aber nicht zum Anstieg der Fluoreszenz führen konnte.

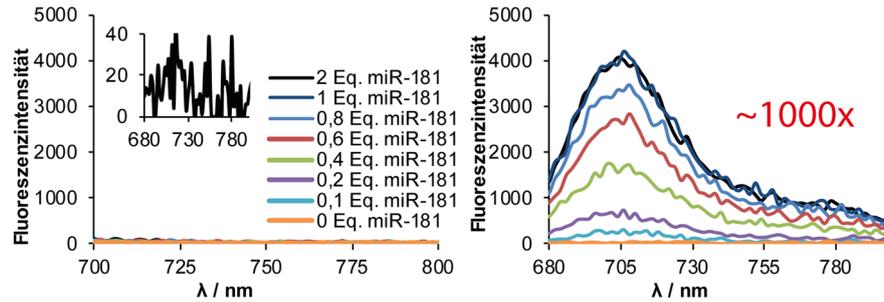


Abb. 91 Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung des Quenching von **LHS-4** vor (links) und nach UV-Belichtung (rechts). Anregung erfolgte bei 630 nm. Das Emissionmaximum liegt bei 704 nm. Die Konzentration von **LHS-4** betrug 1 μ M in PBS-Puffer (pH 7,4).

Die Zyklisierungen von **LHS-4** und **LHS-5** wurden mit 2, 10, 20 und 40 Eq. der Bis-NHS-Linker in Borax-Puffer (pH 8 bis 8,4) über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Studie^[128] über die Zyklisierung von DNA mittels Click-Chemie zeigte, dass bei einem äquimolaren Verhältnis von DNA und Bis-Linker und einer starken Verdünnung die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Höhere Äquivalente des Bis-Linkers führten zur zweifachen Addition des Linkers und zur Bildung von Polymeren. Ein Vorteil von Click-Chemie ist, dass die Reaktionen häufig quantitativ ablaufen.^[128] Äquimolare Reaktionen von Aminen mit NHS-Ester sind normalerweise nicht quantitativ, sodass standardmäßig für ein postsynthetisches Markieren 100-200-fache Überschüsse eingesetzt werden müssen. Bei einer Zyklisierung könnte es durch die Verwendung von einem Überschuss an Bis-NHS-Linker zu einer zweifachen Addition an eine Sequenz kommen, sodass keine Zyklisierung stattfindet oder sogar Polymere gebildet werden könnten. Der zweite Schritt der Zyklisierung ist eine intramolekulare Reaktion, welcher durch eine hohe Verdünnung bevorzugt werden könnte. Da NHS-Ester jedoch einer Konkurrenzreaktion, der basischen Hydrolyse im verwendeten Puffer (Borax-Puffer, pH 8,3) unterliegen, könnte auch eine starke Verdünnung die Zyklisierung verhindern. Die mit Linker-1 (PEG9), Linker-2 (PEG5) und Linker-3 (Korksäure) zyklisierten LHS wurden über RP-HPLC aufgereinigt und gelelektrophoretisch analysiert. Ein exemplarisches Chromatogramm vor und nach der Zyklisierung von **LHS-4** mit den verschiedenen Linkern ist in **Abb. 92** (links) gezeigt. Durch die Zyklisierungsreaktion (oder Addition) mit den bifunktionellen Linker findet eine eindeutige Verschiebung der Retentionszeit statt. Die verschiedenen Signale wurden gesammelt und die Bindung zur miR-181a über EMSA analysiert. Dazu wurde ein natives PAA-Gel mit gleichbleibender Konzentration der miR-181a, aber zunehmenden Konzentrationen des AntimiRs analysiert (EMSA). Da die Intensität der miRNA-Bande mit zunehmender Konzentration des AntimiRs abnahm, wurde davon ausgegangen, dass das vermutlich zyklisierte AntimiR die miRNA auch vor Photolyse bindet (siehe **Abb. 92** rechts).

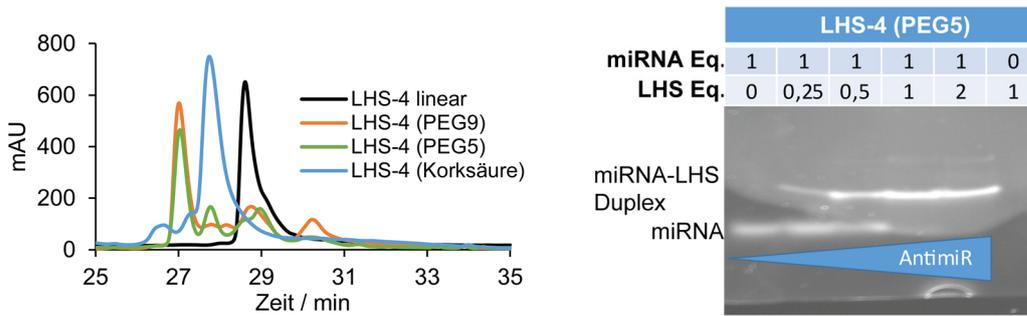


Abb. 92 RP-HPLC Chromatogramme vor und nach der Zyklisierung von **LHS-4** mit den verschiedenen bifunktionellen Linkern (links). 10%iges natives PAA-Gel (EMSA, TA, RT, 2W) zur Untersuchung der Bindung der miR-181a mit **LHS-4** vor der Photolyse. Da die Intensität der miRNA Bande bei Erhöhung der Äquivalenten von **LHS-4 (PEG5)** abnahm, hybridisierte die miRNA mit **LHS-4 (PEG5)** vor der Photolyse. **LHS-4** ohne miR-181a ließ sich nicht detektieren. Vermutlich induziert der Quencher eine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes (SYBR Gold) für die Färbung der Gelbanden.

Wie bereits oben erwähnt laufen Reaktionen mit NHS-Estern häufig nicht quantitativ ab. Da eine massenspektrometrische Analyse bei diesen langen und stark modifizierten LHS-Strängen nicht erfolgreich verlief, war ein direkter Nachweis der Zyklisierung nicht möglich. Der Unterschied der Masse vor und nach einer Zyklisierung beträgt bei einer Amidbindungsknüpfung nur 18 Da. (ein Wassermolekül), was ohnehin nur schwer eindeutig nachgewiesen werden kann bei den Längen dieser modifizierten Nukleinsäure. Da äquimolare Click-Reaktionen häufig auch quantitativ ablaufen, wurde im Folgenden die Zyklisierung über kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC; Click-Chemie) durchgeführt. Ein Nachteil von Click-Chemie ist, dass der BBQ-650-Quencher nicht während der Festphasensynthese eingeführt werden konnte, da dieser nicht kompatibel mit den reduktiven Bedingungen der Click-Chemie ist. Deswegen wurde ein Amin-modifiziertes 2'OMe Uridin (siehe **Abb. 94**) installiert, welches nach erfolgreicher Zyklisierung, mit BBQ-650-NHS markiert werden sollte. Es wurden zwei Stränge synthetisiert, die auf **LHS-4** basieren.

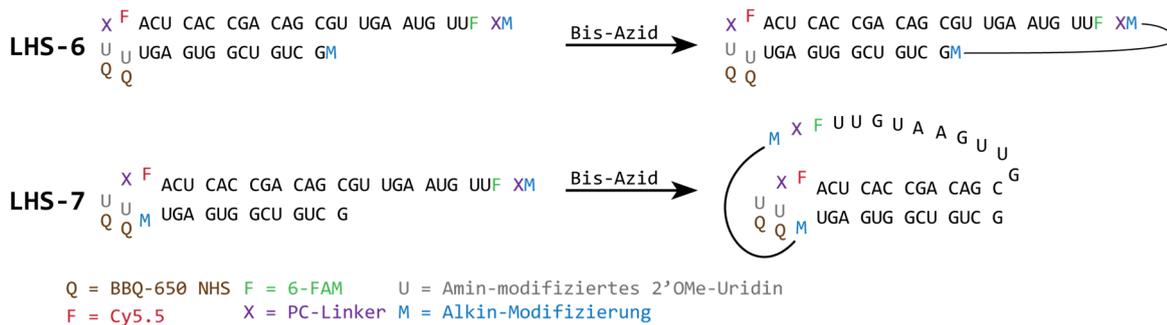


Abb. 93 Sequenzen von **LHS-6** und **LHS-7** zur Verhinderung der Bindung von miR-181a durch Zyklisierung mittels Click-Chemie.

Bei **LHS-6** wurden die Alkingruppen terminal installiert um eine End-zu-End-Zyklisierung durchzuführen. Bei **LHS-7** wurde ein Alkin in die Schleife und das andere an das 3'-Ende platziert. Dadurch soll der Blockierstrang mit einem Teil des AntimiRs einen stabilen Stamm bilden, während der übrige Teil des AntimiR-Strangs durch die Zyklisierung in einer so

ungünstigen Konformation vorliegt, dass die Hybridisierung mit der miR-181a nicht stattfinden sollte.

Die Festphasensynthese und Aufreinigung erfolgte wie oben beschrieben (siehe **Tabelle 20** im Anhang für die massenspektrometrischen Analysen). Die Strukturen der verwendeten modifizierten Phosphoramidite sind in **Abb. 97** dargestellt. Bei dem Design wurde darauf geachtet möglichst kurze Alkin-Linker zu verwenden, um die Flexibilität der zyklisierten Nucleinsäure zu erniedrigen, womit effizienter die Hybridisierung der miR-181a vor Photoaktivierung verhindert werden sollte.

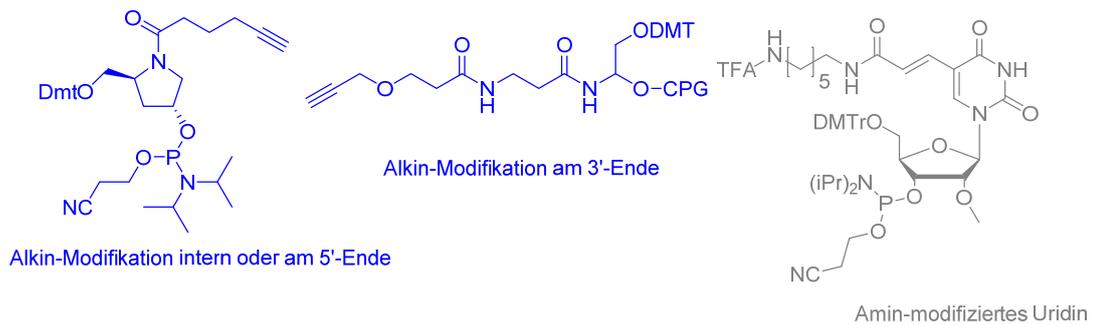


Abb. 94 Chemische Strukturen der Alkin-Modifikationen und des Amin-modifizierten 2'OMe Uridins.

Die Zyklisierungsreaktionen erfolgten nach Literaturbedingungen^[128] mit 1,4-Bis(azidomethyl)benzol (**AMB**, siehe **Abb. 95**) im äquimolaren Verhältnis mit **LHS-6** bzw. **LHS-7** in Anwesenheit von Kupfer-TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) und TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin). Um den Einfluss einer sterischen Hinderung der umgebenden Nucleinsäure zu verringern, wurde die Zyklisierungsreaktionen bei 40 °C und 70 °C durchgeführt.

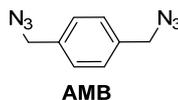


Abb. 95 Chemische Struktur von **AMB** (1,4-Bis(azidomethyl)benzol) als bifunktionaler Linker zur Zyklisierung von **LHS-6** und **LHS-7** mittels Click-Chemie.

Analog zu den Zyklisierungen oben beschrieben, wurden die Reaktionsgemische per RP-HPLC aufgereinigt und gelelektrophoretisch analysiert (siehe **Abb. 96**). In der dritten Fraktion der Zyklisierungsreaktionen von **LHS-6** und der ersten Fraktion von **LHS-7** ist eine einzelne Bande mit einem, im Vergleich zum linearen Edukt, langsameren Migrationsverhalten im denaturierenden PAA-Gel detektierbar. Zusätzlich konnte massenspektrometrisch die Zyklisierung oder die Addition nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 20** im Anhang). Ein eindeutiger massenspektrometrischer Nachweis ist nicht möglich, da sich im zweiten Schritt (dem Ringschluss) der Zyklisierung die Masse nicht ändert. Da langsamere

Migrationsverhalten ein vielversprechender Hinweis für zyklisierte Nukleinsäuren sind,^[128,322] wurden diese Fraktion per EMSA auf ihre Bindung zur miR-181a untersucht.

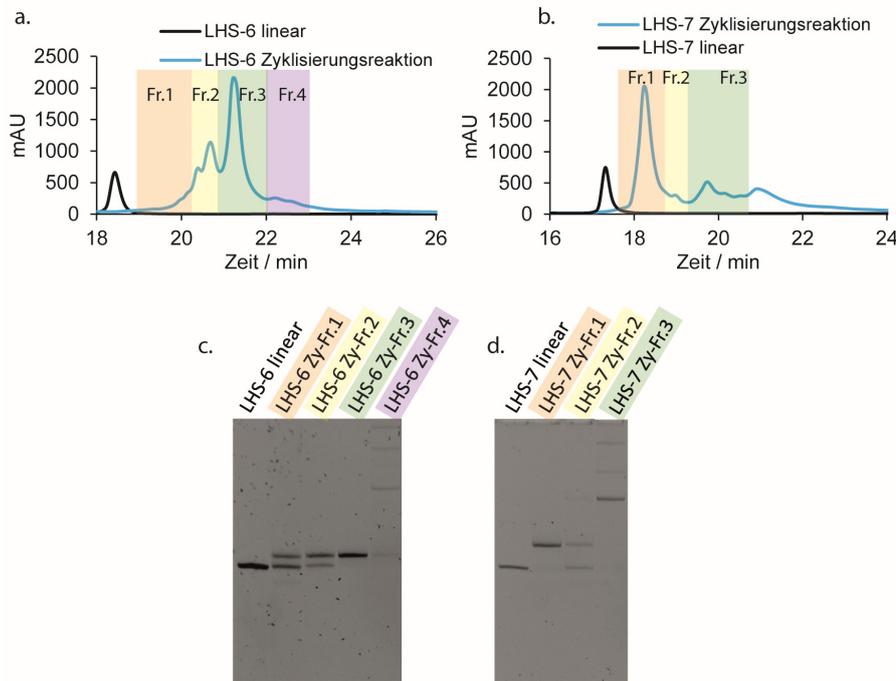


Abb. 96 RP-HPLC Chromatogramme der Zyklisierungsreaktionen von **LHS-6** (a) und **LHS-7** (b) mit **AMB**. Die HPLC erfolgte mit HFIP (400 mM HFIP, 16,3 mM TEA, pH 8) und MeOH an einer *Waters XBridge BEH300* C18, 3,5 μ m, 4,6x250 mm bei einer Temperatur von 60 °C. Die farblich markierten Fraktionen wurden mittels einem 20%igen denat. PAA-Gel (TBE, 200 V, ~30 min) analysiert. Neben dem Ausgangsmaterial ist eine weitere Bande mit langsamerem Migrationsverhalten bei beiden Zyklisierungsreaktionen detektierbar. Die Banden auf der rechten Bahn der jeweiligen Gele könnten auf Polymere zurückzuführen sein.

Die Analyse von **LHS-6** und **LHS-7** nach der Zyklisierung erfolgte, wie oben beschrieben, mittels EMSA. In **Abb. 97** ist zu erkennen, dass die Intensität der miRNA-Bande durch die Erhöhung der Äquivalente von **LHS-6** (zykl. Fr.3) und **LHS-7** (zykl. Fr.1) abnimmt. Das bedeutet, dass trotz Zyklisierung eine Bindung der miR-181a stattfand. Allerdings war die Bindung auch nicht quantitativ, sodass selbst bei einem zweifachen Überschuss an **LHS-6** (zykl. Fr.3) und **LHS-7** (zykl. Fr.1) noch eine schwache miRNA-Bande detektierbar war. Bei diesen Studien konnte zudem kein Unterschied festgestellt werden, ob die Zyklisierungen bei 40 oder 70 °C durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt).

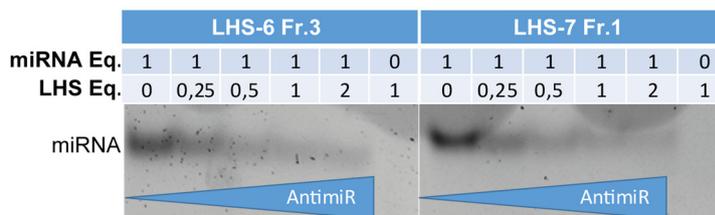


Abb. 97 15%iges natives Polyacrylamid-Gel (TA, RT, 40V, 60 mA, 2W, 5 h) zur Untersuchung der Hybridisierung von **LHS-6** und **LHS-7** mit miR-181a nach der Zyklisierung mit **AMB**.

Da die Zyklisierung an verschiedenen Positionen, mit diversen Linkern und zwei Zyklisierungsmethoden nicht die Bindung der miR-181a mit den AntimiRs vor der Photolyse verhinderte, wurde im Folgenden versucht die LHS zu verlängern, um deren Stabilität zu erhöhen.

2.2.4.2 Optimierung der Stammlänge der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden

Da die Fluoreszenzmessungen von **LHS-4** und **LHS-5** einen sehr guten Anstieg der Fluoreszenz nach Photolyse und Zugabe von miR-181a zeigten, wurde dieses Designprinzip im Folgenden optimiert. Um die Stabilität der Haarnadelstruktur zu erhöhen wurde der Stamm verlängert. Die Untersuchung von **LHS-3** zeigte, dass ein zur AntimiR-Sequenz vollständig komplementärer Blockierstrang nicht ausreichte, um die Bindung von miR-181a zu verhindern. Deswegen wurde in diesem Konzept der Stamm um drei (**LHS-8** und **LHS-10**) und sechs (**LHS-7**) GC-Basenpaare verlängert (siehe **Abb. 98**).



Abb. 98 Sequenzen von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10**.

Die stabilen GC-Basenpaare sollten die Öffnung des Hairpins und somit die miR-181a Bindung verhindern. Der erweiterte Stamm ist über photospaltbare Linker mit dem AntimiR und dem Blockierstrang verknüpft. Photolyse sollte den erweiterten Stamm abspalten, um analog zu **LHS-3** eine Bindung der miRNA zu ermöglichen. Aufgrund der Verfügbarkeit wurde am 5'-Ende anstatt ein C3-Alkyl-Linker, wie bei **LHS-4** und **LHS-5**, ein C12-Alkyl-Linker verwendet. Bei **LHS-10** wurde zusätzlich ein C12-Alkyl-Linker in die Schleife installiert. Durch die Flexibilität des Alkyl-Linkers sollte die Stabilität der Schleife erhöht werden.

Die Festphasensynthese und Aufreinigung erfolgte wie oben beschrieben (siehe **Tabelle 22** im Anhang für massenspektrometrische Analysen). Die gelelektrophoretische Analyse (EMSA) zeigte, dass die Hybridisierung von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** mit der miR-181a vor der Photolyse vollständig verhindert wird (siehe **Abb. 99** links für exemplarisches Beispiel an **LHS-9**).

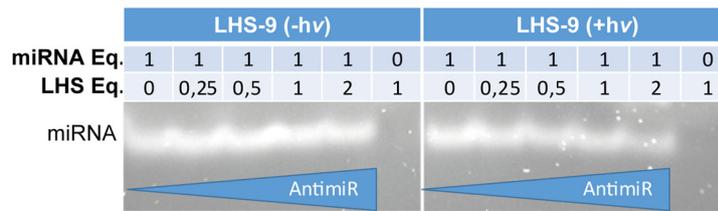


Abb. 99 15%iges natives Polyacrylamid Gel (TA-Puffer, RT, 40 V, 60 mA, 2 W, ~5 h) zur Untersuchung der Hybridisierung von miR-181a und **LHS-9** vor (links) und nach (rechts) UV-Bestrahlung (365 nm). Da die Intensität der miRNA-Bande vor UV-Bestrahlung nicht abnahm, fand keine Hybridisierung von **LHS-9** mit miR-181a statt. Nach UV-Belichtung nahm die Intensität der miRNA-Bande durch Erhöhung der Äquivalenten von **LHS-9** nur gering ab. **LHS-9** war folglich so stabil, dass selbst nach Photolyse keine Hybridisierung mit miR-181a vollständig möglich war.

Die Haarnadelstrukturen von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** sind somit stabil genug, um die Strangverdrängung des Blockierstrangs durch die miRNA zu verhindern. Allerdings zeigten gelelektrophoretische Analysen (EMSA) sowie Fluoreszenzmessungen, dass **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** selbst nach UV-Bestrahlung nicht bzw. nur zu einem sehr geringen Teil mit der miR181a hybridisierten (siehe **Abb. 99** rechts für exemplarisches Gel am Beispiel von **LHS-9** und **Abb. 100** für die Fluoreszenzstudien von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** nach UV-Bestrahlung).

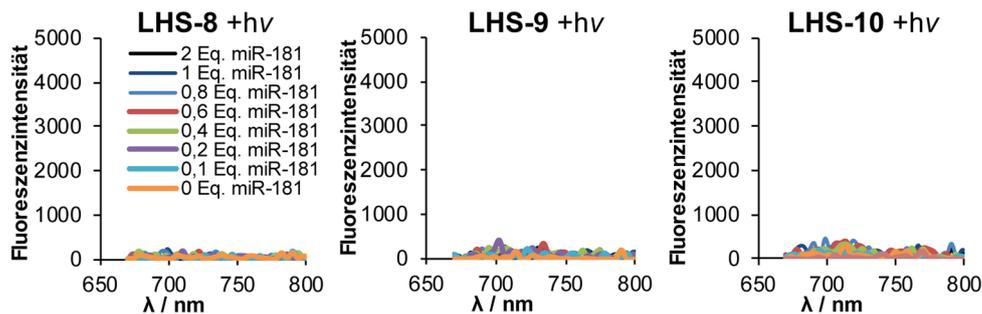


Abb. 100 Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Hybridisierung von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** mit miR-181a nach UV-Licht Bestrahlung (365 nm). Die Messung erfolgte bei einer Konzentration der LHS von 1 μ M in PBS-Puffer (pH 7,4).

Dies war unerwartet, denn im Vergleich mit dem zu instabilen **LHS-3** haben **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** die gleiche Länge des Blockierstrangs nach Photolyse (siehe **Abb. 101**). Die einzigen Unterschiede sind die verwendeten Fluorophore und Quencher sowie deren Position in der Sequenz (siehe **Abb. 101**). Während bei **LHS-3** ein Cy3 Hybridisierungsreporter mit einem BHQ-2 Quencher terminal installiert wurde, befanden sich im Falle von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** ein Cy5.5 und zwei BBQ-650 Quencher in der Schleife. Da Cy5.5 und BBQ-650 laut Angaben des Herstellers (*Berry & Associates, Inc.*) effizientes Kontakt-Quenching zeigen, könnten BBQ-650 und Cy5.5 einen stabilen Komplex bilden, wodurch der Doppelstrang des photolysierte Hairpins (siehe **LHS-8 (+h ν)** in **Abb. 101**) stabilisiert wird und die Hybridisierung der miRNA verhindert. Da eine Suche nach der genauen Ursache nicht zielführend erschien, wurde darauf verzichtet.

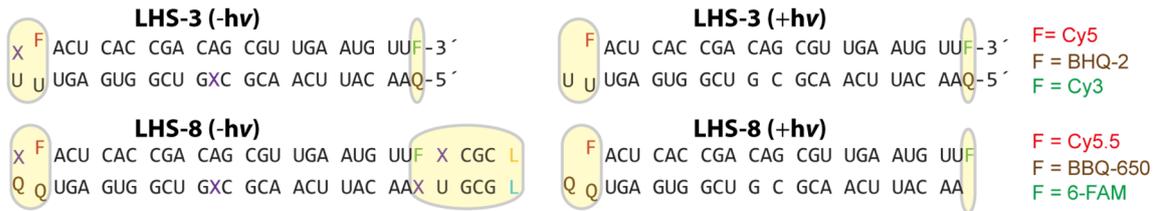


Abb. 101 Vergleich der Sequenzen von **LHS-3** und **LHS-8** vor und nach Photolyse. Die unterschiedlichen Strukturelemente sind farblich hervorgehoben.

Es wurde untersucht, ob durch längere Bestrahlung und Erwärmen der Proben eine Bindung der miR-181a erfolgt. Durch schrittweises Bestrahlen und Erwärmen von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** auf 85 °C und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur konnte eine Fluoreszenzsteigerung und somit Hybridisierung der miRNA beobachtet werden (siehe **Abb. 102** als Beispiel von **LHS-8**). Durch das Erwärmen der Proben auf 85 °C wurde die Haarnadelstruktur geschmolzen, sodass beim Abkühlen die miRNA mit der AntimiR-Sequenz hybridisieren konnte. Der AntimiR-miRNA-Duplex war der thermodynamisch stabilere Doppelstrang, da die miRNA mehr zusammenhängende (23 nt für miR-181a anstatt 10 + 12 nt für z.B. **LHS-8**) und komplementärer Basenpaarungen eingehen konnte.

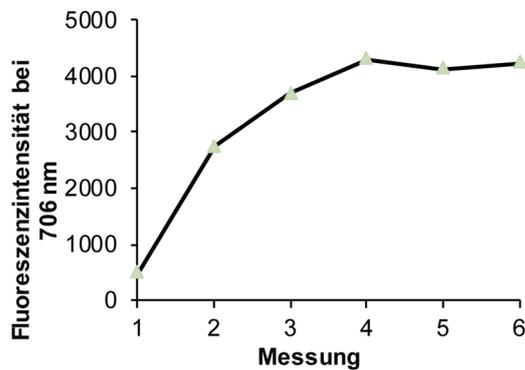


Tabelle 1 Bedingungen der Fluoreszenz-Messungen von **LHS-8** in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (365 nm) und Temperatur.

Messung Nr.	hv (min)	85 °C (min)
1	10	-
2	10	10
3	20	10
4	20	20
5	30	20
6	30	30

Abb. 102 Fluoreszenzmessungen von **LHS-8** in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (365 nm) und Temperatur. Die Messungen erfolgten mit 1 µM Konzentration von **LHS-8** in PBS-Puffer (pH 7,4) in Anwesenheit von 2 Eq. miR-181a. Nachdem die Proben auf 85 °C erwärmt wurden, wurden sie abgekühlt, sodass alle Messungen bei Raumtemperatur erfolgten. Die Bedingungen der Messungen sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Da die Verwendung von erhöhter Temperatur nicht kompatibel mit den Zellexperimenten ist, wurden im Folgenden die Haarnadelstrukturen optimiert. Dazu wurde analysiert, welche Teile des photolytierten Blockierstrangs von **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** die Bindung der miRNA verhinderten. Dazu wurde ein AntimiR synthetisiert (**Anti-miR-181**) welches komplementär zur miR-181a ist und keine Elemente einer Photoaktivierung und auch keine Haarnadelstruktur hatte (siehe **Abb. 103**). Lediglich ein Cy5 Fluorophor am 5'-Ende und ein C3-Linker am 3'-Ende (zur Steigerung der Exonukleaseresistenz) wurden installiert. In der ersten Kontrolle (**Kontrolle-1**, siehe **Abb. 103**) wurde Anti-miR-181 mit dem Teil des

Blockierstrangs (linker Teil; 10mer) hybridisiert, der den Quencher enthält. Fluoreszenzmessungen der **Kontrolle-1** mit miR-181a zeigten, dass die miRNA den Blockierstrang der **Kontrolle-1** verdrängen kann (siehe **Abb. 104**). Der linke Teil des Blockierstrangs in **LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10** war somit nicht alleine verantwortlich für die zu hohe Stabilität und die Verhinderung der effizienten Hybridisierung des AntimiRs mit der miR-181a.

LHS-8 (stabiler Hairpin)	X ^F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUF X CGC L Q ^Q UGA GUG GCU GXC GCA ACU UAC AAX U GCG L	F=Cy5.5 Q=BBQ-650 F=6-FAM
Anti-miR-181	F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUL Q UGA GUG GCU G	F=Cy5 Q=BBQ-650
Kontrolle-1	F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUL Q UGA GUG GCU G	L = C3-Linker
Kontrolle-2	F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUL Q UGA GUG GCU G C GCA ACU UAC AA	
Kontrolle-3	F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUL Q UGA GUG GCU G C GCA AC UAC AA	
Kontrolle-4	F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUL Q UGA GUG GCU GXC GCA ACX UAC AA	
Kontrolle-5	F ACU CAC CGA CAG CGU UGA AUG UUL Q UGA GUG GCU GXC GCA XCU UXC AA	

Abb. 103 Sequenzen von Anti-miR-181 mit verschiedenen Gegensträngen (Blockiersträngen) zur Untersuchung, welche Blockierstränge von der miR-181a verdrängt werden können.

In der **Kontrolle-2** wurde untersucht, ob die miRNA das **Anti-miR-181** binden konnte, wenn zusätzlich zu dem Quencher Strang (linker Teil) auch der „rechte“ Teil des Blockierstrangs (12mer) aus **LHS-8** zugegeben wurde. Da keine gesteigerte Fluoreszenz nach Zugabe von miR-181a beobachtet werden konnte (siehe **Abb. 104**), konnte die miRNA die beiden Teil-Blockierstränge aus **Kontrolle-2** nicht verdrängen. Als nächstes wurde untersucht wie sich das Konstrukt verhält, wenn der rechte Teil des Blockierstrangs (12mer) in zwei Teile (6mer + 5mer) geteilt wird. Dies sollte eine Installation eines weiteren photospaltbaren Linkers in den rechten Teil des Blockierstrangs simulieren. Fluoreszenzstudien (siehe **Abb. 104**) zeigten, dass durch Zugabe der miRNA eine Steigerung der Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Folglich konnte die miRNA den Blockierstrang verdrängen, wenn dieser aus drei Teilen bestand, wie in **Kontrolle-3**. Im nächsten Schritt wurde in der **Kontrolle-4** ein Blockierstrang verwendet, welcher auf **Kontrolle-3** basierte, aber über photospaltbare Linker verknüpft war. Bei der Zugabe von 5mer und 6mer Gegensträngen wie in **Kontrolle-3** ist unklar, ob diese bei Raumtemperatur hybridisierten. **Kontrolle-4** sollte klären wie sich das System verhält, wenn die Teil-Blockierstränge vor der Photolyse

bereits hybridisiert vorlagen. Fluoreszenzmessungen zeigten, dass vor der Photolyse keine Bindung der miRNA beobachtet werden konnte, jedoch nach Photolyse ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz gemessen wurde (siehe **Abb. 104**). Um zu testen, ob das System durch die zusätzliche Installation eines photospaltbaren Linkers verbessert werden könnte, wurde **Kontrolle-5** synthetisiert. Dabei wurden die zwei rechten Teil-Blockierstränge aus **Kontrolle-4** mit einem weiteren PC-Linker in 3 Teile geteilt. Diese Teilstränge sollten so kurz sein, dass diese nach Photolyse sofort dissoziieren, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit der miRNA-Bindung erhöht werden könnte. Fluoreszenzstudien zeigten allerdings, dass der Doppelstrang von **Kontrolle-5** zu instabil war und der **Anti-miR-181** Strang bereits vor der Photolyse die miRNA hybridisierte (siehe **Abb. 104**).

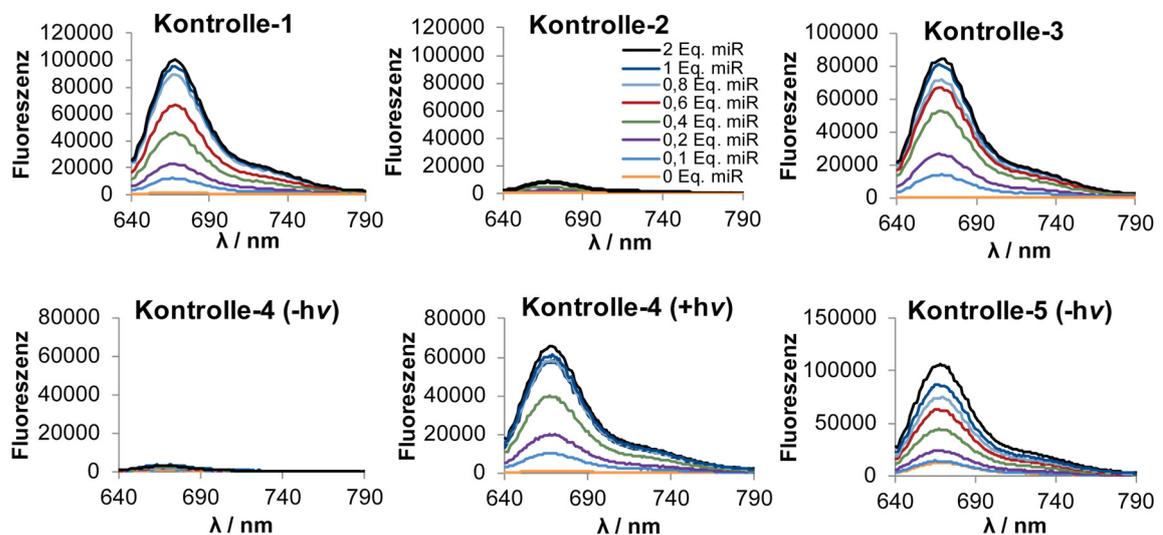


Abb. 104 Fluoreszenzmessung von **Kontrolle-1**, **Kontrolle-2**, **Kontrolle-3**, **Kontrolle-4** und **Kontrolle-5**. Die Messungen erfolgten bei einer 1 μ M Konzentration der Kontrollen in PBS-Puffer (pH 7,4). Anregung von Cy5 erfolgte bei 610 nm. Die Messungen erfolgten an einem *Platereader* Gerät der Firma *Tecan*.

Insgesamt schien **Kontrolle-4** das optimale Konzept zur Synthese einer LHS zu sein. Ein photoschaltbarer Linker weniger als in **Kontrolle-4** und die miRNA kann nach der Photolyse nicht mit dem AntimiR hybridisieren. Ein photospaltbarer Linker mehr als in **Kontrolle-4** und die miRNA hybridisiert mit dem AntimiR bereits vor der Photolyse. Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden LHS, (**LHS-11** und **LHS-12**, siehe **Abb. 105**) basierend auf den Kontrollstudien, synthetisiert. Bei **LHS-12** wurde der Stamm zusätzlich um drei GC-Basenpaare verlängert, um die Stabilität des AntimiR-Blockierstrang-Duplexes vor der Photolyse zu steigern.



Abb. 105 Sequenzen von **LHS-11** und **LHS-12**.

Die Festphasensynthese und Aufreinigung erfolgte unter *UltraMild*-Bedingungen und im DMTrOn-Modus analog zu den Synthesen aus Kapitel 2.2.3. Die Identität und Reinheit von **LHS-11** und **LHS-12** konnte per Massenspektrometrie, analytischer RP-HPLC und gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 20** und **Abb. 233** im Anhang).

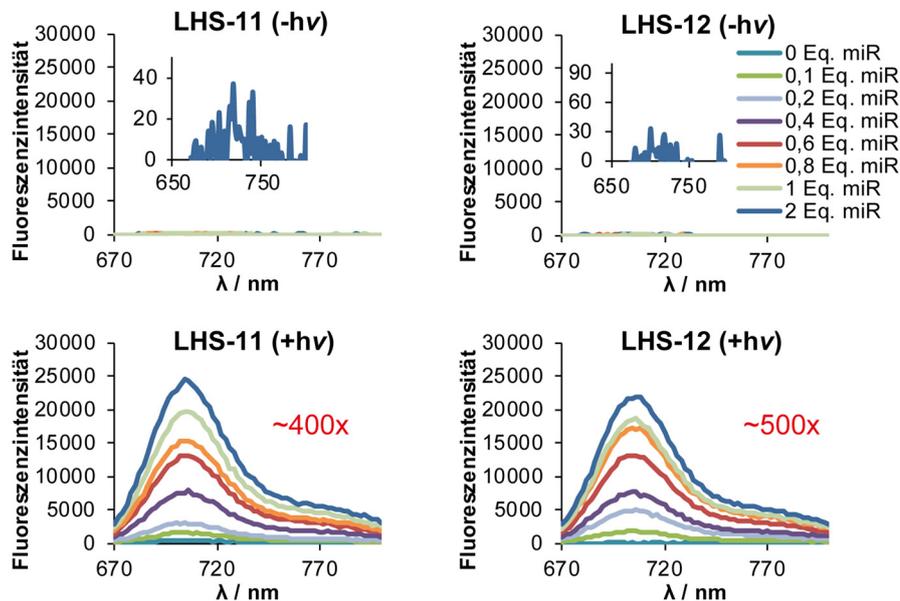


Abb. 106 Fluoreszenzmessungen von **LHS-11** und **LHS-12** vor und nach UV-Belichtung (365 nm) mit verschiedenen Äquivalenten an miR-181a. Die Konzentrationen von **LHS-11** und **LHS-12** betragen 1 μM in PBS-Puffer (pH 7,4). Die Fluoreszenzanstiege am Emissionsmaximum ($\lambda = 704 \text{ nm}$) durch Zugabe der miRNA betrugen ~ 400 -fach für **LHS-11** und ~ 500 -fach für **LHS-12**. Die Messungen erfolgten an einem *Platereader* Gerät der Firma *Tecan*.

Die Fluoreszenzmessungen zeigten, dass vor der Photolyse und in Anwesenheit der miRNA keine signifikante Fluoreszenz gemessen werden konnte (siehe **Abb. 106**). Nach UV-Bestrahlung (365 nm) konnte eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz um den Faktor ~ 400 für **LHS-11** und um den Faktor ~ 500 für **LHS-12** beobachtet werden. Die Studien bewiesen, dass nach Photolyse die miRNA den Blockierstrang verdrängen konnte.

Zur Untersuchung, ob die miR-181a vor der Photolyse **LHS-11** und **LHS-12** band, wurden EMSA Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass **LHS-11** (siehe **Abb. 234** im Anhang) und **LHS-12** (siehe **Abb. 107**) vor der Photolyse die miR-181a nicht band. Nach UV-Bestrahlung fand eine vollständige Bindung der miR-181a statt.

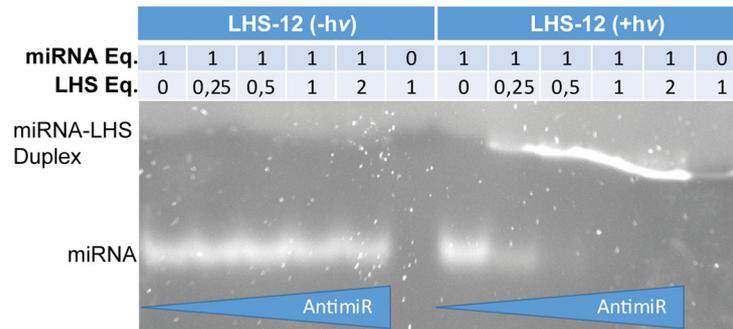


Abb. 107 15%iges natives Polyacrylamid Gel (TA, 2 W, RT) zur Untersuchung der Hybridisierung von **LHS-12** mit der miR-181a vor (links) und nach (rechts) UV-Bestrahlung (365 nm). **LHS-12** ohne miR-181a ließ sich nicht detektieren. Vermutlich induziert der Quencher eine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes (SYBR Gold) für die Färbung der Gelbanden.

2.2.4.3 Zusammenfassung der Optimierungen der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden

Zusammenfassend wurde bei dem Design der lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden (LHS) die Position von Fluorophor, die Position und Anzahl der Quencher, die Länge des Blockierstrangs und die Anzahl an photospaltbaren Linkern im Blockierstrang optimiert (siehe **Abb. 108** für eine Übersicht der synthetisierten LHS). Die Studie zeigte, dass eine Anordnung eines Cy5.5 Hybridisierungsfluorophors und zweier BBQ-650 Quencher in der Schleife der Haarnadelstruktur die Fluoreszenz vor der Photolyse und miRNA Bindung optimal verhinderte. Nach Photolyse und miRNA-Bindung konnte ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz (400- bis 500-fach) gemessen werden. Um die Hybridisierung der miRNA vor der Photolyse zu verhindern, musste der Blockierstrang die selbe Länge wie das AntimiR-Sequenz besitzen. Konstrukte mit kürzeren Blockiersträngen (**LHS-1**, **LHS-2**, siehe **Abb. 108**), die einen *toehold* enthielten, hybridisierten bereits vor der Photolyse mit der miRNA. **LHS-3** mit einem vollständig zum AntimiR komplementären Blockierstrang, bei dem Fluorophor (Cy3) und Quencher (BHQ-2) terminal installiert wurden, hybridisierte auch vor Belichtung mit der miRNA und zeigte zudem ineffizientes Quenching in Abwesenheit der miRNA. Bei den Konzepten **LHS-9 bis 12** befanden sich Fluorophor und Quencher in der Schleife und der Blockierstrang hatte dieselbe Länge wie das AntimiR (plus eine Verlängerung des Stammes, die durch Photolyse entfernt wird). Während ein photolabiler Linker in der Mitte des Blockierstrangs (**LHS-8**, **LHS-9** und **LHS-10**, siehe **Abb. 108**) nicht ausreichte, um die Stabilität des AntimiR-Blockierstrang-Duplex nach Photolyse zu reduzieren, konnte durch die Installation von zwei photospaltbaren Linkern eine Bindung der miRNA nach Photolyse erzielt werden (**LHS-11**, **LHS-12** siehe **Abb. 108**). Kontrollexperimente zeigten, dass ein weiterer PC-Linker die Stabilität des unphotolysierten Hairpins so stark reduzierte, dass die miRNA auch vor der Photolyse hybridisieren konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch durch die Zyklisierung der LHS (**LHS-4 bis 7**) an verschiedenen Positionen mit diversen Linkern die Bindung der miRNA vor Belichtung nicht verhindern konnte. Nur **LHS-11** und **LHS-12** zeigten ein perfekt ausbalanciertes Verhalten. Während

vor der Photolyse keine Bindung der miRNA beobachtet wurde, konnte nach Photolyse eine vollständige Hybridisierung detektiert werden.

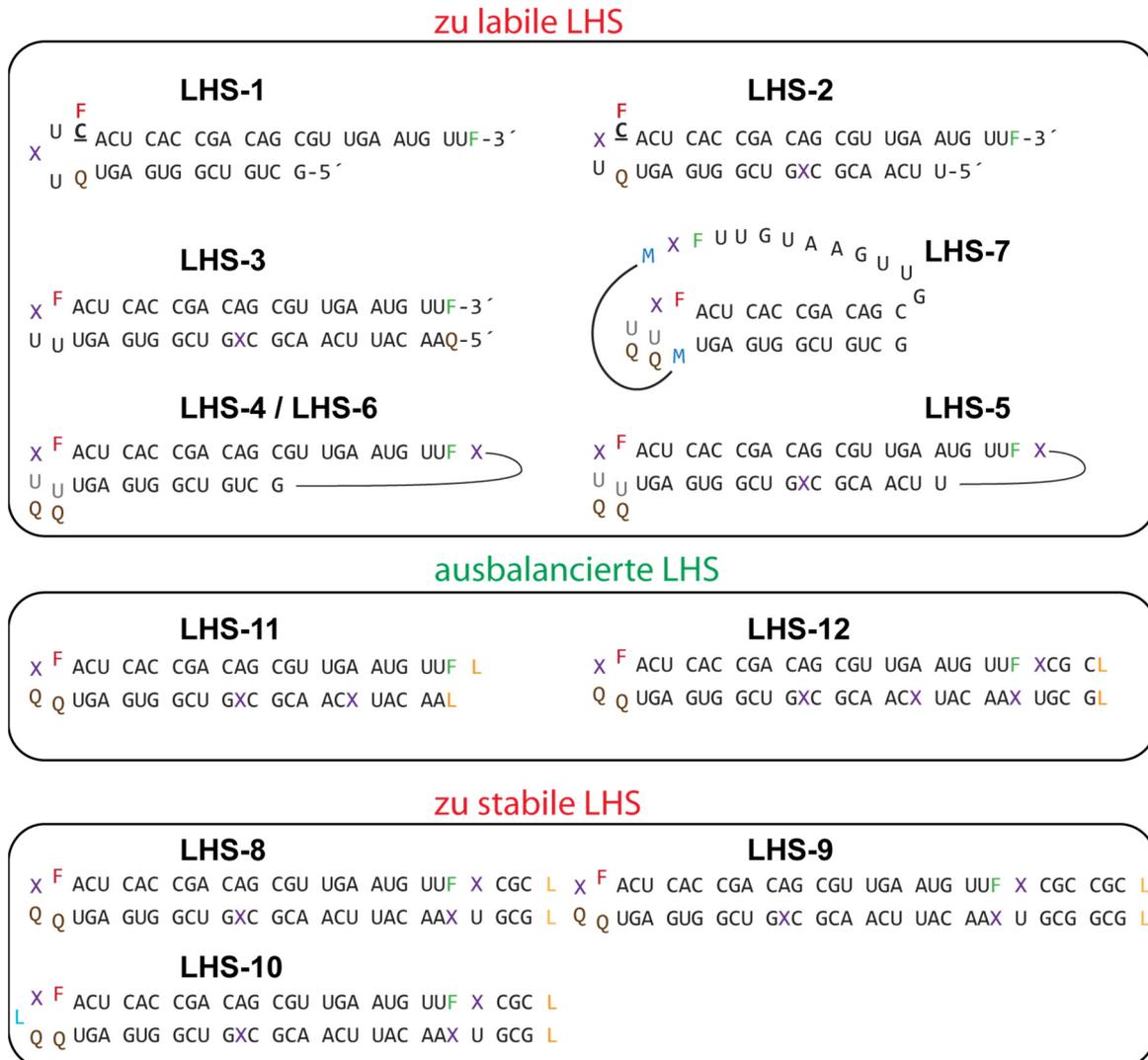


Abb. 108 Übersicht der synthetisierten LHS. Zu labile LHS hybridisierten mit miR-181a auch vor der Photolyse, während die zu stabilen LHS selbst nach der Photolyse nicht mit der miRNA hybridisierten. Die ausbalancierten LHS zeigten keine Bindung der miR-181 vor UV-Bestrahlung, jedoch nach Photoaktivierung eine vollständige Bindung. **LHS-4** und **LHS-6** unterscheiden sich anhand der Zyklisierungsmethode und dem Einbau der Quencher (siehe Kapitel 2.2.4.1).

Ein potentieller Mechanismus der lichtinduzierten Regulation der miRNA Aktivität von **LHS-11** und **LHS-12** ist in **Abb. 109** dargestellt. Vor der Photolyse liegen stabile Haarnadelstrukturen vor, sodass die miRNA nicht binden kann. Der *Tracking*-Fluorophor, Fluorescein (6-FAM), wird nicht gequencht und erlaubt die Verfolgung der LHS in der Zelle. Der Hybridisierungsreporter, Cy5.5, bleibt nicht-fluoreszent aufgrund der benachbarten BBQ-650-Quencher. UV-Bestrahlung führt zur Photolyse der photospaltbaren Linker. Dabei ist das Produkt der Photolyse von **LHS-12** identisch mit dem von **LHS-11**. Die bei der Strangspaltung entstandenen kurzen Teile des Blockierstrangs können dissoziieren, sodass die

miRNA eine *toehold* Strangverdrängung durchführen kann. Der Quencher-Strang wird dabei verdrängt und der Cy5.5 Hybridisierungsreporter fluoresziert. In Abwesenheit der miRNA bleibt der Quencher-Strang hybridisiert.

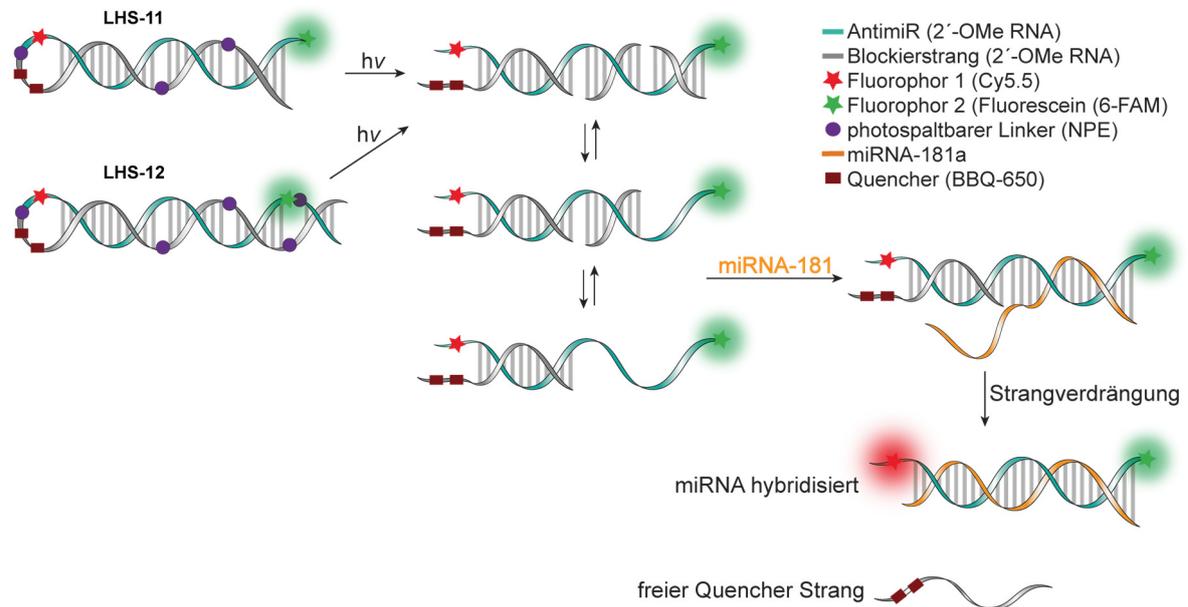


Abb. 109 Mechanismus der Lichtregulation von miR-181a durch LHS-11 und LHS-12.

2.2.5 Vergleich der LHS mit den dual-Fluorophor markierten Molecular Beacons

Obwohl die Fluoreszenzsteigerung im Vergleich mit **c⁸MB1.2** annähernd identisch ist, ist die Gesamtintensität der Fluoreszenz von **LHS-11** und **LHS-12** um den Faktor drei höher als bei dem MB. Dies ist nicht ungewöhnlich, denn bei dem MB bleibt der Quencher auch nach Bindung der miRNA kovalent verbunden und kann über ein FRET-Mechanismus eine anteilige Fluoreszenzlöschung bewirken. Bei **LHS-11** und **LHS-12** bleibt der Quencher nach Hybridisierung der miRNA nicht mehr kovalent verknüpft. Kommt zu einer Dissoziation der miR-181a, hat der MB den Vorteil, dass der Stamm geschlossen wird und die Fluoreszenz erlöscht. Im Vergleich dazu besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass **LHS-11** und **LHS-12** fluoreszent bleiben, da die Konzentration des Quencher-Stranges in der Zelle zu gering sein könnte, um mit dem AntimiR zu hybridisieren. Ein weiterer Nachteil von MBs ist, dass diese Proteine binden könnten und somit ein falsch-positives Signal zeigen.^[323] Ob die lichtaktivierbaren Hairpins ein ähnliches Verhalten zeigen, wurde nach Recherche des Autors dieser Arbeit nicht untersucht. In fortsetzenden Studien könnte ein LHS synthetisiert werden, die keine Komplementarität zu Nukleinsäuren in hippocampalen Neuronen von Ratten besitzt. Dies würde zeigen, ob der Fluoreszenzanstieg nur durch die Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure resultiert oder auch durch unspezifische Bindung von Proteinen.

2.2.6 Regulation von miR-181a durch lichtaktivierbare AntimiR-Sonden in hippocampalen Neuronen

Die Untersuchungen zur Regulation der miR-181a Aktivität in primären hippocampalen Neuronen von Ratten (*rattus norvegicus*) wurden von Mantian Wang (MPI für Gehirnforschung, AK Erin Schuman) durchgeführt. Im ersten Teil dieser Studie wurde **Anti-miR-181** verwendet (siehe **Abb. 103**). Dieses AntimiR benötigte keine Photoaktivierung und hatte auch keinen hybridisierungssensitiven Fluorophor. Ein Cy5 Fluorophor am 5'-Ende diente als *Tracking*-Fluorophor und ein *n*-Propanol-Linker am 3'-Ende zum Schutz gegen Exonukleaseverdau. **Anti-miR-181** wurde in verschiedenen Konzentrationen (1, 2,5 und 5 ng· μL^{-1}) mit *Lipofectamine MessengerMAX* für 1,5 h transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde über qPCR der mRNA-Level von CaMKII α und GluA2 (*Gria2*) bestimmt (siehe **Abb. 110**). Die Ergebnisse zeigten, dass der mRNA-Level von CaMKII α im Durchschnitt um den Faktor 1,5 gesteigert werden konnte. Aufgrund der geringen Anzahl an Replikaten kann eine Konzentrationsabhängigkeit des transfizierten **Anti-miR-181** nicht signifikant bestimmt werden. Die Genexpression von CaMKII α ist sehr heterogen, weshalb wiederholte Messungen für eine genaue Quantifizierung notwendig wären.

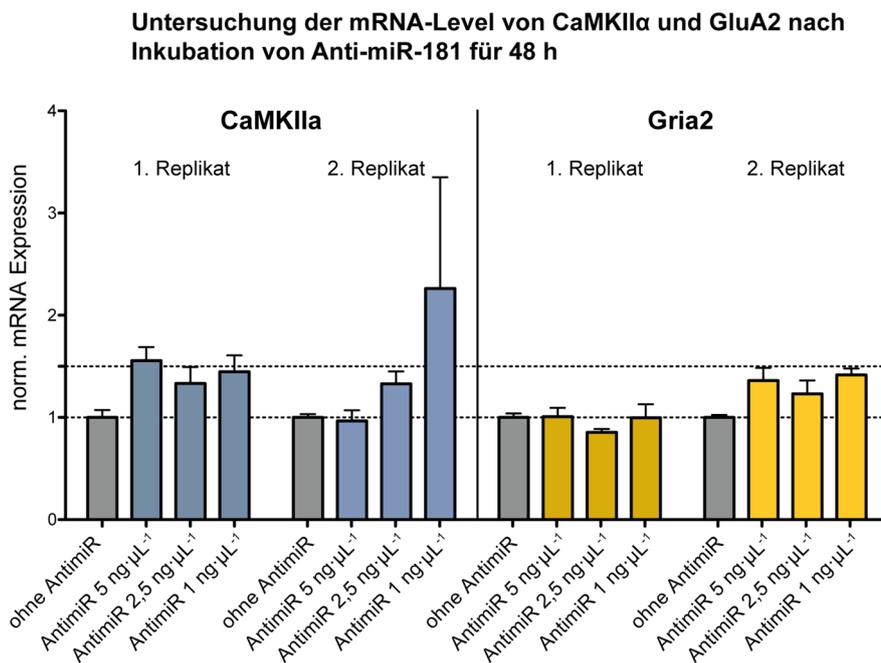


Abb. 110 Untersuchung der mRNA Expressionslevel von CaMKII α und GluA2 (*Gria2*) in primären hippocampalen Neuronen von Ratten die 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von **Anti-miR-181** inkubiert wurden. Die Transfektion erfolgte mit *Lipofectamine MessengerMAX* für 1,5 h. Die Messungen und Auswertungen wurden von Mantian Wang durchgeführt. Die Abbildung wurde modifiziert von Mantian Wang übernommen.

Der mRNA-Level von GluA2 nach Inkubation von **Anti-miR-181** zeigte ein noch stärker heterogenes Verhalten. Während für das erste Replikat keinen Unterschied zur Kontrolle (ohne Transfektion) festgestellt werden konnte, zeigte das zweite Replikat eine Steigerung des *Gria2*-Levels um den Faktor $\sim 1,4$. Dieser Anstieg ist ähnlich zu den Ergebnissen von

Schratt *et al.*^[68], bei denen der *Gria2*-Level nach Inkubation mit einem LNA-basierten Anti-miR um den Faktor $\sim 1,5$ gesteigert werden konnte. Zur Untersuchung des Proteinlevels von neu-synthetisierten CaMKII α wurden Puro-PLA^[299] (Puromycin *proximity ligation amplification*, siehe **Abb. 111**) Experimente durchgeführt. Zum Markieren von neu-synthetisierten Proteinen werden zwei Antikörper benötigt: Ein Antikörper (Antikörper-1), der nur die neu-synthetisierten Proteine markiert und ein Antikörper (Antikörper-2) der selektiv nur das zu untersuchende Protein bindet. Bei Puro-PLA werden die neu-synthetisierten Proteine mit Puromycin markiert. Wird Puromycin in das Protein eingebaut kommt es zu einer Termination der Translation. Im Falle von Puro-PLA bindet Antikörper-1 spezifisch Puromycin. In dem hier vorliegenden Fall war der zweite Antikörper spezifisch für CaMKII α . Zusätzlich müssen zwei sekundäre Antikörper zugegeben werden, die Oligonukleotide enthalten. Diese Oligonukleotide bilden einen Matrizenstrang für Zyklisierung einer weiteren Nukleinsäure mittels *Splint*-Ligation. Durch eine *rolling circle amplification* wird die zyklisierte Nukleinsäure amplifiziert. Für die Amplifikation werden Fluorophor-markierte (Cy3) Nukleosidtriphosphate verwendet, sodass fluoreszenzspektroskopisch eine Detektion (und Quantifizierung) von neu-synthetisierten Proteinen (hier: CaMKII α) erfolgen kann.

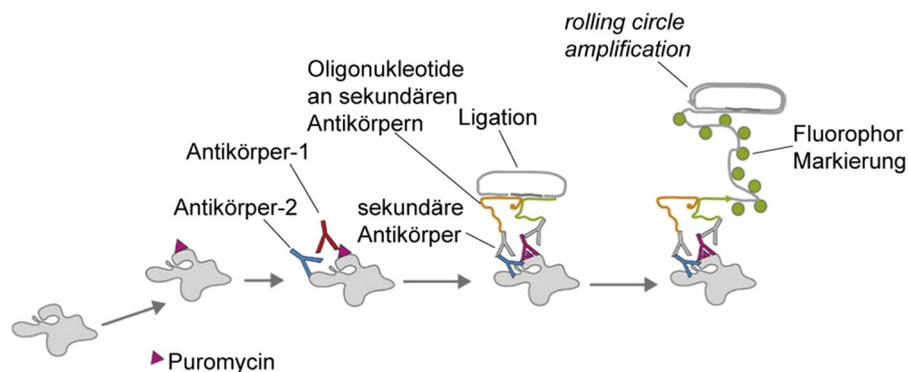


Abb. 111 Schema von Puro-PLA zur spezifischen Markierung von neu-synthetisierten Proteinen. Die Abbildung wurde modifiziert von Schuman *et al.*^[299] übernommen

Aufgrund der spektralen Kompatibilität (siehe **Abb. 112**) wurde Cy3 für das Markieren von neu-synthetisierten CaMKII α verwendet.

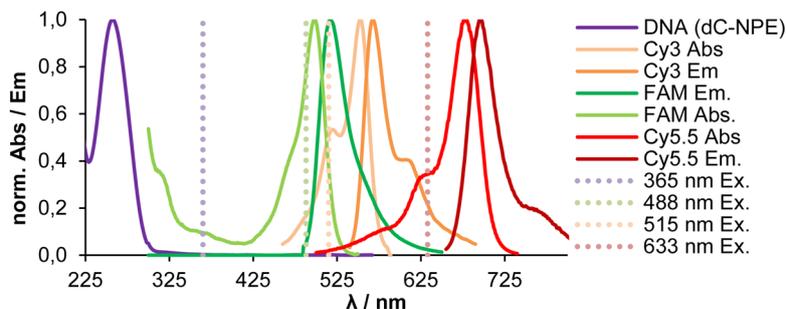


Abb. 112 Absorptions-, Emissionsspektren mit den verschiedenen Anregungswellenlängen der verwendeten Chromophore. Die Daten für die Fluorophore wurden aus dem *spectra viewer* von *ThermoFisher Scientific* oder *Chroma* entnommen. DNA (dC-NPE) bezeichnet ein 15mer DNA Strang mit einem NPE-geschützten Cytidin in der Mitte der Sequenz.

Die Auswertung der Puro-PLA Experimente erfolgte durch Zählung der fluoreszierenden CaMKII α Moleküle im Soma von ca. 50 verschiedenen Neuronen (siehe **Abb. 113**, rechts). Die Experimente zeigten, dass der Proteinlevel von CaMKII α durch Inkubation mit **Anti-miR-181** um den Faktor $\sim 1,4$ gesteigert werden konnte. **Abb. 113** (links) zeigt eine Mikroskopieaufnahme eines hippocampalen Neurons ohne (unten) und nach (oben) der Inkubation von **Anti-miR-181**. Nach der Inkubation von **Anti-miR-181** sind deutlich mehr fluoreszierende, also neu-synthetisierte, CaMKII α Moleküle (grüner Kanal) zu erkennen. Der rote Kanal in **Abb. 113** (links) zeigt die Lokalisierung von **Anti-miR-181** anhand der Fluoreszenz des Cy5 *Tracking*-Fluorophors. Die Färbung von MAP2 (Mikrotubulin-assoziiertes Protein) wurde verwendet um das Mikrotubulin-Netzwerk des Cytoskeletts der Neuronen zu visualisieren.

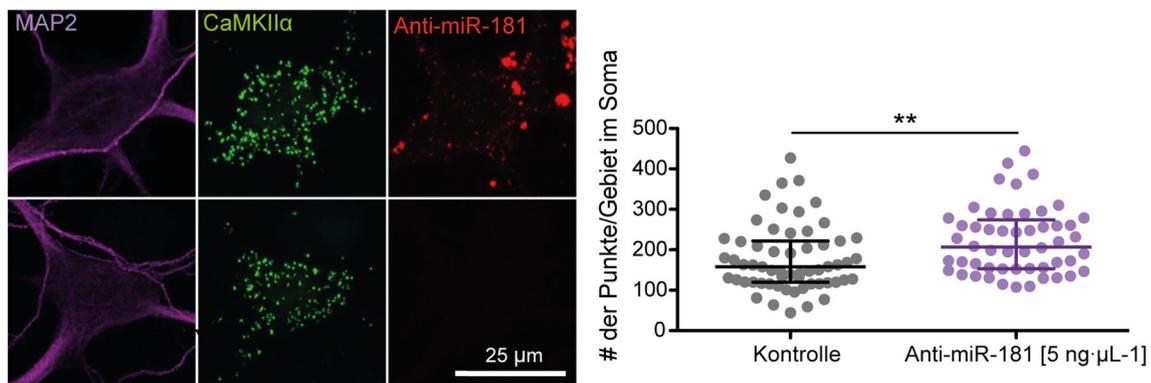


Abb. 113 Puro-PLA Experimente zur Visualisierung von neu-synthetisierten CaMKII α nach Inkubation von **Anti-miR-181** in primären hippocampalen Neuronen für 48 h. Die Inkubation der Zellen mit Puromycin (1 μ M) erfolgte für fünf Minuten. Links sind Mikroskopieaufnahmen (an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop) von hippocampalen Neuronen ohne (unten) und nach (oben) Inkubation von **Anti-miR-181** gezeigt. Die Fluorophormarkierung der PLA-Experimente erfolgte mit Cy3 (grüner Kanal in der linken Abbildung). Die Auswertung (rechts) erfolgte durch Zählung der Punkte (grüne Punkte, links). Jeder Punkt in der rechten Grafik (grau, magenta) stellt eine Zählung der grünen Punkte (links) im Soma einer Zelle dar. Die Experimente und Auswertung erfolgten von Mantian Wang und wurden modifiziert übernommen.

Da das nicht-lichtaktivierbare AntimiR (**Anti-miR-181**) sowohl den mRNA-, als auch den Proteinlevel von CaMKII α erhöhte, wurde im nächsten Schritt der lichtaktivierbare Molecular Beacon (**c⁸MB1.2**) und die lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden (**LHS-11** und **LHS-12**) untersucht. Anders als bei den Fluoreszenzstudien von **LHS-11**, **LHS-12** und **c⁸MB3** außerhalb von Zellen, konnten vor UV-Bestrahlung bereits Fluoreszenz des hybridisierungssensitiven Fluorophors detektiert werden (siehe **Abb. 114**, Cy5.5). Diese Hintergrundfluoreszenz war bei dem Molecular Beacon am stärksten, während **LHS-11** und **LHS-12** eine annähernd gleiche Hintergrundfluoreszenz zeigten.

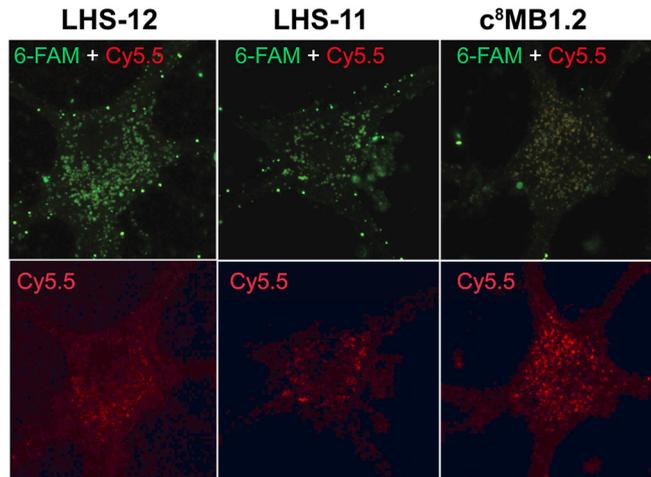


Abb. 114 Fluoreszenzmessungen von **LHS-11**, **LHS-12** und **c⁸MB1.2** in primären hippocampalen Neuronen vor UV-Belichtung an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Oben ist eine Überlagerung der Fluoreszenz von 6-FAM und Cy5.5 gezeigt. Unten ist die Fluoreszenz des hybridisierungssensitiven Fluorophors Cy5.5 gezeigt. Die Transfektion der Proben erfolgte für 1,5 h und die Inkubation über Nacht. Die Messungen wurden von Mantian Wang durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl und Leistung (Power) der Laserpulse zur Photolyse der photolabilen Schutzgruppen bestimmt.

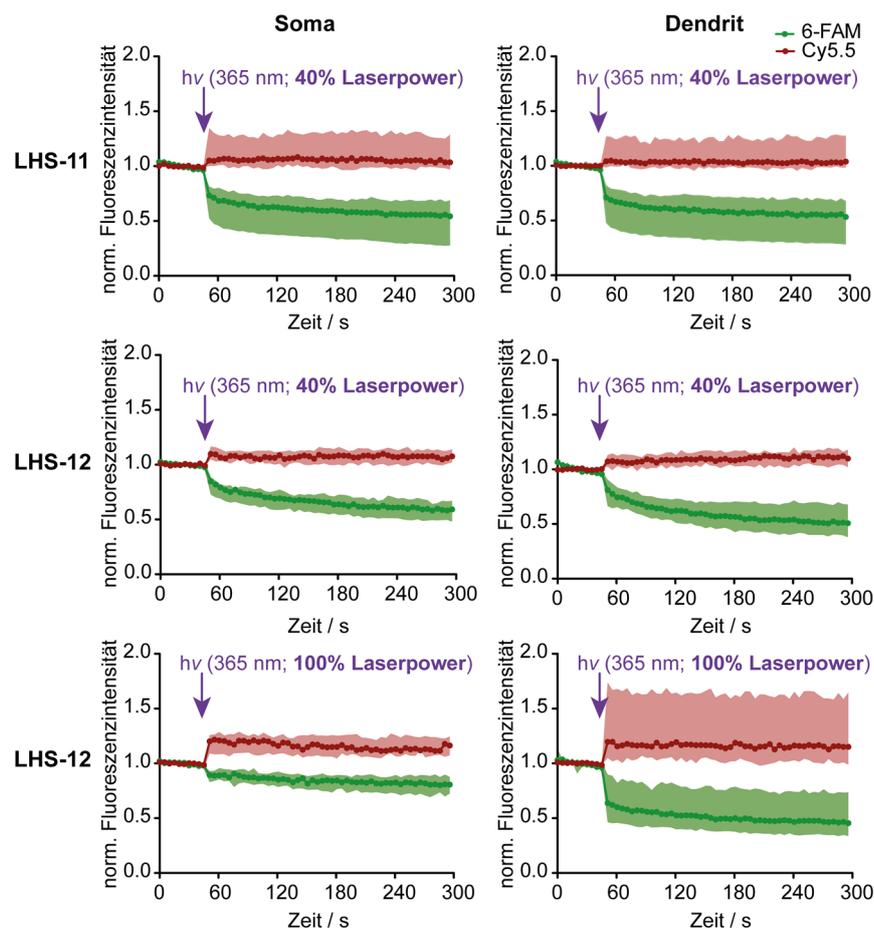


Abb. 115 Fluoreszenzmessungen (Cy5.5 und 6-FAM) von **LHS-11** und **LHS-12** vor und nach UV-Bestrahlung bei 355 nm ($9,26 \mu\text{s} \cdot \text{Pixel}^{-1}$) mit 40 (oben, Mitte) und 100% (unten) Laserpower in Somata (links) und Dendriten (rechts). Es sind der Durchschnitt, sowie die Standardfehler des Mittelwerts (SEM) gezeigt. Die Messungen wurden von Mantian Wang durchgeführt. Die Abbildung wurde von Mantian Wang modifiziert übernommen.

Im Vergleich zu 40% Laserpower, führte die einmalige Verwendung von 100% Laserpower zu einem stärkeren Anstieg der Fluoreszenz, was auf eine erhöhte Hybridisierung mit der miR-181a zurückzuführen ist. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Photoaktivierungen im Somata und im Dendriten detektiert werden. 6-FAM zeigte allerdings Photobleichen, sowohl durch UV-Bestrahlung, als auch durch wiederholte Fluoreszenzmessungen. Die Hybridisierungen von den LHS liefen instantan ab, sodass Detektionen für eine Stunde nach der Photolyse nicht zum Anstieg der Fluoreszenz des Hybridisierungsreporters führte (siehe **Abb. 116**). Während Cy5.5 kein Photobleichen nach einstündigen Fluoreszenzmessungen zeigte, konnte bei 6-FAM ein stetiger Abfall der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dies konnte bereits in den Fluoreszenzstudien in Kapitel 2.2.4.2 beobachtet werden.

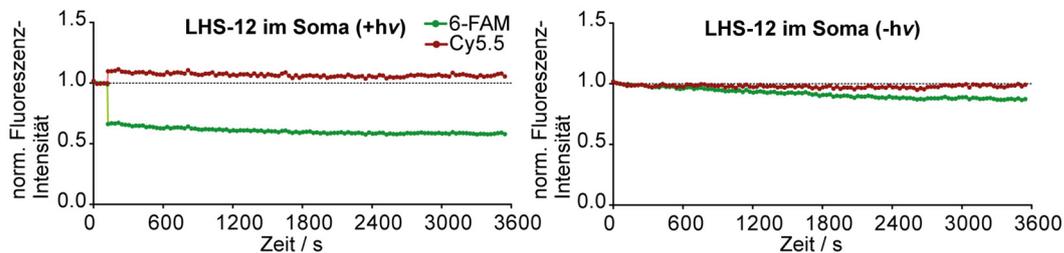


Abb. 116 Fluoreszenzmessungen von **LHS-12** im Soma ohne und mit UV-Bestrahlung für 1 h. Die Messungen wurden von Mantian Wang durchgeführt. Die Abbildung wurde von Mantian Wang übernommen.

Der maximale Anstieg der Fluoreszenz von Cy5.5 konnte nach zwei Laserpulsen für die LHS und nach vier Laserpulsen mit 100% Laserpower für den MB erreicht werden (siehe **Abb. 117**). Weitere UV-Bestrahlung führte zur schrittweisen Verringerung der Fluoreszenz (UV-Licht induziertes Photobleichen). Die Anregung mit 40% Laserpower führte nach acht Impulsen zu einem stetigen Fluoreszenzanstieg von **LHS-11** und **c⁸MB1.2**, während **LHS-12** einen leichten Abfall der Fluoreszenz nach fünf Pulsen zeigte.

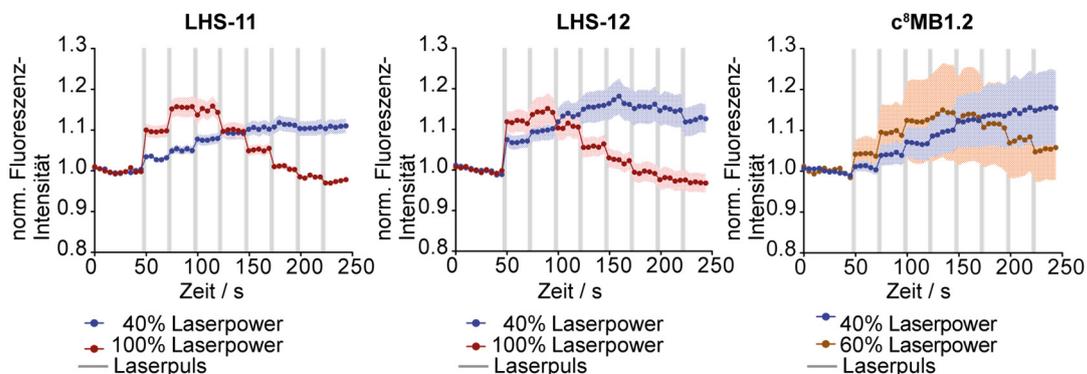


Abb. 117 Fluoreszenzmessung von **LHS-11**, **LHS-12** und **c⁸MB1.2** mit wiederholten Laserpulsen (355 nm, 9,26 $\mu\text{s}\cdot\text{Pixel}^{-1}$) mit 40 und 100% Laserpower. Die Messungen wurden von Mantian Wang durchgeführt. Die Abbildung wurde von Mantian Wang übernommen.

Im nächsten Schritt wurde die lokale Proteinsynthese von CaMKII α nach dreimaliger UV-Bestrahlung (355 nm, 100% Laserpower, 50 mW) von **LHS-12** untersucht (siehe **Abb.**

118). Dazu wurden ein mit UV-Licht bestrahlter Bereich (siehe **Abb. 118** rot umrahmt) mit einem unbelichteten Bereich (siehe **Abb. 118** weiß umrahmt) in Dendriten verglichen. Die UV-Licht bestrahlten Bereiche zeigten eine höhere Fluoreszenz des Hybridisierungsreporters (Cy5.5). Zusätzlich konnte in den mit UV-Licht bestrahlten Bereichen mehr neu-synthetisierte CaMKII α Proteine (weiße Signale in den rechten Bildern in **Abb. 118**) nach bereits fünf Minuten durch Puro-PLA detektiert werden, was besonders deutlich im mittleren Bild von **Abb. 118** zu erkennen ist. Ein Vergleich mit einer Negativkontrolle (Mock) ohne AntimiR zeigte, dass der Effekt nicht auf die UV-Bestrahlung zurückzuführen ist.

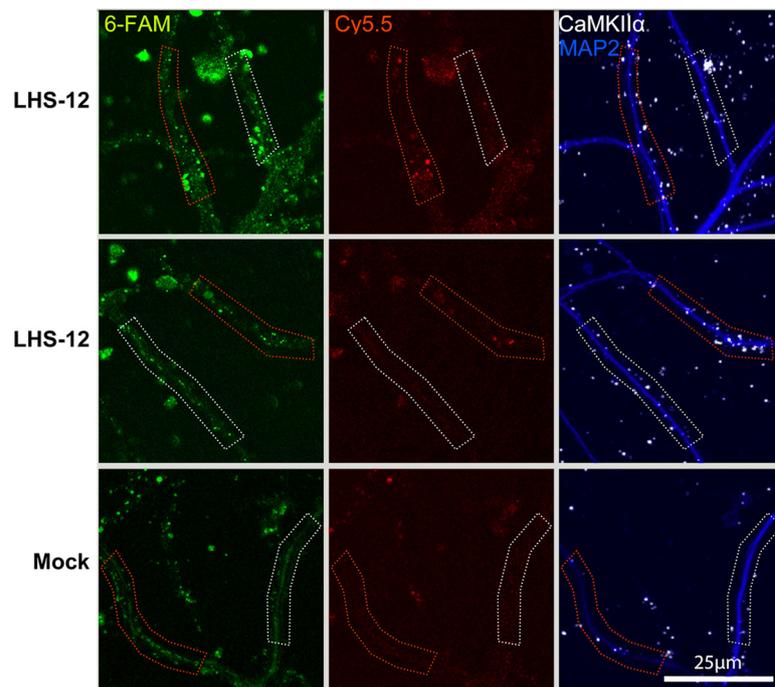


Abb. 118 Fluoreszenzmessungen (an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop) von **LHS-12**, **LHS-12** sowie einer Negativkontrolle (Scheinbehandlung, Mock), bei der kein AntimiR transfiziert wurde, in Dendriten von primären hippocampalen Neuronen. Die linken Bilder zeigen die Fluoreszenz des Tracking-Fluorophors (6-FAM), bzw. die Autofluoreszenz der Zelle im Falle der Negativkontrolle (Mock). Die mittleren Bilder zeigen die Fluoreszenz des hybridisierungssensitiven Fluorophors (Cy5.5). Die rechten Bilder zeigen die Fluoreszenz der neu-synthetisierten CaMKII α -Moleküle nach der Durchführung von Puro-PLA. Der rote Rahmen zeigt den Bereich, der dreimal mit UV-Licht (355 nm, 100% Laserpower, 50 mW) bestrahlt wurde. Der weiße Rahmen wurde nicht mit UV-Licht bestrahlt und dient als Vergleich für die Fluoreszenz des hybridisierungssensitiven Fluorophors (Cy5.5), sowie für die Auswertung von neu-synthetisiertem CaMKII α . Die Messungen wurden von Mantian Wang durchgeführt. Die Abbildung wurde von Mantian Wang erstellt und modifiziert übernommen.

Die Untersuchungen der lichtaktivierbaren AntimiR-Sonden in hippocampalen Neuronen waren zu dem Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Eine genaue Quantifizierung der neu-synthetisierten CaMKII α und GluA2 Proteine in Abhängigkeit von der Menge an inhibierter miR-181a wird in Zukunft erfolgen. Zudem wird analysiert wie lange nach der Photoaktivierung gewartet werden muss, damit der Effekt auf die lokale Proteinsynthese am stärksten ist und wann dieser abklingt. Zusätzlich soll in fortsetzenden Studien untersucht werden, ob das AntimiR analog wie andere Nukleinsäure mittels RNA-Granula transportiert wird.

2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Projekts war die Entwicklung einer lichtaktivierbaren AntimiR-Sonde zur Regulation der lokalen, hippocampalen Genexpression von zwei wichtigen Proteinen für synaptische Plastizität, CaMKII α und GluA2. Dazu wurden drei Konzepte für lichtaktivierbare Sonden synthetisiert und verglichen: Im ersten Konzept wurde Thiazolorange als hybridisierungssensitiver Fluorophor verwendet. Nach Optimierungen konnte ein zirka 3-facher Anstieg der Fluoreszenz nach Hybridisierung mit überschüssiger miRNA erzielt werden. Dieser Fluoreszenzanstieg war allerdings zu gering, da für die vollständige Inhibierung der miRNA in Neuronen das AntimiR und nicht die miR-181a im Überschuss vorhanden sein muss. Das zweite Konzept beschäftigte sich mit der Synthese eines dual-Fluorophor markierten, lichtaktivierbaren Molecular Beacons. Es konnte gezeigt werden, dass ein Stamm von drei Basenpaaren, die Installation von acht photolabilen NPE-Schutzgruppen und die Verwendung von Cy5.5 und zwei BBQ-650 als Hybridisierungsfluorophor und Quencher optimale Ergebnisse zeigte. Während vor UV-Bestrahlung keine Fluoreszenz gemessen wurde, konnte nach Photoaktivierung und Zugabe der miRNA ein ~1000-facher Anstieg der Cy5.5-Fluoreszenz gemessen werden. Im dritten Konzept wurde das Design von lichtaktivierbaren Hairpin-Sonden (LHS) optimiert. Ideale Ergebnisse konnten durch die Verwendung eines Blockierstrangs erzielt werden, der dieselbe Länge wie das AntimiR selbst hat und durch die Installation von drei photospaltbaren NPE-Linkern. Ein photospaltbarer Linker verknüpft den Blockierstrang mit dem AntimiR, die anderen beiden spalten den Blockierstrang. Dadurch wurde dessen Stabilität so stark erniedrigt, dass die miRNA den gespaltenen Blockierstrang verdrängen und das AntimiR binden konnte. Dieses Konzept erforderte eine enorme Feinoptimierung der Anzahl und Position der photospaltbaren Linker: Ein photospaltbarer Linker weniger im Blockierstrang führte dazu, dass die miRNA sogar nach Photoaktivierung das AntimiR nicht binden konnte. Ein photospaltbarer Linker mehr als benötigt destabilisierte die Wechselwirkung mit dem Blockierstrang so stark, dass bereits vor der Photoaktivierung die miRNA das AntimiR binden konnte. Zusätzlich konnte evaluiert werden, dass durch die Installation des hybridisierungssensitiven Fluorophors und Quencher in der Schleife optimale Ergebnisse erzielt werden konnten. Nach Hybridisierung mit der miRNA konnte ein ~500-fachen Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden. Dieses Konzept einer lichtaktivierbaren Hairpin-Sonde ist, nach Recherche des Autors, das erste, welches ausschließlich die Strangverdrängung durch Hybridisierung mit der Ziel-Nukleinsäure und nicht die Photolyse visualisiert.

Die Untersuchung eines nicht-lichtaktivierbaren AntimiRs gegen miR-181a (**Antimi-miR-181**) in hippocampalen Neuronen zeigte, dass der mRNA- und der Proteinlevel von CaMKII α in einem gesamten Neuron um den Faktor ~1,5 gesteigert werden konnte. Anders als bei Experimenten außerhalb von Zellen, zeigten die lichtaktivierbaren Sonden *in vitro*

eine Fluoreszenz der hybridisierungssensitiven Fluorophore vor der Photoaktivierung. Puro-PLA Experimente zeigten, dass durch orts aufgelöste Photoaktivierung von **LHS-12** eine signifikante Steigerung der lokalen Proteinbiosynthese von CaMKII α erzielt werden konnte. In fortsetzenden Studien wird der Effekt der miR-181a Aktivität auf die lokale Proteinsynthese von CaMKII α und GluA2 quantifiziert. Diese Studie soll den Einfluss der miR-181a auf die lokale Proteinsynthese untersuchen. Die lokale Proteinsynthese ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung, aber der Einfluss von miRNA ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Die Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Untersuchung des komplexen Systems der Langzeitpotenzierung leisten, um so die Mechanismen von Lernen und Gedächtnis zu entschlüsseln.

3 Reversible Lichtregulation von Nukleinsäuren mit Azobenzol C-Nukleosiden

3.1 Motivation und Zielsetzung

Hybridisierung ist eine grundlegende Eigenschaft von Nukleinsäuren und ist fundamental für eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Im Falle von RNA kann regulatorische RNA (siRNA, miRNA) durch Hybridisierung die Genexpression regulieren. Zusätzlich steht die Ausbildung von Sekundärstrukturen, also die Formation von intramolekulare Doppelstränge, oft direkt in Zusammenhang mit der Funktion der RNA. Auch die Hybridisierung von DNA spielt eine entscheidende Rolle. So sind zum Beispiel DNA Replikation oder Transkription abhängig von der Duplexbildung. Zudem beruhen analytische Anwendungen wie PCR, Sequenzierung oder Nukleinsäure basierende fluoreszierende Sonden (*Southern Blotting*, *Taq Man*, *FISH (fluorescence in situ hybridization)*) auf der spezifischen Hybridisierung. Auch DNA Nanoarchitektur, die es ermöglicht große, stabile und komplexe dreidimensionale Konstrukte herzustellen, wird erst möglich durch Doppelstrangbildung. Die Regulation der Hybridisierung würde ein mächtiges Werkzeug schaffen, um all jene Prozesse zu regulieren. Dies könnte zum einen helfen viele biologische Prozesse in der Zelle besser verstehen zu können und zum anderen diese auch gezielt zu beeinflussen für diagnostische oder therapeutische Zwecke. Licht ist für diese Regulation ein ideales Triggersignal, denn eine Bestrahlung kann mit hoher Orts- und Zeitaufösung durchgeführt werden. Zudem ist Licht nicht-invasiv und durch die Wahl einer geeigneten Wellenlänge ($\lambda \geq 330$ nm) wird das biologische System nicht geschädigt oder beeinflusst, was zum Beispiel durch Zugabe von Säuren, Basen oder Temperaturänderung zur Aktivierung der Fall wäre. Photolabile Schutzgruppen können die Hybridisierung von Nukleinsäuren temporär inaktivieren. Photolyse setzt die native Nukleinsäure irreversibel frei, sodass der Ausgangszustand nicht wiederhergestellt werden kann. Bei der Photolyse entsteht die abgespaltene Schutzgruppe als ein Abfallprodukt, was das zu untersuchende System beeinflussen kann. Eine Alternative an photoaktivierbaren Verbindungen sind Photoschalter. Diese Verbindungen können durch Bestrahlung zwischen zwei Konformationen reversibel isomerisiert werden. Azobenzole eignen sich besonders für die Regulation von Nukleinsäuren, da das unpolare und planare *trans*-Azobenzol in den Basenstapel interkalieren kann und den Doppelstrang stabilisiert, während das gewinkelte und sterisch anspruchsvolle *cis*-Azobenzol die Stabilität des Doppelstranges erniedrigt. Der Linker, der das Azobenzol kovalent mit der Nukleinsäure verknüpft spielt eine enorm wichtige Rolle, da das Azobenzol perfekt in die chirale Helix hineinpassen muss. Ein starre Linker verhindert das Drehen des Azobenzols aus der Helix und erlaubt eine bessere Kraftübertragung von der lichtinduzierten Isomerisierung auf die Strukturänderung der Nukleinsäure. Bisherige azyklische Linker (siehe 1.4.4) sind

keine natürlichen Bausteine von Nucleinsäuren und können somit immer eine Änderung der helikalen Natur eines Doppelstranges bewirken. Diese Studie beschäftigte sich mit der Entwicklung von C-nucleosidisch verknüpften Azobenzolen (**pAzo** und **mAzo**) zur Lichtregulation von DNA und RNA. Durch den Riboselinker soll das Rückgrat und die helikale Natur einer nativen Nucleinsäure optimal nachgeahmt werden.

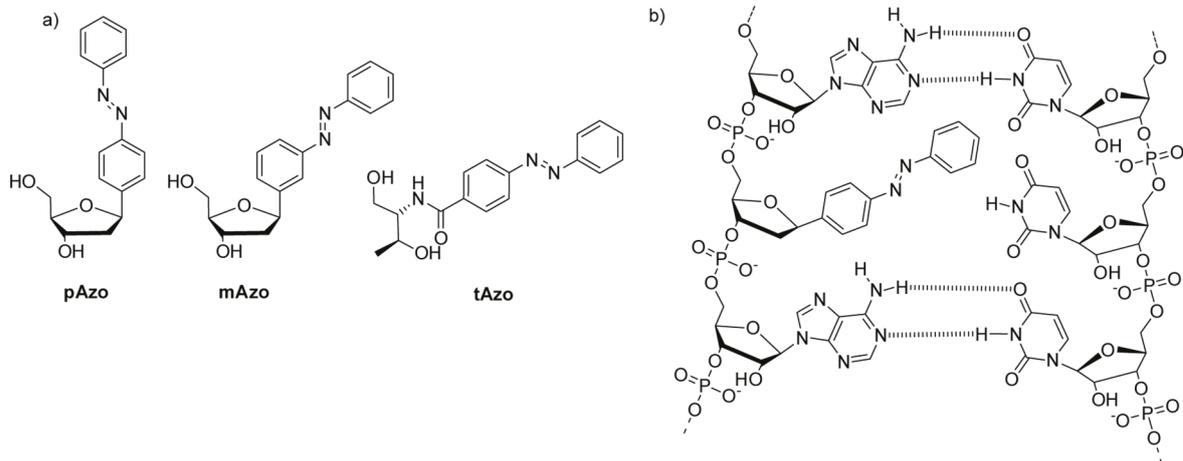


Abb. 119 Chemische Strukturen von **pAzo**, **mAzo** und **tAzo** (a), sowie ein Ausschnitt von **pAzo** in einem RNA Doppelstrang.

Es soll untersucht werden, welchen Einfluss die umgebenden Nucleinsäuren (RNA und DNA) auf die thermische Stabilität des *cis*-Isomers, sowie die Ermüdung bei repetitiver Bestrahlung, als auch der Schaltamplitude hat. Schmelzpunktstudien sollen zeigen, ob ein *trans*-Azobenzol einen Doppelstrang stabilisieren und ein *cis*-Azobenzol destabilisieren kann. Zur systematischen Analyse sollen die Azobenzol C-Nucleoside gegenüber einer Base, zusätzlich in die Nucleinsäure oder in beiden Strängen gegenüberliegend dimerisiert eingebaut werden. Daraus sollen Informationen über eine effektive Positionierung der Azobenzol C-Nucleoside gewonnen werden, die eine möglichst effiziente lichtinduzierte reversible Doppelstrang (De-)Stabilisierung von DNA und RNA ermöglichen. Ein Vergleich mit dem von Asanuma *et al.* etablierten und zahlreich in der Literatur verwendeten **tAzo**, soll zeigen, wo die Vor- und Nachteile beider Systeme liegen. Dabei soll besonders die Temperaturabhängigkeit der Isomerisierung im Doppelstrang analysiert werden. MM/MD Simulationen in Kooperation mit dem Arbeitskreis Burghardt sollen die Interpretation der Ergebnisse unterstützen.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Synthese von Azobenzol C-Nukleosiden

Die chemischen Synthesen der Azobenzol C-Nukleoside wurden von dem Autor dieser Arbeit im Rahmen einer Masterarbeit etabliert und werden der Vollständigkeit halber in dieser Arbeit kurz zusammengefasst (siehe **Abb. 120**). Für eine detaillierte Beschreibung der Synthesen wird auf die Publikation^[211] des Projektes verwiesen. Die Masterarbeit wurde von Clara Briek betreut und im Arbeitskreis von Prof. Heckel (Universität Frankfurt am Main) durchgeführt. Clara Briek hatte bereits Vorarbeiten zu den Synthesen geleistet, auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

Ausgehend von Thymidin **96** wurde nach Literaturvorschrift^[324] das 3'-O-TBDPS (*tert.*-Butyldiphenylsilyl) geschützte Glycal **97** hergestellt. Dies wurde in einer Palladium-katalysierten Heck-Kupplung^[325] mit *para*-Iodazobenzol^[326] sowie *meta*-Iodazobenzol^[327] zu **98** und **102** umgesetzt.

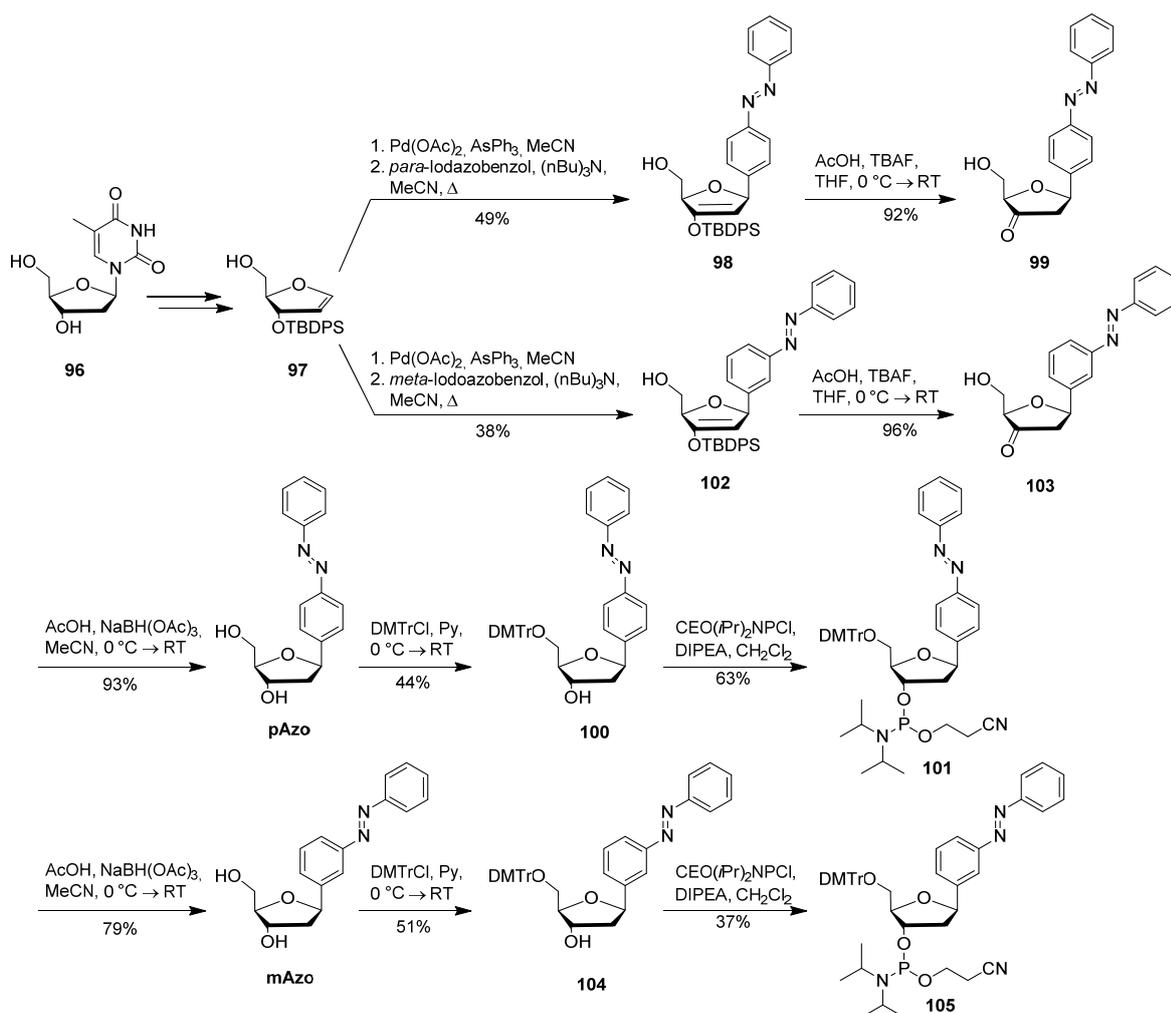


Abb. 120 Darstellung der Azobenzol C-Nukleoside **pAzo** und **mAzo** und deren weiteren Umsetzung zu den entsprechenden Phosphoramiditen.

Die sterisch anspruchsvolle TBDPS-Schutzgruppe dirigierte die Anlagerung der Azobenzol-Palladium-Komplexe von oben,^[328] sodass als Produkt selektiv das β -Anomer erhalten wurde. Zusätzlich findet eine β -Hydrid-Eliminierung nur beim β -Anomer statt, da nur dort das zu eliminierende Hydrid und der Palladium-Komplex in der koplanaren *syn*-Anordnung stehen.^[325]

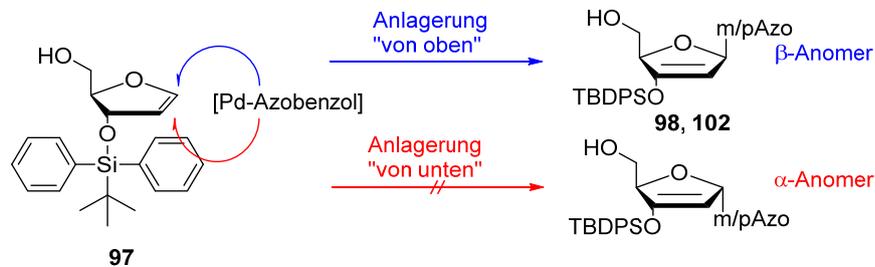


Abb. 121 Stereoselektivität zur Darstellung des β -Anomers von **pAzo** und **mAzo**. Die sterisch anspruchsvolle TBDPS-Schutzgruppe des Glycals **97** verhindert eine Anlagerung „von unten“. (Abbildung modifiziert aus der Masterarbeit des Autors dieser Arbeit)

Die TBDPS-Schutzgruppe wurde im Anschluss mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entfernt. Das Keton (**99**, **103**) wurde mit Triacetoxyborohydrid in einer Evans-Saksena^[329,330] artigen Reaktion stereoselektiv zum 1,3-anti-diol reduziert,^[331] wodurch **pAzo** und **mAzo** erhalten wurden. Bei der Reaktion wird ein sechs-gliedriger Übergangszustand erhalten, bei dem das Bor an die 5'-OH Gruppe koordiniert, sodass die Hydridanlagerung von der entgegengesetzten Seite zur chelatisierenden 5'-OH Gruppe erfolgt (siehe **Abb. 104**).^[330]

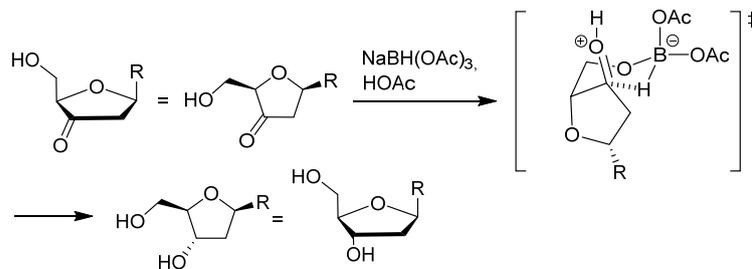


Abb. 122 Stereoselektive Evans-Saksena artige Reduktion des 3'-Ketons (**99**, **103**) zum 5',3'-anti-Diol (**pAzo**, **mAzo**) mit Triacetoxyborohydrid.^[330]

Unter Standardbedingungen wurden die 5'-OH Gruppen wurde DMTrCl trityliert und die 3'-OH Gruppen zum Phosphoramidit umgesetzt.

3.2.2 Untersuchungen von **pAzo** und **mAzo** in RNA

Dieses Teilprojekt beschäftigt sich mit der Untersuchung von **pAzo** und **mAzo** im RNA Einzel- und Doppelstrang. Viele biologische Prozesse, wie z.B. miRNA Stilllegung, beruhen auf der Hybridisierung von RNA Doppelsträngen. Zudem wird die Funktion vieler RNAs durch die Sekundärstruktur, also die Ausbildung von intramolekularen Doppelsträngen, be-

stimmt. Durch die reversible lichtregulierbare Kontrolle der Hybridisierungsprozesse könnten diese Prozesse selektiv untersucht oder manipuliert werden. Da der Linker des Azobenzol Photoschalters einen großen Einfluss auf die Effektivität der lichtinduzierten Duplex (De-)Stabilisierung hat, wurde untersucht wie gut **pAzo** und **mAzo** Stabilität von RNA Doppelsträngen regulieren können. Die Kontrolle von RNA Hybridisierung mit Azobenzol-Photoschaltern ist nicht weit erforscht. So gibt es außer der hier vorliegenden Studie nur eine weitere^[332] bei der **tAzo** in RNA untersucht wurde. Zusätzlich soll der Einfluss von der umgebenden RNA auf die thermische Stabilität des *cis*-Isomers und die Isomerisierungseigenschaften im RNA Einzel- bzw. Doppelstrang untersucht werden.

3.2.2.1 Synthese der Azobenzol C-Nukleosid modifizierten RNA Stränge

Die Festphasensynthese vier Azobenzol-modifizierter RNA Stränge wurde nach der Phosphoramidit-Methode unter Standardbedingungen mit einer Kupplungszeit von 12 Minuten und der Verwendung von BTT als Aktivator durchgeführt. Zur Untersuchung der Photoschalter **pAzo** und **mAzo** im Kontext von RNA wurden diese in die Mitte eines 15mer RNA Stranges eingebaut. Die Sequenz wird im AK Heckel standardmäßig zur Untersuchung von Modifikationen verwendet (sog. *Benchmark-Sequenz*, siehe **Tabelle 2**). Die Abspaltung der RNA vom Festphasenmaterial erfolgte mit einer 3:1 Mischung aus 32% *aq.*NH₃ und EtOH. Nach Filtration wurden die flüchtigen Bestandteile bei 4 °C in einem Vakuumkonzentrator entfernt. Der Rückstand wurde in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst und mit einem Gemisch aus Et₃N und Et₃N·3HF versetzt, um die 3'-O-TBDMS Schutzgruppe der RNA Basen zu entfernen. Die RNA wurde mit *n*BuOH gefällt und die RNA über Ionenaustauscherchromatographie (AE-HPLC; Anion-exchange HPLC) gereinigt. Zur Entsalzung und weiteren Aufreinigung wurde eine Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) durchgeführt. Die Identität und Reinheit der erhaltenen RNAs wurde mittels Massenspektrometrie (siehe **Tabelle 2**) und analytischer HPLC quantifiziert (siehe **Abb. 123**, c). Dabei konnten keine Verunreinigungen detektiert werden. Zusätzlich wurden noch die entsprechenden Gegenstränge synthetisiert. Es wurden vier unmodifizierte Gegenstränge synthetisiert, wobei zwei der Gegenstränge das mittlere Nukleotid nicht enthalten (14mer). Mithilfe dieser Gegenstränge sollte der Einfluss der Photoschalter auf die Stabilität eines RNA Doppelstranges bei Verwendung eines „*wedge* Motives“ untersucht werden. Weiter wurde angenommen, dass eine Pyrimidin-Base dem *trans*-Azobenzol mehr Platz bietet, im Vergleich zu einer größeren Purinbase. Dies sollte verhindern, dass der *trans*-Zustand den Doppelstrang destabilisiert. Um zu untersuchen, ob selbst eine Pyrimidinbase dem *trans*-Azobenzol zu wenig Raum bietet, wurden zusätzlich der Vorwärts- und Rückwärtsstrang mit einer abasischen Stelle (AP) in der Mitte der Sequenz synthetisiert. Eine Übersicht der synthetisierten Stränge und deren massenspektrometrischen Analyse kann in **Tabelle 2** gefunden werden. Dabei ergibt sich die Möglichkeit einen Azobenzol-modifizierten Strang mit jeweils fünf

Gegensträngen zu kombinieren. So kann z.B. **RNA1(pAzo)** mit **RNA2**, **RNA2(C)**, **RNA2(U)**, **RNA2(mAzo)** oder **RNA2(pAzo)** hybridisiert werden. Bei vier Azobenzol-modifizierten Strängen können somit insgesamt 20 Doppelstränge untersucht werden.

Tabelle 2 Sequenzen und massenspektrometrische Analyse der synthetisierten Oligonukleotiden

Sequenz		berechnet	gemessen
5'-GCA UAA ApAzoA AAG GUG-3'	RNA1(pAzo)	4898,8	4898,7
5'-GCA UAA AmAzoA AAG GUG-3'	RNA1(mAzo)	4898,8	4899,5
5'-GCA UAA AUA AAG GUG-3'	RNA1(U)	4844,7	4844,6
5'-GCA UAA ACA AAG GUG-3'	RNA1(C)	4843,7	4843,6
5'-GCA UAA AAA AGG UG-3'	RNA1	4538,7	4538,6
5'-CAC CUU UpAzoU UUA UGC-3'	RNA2(pAzo)	4663,6	4664,3
5'-CAC CUU UmAzoU UUA UGC-3'	RNA2(mAzo)	4663,6	4664,3
5'-CAC CUU UUU UUA UGC-3'	RNA2(U)	4609,6	4609,6
5'-CAC CUU UCU UUA UGC-3'	RNA2(C)	4608,6	4608,4
5'-CAC CUU UUU UAU GC-3'	RNA2	4302,6	4303,4

3.2.2.2 Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der Azobenzol-modifizierten RNA Einzelstränge

Dr. Keiji Murayama, aus der Gruppe von Hiroyuki Asanuma (Nagoya Universität, Japan), unterstützte den Autor dieser Arbeit für drei Monate bei den Studien. Gemeinsam wurden die thermischen Raten photoschaltbarer Oligoribonukleotide (die auch zum Teil von Sabrina Steinwand untersucht wurden), die Belichtungszeitabhängige Isomerisierung im Einzelstrang, sowie Schmelzpunktmessungen mit den modifizierten Strängen **RNA1(pAzo)**, **RNA1(mAzo)** und **RNA2(mAzo)** durchgeführt. Um das Verhältnis der *trans*- und *cis*-Photoisomere nach Bestrahlung zu berechnen wurden zunächst Reinspektren der Photoisomere aufgenommen. Da durch Bestrahlung keine vollständige Überführung in die *trans*- und *cis*-Isomere möglich ist und da zu wenig Material zu Verfügung war, um die Absorptionskoeffizienten der reinen Isomere (Reinspektren) mittels NMR zu bestimmen, wurden die Photoisomere per HPLC getrennt. Da angenommen wurde, dass Acetonitril als Eluent in der RP-HPLC die Absorption beeinflussen könnte, wurde die Trennung über AE-HPLC mit wässriger LiCl-Lösung als Eluat durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass der Zusatz von LiCl keinen signifikanten Einfluss auf die Absorption hat. Exemplarisch wird hier das Chromatogramm mit den zugehörigen Absorptionsspektren der reinen *cis*- und *trans*-Isomere von **RNA1(pAzo)** gezeigt (siehe **Abb. 123**). Die Chromatogramme mit den dazugehörigen Reinspektren von **RNA1(mAzo)**, **RNA2(pAzo)** und **RNA2(mAzo)** sind im Anhang zu finden (**Abb. 220**, **Abb. 221** und **Abb. 222**). Das Absorptionsspektrum wurde am isosbestischen Punkt ($\lambda = 260 \text{ nm}$) auf 1 normiert. Die RNA Stränge mit dem unpolarerem *trans*-Isomer eluieren dabei immer später, als die

Stränge mit dem *cis*-Isomer. Aufgrund der relativ hohen thermischen Stabilität des *cis*-Isomers bei Raumtemperatur (siehe Kapitel 3.2.2.3), kann eine *cis*-zu-*trans* Isomerisierung während der HPLC vernachlässigt werden.

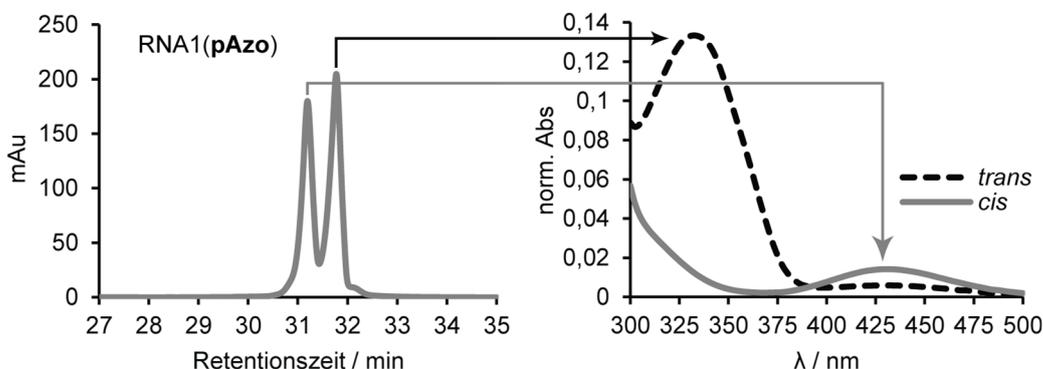


Abb. 123 AE-HPLC Chromatogramm von **RNA1(pAzo)** für die Auftrennung der Photoisomere vom Azobenzol. Die Absorption der Reinspektren wurde während der HPLC aufgenommen (DAD Detektor). Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt auf 1 normiert $R_f(\text{trans})=31,8$ min; $R_f(\text{cis})=31,2$ min. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linear Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Säule: DNAPac™ PA100 von Dionex; 4,6x250 mm.

Um das photochemische Isomerisierungsverhalten zu untersuchen wurden die Stränge mit UV-Licht (365 nm, 300 mW) und sichtbarem Licht bei 420 nm (300 mW) belichtet. Vor der Bestrahlung mit UV-Licht wurden die Stränge bei 60 °C bei 420 nm bestrahlt, um den Ausgangszustand, also den maximal erreichbaren Anteil des *trans*-Isomers zu erhalten. Diese Bestrahlung erfolgt solange, bis die Absorption bei 330 nm konstant war. Die Stränge wurden dann für 10 s, 20 s, 30 s, 60 s und 120 s UV Licht bestrahlt und zu diesen Zeitpunkten wurde ein UV/vis Absorptionsspektrum aufgenommen. Analog dazu wurde zur Untersuchung der belichtungszeitabhängigen *cis*-zu-*trans* Isomerisierung die Stränge zuvor bei 20 °C mit UV-Licht bestrahlt, solange bis sich die Absorption bei 330 nm nicht mehr änderte. Mithilfe der aufgenommenen Reinspektren (siehe **Abb. 123**, **Abb. 220** und **Abb. 221**) konnten die *cis*-zu-*trans* Verhältnisse nach der jeweiligen Bestrahlungsdauer mit **Formel 1** berechnet werden (siehe Kapitel 5.1 für die Herleitung der Formel).

Formel 1
$$\text{cis Verh\u00e4ltnis} = \frac{A(\text{trans})_{332} - A_{332}}{A(\text{trans})_{332} - A(\text{cis})_{332}}$$

Nach 45 s wurden vollständige Isomerisierungen zu den photostation\u00e4ren Zust\u00e4nden erreicht (Beispiel von **RNA1(pAzo)** siehe **Abb. 124**). Diese liegen unter diesen Bedingungen bei 80-98% *cis* und >90% *trans* (siehe **Tabelle 3**). Eine vollständige \u00dcberf\u00fchrung in die jeweiligen Isomere ist problematisch, da zum einen die Absorptionsspektren der Isomere \u00fcberlappen und zum anderen aufgrund der thermischen Relaxation. Im Vergleich der maximalen *cis*-Verh\u00e4ltnisse von **pAzo** und **mAzo**, die durch Bestrahlung mit UV erreicht werden k\u00f6nnen, zeigt sich, dass in allen F\u00e4llen der Isomerisierungsgrad von **pAzo** \u00fcber dem von **mAzo** liegt (siehe **Tabelle 3**).

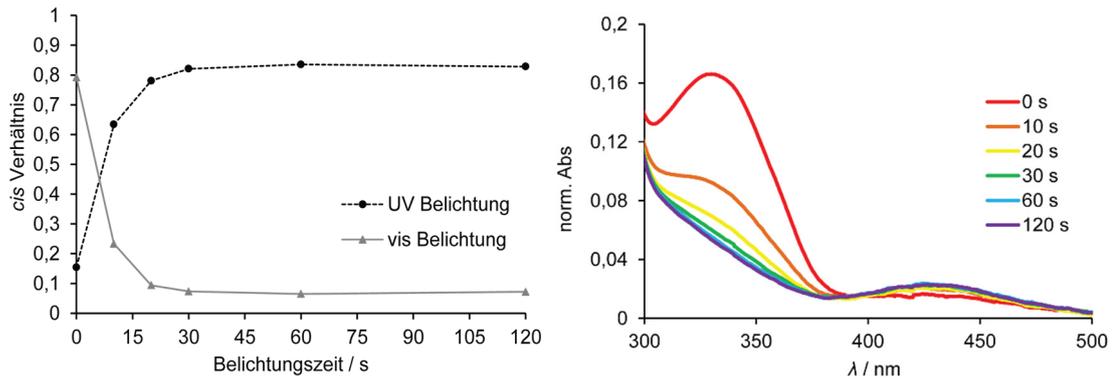


Abb. 124 Belichtungszeit-abhängige Isomerisierung von **RNA1(pAzo)** (5 μ M in PBS Puffer, pH 7.4). Der Verlauf der berechneten *cis*-Verhältnisse bei Bestrahlung mit UV oder vis Licht ist links und die zugehörigen Absorptionsspektren der *trans*-zu-*cis* Isomerisierung rechts abgebildet.

Die spektroskopischen Experimente der thermischen *cis*-zu-*trans* Isomerisierung wurden teilweise vom Autor dieser Arbeit und teilweise von Dr. Sabrina Steinwand aus dem Arbeitskreis von Prof. Wachtveitl (Universität Frankfurt am Main) durchgeführt und im Folgenden hier aufgeführt.

3.2.2.3 Thermische Stabilität der *cis* Photoisomere der Azobenzol C-Nukleoside in RNA

Um den Einfluss von RNA auf die thermische Stabilität des *cis*-Isomers von **pAzo** und **mAzo** zu untersuchen, wurden die Stränge **RNA1(pAzo)**, **RNA1(mAzo)**, **RNA2(pAzo)** und **RNA2(mAzo)** mit UV-Licht in den *cis* Zustand überführt und bei 20 °C, 37 °C, 50 °C, 70 °C inkubiert und in definierten Zeitabständen UV/vis Absorptionsspektren aufgenommen (siehe **Abb. 125** für die UV/vis Absorptionsspektren der thermischen Relaxation für **RNA1(pAzo)** bei 70 °C).

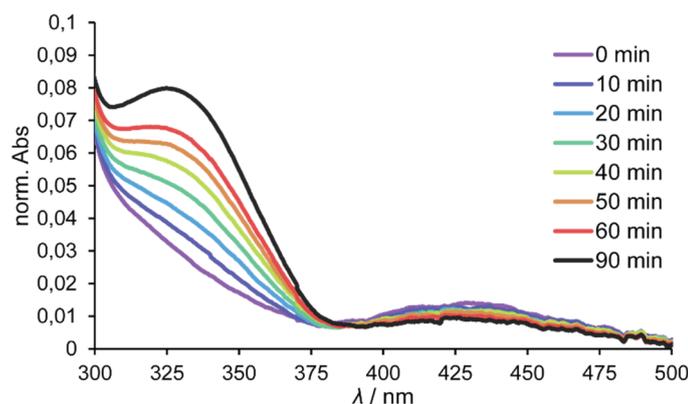


Abb. 125 UV/vis Absorptionsspektren der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation von **RNA1(pAzo)** bei 70 °C.

In **Abb. 126** ist der zeitabhängige Verlauf der Abnahme des *cis*-Isomers am Beispiel von **RNA1(pAzo)** bei 50 °C, 60 °C und 70 °C dargestellt. Die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxierung des Azobenzols ist eine Reaktion erster Ordnung, weshalb die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Halbwertszeiten mithilfe der Formeln 2-4 berechnet werden konnte.

Formel 2
$$v = -\frac{d[cis]}{dt} = k \cdot [cis]$$

Integriert ergibt sich daraus:

Formel 3
$$[cis]_t = [cis]_0 \cdot e^{-kt}$$

Die Halbwertszeit wurde gemäß der Formel:

Formel 4
$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Die Aktivierungsenergie lässt sich anhand der Arrhenius Gleichung ermitteln:

Formel 5
$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

Für die Berechnung wurden die reziproken Temperaturen ($1/T$) gegen den natürlichen Logarithmus ($\ln(k)$) der Geschwindigkeitskonstanten aufgetragen. Über die Steigung ($-(E_A/T)$) einer linearen Regression konnte die Aktivierungsenergie bestimmt werden.

Bei 20 °C konnte keine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante berechnet werden, da die Zunahme der Absorption bei 330 nm nach 15 h zu gering war (siehe **Abb. 126** rechts). Dies bedeutet, dass die thermische Relaxation für Experimente bei Raumtemperatur weitestgehend vernachlässigt werden kann.

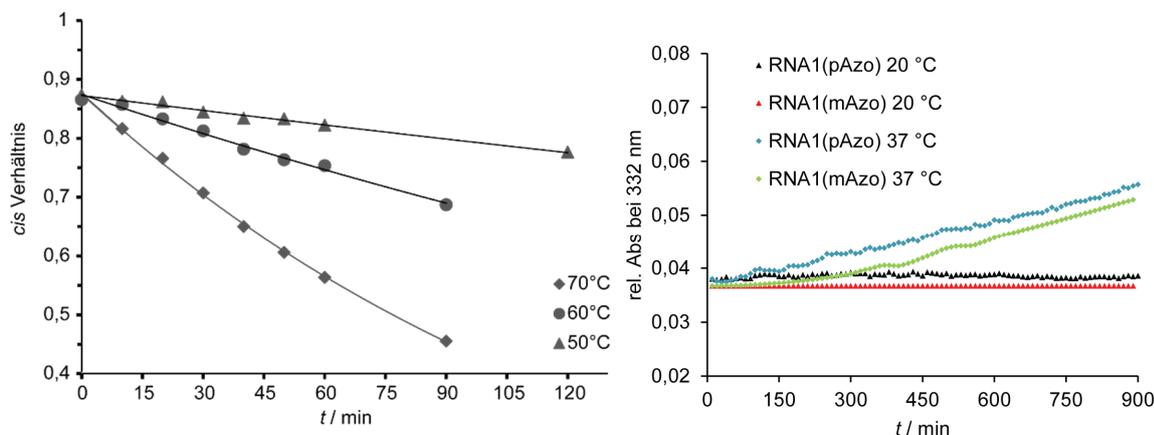


Abb. 126 Thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von **RNA1(pAzo)** (1 μ M in PBS Puffer) bei 37 °C, 50 °C und 70 °C (links). Das Diagramm der thermisch *cis*-zu-*trans* Isomerisierung von **pAzo** und **mAzo** in **RNA1** bei 20 °C und 37°C ist rechts gezeigt. Bei 20 °C konnte innerhalb von 15 h keine signifikante Veränderung der Absorption beobachtet werden.

Die vollständigen kinetischen Parameter für die thermische *cis*-zu-*trans* Isomerisierung können aus **Tabelle 3** entnommen werden.

Tabelle 3 Kinetische Parameter für die thermische Relaxation von den Monomeren **pAzo** und **mAzo**, sowie **RNA1(pAzo)**, **RNA1(mAzo)**, **RNA2(pAzo)** und **RNA2(mAzo)** bei 37 °C, 50 °C und 70 °C. Die Konzentration der Monomere betrug 30 µM, die der RNA-Stränge 5 µM. Alle Messungen erfolgten in PBS Puffer (pH 7.4).

	max. % <i>cis</i>	T [°C]	k [s ⁻¹]	Halbwertszeit [h]	E _A [kJ·mol ⁻¹]
pAzo	91 ^[a]	70	4,5 · 10 ⁻⁵	4,298 ± 0,016	84 ± 4
		50	6,7 · 10 ⁻⁶	28,6 ± 0,3	
		37	2,0 · 10 ⁻⁶	96,8 ± 0,6	
mAzo	88 ^[a]	70	1,8 · 10 ⁻⁵	10,756 ± 0,010	62,3 ± 1,7
		50	4,7 · 10 ⁻⁶	40,62 ± 0,05	
		37	1,7 · 10 ⁻⁶	113,3 ± 0,7	
RNA1(pAzo)	87	70	5,5 · 10 ⁻⁵	3,526 ± 0,019	96 ± 5
		50	6,8 · 10 ⁻⁶	28,23 ± 0,06	
		37	1,4 · 10 ⁻⁶	138 ± 3	
RNA1(mAzo)	80	70	3,8 · 10 ⁻⁵	5,134 ± 0,010	91 ± 4
		50	6,1 · 10 ⁻⁶	31,8 ± 0,3	
		37	1,2 · 10 ⁻⁶	155 ± 6	
RNA2(pAzo)	98	70	5,7 · 10 ⁻⁵	3,390 ± 0,010	90 ± 7
		50	6,9 · 10 ⁻⁶	28,03 ± 0,06	
		37	2,2 · 10 ⁻⁶	86,0 ± 1,2	
RNA2(mAzo)	90	70	2,9 · 10 ⁻⁵	6,594 ± 0,014	91 ± 5
		50	3,3 · 10 ⁻⁶	59,1 ± 0,3	
		37	9,8 · 10 ⁻⁷	196 ± 3	

^[a] Die Reinspektren der *cis* und *trans* Isomere für die Berechnung von max. % *cis* wurden in der HPLC aufgenommen und enthalten ca. 60 % MeCN. Der Zusatz von MeCN kann die Absorption verändern, sodass diese Werte eher als Richtwerte angesehen werden müssen. Es wurde ein Fehler der *cis* Verhältnisse von ±5% angenommen.

Die umgebende RNA hatte einen Einfluss auf die thermische Stabilität des *cis*-Isomers: So stieg zum Beispiel die Aktivierungsenergie von 84 kJ · mol⁻¹ für **pAzo** auf 96 kJ · mol⁻¹ (ΔE_A = 12 kJ · mol⁻¹) für **RNA1(pAzo)**. Im Falle von **mAzo** war der Unterschied noch deutlicher. In diesem Fall stieg durch den Einbau von **mAzo** in **RNA1** die Aktivierungsenergie von 62 auf 91 kJ · mol⁻¹ (ΔE_A = 29 kJ · mol⁻¹). Eventuell erschwerte die RNA durch sterische Hinderung die Isomerisierung.

Interessanterweise wurde durch den Einbau von **pAzo** und **mAzo** in RNA die thermische Relaxationsgeschwindigkeit bei 37 °C verringert (außer für **RNA2(pAzo)**), während sie bei einer Temperatur von 70 °C erhöht wurde. Im Fall von **pAzo** betrug die Halbwertszeit von **pAzo** als Monomer 97 h, während die Halbwertszeit von **RNA1(pAzo)** bei 138 h lag (Δt_{1/2(37 °C)} = +41 h). Bei 70 °C verringerte sich die Halbwertszeit von **pAzo** durch den Einbau in RNA1 von 4,3 h auf 3,6 h (Δt_{1/2(70 °C)} = -0,7 h). Eine Ausnahme bildete die thermische Rate von **RNA2(pAzo)** bei 37 °C, da die Halbwertszeit kürzer als bei dem Monomer **pAzo** war. Als weiterer Trend ließ sich erkennen, dass das *meta*-substituierte Azobenzol (**mAzo**) eine

deutlich höhere thermische Stabilität besaß als das *para*-substituierte (**pAzo**). Die Halbwertszeit bei 70 °C von **RNA2(mAzo)** war mit 6,6 h fast doppelt so lang, wie die von **RNA2(pAzo)** mit 3,4 h. Ähnliches Verhalten wurde auch Asanuma *et al.*^[191] für ein *meta*-verknüpftes Azobenzole mit D-Threoninol-Linker (**tAzo**) beobachtet.

Insgesamt ist zu erkennen, dass sowohl die Oligonukleotidsequenz, als auch die Verknüpfungsstelle des Azobenzols (*meta* oder *para*) einen Einfluss auf die thermische Stabilität des *cis*-Isomers hat.

3.2.2.1 Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der Azobenzol-modifizierten RNA im Duplex

Um zu untersuchen, wie sehr der *trans*-Zustand von **pAzo** und **mAzo** einen Duplex stabilisiert und der *cis*-Zustand den Duplex destabilisiert, wurden Schmelzpunktmessungen durchgeführt. Das planare und unpolare *trans*-Isomer soll in den Basenstapel interkalieren und somit eine Duplexbildung begünstigen. Das gewinkelte bzw. helikale *cis*-Azobenzol hat einen höheren sterischen Anspruch und soll dadurch einen Duplex destabilisieren.

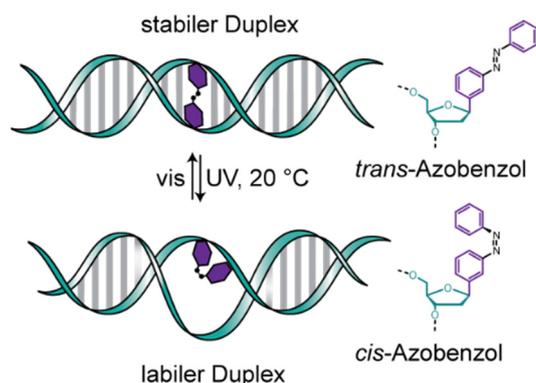


Abb. 127 Schematische Darstellung der lichtinduzierten reversiblen Duplex (De-)Stabilisierung am Beispiel von **mAzo**.

Um die Komplexität gering zu halten und kooperative Effekte auszuschließen, wurden nur Stränge verwendet, die ein einziges Azobenzol erhalten. Lediglich die Möglichkeit eines sogenannten „*Dimer Motives*“ bei dem der Vorwärts- und Rückwärtsstrang ein Azobenzol enthält und somit im Duplex nebeneinanderliegen wurden untersucht (siehe **Abb. 30** für eine schematische Darstellung der verschiedenen Motive). Anhand dieser Studien sollte evaluiert werden, welche Base/Modifikation gegenüber eines Azobenzols am besten geeignet ist, um die Duplexstabilität mit Licht zu regulieren. Es wurde dabei angenommen, dass im Vergleich zu einer Purinbase, eine kleinere Pyrimidinbase den *trans*-Zustand des Azobenzols weniger stören sollte und somit erhöhte Duplexstabilität beobachtet werden sollte. Zusätzlich wurde der Einfluss einer AP-Stelle (A-purinische, A-pyrimidinische (abasische) Stelle) gegenüber dem Azobenzol untersucht. Die fehlende Nukleobase der AP-Stelle, sollte dem *trans*-Azobenzol eine maximal effiziente Interkalation ermöglichen, ohne

dabei den Doppelstrang zu stören bzw. diesen sogar zu stabilisieren. Auch der Einfluss der Verwendung eines „wedge Motives“, bei dem der Gegenstrang eine Base weniger enthält, wurde untersucht. Um einen Vergleich mit dem etablierten **tAzo** zu ermitteln, wurden diese Doppelstränge von Keiji Murayama (Arbeitskreis Asanuma, Japan) unter den gleichen Bedingungen vermessen.

In Kooperation mit Dr. Padmabati Mondal und Dr. Mithun Biswas vom Arbeitskreis Prof. Dr. Irene Burhardt (Goethe Universität Frankfurt am Main) wurden MM/MD Studien zu den Duplexen **DNA1(pAzo)/DNA2(AP)**, **DNA1(pAzo)/DNA2(U)**, **DNA1(tAzo)/DNA2(AP)** und **DNA1(tAzo)/DNA2(U)** durchgeführt. Die Veröffentlichung dieser Ergebnisse erfolgte in zwei gemeinsamen Publikationen.^[211,333] Die Simulationen sollten einen tieferen Einblick in die Struktur des Doppelstranges erlauben. Zusätzlich wurde in diesen Studien überprüft, ob das α -oder β -Anomer der Ribose bzw. die D-oder L-Konfiguration von Threoninol effektivere Linker darstellen. Ein idealer Linker sollte eine gewisse Flexibilität besitzen, um sequenzunabhängig und effektiv im *trans*-Zustand in den Basenstapel zu interkalieren und diesen somit zu stabilisieren. Der Linker muss auch starr genug sein, sodass durch Isomerisierung eine effektive Kraftübertragung erfolgt und vermeidet, dass sich das Azobenzol in die kleine oder große Furche dreht. Nur so kann das sterisch anspruchsvolle *cis*-Azobenzol die benachbarten Basenpaarungen stören und somit den Duplex destabilisieren.

Bei Schmelzpunktstudien wird ein Duplex zyklisch erwärmt und abgekühlt und dabei die Absorption bei 260 nm gemessen. Mit steigender Temperatur wird der Duplex in Einzelstränge überführt, was in einer erhöhten Absorption resultiert. Der Effekt, dass der molare Extinktionskoeffizient der Einzelstränge höher ist, als der des Doppelstranges wird als Hyperchromizität bezeichnet. Die prozentuale Hyperchromizität lässt sich anhand **Formel 6** berechnen. Bei Schmelzpunktmessungen werden sigmoidale Kurven erhalten, deren Wendepunkt der Schmelzpunkt ist. Dieser ist definiert als der Punkt bei dem 50% der Doppelstränge als Einzelstränge vorliegen.

Formel 6 Hyperchromizität % = $100 \cdot \frac{\text{Abs}(\text{gemessen}) - \text{Abs}(\text{dsRNA})}{\text{Abs}(\text{ssRNA})}$

Zur Untersuchung der thermischen Duplexstabilität des *trans*-Isomers wurden die Stränge in PBS Puffer (pH 7,4) bei 60 °C bei 420 nm bestrahlt, bis der photostationäre Zustand erreicht wurde. Dies wurde anhand einer konstanten Absorption bei 332 nm quantifiziert. Die Isomerisierung erfolgte bei einer Temperatur über der Schmelztemperatur des Doppelstranges, um eine möglichst vollständige Isomerisierung zu garantieren (Erklärung siehe Ende dieses Kapitels und Ende von Kapitel 1.4.4). Zudem begünstigt die hohe Temperatur die thermische *cis*-zu-*trans* Isomerisierung. Obwohl laut Literatur^[160] durch thermische Relaxation mehr *trans*-Isomer als durch Bestrahlung erreicht werden kann, konnten in diesen

Studien keine signifikanten Unterschiede des maximalen *trans*-Isomers, erreicht durch Bestrahlung oder thermischer Energie, beobachtet werden. Zur Messung der *cis*-Isomere wurden die Stränge bei 60 °C mit UV-Licht bestrahlt und unter Bestrahlung auf Raumtemperatur abgekühlt. Diese Bedingungen sollten eine möglichst effiziente Isomerisierung zum *cis*-Isomer ermöglichen, wobei durch die kontinuierliche Bestrahlung während der Abkühlung eine thermische Relaxation ausgeschlossen werden sollte. Dies wurde so lange wiederholt bis ein photostationärer Zustand erreicht wurde bei dem der *cis*-Anteil konstant war. Die Bestrahlung mit UV-Licht erfolgte nach jedem Zyklus (Hochheizen und Abkühlen).

Die Schmelzpunktmessungen erfolgten von 20 bis 60 °C mit einem Temperaturanstieg von 1 °C · min⁻¹. Ein langsamerer Anstieg hat den Vorteil, dass sich das Temperaturgleichgewicht zwischen der Blocktemperatur (der beheizte Teil des Spektrometers) und der Probe besser einstellen kann. Allerdings kann es durch die erhöhte Messzeit beim *cis*-Isomer zu einer thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation kommen, die das Ergebnis verfälschen könnten. Eine permanente Bestrahlung, sowie die Temperaturmessung in der Probe war mit den vorhandenen Apparaturen nicht möglich. Der entscheidende Wert für die Duplex (De-)Stabilisierung ist der ΔT_M , also die Differenz der Schmelzpunkte von *trans* ($T_M(\textit{trans})$) und *cis* ($T_M(\textit{cis})$) (siehe **Formel 7**).

Formel 7
$$\Delta T_M = T_M(\textit{trans}) - T_M(\textit{cis})$$

Somit haben die absoluten Werte von ($T_M(\textit{trans})$) und *cis* ($T_M(\textit{cis})$) eine untergeordnete Bedeutung, da die Gleichgewichtseinstellung bei allen Messungen gleich ist und dies somit keinen Einfluss auf den ΔT_M -Wert haben sollte.

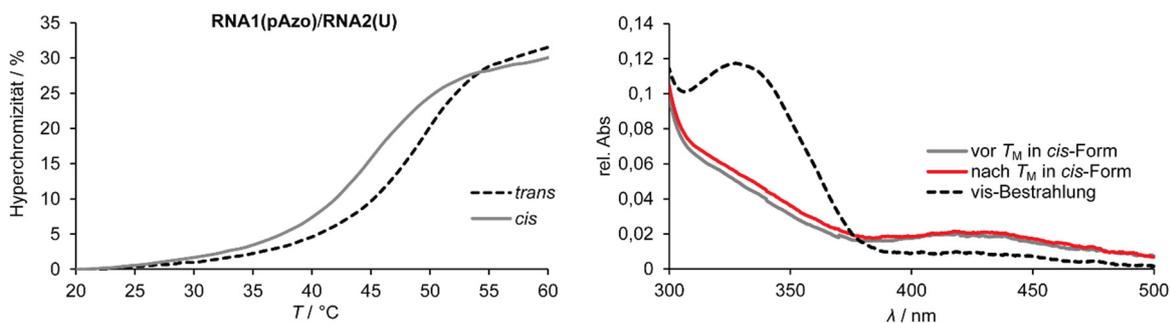


Abb. 128 Schmelzpunktkurve von RNA1(pAzo)/RNA2(U) im *trans*- (schwarze Kurve) und *cis*-Zustand (graue Kurve) des Azobenzols (links). Die Hyperchromizität wurde anhand **Formel 8** berechnet. UV/vis Absorptionsspektren (rechts) von RNA1(pAzo)/RNA2(U) vor (grau) und nach (rot) den Schmelzpunktmessungen, sowie der Vergleich nach Belichtung mit sichtbarem Licht (gestrichelte schwarze Linie) sind rechts gezeigt. Der geringe Unterschied der Absorption vor und nach den Schmelzpunktmessungen macht deutlich, dass eine thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation innerhalb eines Zyklus vernachlässigt werden konnte.

Die Aufnahme von UV/vis Absorptionsspektren (siehe **Abb. 128**, rechts) vor und nach den Schmelzpunktmessungen bestätigte, dass die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation während eines Zyklus (Hochheizen und Abkühlen) vernachlässigt werden kann. Im Vergleich zum Absorptionsspektrum nach Bestrahlung mit vis-Licht, ist der Unterschied der Absorption

bei 332 nm vor und nach Bestrahlung nicht signifikant. Alle Schmelzpunktmessungen (Beispiel für Schmelzpunktkurve siehe **Abb. 128**) wurden mindestens drei Mal wiederholt und es wurde daraus der Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien von **mAzo** und **pAzo** in den Sequenzen:^[a]

RNA1 (N¹) : 5' -GCA UAA AN¹A AAG GUG-3'

RNA2 (N²) : 3' -CGU AUU UN²U UUC CAC-5'

		T_m [°C]		
N ¹	N ²	<i>trans</i>	<i>cis</i>	ΔT_m
pAzo	-	48,7	47,0	1,7
pAzo	U	47,2	43,4	3,8
pAzo	C	48,5	44,9	3,6
pAzo	AP ^[b]	49,6	45,7	3,9
-	pAzo	51,0	46,8	4,2
U	pAzo	48,9	44,9	4,0
C	pAzo	48,6	44,1	4,5
AP ^[b]	pAzo	52,7	46,9	5,7
mAzo	-	49,5	46,2	3,3
mAzo	U	47,7	43,4	4,3
mAzo	C	49,4	44,9	4,5
mAzo	AP ^[b]	50,5	46,4	4,0
-	mAzo	51,0	46,6	4,4
U	mAzo	50,1	44,7	5,4
C	mAzo	49,2	43,3	5,9
AP ^[b]	mAzo	52,4	47,0	5,4
pAzo	pAzo	48,2	43,7	5,5
pAzo	mAzo	50,3	46,0	4,3
mAzo	pAzo	52,7	47,3	5,4
mAzo	mAzo	51,7	47,0	4,7

[a] Der Schmelzpunkt der (nativen) RNA ohne N¹ and N² liegt bei 55,4 °C. [b] AP = A-basisches (A-purinische/A-pyrimidinische) Stelle. Die Fehler der Messungen betragen $\pm 0,5$ °C.

Im Vergleich mit dem Schmelzpunkt des nativen Duplex (RNA1/RNA2; 55,4 °C), führte der Einbau von **pAzo** oder **mAzo** in RNA generell zu einer Destabilisierung der Doppelstränge im Bereich von 2,7 °C für **RNA1(mAzo)/RNA2(pAzo)** bis zu 8,2 °C für **RNA1(pAzo)/RNA2(U)**. Dies war nicht unerwartet und wurde bereits von Asanuma *et*

a).^[332] für **tAzo** in RNA beobachtet. Die A-helikale RNA ist im Vergleich zu einer B-DNA starrer und besitzt eine tiefere und flachere kleine Furche.^[334,335] Simulationen von Asanuma und Burghardt (mit **tAzo**) begründeten damit, dass es durch den Einbau eines Azobenzols zu einer Destabilisierung kommen kann.^[332,336,337] Als genereller Trend ist zu erkennen, dass im Vergleich zu **RNA1** der Einbau von **pAzo** und **mAzo** in **RNA2** eine geringere Destabilisierung im *trans*-Zustand bewirkte. Im Vergleich von **pAzo** und **mAzo** wird deutlich, dass **mAzo** den Duplex im *trans*-Zustand weniger destabilisiert, was darauf schließen lässt, dass das *meta*-verknüpfte Azobenzol allgemein besser in die helikale Struktur der RNA interkalieren kann. Die höchsten Schmelzpunkte konnten im *trans*-Zustand mit der Kombination einer AP-Stelle gemessen werden (z.B. **RNA1(AP)/RNA2(pAzo)** $T_M = 52,7$ °C und **RNA1(AP)/RNA2(mAzo)** $T_M = 52,4$ °C). Im Vergleich zu einer Purinbase ist der Azobenzol-Chromophor länger und konkurriert mit der gegenüberliegenden Base um den Raum in der gestapelten Region. Im Fall von **RNA1(pAzo)/RNA2(U)** konnten Simulationen^[337] zeigen (siehe **Abb. 129 a** und **Abb. 130**), dass das *trans*-Azobenzol hauptsächlich in der großen Furche lokalisiert ist und nur wenig in der gestapelten Region. Zusätzlich befindet sich das gegenüberliegende Uridin in der kleinen Furche um sterische Repulsion zu vermeiden. Das dynamische Ausweichen von **pAzo** und Uridin bewirkt eine hohe Fluktuation des Doppelstranges (höheren B-Faktor, siehe **Abb. 129 a**). Das führt zu einer strukturellen Veränderung der RNA, was die hohe Destabilisierung von 8,2 °C erklärt. Eine AP-Stelle kann die größere Länge kompensieren, sodass Simulationen zeigten, dass das Azobenzol fast ausschließlich in der Basenstapel-Region lokalisiert ist und der Doppelstrang enorm wenig Fluktuation zeigt (siehe **Abb. 129 b** und **Abb. 130**). Der Grad der Fluktuation kann mit einem unmodifizierten Doppelstrang verglichen werden (siehe **Abb. 129** oben). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination von **pAzo** (oder **mAzo**) und einer AP-Stelle ideale Voraussetzungen liefert, einen stabilen Doppelstrang zu bilden. Auch die Verwendung eines „*Dimer Motives*“ erzielte hohe Schmelzpunkte im *trans*-Zustand für **RNA1(mAzo)/RNA2(pAzo)** mit $T_M = 52,7$ °C und **RNA1(mAzo)/RNA2(mAzo)** mit $T_M = 51,7$ °C. Im „*Dimer Motiv*“ sind Vorwärts- und Rückwärtsstrang mit jeweils einem Azobenzole modifiziert und die Azobenzole liegen im Doppelstrang nebeneinander, wodurch der Duplex durch zusätzliche π - π -Wechselwirkung der planaren *trans*-Azobenzole stabilisiert werden kann.^[187,195] Die Verwendung eines „*wedge Motives*“ stabilisiert den Duplex mit einem *trans*-Azobenzol mehr, als ein gegenüberliegendes Uridin oder Cytidin. Auch dies unterstreicht die Hypothese, dass die Länge der Azobenzol C-Nukleoside zu groß ist für eine gegenüberliegende Base. Im „*wedge Motiv*“ ist das Azobenzol zusätzlich eingebaut und kann sich wie ein Keil (engl. *wedge*) zwischen die Nukleobasen schieben.

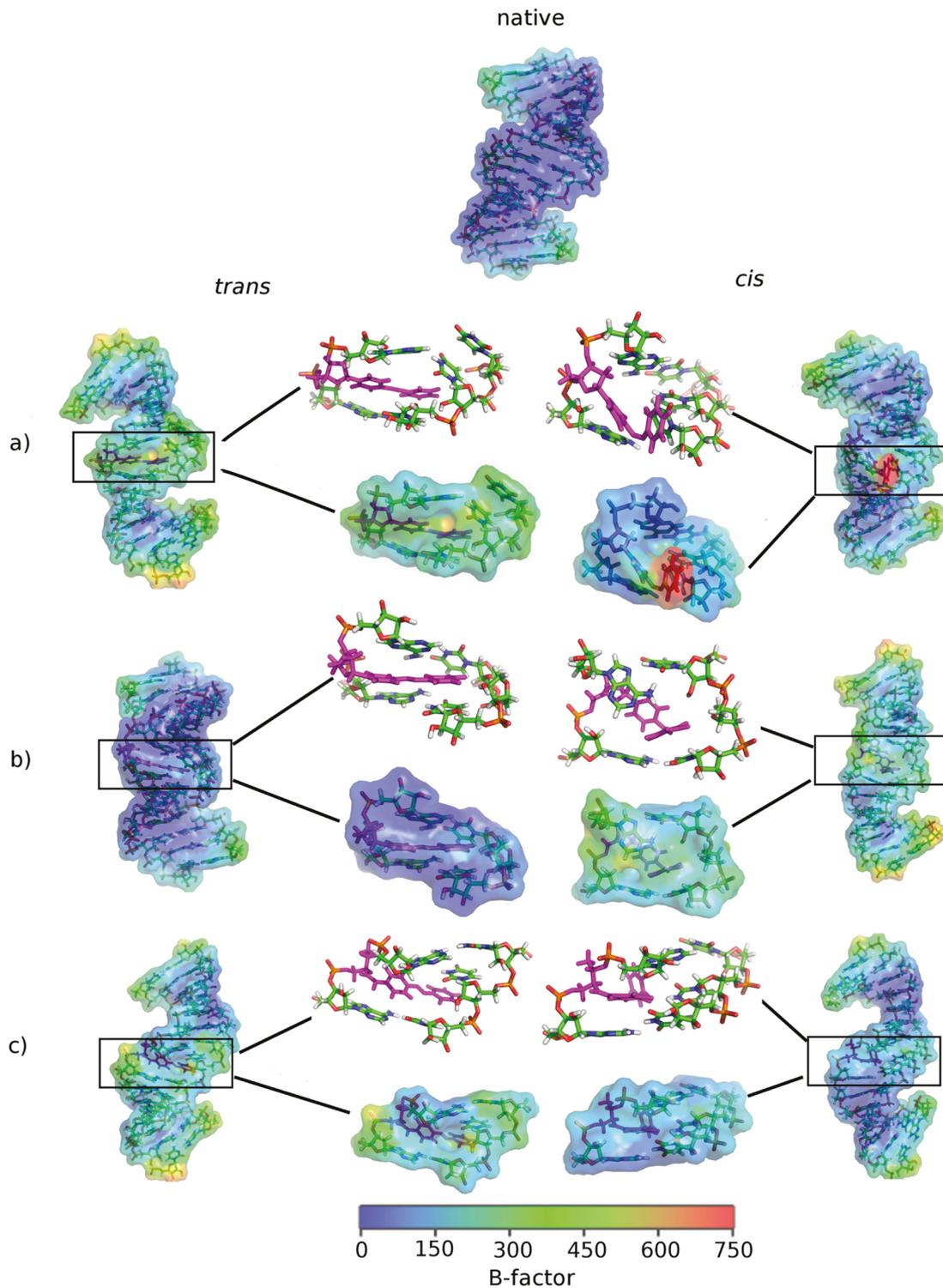


Abb. 129 Simulierte (MM/MD) Strukturen von **RNA1(pAzo)/RNA2(U)** (a), **RNA1(pAzo)/RNA2(AP)** (b) und **RNA1(tAzo)/RNA2(U)** (c) im *trans*- und *cis*-Zustand. Der B-Faktor bezeichnet die relative Fluktuation/Flexibilität der Strukturbereiche. Die Abbildung wurde von Dr. Padmabati Mondal erstellt und entnommen aus Goldau *et al.*^[211]

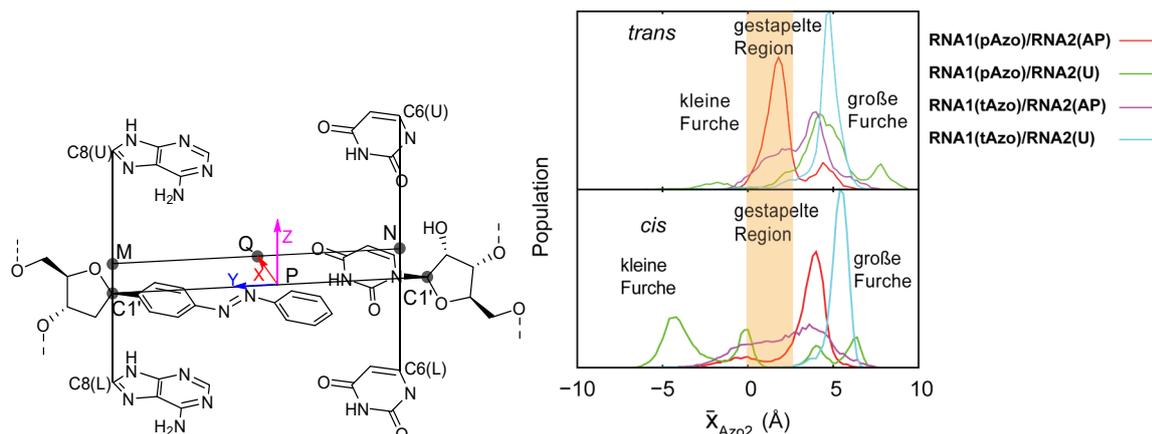


Abb. 130 Ein lokales Koordinatensystem (*Local reference frame*) am Beispiel von **DNA1(pAzo)/DNA2(U)** ist links gezeigt. Die Verteilung von \bar{x}_{Azo2} im lokalen Koordinatensystem von **pAzo** und **tAzo** in RNA Doppelsträngen im *trans*- (oben) und *cis*-Zustand ist rechts gezeigt. Azo2 bezeichnet den distalen Phenylring (zum Linker) vom Azobenzol. Da der proximale Ring des Azobenzols (Azo1) fast immer gestapelt vorliegt, wurde nur die Position von Azo2 bestimmt. \bar{x}_{Azo2} bezeichnet die Mitte der Masse des distalen Phenylrings. Die rechte Abbildung zeigt die Population des distalen Rings von **RNA1(pAzo)/RNA2(AP)**, **RNA1(pAzo)/RNA2(U)**, **RNA1(tAzo)/RNA2(AP)** und **RNA1(tAzo)/RNA2(U)** in der kleinen und großen Furche, sowie in der gestapelten Region. Die rechte Abbildung wurde von Padmabati Mondal übernommen und modifiziert. Beide Abbildungen wurden aus Mondal *et al.*^[337] entnommen.

Wie erwartet induziert eine photochemische Anreicherung des *cis*-Isomers eine stärkere Duplex-Destabilisierung. Der niedrigste Schmelzpunkt für die *cis*-Zustände konnte mit den Doppelsträngen **RNA1(pAzo)/RNA2(U)** ($T_M = 43,4$ °C), **RNA1(mAzo)/RNA2(U)** ($T_M = 43,4$ °C) und **RNA1(C)/RNA2(mAzo)** ($T_M = 43,3$ °C) gemessen werden. Während bei **RNA1(Azo)/RNA2(U)** immer der niedrigste Schmelzpunkt gemessen werden konnte, scheint bei einem Azobenzol in **RNA2** ein gegenüberliegendes Cytidin (**RNA1(C)/RNA2(Azo)**) den Doppelstrang am stärksten zu destabilisieren. Simulationen (siehe **Abb. 130**) zeigten, dass im Falle von **RNA1(pAzo)/RNA2(U)** das *cis*-Azobenzol hauptsächlich in der großen Furche lokalisiert ist, während im Falle von **RNA1(Azo)/RNA2(AP)** das *cis*-Azobenzol sich zum Großteil in der kleinen Furche befindet.^[337] Die Lokalisierung in der kleinen und großen Furchen korreliert zudem mit der Helizität des Azobenzols. Während P-helikale *cis*-Azobenzole hauptsächlich in der großen Furchen lokalisiert sind, sind M-helikale *cis*-Azobenzole bevorzugt in der kleinen Furchen lokalisiert. Berechnungen zeigten, dass **RNA1(pAzo)/RNA2(U)** in beiden Zuständen, *trans* und *cis*, partielle gebrochene Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet werden konnten, wobei im *cis*-Zustand etwas weniger Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet werden konnten. Interessanterweise hat die Struktur des gesamten Doppelstranges weniger Fluktuation im *cis*-Zustand als in der *trans*-Form. Allerdings zeigt die Position um das Azobenzol eine enorm hohe Fluktuation (siehe **Abb. 129**). **RNA1(pAzo)/RNA2(AP)** zeigte hingegen stabile Wasserstoffbrückenbindungen im *trans*-Zustand und eine signifikante Abnahme im *cis*-Zustand. Im Vergleich zum *trans*-Zustand, zeigt **RNA1(pAzo)/RNA2(AP)** deutlich mehr Fluktuation mit *cis*-Zustand (siehe **Abb. 129 b**). Dies schafft eine ideale Voraussetzung für eine lichtgesteuerte Regulation von biologischen Prozessen, bei denen

Biomoleküle nur einen nativen und perfekt gepaarten Doppelstrang erkennen (wie z.B. die *Seed*-Region von miRNA siehe 1.1.3.1).

Der Vergleich der ΔT_M -Werte von **pAzo** und **mAzo** zeigt, dass **mAzo** eine effektivere photoinduzierte (De-)Stabilisierung bewirkte. Der stärkste Destabilisierungseffekt nach photoinduzierter *trans*-zu-*cis* Isomerisierung konnte mit **RNA1(AP)/RNA2(mAzo)** ($\Delta T_M = 5,7$ °C), **RNA1(U)/RNA2(mAzo)** ($\Delta T_M = 5,4$ °C), **RNA1(AP)/RNA2(mAzo)** ($\Delta T_M = 5,4$ °C), und **RNA1(C)/RNA2(mAzo)** ($\Delta T_M = 5,5$ °C), als auch für die „Dimer Motive“ **RNA1(pAzo)/RNA2(pAzo)** ($\Delta T_M = 5,5$ °C) und **RNA1(mAzo)/RNA2(pAzo)** ($\Delta T_M = 5,5$ °C) erreicht werden. Obwohl die Schmelzpunkte des „wedge Motives“ im *trans*-Zustand höher sind, als die mit einem Uridin oder Cytidin gegenüber, konnte bei diesen Doppelsträngen nach *trans*-zu-*cis* Isomerisierung der geringste ΔT_M gemessen werden im Bereich von 1,7 °C für **RNA1(pAzo)/RNA2(-)** bis 4,4 °C für **RNA1(-)/RNA2(mAzo)**. Anscheinend kann das Azobenzol im *trans*-Zustand zwar effektiv in den Basenstapel interkalieren, allerdings hat wenig störenden Effekt im sterisch anspruchsvolleren *cis*-Zustand. Analog zu den Studien von Asanuma *et al.*^[204] könnte sich das Azobenzol in die kleine oder große Furche der RNA drehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es komplex ist einen Trend zu erkennen, um vorherzusagen in welcher Kombination das Azobenzol den Doppelstrang am effektivsten stabilisiert oder destabilisiert. Auch die Simulationen unterstützen eine präzise Vorhersage dabei nur teilweise, da nur zwei Stränge simuliert wurden, die sogar in den experimentellen Studien ähnliche De-(Stabilisierungseffekte) zeigten. Obwohl **RNA1(pAzo)/RNA2(AP)** aus den Simulationen als vielversprechender Kandidat resultierte, konnte nur ein mäßig guter (De-)Stabilisierungseffekt experimentell gemessen werden.

Um **pAzo** und **mAzo** mit dem etablierten **tAzo** System zu vergleichen wurden die Doppelstränge mit **tAzo** von Keiji Murayama vermessen und im Folgenden hier aufgeführt. Die vollständigen Ergebnisse sind in **Tabelle 5** zu finden. Ein Vergleich der absoluten *trans* und *cis*-Werte ist schwierig, da die Messung an unterschiedlichen Geräten (JASCO-V550 und JASCO-V650) erfolgte. Aus diesem Grund werden hier nur allgemeine Tendenzen, sowie der Vergleich der ΔT_M -Werte von **pAzo** und **mAzo** mit **tAzo** diskutiert. Die ΔT_M -Werte sollten weitestgehend unabhängig vom verwendeten Gerät sein zumal die experimentellen Bedingungen (Konzentration, Puffer, Temperaturrampe) ansonsten identisch waren.

Tabelle 5 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien mit D-threoinol verknüpftem Azobenzol (**tAzo**)

N ¹	N ²	<i>trans</i>	<i>cis</i>	ΔT_M
---	---		nativ (53,9)	
tAzo	tAzo	51,6	44,6	7,0
tAzo	---	50,5	45,4	5,1
tAzo	U	48,8	43,4	5,4
tAzo	C	48,5	41,7	6,8
---	tAzo	51,9	44,0	7,9
U	tAzo	49,2	42,4	6,8
C	tAzo	50,2	42,1	8,1

Die Messungen der Schmelzpunkte wurden von Keiji Murayama an einem JASCO-V550 UV/vis Spektrometer durchgeführt.

Wie erwartet, führte auch hier der Einbau von **tAzo** in RNA zu einer generellen Destabilisierung der Doppelstränge. Bei den von Burghardt *et al.*^[337] simulierten Doppelsträngen **DNA1(tAzo)/DNA2(U)** und **DNA1(tAzo)/DNA2(AP)** konnte gezeigt werden, dass das *trans*-Azobenzol meist in der großen Furche lokalisiert war und lediglich im Fall von **DNA1(tAzo)/DNA2(AP)** eine geringe Population einer Interkalation in den Basenstapel zeigte (siehe **Abb. 129** und **Abb. 130**). Der Vergleich des nativen Schmelzpunktes mit denen der *trans*-Zustände von **tAzo** zeigte, dass die Destabilisierung mit 2,0 °C bis 5,4 °C etwas geringer ist als bei **pAzo** und **mAzo**. Auch hier wird durch den Einbau von **tAzo** in **RNA2** eine effektivere Destabilisierung nach photoinduzierter *trans*-zu-*cis* Isomerisierung erreicht.

Der Vergleich der ΔT_M -Werte von **pAzo** und **mAzo** mit **tAzo** zeigt, dass **tAzo** einen stärkeren Effekt auf die lichtinduzierte Duplex(de)Stabilisierung aufweist mit ΔT_M -Werten von 8,1 und 7,9 °C. Auch im Fall von **tAzo** in **RNA1** war das „*wedge* Motiv“ die uneffektivste Kombination, hier konnte der niedrigste ΔT_M -Wert mit 5,1 °C gemessen werden. Überraschenderweise führte die Verwendung von **tAzo** in **RNA2** im „*wedge* Motiv“ zu dem zweithöchsten ΔT_M -Wert. In der Literatur wird **tAzo** im Kontext von DNA häufig im „*wedge* Motiv“ verwendet, da **tAzo** in diesem und „*Dimer* Motiv“ die höchste Effizienz besitzt (siehe Kapitel 1.4.4).^[187,195] Für die Verwendung von **tAzo** in RNA gibt es außer der vorliegenden nur eine weitere Schmelzpunktstudie, in der nur das „*wedge* Motiv“ verwendet wurde.^[332]

Tabelle 6 Vergleich der Duplexdestabilisierung nach photoinduzierter *trans*-zu-*cis* Isomerisierung von **pAzo**, **mAzo** und **tAzo** in RNA1(N¹)/RNA2(N²).

N ¹	N ²	ΔT_M (Azo = pAzo)	ΔT_M (Azo = mAzo)	ΔT_M (Azo = tAzo) ^[a]
Azo	-	1,7	3,3	5,1
Azo	U	3,8	4,3	5,4
Azo	C	3,6	4,5	6,8
-	Azo	4,2	4,4	7,9
U	Azo	4,0	5,4	6,8
C	Azo	4,5	5,9	8,1
Azo	Azo	5,5	4,7	7,0

[a] Die Messungen der **tAzo** modifizierten Doppelstränge wurden von Keiji Murayama durchgeführt.

Ein großer Nachteil von **tAzo** ist, dass die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung im Duplex nur bei erhöhter Temperatur, nahe Schmelztemperatur der Doppelstränge (häufig 60 °C), durchgeführt werden kann.^[198,202,215] Bei Raumtemperatur konnte mit **tAzo** im DNA Doppelstrang häufig nur 20-40% des *cis*-Isomers bei Belichtung mit UV-Licht erreicht werden.^[187,203,338] Im Falle von **tAzo** in RNA gibt es zu der Temperaturabhängigkeit der Isomerisierung keine Untersuchungen. Asanuma *et al.* erwähnten lediglich, dass die Bestrahlung von **tAzo** in RNA bei 60 °C für 3 min durchgeführt wurde.^[332] Eine Begründung oder Nachweis der Notwendigkeit fehlt allerdings.

Die temperaturabhängige Isomerisierung im RNA Doppelstrang wurde anhand des „*wedge* Motives“ untersucht, da dies das am häufigsten verwendete Motiv von **tAzo** ist. Da die photoinduzierte Duplex-Destabilisierung von **pAzo**, **mAzo** und **tAzo** in **RNA2** effektiver war, wurden die Untersuchungen mit **RNA1/RNA2(pAzo)**, **RNA1/RNA2(mAzo)**, **RNA1/RNA2(tAzo)** durchgeführt. Um das *cis*-Verhältnis im Duplex zu quantifizieren, wurden zunächst Reinspektren der *trans*- und *cis*-Photoisomere im Duplex aufgenommen (siehe **Abb. 131** für **RNA1/RNA2(mAzo)**; für **RNA1/RNA2(pAzo)** und **RNA1/RNA2(tAzo)** siehe **Abb. 224** und **Abb. 225** im Anhang). Analog zu **Abschnitt 3.2.2.2**, wurden dazu die Photoisomere in den Doppelsträngen über eine AE-HPLC getrennt und Absorptionsspektren aufgenommen. AE-HPLC wurde gegenüber RP-HPLC bevorzugt, da zum einen Acetonitril (als Eluent) den Absorptionskoeffizienten beeinflussen könnte und zum anderen AE-HPLC unter nativen Bedingungen durchgeführt werden kann.

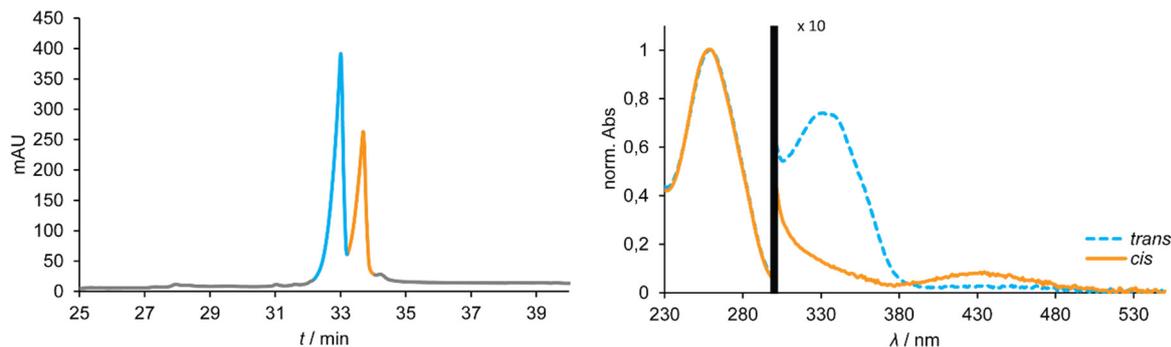


Abb. 131 AE-HPLC Chromatogramme (links) für die Trennung der *cis*- und *trans*-Photoisomere von **mAzo** im RNA Duplex **RNA1/RNA2(mAzo)** ($R_t(\text{trans})=33,0$ min; $R_t(\text{cis})=33,7$ min). Die Trennung und Aufnahme der UV/vis Absorptionsspektren der reinen Isomere (rechts) erfolgte in der AE-HPLC. Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt bei 270 nm auf 1 normiert. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linearer Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Es wurden 2 nmol injiziert.

Für die bestrahlungszeitabhängige *cis*-zu-*trans* und *trans*-zu-*cis* Isomerisierung im Duplex (siehe **Abb. 132**) wurden vor der eigentlichen Messung die Doppelstränge durch Bestrahlung mit UV (365 nm, 300 mW) bzw. sichtbarem Licht (420 nm, 300 mW) in den photostationären Zustand überführt. Um eine maximale Anreicherung des *cis*- bzw. *trans*-Isomers zu garantieren, wurden die Stränge während der Bestrahlung erwärmt. **RNA1/RNA2(mAzo)**, **RNA1/RNA2(pAzo)** wurden dazu auf 60 °C erwärmt, während bei **RNA1/RNA2(tAzo)** sogar 75 °C notwendig waren. Die Belichtung zur Isomerisierung im Duplex wurde 600 s bei Raumtemperatur und 300 s bei 60 °C für **RNA1/RNA2(mAzo)**, **RNA1/RNA2(pAzo)** bzw. 75 °C für **RNA1/RNA2(tAzo)** durchgeführt.

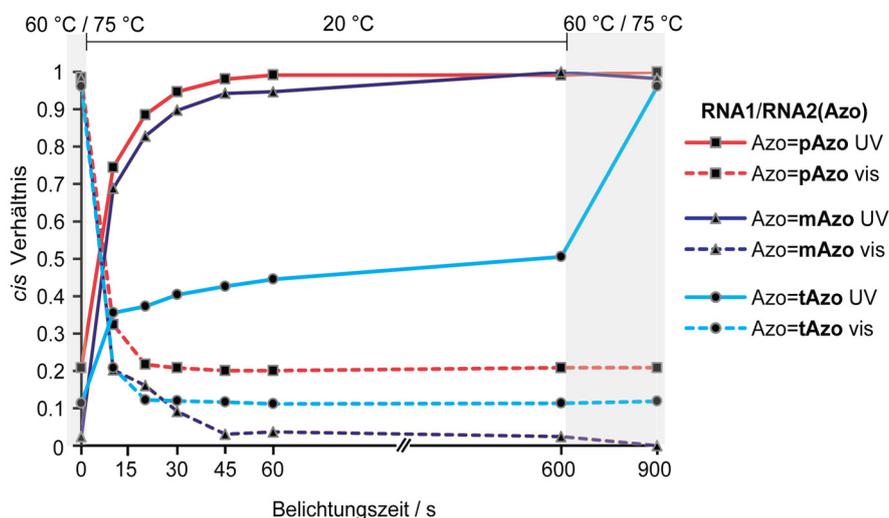


Abb. 132 Bestrahlungszeitabhängige *trans*-zu-*cis* und *cis*-zu-*trans* Photoisomerisierung von **RNA1/RNA2(pAzo)** (Rot, Quadrate), **RNA1/RNA2(mAzo)** (Magenta, Dreiecke) und **RNA1/RNA2(tAzo)** (Hellblau, Kreise). Die Bestrahlung startete von den jeweiligen photostationären Zuständen aus. Diese wurden angereichert durch vorhergehende Bestrahlung bei 60 °C für **RNA1/RNA2(pAzo)**, **RNA1/RNA2(mAzo)** und 75 °C für **RNA1/RNA2(tAzo)**. Alle Stränge wurden für 600 s bei Raumtemperatur und 300 s bei 60 °C für **pAzo** und **mAzo** und 75 °C für **tAzo** bestrahlt (365 nm oder 420 nm, 300 mW). Die Berechnung der *cis* Verhältnisse erfolgte anhand **Formel 1** mit den in der HPLC getrennten Reinspektren der Photoisomeren (siehe **Abb. 131**, **Abb. 224** und **Abb. 225**).

Bestrahlung von **RNA1/RNA2(mAzo)** und **RNA1/RNA2(pAzo)** mit UV-Licht bei Raumtemperatur überführte die Stränge nach 45-60 s in einen photostationären Zustand, bei dem ca. 90-95% als *cis*-Isomer vorlagen. Weitere Bestrahlung für 300 s bei 60 °C veränderte das *cis*-Verhältnis nicht weiter. Im Falle von **RNA1/RNA2(tAzo)** konnte nach 600 s Bestrahlung mit UV-Licht bei Raumtemperatur lediglich ~45% der *cis*-Form erhalten werden. Erst durch weitere Bestrahlung für 300 s bei 75 °C führte zu einer ~95% Überführung in das *cis*-Isomer. Bei der *cis*-zu-*trans* Isomerisierung konnte durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht bei Raumtemperatur in allen Fällen nach 45 s ein photostationärer Zustand erhalten werden. Dieser änderte sich auch nicht durch weitere Bestrahlung bei erhöhter Temperatur.

Die Ergebnisse zeigten, dass die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung bei Raumtemperatur von **tAzo** im RNA Duplex ähnlich ineffektiv war, wie die in der Literatur^[187,198,203,204,212] beschriebene Isomerisierung von **tAzo** in DNA. **pAzo** und **mAzo** konnte hingegen bei Raumtemperatur vollständig in den *cis* und *trans* Zustand überführt werden. **RNA1/RNA2(mAzo)** zeigte zudem noch eine enorm hohe Schaltamplitude von 5%-95% des *cis*-Isomers. Für viele Anwendungen, vor allem im biologischen Bereich, müssen erhöhte Temperaturen ausgeschlossen werden. Dies verringert die maximale Effektivität von **tAzo** einen Duplex zu regulieren. Unter idealen Isomerisierungsbedingungen, also bei erhöhter Temperatur, bewirkte **tAzo** eine höhere photoinduzierte Duplexdestabilisierung (ΔT_M (**RNA1/RNA2(tAzo)**) 7,9 °C) als **pAzo** (ΔT_M (**RNA1/RNA2(mAzo)**) 4,4 °C) oder **mAzo** (ΔT_M (**RNA1/RNA2(tAzo)**) 4,2 °C). Würde man einen linearen Zusammenhang zwischen Isomerisierungsgrad (max. %*cis*) und ΔT_M annehmen, würde dies mathematisch bedeuten, dass der ΔT_M -Wert für **RNA1/RNA2(tAzo)** bei einer Isomerisierung bei Raumtemperatur (auf 45%) sinken würde: ΔT_M (**RNA1/RNA2(tAzo)**) 7,9 °C x 0,45 (Isomerisierungsgrad bei Raumtemperatur) = 3,6 °C. Dieser hypothetisch berechnete Wert liegt signifikant unter den experimentell ermittelten ΔT_M -Werten von **pAzo** und **mAzo** in **RNA1/RNA2(Azo)**. Dies würde bedeuten, dass bei einer Isomerisierung bei Raumtemperatur **pAzo** und **mAzo** effektiver als **tAzo** einen Duplex im „wedge Motiv“ **RNA1/RNA2(Azo)** regulieren können.

Mondal und Burghardt berechneten die Isomerisierung von **pAzo** im RNA Doppelstrang (*Displacement* Motiv) mit den Sequenzen 5'-UAAApAzoAAAG-3' und 5'-CUUUUUUUA-3' mit QM/MM Methoden.^[339] Die Sequenz ist eine kürzere Version zu der in dieser Arbeit untersuchten Sequenz (9mer vs. 15mer; vgl. **Tabelle 2**). Im Vergleich zum Vakuum verlangsamt die umgebende RNA die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung von 500 Femtosekunden zu ~15 Pikosekunden, während die *cis*-zu-*trans* Isomerisierung nicht beeinflusst wird und im Pikosekunden-Bereich abläuft. Die Quantenausbeuten der Isomerisierungsprozesse für *trans*-zu-*cis* und *cis*-zu-*trans* wurden mit $\Phi_{t \rightarrow c} = 10\%$ und $\Phi_{c \rightarrow t} = 50\%$ berechnet. Dies zeigt,

dass die sterische Hinderung der umgebenden RNA die Isomerisierung nur von *trans* nach *cis* verlangsamt und erschwert. Interessanterweise wurde der Isomerisierungsmechanismus als Pedal-ähnlich bestimmt (siehe **Abb. 133**), ein Mechanismus der enorm platzsparend ablaufen kann ohne die umliegenden Basenpaare zu stören. Der selbe Mechanismus konnte bei der Berechnung einer anderen Sequenz mit **pAzo** im „wedge Motiv“ von Mondal und Burghardt bestimmt werden.^[339] Dies könnte bedeuten, dass der Mechanismus unabhängig von der Sequenz und Struktur der umgebenden RNA sein kann und eventuell nur vom Linker beeinflusst wird.

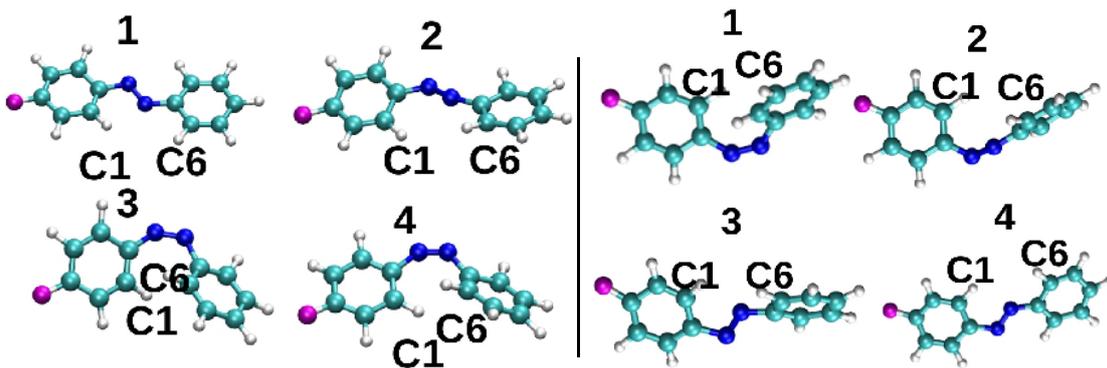


Abb. 133 Mechanismen der *trans*-zu-*cis* (links) und *cis*-zu-*trans* (rechts) Isomerisierung nach Mondal und Burghardt^[339]. Im *trans*-zu-*cis* Isomerisierungsmechanismus findet eine Drehung von N3-N4 statt, gefolgt von einer Rotation um die N4-C5 Einfachbindung. Der distale Ring (vom Linker betrachtet) unterliegt einer partiellen Rotation in der Ebene um die N4-C5 Bindung. Bei der *cis*-zu-*trans* (rechts) Isomerisierung findet (annähernd) analog umgekehrt statt.^[339] Die Abbildungen wurde aus Burghardt *et al.*^[339] entnommen.

Ginger *et al.*^[213] bestimmten 2017 den Isomerisierungsmechanismus für **tAzo** in DNA als Rotations- oder Hula-Twist Mechanismus (siehe **Abb. 33**). Dieser benötigt deutlich mehr Platz, wodurch die Isomerisierungsquantenausbeute deutlich erniedrigt wird, wenn sterische Faktoren wie benachbarte Basenpaare vorhanden sind. Höhere Temperaturen führten zur Lockerung des DNA Doppelstrangs, wodurch die Isomerisierung mit höheren Quantenausbeuten ablaufen konnte. Auch lokale Störungen wie Fehlbasenpaare oder AP-Stellen führten zu höheren Isomerisierungsquantenausbeuten. Die thermische Rückisomerisierung wurde als ein platzsparender Inversionsmechanismus berechnet. Biswas und Burghardt bestimmten allerdings 2014 den Isomerisierungsmechanismus von **tAzo** im DNA Doppelstrang als platzsparenden Pedal-ähnlichen Mechanismus.^[340] Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der Berechnungen, lässt sich keine exakte Schlussfolgerung treffen, welcher Isomerisierungsmechanismus bei **tAzo** stattfindet und ob dieser zu der geringeren *trans*-zu-*cis* Isomerisierung beiträgt. Eine andere Erklärung ist, dass **tAzo** besser in den Basenstapel interkaliert und dadurch so fixiert vorliegt, dass eine Isomerisierung, auch nicht mit dem platzsparend Pedal-ähnlichen Mechanismus, ablaufen kann. Simulationen von Burghardt *et al.*^[337] zeigten jedoch, dass **tAzo** im Falle von **RNA1(tAzo)/RNA2(U)** und **RNA1(tAzo)/RNA2(AP)** im *trans*-Zustand nur eine geringe Population im interkalierten

Zustand besitzt und der distale Azobenzol-Ring meist in der großen Furche des RNA Doppelstranges lokalisiert ist (siehe **Abb. 130**). Da bei denselben Sequenzen mit **pAzo** der distale Azobenzol Ring häufiger in der Basenstapel-Region lokalisiert ist, bleibt die Frage offen, warum **pAzo** und **mAzo** vollständig aber **tAzo** nur beschränkt isomerisiert werden konnten. Weitere Untersuchungen und Simulationen sind notwendig, um diese Frage zu klären.

3.2.3 Untersuchung von pAzo und mAzo in DNA

Das folgende Teilprojekt befasst sich mit der Untersuchung von **pAzo** und **mAzo** im DNA Einzel- und Doppelstrang. Viele biologische Prozesse basieren auf der Hybridisierung von DNA und könnten durch die Einführung von Photoschaltern lichtregulierbar gemacht werden. Da der Desoxyribose-Linker von **pAzo** und **mAzo** die natürliche Struktur der DNA ideal nachahmt, sollte untersucht werden, wie effizient durch lichtinduzierte Isomerisierung ein Duplex (de-)stabilisiert werden kann. Zusätzlich wurde untersucht, wie die umgebende DNA die thermische Stabilität, die Photoermüdung und die Isomerisierung von **pAzo** und **mAzo** beeinflusst.

3.2.3.1 Festphasensynthese und Aufreinigung von pAzo und mAzo in DNA

Die Synthese der Stränge **DNA1(pAzo)**, **DNA2(pAzo)**, **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)** (Sequenzen siehe **Tabelle 7**) erfolgte bereits in der Masterarbeit vom Autor dieser Arbeit und wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit reproduziert. Alle weiteren Experimente wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt.

Die Synthese der Stränge erfolgte unter Standardbedingungen der Phosphoramidit-Synthese im DMTrON-Modus. Lediglich die Kupplungszeit von **101** und **105** wurde auf 12 Minuten verlängert. Im DMTrON-Modus wird die letzte DMTr-Schutzgruppe nicht entfernt. Da nur das Vollängenprodukt diese unpolare DMTr-Schutzgruppe enthält, wird dies auf der RP-HPLC später eluiert. Dies erlaubt eine effiziente Abtrennung der Abbruchsequenzen.

Die Abspaltung vom Festphasenmaterial erfolgte mit 32% *aq.* NH₃ über Nacht bei Raumtemperatur. Nachdem das Festphasenmaterial durch Filtration entfernt und das Filtrat eingengt wurde, erfolgte die Aufreinigung per RP-HPLC (MeCN, 0,1 M TEAA). Die eingengten Fraktionen wurden mit Essigsäure versetzt, um die DMTr-Schutzgruppe zu entfernen. Nach erneutem einengen und RP-HPLC wurden die Stränge sauber erhalten (analytische RP-HPLC Spektren und massenspektrometrische Analyse siehe **Abb. 226** und **Tabelle 7**).

Tabelle 7 Sequenzen und massenspektrometrische Analyse der synthetisierten Oligonukleotide.

Sequenzen	Bezeichnungen	berechnet	gemessen
5'-GCA TAA A pAzo A AAG GUG-3'	DNA1(pAzo)	4703,1	4703,0
5'-CAC CTT T pAzo T TTA TGC-3'	DNA2(pAzo)	4538,0	4538,0
5'-GCA TAA A mAzo A AAG GTG-3'	DNA1(mAzo)	4702,9	4703,0
5'-CAC CTT T mAzo T TTA TGC-3'	DNA2(mAzo)	4538,0	4538,0

3.2.3.2 Untersuchung von pAzo und mAzo im DNA Einzelstrang

Analog zu den Studien von **pAzo** und **mAzo** in RNA wurden zu Beginn die photochemischen Eigenschaften der Azobenzol C-Nukleoside im DNA Einzelstrang untersucht. Um die *cis*-zu-*trans*-Verhältnisse, also den Isomerisierungsgrad, anhand der gemessenen Absorption berechnen zu können, wurden zunächst Reinspektren der entsprechenden Photoisomere im DNA Einzelstrang aufgenommen. Dazu wurden die Photoisomere der Stränge **DNA1(pAzo)**, **DNA2(pAzo)**, **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)** über AE-HPLC getrennt. Ein Beispiel von **DNA2(mAzo)** ist in **Abb. 134** gezeigt. Vor der HPLC wurde die Hälfte des in die HPLC injizierten Materials mit UV-Licht bestrahlt, um das *cis*-Isomer anzureichern. Dies liegt im thermischen Gleichgewicht nur bei ca. 10-15% vor (Daten nicht gezeigt). Das unpolare *trans*-Isomer wird, analog zu den Studien von **pAzo** und **mAzo** in RNA, immer später eluiert. Von den getrennten Isomeren wurden in der HPLC UV/vis Absorptionsspektren aufgenommen. Mit diesen Werten konnte anhand **Formel 1** der *cis*-Anteil berechnet werden. Die Trennung der Photoisomere von **DNA2(pAzo)**, war nicht ausreichend, weshalb dieses Konstrukt für die weiteren Untersuchungen im Einzelstrang nicht berücksichtigt wurde (siehe **Abb. 227** und **Abb. 228** für die Chromatogramme und Reinspektren von **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)**).

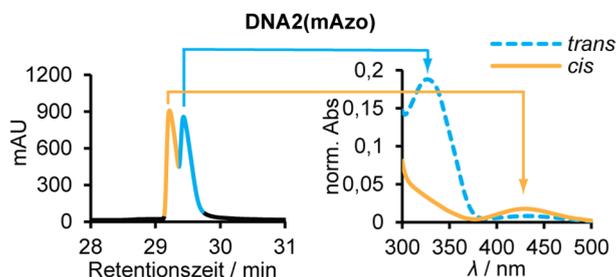


Abb. 134 AE-HPLC Chromatogramm von **DNA2(mAzo)** (links) und die dazugehörigen in der HPLC aufgenommenen UV/vis Absorptionsspektren der reinen isomeren Formen vom Azobenzol C-Nukleosid. Das Absorptionsspektrum wurde am isosbestischen Punkt ($\lambda = 248$ nm) auf eins normiert. Die Hälfte des injizierten Materials wurde zuvor mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) für 5 min bestrahlt. Für die kompletten UV/vis Absorptions-Reinspektren von **DNA1(pAzo)**, **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)** siehe **Abb. 228** im Anhang.

Wie bereits ausführlich in Abschnitt 1.4.3 und 3.2.2.2 diskutiert, unterliegen Azobenzole einer thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation. Diese ist abhängig von dem Substitutionsmuster, der Temperatur und von der Umgebung des Azobenzols. Für eine Anwendung im biologischen Kontext kann es hilfreich sein eine hinreichende Stabilität zu haben, um eine permanente oder wiederholende Bestrahlung während der Experimentdauer zu vermeiden. Um den Einfluss von DNA auf die Stabilität des *cis*-Isomers zu untersuchen, wurden die kinetischen Parameter von **DNA1(pAzo)**, **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)** bestimmt. Vor der Bestimmung der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation wurden die DNA Stränge mit UV-Licht (365 nm) bestrahlt, um das *cis*-Isomer anzureichern. Dabei wurde so lange bestrahlt, bis sich die Absorption bei $\lambda = 332$ nm (Maximum der π - π^* -Bande des Azobenzols) nicht weiter änderte. Die Proben wurden für 24 h bei 20, 37 und 70 °C inkubiert und im Abstand von fünf Minuten wurden UV/vis Absorptionsspektren gemessen. Anhand **Formel 1** wurde der *cis*-Anteil berechnet. Die Spektren wurde am isosbestischem Punkt ($\lambda = 248$ nm) normiert. Die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation ist in **Abb. 135** am Beispiel von **DNA2(mAzo)** gezeigt. Die entsprechenden Diagramme von **DNA1(pAzo)** und **DNA1(mAzo)** befinden sich im Anhang (siehe **Abb. 229**).

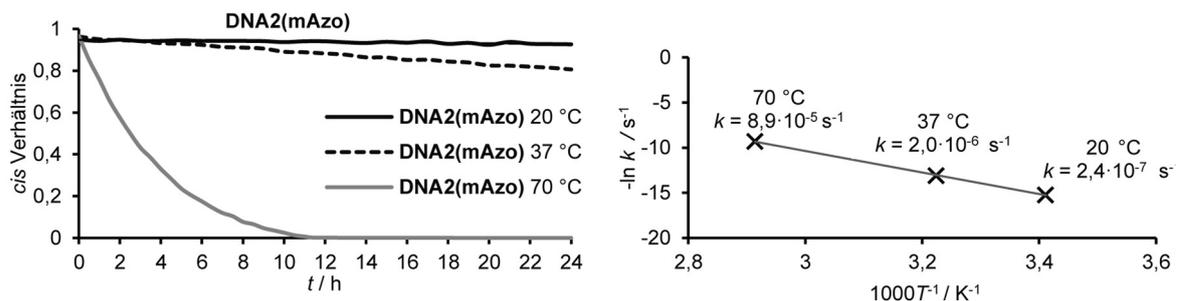


Abb. 135 Thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von **DNA2(mAzo)** bei 20 °C, 37 °C und 70 °C (links) und das Arrhenius Diagramm (rechts). Die *cis* Verhältnisse wurden anhand der gemessenen Absorption bei 332 nm mit **Formel 1** bestimmt. Mit der Steigung der linearen Regression im Arrhenius Diagramm wurde die Aktivierungsenergie bestimmt (siehe **Formel 5**). Die Messungen erfolgten in PBS Puffer (pH 7,4) und die Konzentration betrug 7 μM . Die entsprechenden Diagramme von **DNA1(pAzo)** und **DNA1(mAzo)** befinden sich im Anhang in **Abb. 229**.

Da die thermische Relaxation eine Reaktion erster Ordnung ist, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit anhand **Formel 3** und die Halbwertszeit anhand **Formel 4**, sowie die Aktivierungsenergie anhand **Formel 5** berechnet werden.

Die vollständigen kinetischen Parameter sind in **Tabelle 8** zu finden. Alle Azobenzol-modifizierten Stränge haben eine sehr hohe Schaltamplitude von mehr als 96% des *cis* und mehr als 97% des *trans*-Isomers. **pAzo** und **mAzo** haben in DNA eine ausgesprochen hohe thermische Stabilität bei 20 °C. Die Halbwertszeit beträgt zwischen 28 (**DNA1(pAzo)**) und 43 Tagen (**DNA1(mAzo)**). Selbst bei 37 °C besitzen sie eine ausgezeichnete Stabilität mit einer Halbwertszeit von 63 h für **DNA1(pAzo)** bis 107 h von **DNA1(mAzo)**. Die Stabilität

in diesem Zeitraum ist wahrscheinlich für (fast) alle biologischen Experimente ausreichend. Bei 70 °C sinkt die Halbwertszeit auf 2,2 h für **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)** und 1 h für **DNA1(pAzo)**. Analog zu den Ergebnissen von **pAzo** und **mAzo** in RNA (siehe **Tabelle 3**) und anderen *meta*-verknüpften Azobenzolen^[184,191], ist die thermische Relaxation von **DNA1(pAzo)** schneller als von **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)**. Im Vergleich zu den Monomeren **pAzo** und **mAzo**, sinkt die Halbwertszeit bei 70 °C und 37 °C durch den Einbau in DNA (z.B. von 4,3 h auf 1,0 h bei 70 °C und von 97 h auf 63 h bei 37 °C für **pAzo** und **DNA1(pAzo)**). Dies ist anders als bei **pAzo** und **mAzo** in RNA, wo die thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation bei 37 °C zwar verlangsamt, bei 70 °C jedoch beschleunigt wurde (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 8 Kinetische Parameter für die thermische Relaxation von **DNA1(pAzo)**, **DNA2(mAzo)** und **DNA1(mAzo)** (7 µM in PBS Puffer, pH 7,4) bei 20 °C, 37 °C und 70 °C.

	max. % <i>cis</i>	T [°C]	k [s ⁻¹]	t _{1/2} [h]	E _A [kJ·mol ⁻¹]
		70	(1,9 ± 0,2)·10 ⁻⁴	1,0 ± 0,1	
DNA1(pAzo)	96	37	(3,1 ± 0,1)·10 ⁻⁶	63 ± 1	110 ± 1
		20	(2,9 ± 0,6)·10 ⁻⁷	673 ± 130	
		70	(8,9 ± 0,2)·10 ⁻⁵	2,2 ± 0,1	
DNA1(mAzo)	98	37	(1,8 ± 0,1)·10 ⁻⁶	107 ± 4	104 ± 1
		20	(1,9 ± 0,4)·10 ⁻⁷	1041 ± 213	
		70	(8,9 ± 0,2)·10 ⁻⁵	2,2 ± 0,1	
DNA2(mAzo)	96	37	(2,0 ± 0,1)·10 ⁻⁶	95 ± 2	101 ± 1
		20	(2,4 ± 0,3)·10 ⁻⁷	796 ± 94	
		70	(8,9 ± 0,2)·10 ⁻⁵	2,2 ± 0,1	

Generell war die thermische Relaxation von **pAzo** und **mAzo** in DNA schneller als in RNA. Dies lässt darauf schließen, dass die geometrische Form der Nukleinsäure eine entscheidende Rolle spielt. Der Einbau von **pAzo** und **mAzo** in DNA führte zu einer Erhöhung der Aktivierungsenergie von 84 kJ·mol⁻¹ für **pAzo** zu 110 kJ·mol⁻¹ für **DNA1(pAzo)** ($\Delta E_A = 26$ kJ·mol⁻¹) und von 62 kJ·mol⁻¹ für **mAzo** auf 104 kJ·mol⁻¹ für **DNA1(mAzo)** ($\Delta E_A = 42$ kJ·mol⁻¹) und auf 101 kJ·mol⁻¹ für **DNA2(mAzo)** ($\Delta E_A = 39$ kJ·mol⁻¹). Diese Unterschiede waren ausgeprägter als im Falle von RNA, bei denen die Aktivierungsenergien nur um 12 kJ·mol⁻¹ für **pAzo** und **RNA1(pAzo)**, sowie 28,7 kJ·mol⁻¹ für **mAzo** und **RNA1(mAzo)** anstiegen. Ähnlich wie im Falle von RNA, hatte die thermische *cis*-zu-*trans* Isomerisierung von **DNA1(pAzo)** eine leicht höhere Aktivierungsenergie im Vergleich mit **DNA1(mAzo)** und **DNA2(mAzo)**.

Da viele Anwendungen repetitive Isomerisierungen benötigen, wurde die Ermüdung von **pAzo** und **mAzo** in DNA untersucht. Dazu wurden die Stränge 20-Mal abwechselnd für 60 s mit UV (365 nm) und sichtbarem Licht (420 nm) bestrahlt (für Beispiel an **DNA2(mAzo)** siehe **Abb. 136**; für **DNA1(pAzo)** und **DNA1(mAzo)** siehe **Abb. 230** im Anhang).

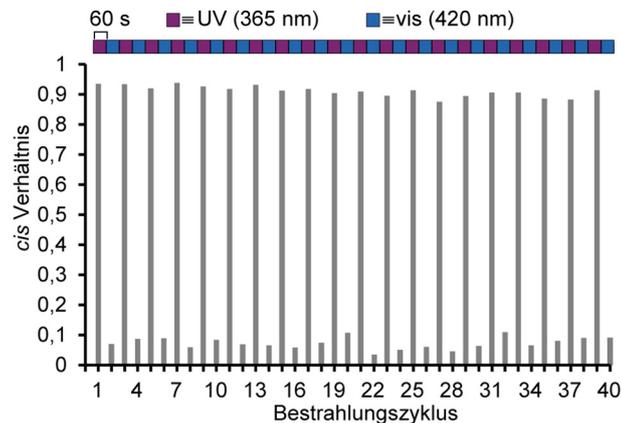


Abb. 136 Ermüdungsresistenzstudien von **DNA2(mAzo)**. Der DNA Strang (7 μ M) wurde abwechselnd 20x mit UV-Licht (365 nm, 300 mW, 60s, lila) und sichtbarem Licht (420 nm, 300 mW, 60s, blau) bestrahlt. Das *cis*-Verhältnis wurde anhand **Formel 1** mit den normalisierten UV/vis Absorptionsspektren berechnet. Die entsprechenden Spektren von **DNA1(pAzo)** und **DNA1(mAzo)** befinden sich im Anhang (**Abb. 230**).

Alle Azobenzol-modifizierten Stränge zeigen nach 20 Bestrahlungs- bzw. Isomerisierungszyklen keine Ermüdung. Dies sollte eine ausreichende Stabilität für viele biologische Experimente bedeuten. Azobenzole haben im Allgemeinen eine sehr hohe Ermüdungsresistenz, was auch für die Monomere **pAzo** und **mAzo** bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).^[211]

Zusammenfassend zeigen **pAzo** und **mAzo** auch im Kontext von DNA eine exzellente thermische Stabilität über einen breiten Temperaturbereich. Zudem zeigen sie keine Ermüdung bei repetitiver Isomerisierung. Dies macht **pAzo** und **mAzo** in DNA zu guten Kandidaten für die Regulation von Nukleinsäuren, auch bei lang andauernden Experimenten.

3.2.3.3 Untersuchungen von **pAzo** und **mAzo** im DNA Doppelstrang

Neben thermischer Stabilität, Ermüdungsresistenz und Schaltamplitude ist die photoinduzierte (De-)Stabilisierung eines DNA Doppelstranges eine wichtige Eigenschaft von Azobenzol-modifizierten Nukleinsäuren. Um dies zu untersuchen, wurden Schmelzpunktstudien von 16 DNA Doppelsträngen (siehe **Tabelle 9**) jeweils im *trans*- und *cis*-Zustand der Azobenzole durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Anordnungen untersucht, bei denen das Azobenzol gegenüber einer Base („*Displacement* Motiv“), zusätzlich eingebaut („*wedge* Motiv“) oder nebeneinander in gegenüberliegenden Strängen eingebaut ist („*Dimer* Motiv“) (siehe **Abb. 30** für eine schematische Darstellung der verschiedenen Motive).

Da das Azobenzol größer ist als eine Nukleobase (siehe **Abb. 129**), wurden im „*Displacement* Motiv“ nur Pyrimidin-Basen gegenüber dem Azobenzol verwendet, da diese kleiner sind als Purinbasen. Abgesehen vom „*Dimer* Motiv“, wurden nur Doppelstränge mit einem Azobenzol vermessen, um kooperative Effekte auszuschließen und somit zielgerichteter Informationen über eine günstige Anordnung von **pAzo** und **mAzo** in DNA zu erhalten.

Vor den Schmelzpunktmessungen wurden die Doppelstränge bei 60 °C mit UV-Licht oder sichtbarem Licht bestrahlt, bis die Absorption der π - π^* -Bande des Azobenzols bei 332 nm konstant war. Die höhere Temperatur sollte den Doppelstrang aufschmelzen, um somit sterische Hinderung von der RNA auf die Isomerisierung zu vermeiden. Dies sollte eine möglichst effiziente Isomerisierung ermöglichen (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte von 20 °C bis 60 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C · min⁻¹. Während bei **pAzo** und **mAzo** in RNA die Temperaturmessung am Heizblock erfolgte, wurden bei den Schmelzpunktmessungen der DNA Doppelstränge Temperaturfühler in der Probe verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass die Temperaturunterschiede zwischen Heizblock und Probe vernachlässigt und somit auch bei einer schnellen Temperaturrampe immer akkurate Werte erhalten werden konnten. Anhand der relativ niedrigen thermischen Rate bei 70 °C war zu erwarten, dass eine permanente Bestrahlung während der Messung nicht nötig sei. Deshalb wurden die Stränge beim Vermessen des *cis*-Isomers nach jedem Zyklus, also einmal Hochheizen und Abkühlen, erneut bestrahlt. Zudem wurden UV/vis Absorptionsspektren der Doppelstränge vor und nach einem Zyklus aufgenommen, um die Stabilität des *cis*-Isomers zu verifizieren. Ein Beispiel einer Schmelzpunktkurve, sowie das Absorptionsspektrum vor und nach einem Zyklus ist in **Abb. 137** am Beispiel von **DNA1(C)/DNA2(mAzo)** dargestellt. Da kein Unterschied in der Absorption vor und nach einem Zyklus zu vorhanden war, zeigte sich, dass das Azobenzol keiner thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation während den Messungen unterlag und somit keine permanente Bestrahlung nötig war.

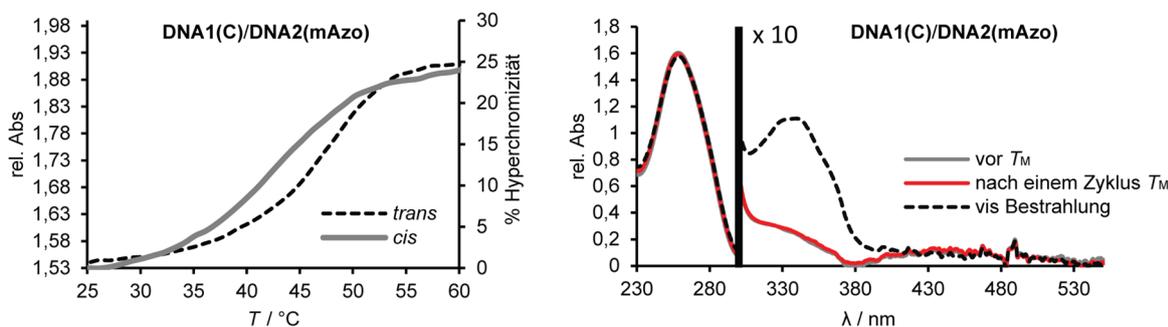


Abb. 137 Schmelzpunktkurve (links) von **DNA1(C)/DNA2(mAzo)** im *trans* (schwarz gestrichelt) und *cis* (grau) Zustand. Aus dem Wendepunkt des sigmoidalen Verlaufs der Schmelzpunktkurve wurde der Schmelzpunkt T_M bestimmt. Die Hyperchromizität ist auf der Sekundärachse gezeigt und wurde anhand **Formel 6** berechnet. Das UV/vis Absorptionsspektrum vor und nach einem Zyklus, sowie nach Belichtung bei 420 nm ist links gezeigt.

Eine Übersicht der Ergebnisse der Schmelzpunktstudien ist in **Tabelle 9** zu finden.

Tabelle 9 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien von **pAzo** und **mAzo** in den Sequenzen:^[a]

DNA1(N¹): 5'-GCA TAA AN¹A AAG GTG-3'

DNA2(N²): 3'-CGT ATT TN²T TTC CAC-5'

N ¹	N ²	T _M [°C]		ΔT _M ^[b]
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	
-	-	50,9 (nativ)		
pAzo	-	51,0	47,6	3,5
pAzo	T	47,1	44,7	2,3
pAzo	C	49,0	46,4	2,6
-	pAzo	45,7	44,6	1,1
T	pAzo	44,3	42,5	1,8
C	pAzo	44,4	42,3	2,2
mAzo	-	49,0	47,1	1,9
mAzo	T	45,2	40,5	4,6
mAzo	C	48,1	44,5	3,6
-	mAzo	48,4	44,7	3,6
T	mAzo	46,2	42,0	4,2
C	mAzo	46,8	42,1	4,8
pAzo	pAzo	48,0	46,4	1,6
pAzo	mAzo	48,7	46,3	2,4
mAzo	pAzo	46,2	46,1	0,1
mAzo	mAzo	49,8	46,7	3,1

^[a] Der Schmelzpunkt des native DNA Duplex ohne die Basen N¹ und N² liegt bei 50.9 °C. ^[b] ΔT_M = T_M(*trans*)-T_M(*cis*). 5 μM, PBS Puffer (pH 7.4). Die Stränge mit N¹,N² = -, T, C wurden von *Biomers* bezogen. Es wurden mindestens drei Zyklen gemessen. Die Fehler betragen weniger als ±0,5 °C.

Der höchste Schmelzpunkt konnte für den Duplex **DNA1(pAzo)/DNA2** im *trans*-Zustand mit 51,0 °C erzielt werden. Dieser ist gleich zu dem Schmelzpunkt des nativen Doppelstranges **DNA1/DNA2** mit 50,9 °C. Das zeigte, dass **pAzo** in **RNA1** bei Verwendung eines „*wedge Motives*“ effizient in den Basenstapel interkalieren konnte, ohne dabei die Stabilität des DNA Doppelstranges zu reduzieren. Allgemein besaß das „*wedge Motiv*“ in allen Serien (mit einem Azobenzol pro Doppelstrang) sowohl im *trans*- als auch im *cis*-Zustand immer den höchsten Schmelzpunkt. Dies könnte bedeuten, dass sowohl das *cis*- also auch das *trans*-Isomer im „*wedge*“ Motiv ohne viel Störung in die Doppelstränge eingebaut werden konnte oder das *cis*-Isomer in einer Furche lokalisiert war und die native Stabilität des Doppelstranges wenig beeinflusste. Die geringfügige Störung der Doppelstränge in der *cis*-Form im „*wedge Motiv*“ führte zu einem geringen (De-)Stabilisationseffekt. Während im Fall von **DNA1(pAzo)** mit dem „*wedge Motiv*“ der höchste (De-)Stabilisationseffekt (ΔT_M = 3,5 °C) erzielt werden konnte, konnten im Falle von **DNA2(pAzo)** (ΔT_M = 1,1 °C), **DNA1(mAzo)**

($\Delta T_M = 2,2 \text{ }^\circ\text{C}$) und **DNA2(mAzo)** ($\Delta T_M = 3,6 \text{ }^\circ\text{C}$) die geringsten ΔT_M -Werte der entsprechenden Serie beobachtet werden. Der Trend, dass der *trans*-Zustand im „wedge Motiv“ zu den höchsten Schmelzpunkten führte, konnte auch für **pAzo** und **mAzo** in RNA beobachtet werden (siehe **Tabelle 4**). Bei diesen Studien konnte lediglich durch die Verwendung einer AP-Stelle höhere Schmelzpunkte vermessen werden. In den Studien von **pAzo** und **mAzo** in DNA wurde auf die Untersuchung mit einer AP-Stelle verzichtet. Im Vergleich mit **pAzo** zeigte **mAzo** immer eine stärkere lichtinduzierte Duplex (De-)Stabilisierung. Somit lagen die durchschnittlichen ΔT_M -Werte bei $2,3 \text{ }^\circ\text{C}$ für **pAzo** und $\Delta T_M = 3,8 \text{ }^\circ\text{C}$ für **mAzo** modifizierte Stränge (mit einem Azobenzol). Der höchste ΔT_M -Wert konnte für den Duplex **DNA1(C)/DNA2(mAzo)** mit $4,8 \text{ }^\circ\text{C}$ erzielt werden. Interessanterweise war diese Kombination auch die effektivste im Falle von RNA. Ähnlich effizient konnten die Doppelstränge **DNA1(mAzo)/DNA2(T)** ($\Delta T_M = 4,6 \text{ }^\circ\text{C}$) und **DNA1(T)/DNA2(mAzo)** ($\Delta T_M = 4,2 \text{ }^\circ\text{C}$) reguliert werden. In RNA zeigten diese Duplexe nur moderate (De-)Stabilisierungseffekte. Die Verwendung von **pAzo** und **mAzo** im „Dimer Motiv“ reduziert allgemein dramatisch die photoinduzierte (De-)Stabilisierung von DNA Doppelsträngen. Der Duplex **DNA1(mAzo)/DNA2(pAzo)** zeigte annähernd keine Veränderung der thermischen Stabilität nach Belichtung ($\Delta T_M = 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). Lediglich für den Duplex **DNA1(mAzo)/DNA2(mAzo)** konnte ein moderater ΔT_M mit $3,1 \text{ }^\circ\text{C}$ erzielt werden. Interessanterweise war bei diesem Duplex der Schmelzpunkt des *trans*-Zustandes ähnlich zu dem des nativen Doppelstranges. Anscheinend konnte **mAzo** im „Dimer Motiv“ effizient in den Duplex integriert werden. In den Studien mit RNA zeigte das „Dimer Motiv“ hingegen durchgehend hohe (De-)Stabilisierungseffekte.

Um **pAzo** und **mAzo** im Kontext von DNA mit dem etablierten **tAzo** Photoschalter zu vergleichen, wurden auch diese Oligonukleotide untersucht. Die Stränge wurden vom Arbeitskreis Asanuma bereitgestellt.

Tabelle 10 Ergebnisse der Schmelzpunktstudien von **tAzo** in den Sequenzen:^[a] **DNA1(N¹)**: 5'-GCA TAA AN¹A AAG GTG-3'

DNA2(N²): 3'-CGT ATT TN²T TTC CAC-5'

N ¹	N ²	$T_M(\text{trans})$	$T_M(\text{cis})$	$\Delta T_M^{[a]}$
tAzo	-	51,8	48,9	2,8
tAzo	T	48,5	44,4	4,1
tAzo	C	50,5	47,3	3,2
-	tAzo	52,5	47,6	4,8
T	tAzo	54,3	50,0	4,3
C	tAzo	45,0	44,0	1,0
tAzo	tAzo	56,2	54,2	1,9

^[a] $\Delta T_M = T_M(\text{trans}) - T_M(\text{cis})$

tAzo zeigt im *trans*-Zustand im „Dimer Motiv“ den höchsten Schmelzpunkt ($T_M = 56,2 \text{ °C}$), welcher deutlich über dem Schmelzpunkt des nativen Duplex ($T_M = 50,9 \text{ °C}$) liegt. Der flexible D-Threoninol-Linker erlaubt dabei vermutlich eine effiziente Interkalation des Azobenzol Chromophors in den Basenstapel und kann somit die Stabilität des Doppelstranges erhöhen. Da im „Dimer Motiv“ aber auch der *cis*-Zustand einen hohen Schmelzpunkt hat, ist der gesamte lichtinduzierte (De-)Stabilisierungseffekt eher gering ($\Delta T_M = 1,9 \text{ °C}$). Während mit **DNA2(tAzo)** der höchste aller ΔT_M -Wert mit dem „wedge Motiv“ erzielt werden konnte ($\Delta T_M = 4,8 \text{ °C}$), war im Falle von **DNA1(tAzo)** das „wedge Motiv“ die ungünstigste Kombination und ergab in dieser Serie den niedrigsten ΔT_M -Wert ($2,8 \text{ °C}$). Obwohl das „wedge Motiv“ das am meistens verwendete Motiv von **tAzo** ist, scheint dessen Effizienz doch stark sequenzabhängig zu sein.

Auffällig ist auch, dass die extrem hohen ΔT_M -Werte (z.B. 14 °C) aus der Literatur von Asanuma et al.^[194] hier nicht bestätigt werden konnten. Ob das an den Sequenzen, der Länge der DNA liegt oder den experimentellen Bedingungen bleibt ungeklärt. **tAzo** wurde zum Beispiel in einem 8-mer zusätzlich in der Mitte eingebaut und zeigte einen ΔT_M -Wert von $14,3 \text{ °C}$.^[194] Selbstverständlich ist der Effekt der (De-)Stabilisierung bei einer kürzeren Nukleinsäure stärker, da die Isomerisierung die in der Nähe befindlichen Basen stärker beeinflusst, als die weiter entfernten und somit der Gesamteffekt stärker ist. Zusätzlich mussten in der hier vorliegenden Studie die Doppelstränge mit **tAzo** auf 85 °C erwärmt und wiederholt mit UV-Licht bestrahlt werden, jedoch konnte trotzdem nicht in allen Fällen eine vollständige Isomerisierung erreicht werden.

Im Vergleich der (De-)Stabilisierungseffekte von **pAzo** und **mAzo** mit **tAzo** (siehe Tabelle 11) zeigt sich, dass **mAzo** eine höhere durchschnittliche Destabilisierung hat als **tAzo** ($\Delta T_M \emptyset(\mathbf{mAzo}) = 3,7 \text{ °C}$ und $\Delta T_M \emptyset(\mathbf{tAzo}) = 3,2 \text{ °C}$). **pAzo** zeigt den geringsten Effekt mit $\Delta T_M \emptyset(\mathbf{pAzo}) = 2,2 \text{ °C}$. Die höchsten Destabilisierungseffekte nach *trans*-zu-*cis* Isomerisierung von **tAzo** und **mAzo** sind ähnlich und wurden für **DNA1(C)/DNA2(mAzo)**, **DNA1(mAzo)/DNA2(T)** und **DNA1/DNA2(tAzo)** mit $\Delta T_M = 4,6\text{-}4,8 \text{ °C}$ gemessen.

Tabelle 11 Vergleich der Duplex Destabilisierungseffekte nach *trans*-zu-*cis* Isomerisierung von **pAzo**, **mAzo** und **tAzo** im Duplex **DNA1(N¹)/DNA2(N²)**.

N ¹	N ²	$\Delta T_M^{[b]}$ (Azo=pAzo)	$\Delta T_M^{[a]}$ (Azo=mAzo)	$\Delta T_M^{[a]}$ (Azo=tAzo) ^[b]
Azo	-	3,5	1,9	2,8
Azo	T	2,3	4,6	4,1
Azo	C	2,6	3,6	3,2
-	Azo	1,1	3,6	4,8
T	Azo	1,8	4,2	4,3
C	Azo	2,2	4,8	1,0
Azo	Azo	1,6	3,1	1,9
	∅	2,2	3,7	3,2

^[a] $\Delta T_M = T_M(\text{trans}) - T_M(\text{cis})$; ^[b] Die **tAzo** modifizierten Stränge wurden von der Arbeitsgruppe Asanuma bereitgestellt.

Wie in Kapitel 1.4.4 und 3.2.2.1 beschrieben ist die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung von **tAzo** im Duplex bei Raumtemperatur nur beschränkt möglich. Um zu untersuchen, ob eine Isomerisierung von **pAzo** und **mAzo** im DNA Duplex vollständig möglich ist und dies mit **tAzo** zu vergleichen wurde das temperatur- und bestrahlungszeitabhängige Isomerisierungsverhältnis bestimmt. Da die (De-)Stabilisierungseffekte mit Azobenzolen in **DNA2** effektiver waren, wurden diese im „wedge Motiv“ untersucht. Um die *cis*-Verhältnisse zu bestimmen wurde versucht Reinspektren der *cis*- und *trans*-Photoisomere im DNA Duplex aufzunehmen. Analog zu den Studien von **pAzo** und **mAzo** im DNA und RNA Einzelstrang und RNA Duplex, wurde versucht die Isomere in der AE-HPLC zu trennen und die entsprechenden Reinspektren aufzunehmen. Dafür wurde zuvor ein Teil der injizierten Probe mit UV-Licht bestrahlt, um das *cis*-Isomer anzureichern. Für die **pAzo** und **mAzo** modifizierten Doppelstränge **DNA1/DNA2(pAzo)** und **DNA1/DNA2(mAzo)** konnten keine hinreichenden Trennungen erreicht werden, weshalb mit diesen Doppelsträngen das *cis*-Verhältnis nicht bestimmt werden konnte. Die vollständige Isomerisierung wurde bei diesen Doppelsträngen anhand der relativen Absorptionsänderung bestimmt. Für den **tAzo** modifizierten Duplex (**DNA1/DNA2(tAzo)**) konnten die Isomere getrennt werden (siehe **Abb. 138**), sodass in diesem Fall das *cis*-Verhältnis anhand **Formel 1** bestimmt werden konnte.

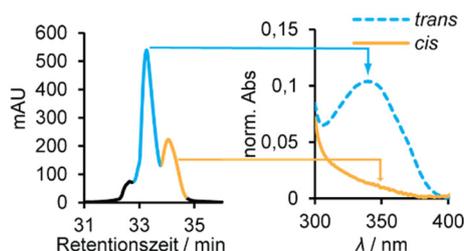


Abb. 138 AE-HPLC Chromatogramm von **DNA1/DNA2(tAzo)** zur Trennung der *cis* (orange) und *trans* (blau) Isomere (links). Die entsprechenden UV/vis Absorptionsspektren der Isomere (rechts). Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt ($\lambda = 248 \text{ nm}$) auf eins normiert.

Als Ausgangspunkt wurden die Doppelstränge bei 75 °C mit UV- oder sichtbarem Licht bestrahlt. Da diese Temperatur deutlich über der Schmelztemperatur des Doppelstranges (50,9 °C) liegt, sollte dies eine vollständige Isomerisierung ermöglichen. Die Stränge wurden auch während des Abkühlens bestrahlt um eine thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation weitestgehend zu verhindern. Alle Duplexe konnten bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht ($\lambda = 420 \text{ nm}$, 300 mW) bei Raumtemperatur innerhalb von 60 Sekunden in einen photostationären Zustand (*trans*-Isomer) überführt werden, welcher sich auch nach zusätzlicher Bestrahlung für fünf Minuten bei 75 °C nicht mehr änderte (siehe **Abb. 139**, rote Linie).

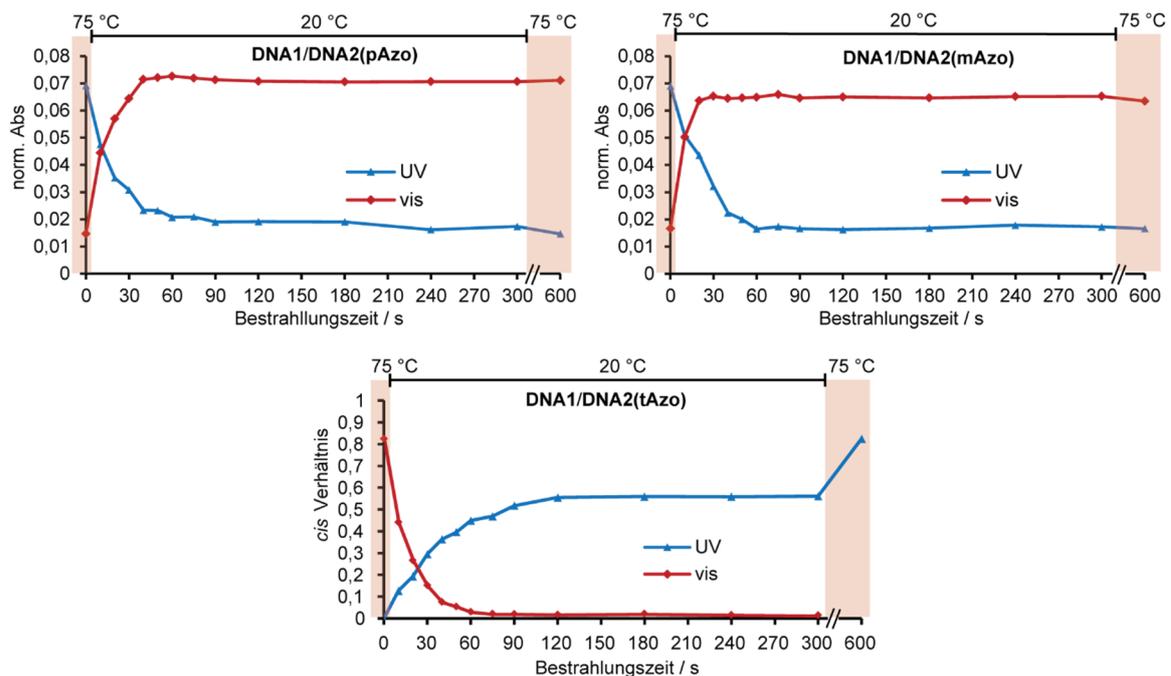


Abb. 139 Temperatur- und bestrahlungszeitabhängige *cis*-zu-*trans* (rote Linie) und *trans*-zu-*cis* (blaue Linie) Isomerisierung von **DNA1/DNA2(pAzo)**, **DNA1/DNA2(mAzo)** und **DNA1/DNA2(tAzo)**. Vor der jeweiligen Messung wurden die Duplexe durch Bestrahlung mit UV- oder sichtbarem Licht in einen photostationären Zustand der *cis*- und *trans*-Isomere überführt, welcher sich durch weitere Bestrahlung nicht mehr änderte. Ausgehend von diesem Zustand wurden die Proben 300 s bei Raumtemperatur bestrahlt und nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 180 und 300 s wurden UV/Vis Absorptionsspektren aufgenommen. Im Anschluss der Messungen wurden die Duplexe weitere 300 s bei 75 °C mit UV- oder vis-Licht bestrahlt. Die Spektren wurden am isosbesitischen Punkt auf 1 normiert. Das *cis*-Verhältnis im Falle von **DNA1/DNA2(tAzo)** wurde anhand **Formel 1** bestimmt. Die hellroten Kästen symbolisieren, dass in diesen Bereichen bei 75 °C bestrahlt wurde.

Diese vollständige temperaturunabhängige *cis*-zu-*trans* Isomerisierung wurde bereits für die RNA modifizierten Duplexe beobachtet und von Asanuma *et al.*^[194] für **tAzo** im Kontext von DNA. Die **pAzo**- und **mAzo**-modifizierte Stränge konnten auch durch die Bestrahlung mit UV-Licht in einen photostationären Zustand überführt werden, welcher sich nicht weiter durch Bestrahlung bei erhöhter Temperatur änderte. Die fehlenden Reinspektren verhindern eine exakte Quantifizierung des Isomerisierungsverhältnisses. Trotzdem wird aufgrund der sehr niedrigen Absorption bei 332 nm von einer *trans*-zu-*cis* Isomerisierung ausgegangen, bei der mehr als 90% in der *cis*-Form vorliegen. Im Gegensatz dazu, konnte bei Raumtemperatur der Duplex **DNA1/DNA2(tAzo)** nur zu 55% in die *cis*-Form isomerisiert werden.

Erst die Bestrahlung für weitere fünf Minuten bei 75 °C erlaubte eine vollständige *trans*-zu-*cis* Isomerisierung.

Diese Ergebnisse sind ähnlich zur Literatur, in denen z.B. Asanuma *et al.*^[203] nur 20-40% des *cis*-Isomers durch Bestrahlung bei 37 °C anreichern konnten. Durch mehrfachen Einbau von **tAzo** konnte zwar die Hybridisierung bei Raumtemperatur reversibel gesteuert werden, obwohl diese nur zu 40% nach *cis* isomerisierten.^[338] Allerdings mussten dazu 14 **tAzo** Modifikationen im „*interstrand wedge* Motiv“ in einem 10mer DNA Duplex verwendet werden. Durch die hohe Anzahl an Modifikationen und die Notwendigkeit diese in den Vorwärts- und Rückwärtsstrang einzubauen, nimmt die Spezifität der Nukleinsäure stark ab und schränkt somit eine Anwendung im biologischen Kontext ein. Ginger *et al.*^[212] untersuchten die Sequenzabhängigkeit der Isomerisierungsquantenausbeute von **tAzo**. Sie zeigten, dass der Einbau von **tAzo** in ssDNA zu einer 40%ig und im Doppelstrang sogar um 94%ig verminderten Quantenausbeute führte. Eine AP-Stelle gegenüber **tAzo** oder eine Fehlpaarungsstelle führte zu einer zwei- bis dreifach besseren Quantenausbeute. Daraus konnte Ginger folgern, dass der Schmelzpunkt eines Doppelstranges, sowie sterischer Anspruch die *trans*-zu-*cis* Photoisomerisierungseffizienz beeinflusst. Dies wurde mit einem Hula-Twist- bzw. Rotations-Isomerisierungsmechanismus begründet, der viel Platz benötigt^[213] (Diskussion dazu siehe **Abb. 33** und Ende von 1.4.4 sowie Ende von 3.2.2.1). Liang *et al.*^[215] verwendeten einen Glycol-basierten Linker (**gAzo**, siehe **Abb. 29**) für die lichtinduzierte Regulation der Duplexstabilität bei Raumtemperatur. Sie zeigten, dass die *trans*-zu-*cis*-Isomerisierung bei Raumtemperatur in einem 20nt Doppelstrang zu 75% erfolgte. Durch den Einbau von neun **gAzo** Photoschaltern in ein 20mer DNA Doppelstrang im „*wedge* Motiv“ konnten bei Raumtemperatur 70% eines Doppelstranges reversibel hybridisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie und der Vergleich mit der Literatur zeigen erneut, dass der Linker eine entscheidende Rolle in der reversiblen Lichtregulation der Duplexstabilität spielt.

In fortsetzenden Studien könnte der Einfluss der Basen neben dem Azobenzol und neben der gegenüberliegenden Base untersucht werden. Weiterhin könnte überprüft werden, ob eine gegenüberliegende Purinbase, wie angenommen, tatsächlich die Effizienz verringert. Dies würde Aufschluss darüber geben, an welcher Position **mAzo** und **pAzo** die höchste Effektivität besitzen. Auch die Untersuchung von kooperativen Effekten wäre sehr interessant, um die notwendige Anzahl der Azobenzole zu bestimmen, die das reversible Dissoziieren und Assoziieren eines Duplexes bei Raumtemperatur erlauben würden.

3.2.4 Neue Generation von Azobenzol C-Nucleosiden

Die chemische Synthese von **pAzo** und **mAzo** hat zwei Nachteile: Ersten können unter diesen Bedingungen nur Desoxyribo-C-Nucleoside erhalten werden. Mit einem anderen Syntheseweg soll auch der Zugang zu 2'OH- oder 2'OMe-substituierten Azobenzol C-Nucleosiden (**2'OH pAzo**, **2'OH-mAzo**, **2'OMe-pAzo**, **2'-OMe-mAzo**; siehe **Abb. 141** und **Abb. 142**) möglich sein. Dies sollte in fortsetzenden Studien den Einfluss von Substituenten am Linker auf die reversible, lichtgesteuerte Hybridisierung von Nucleinsäuren ermöglichen. Möglicherweise könnte durch die Verwendung des passenden Linkers zur verwendeten Nucleinsäure noch weniger Störung der helikalen Struktur der Nucleinsäure erzielt werden (z.B. durch die C2'-endo oder C3'-endo-Konformation des Linkers). Zweitens ist ein Problem bei der Synthese der Azobenzol C-Nucleoside **pAzo** und **mAzo** das Hochskalieren des Reaktionsansatzes. Dabei ist die Palladium-katalysierte Heck-Kreuzkupplung der limitierende Schritt. Ein reines Hochskalieren der verwendeten Reagenzien lieferte nicht mehr Ausbeute. Es erwies sich am effektivsten zwischen 200 und 400 mg des Glycals **97** einzusetzen. Es wurde auch versucht die Synthese in der Mikrowelle durchzuführen. Reaktion in der Mikrowelle haben oft kürzere Reaktionszeiten, wodurch der Durchsatz erhöht werden könnten.^[341] Doch auch unter diesen Bedingungen konnte nur ein sehr geringer Umsatz beobachtet werden.

C-Nucleoside lassen sich auf mehrere Weisen herstellen.^[342] Neben der Heck-Kupplung mit dem Glycal können C-Nucleoside auch unter anderem mit einem Hoff'schen Chlorzucker **106** oder mit einem Ribonolacton **107** hergestellt werden.

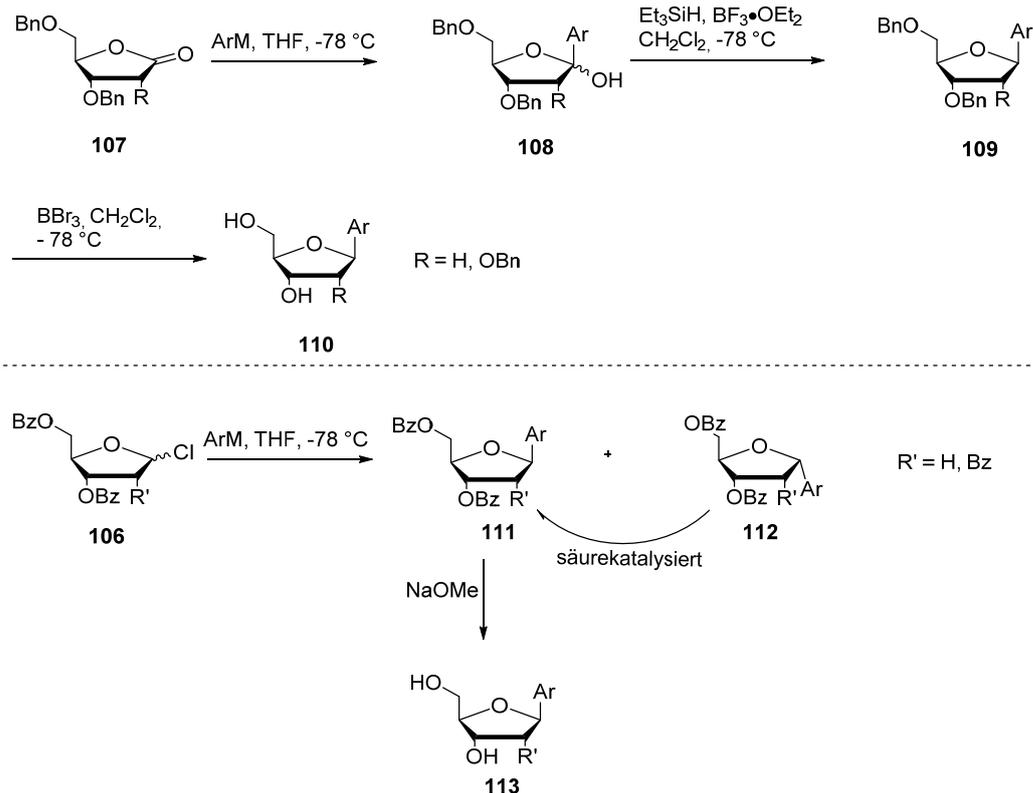


Abb. 140 Synthesewege zur Darstellung von C-Nucleosiden. Nucleophile Addition eines Metallaryls mit einem Ribonolacton **107** (oben). Nach der nucleophilen Addition mit dem Metallaryl wird das entstehende Halbacetal mit Triethylsilan und Bortrifluoriddiethyletherat reduziert. Im letzten Schritt werden die Benzyl-Schutzgruppen mit BBr_3 entfernt. Alternativ kann dies auch hydrogenolytisch durchgeführt werden. Die Umsetzung eines Hoff'schen Chlorozucker-Derivates **106** mit einem Metallaryl ist unten gezeigt. Säurekatalysiert durch Epimerisierung kann das β -Anomer angereichert werden. Nach basischer Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppen wird das C-Nucleosid **113** erhalten.

3.2.4.1 Syntheseübersicht von 2'-OH-pAzo und 2'-OH-mAzo und deren Derivatisierung

Da die Synthese mit dem Hoff'schen Chlorozucker häufig nicht selektiv zum β -Anomer führt,^[342] wurde die Synthese mit dem Ribonolacton durchgeführt.

Die Synthese von 2'-OH-pAzo und 2'-OH-mAzo startete ausgehend von Iodazobenzol **114**, welches nach Lithierung **115** an ein 1,4-Ribonolacton **116** addiert. Nach Deoxygenierung **118** und Abspaltung der benzylischen Schutzgruppen sollten 2'-OH-pAzo und 2'-OH-mAzo erhalten werden.

Ein Vorteil dieser Syntheseroute ist, dass 2'-OH-pAzo und 2'-OH-mAzo in wenigen Schritten derivatisiert werden könnten (siehe **Abb. 142**). Durch Methylierung der 2'-OH Gruppe könnte ein Methoxy-RNA Linker **120** hergestellt werden. In Anlehnung an Marx *et al.*^[343] könnte durch eine *Barton-McCombie* Deoxygenierung^[344] der 2'-OH Gruppe ein Desoxyribose-Linker **119** erhalten werden.

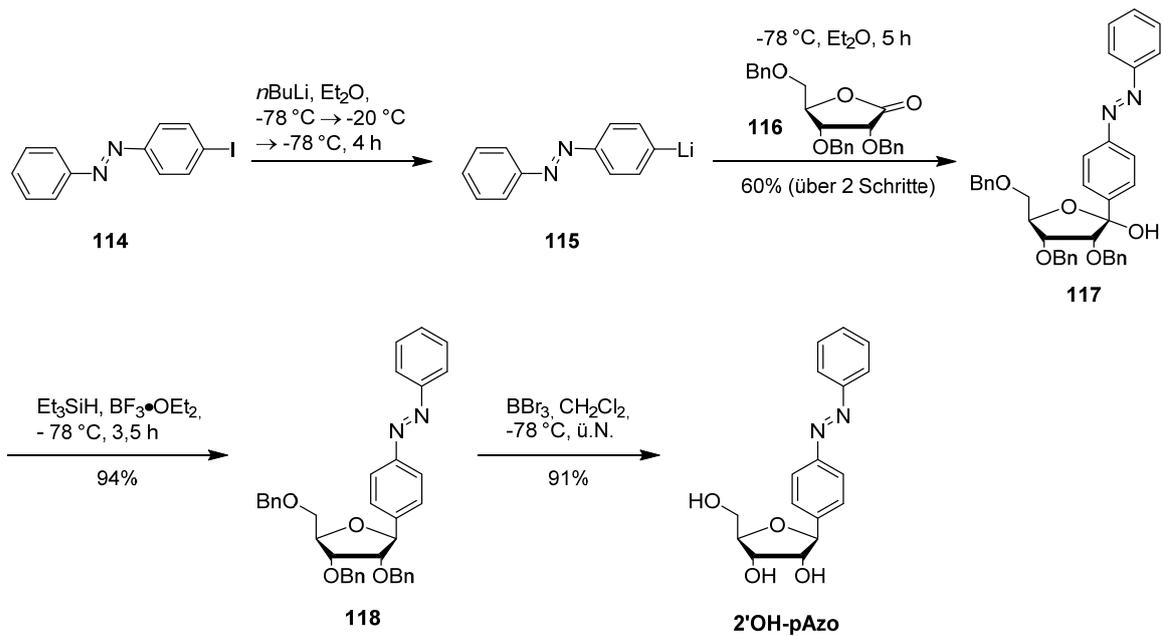


Abb. 141 Syntheseübersicht zur Darstellung von **2'OH-pAzo**. Durch ein Metall-Halogen-Austausch von *p*-Iodazobenzol **114** und *n*BuLi wurde Lithiumazobenzol **115** erhalten.^[345] Dieses wurde *in situ* mit dem Benzylgeschützten Ribonolacton **116** zum Halbacetal **117** umgesetzt. Reduktion mit Triethylsilan und Bortrifluoriddiethyletherat ergab **118**. Die Entfernung der Benzyl-Schutzgruppen mit BBr_3 liefert **2'OH-pAzo**.

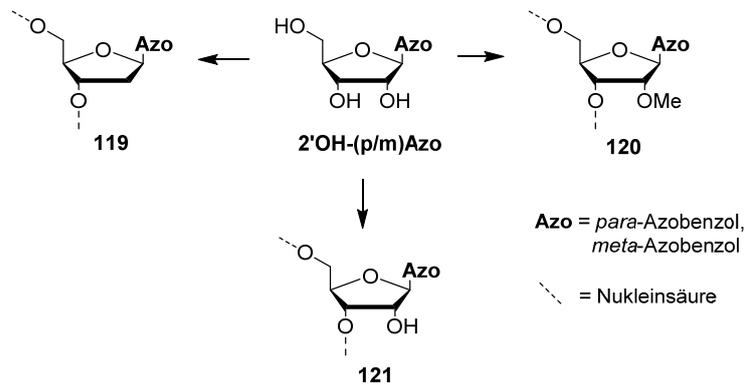


Abb. 142 Derivatisierungsoptionen von **2'OH-Azo** (**Azo** = **pAzo**, **mAzo**). Die 2'-OH-Gruppe der Ribose könnte in einer *Barton-McCombie* Reaktion^[344] mit Tributylzinnhydrid und AIBN zu **pAzo** oder **mAzo** deoxygeniert werden (in Anlehnung an Marx *et al.*^[343]; eventuell zuvor Schutzgruppen-Strategie notwendig) und unter den in Kapiteln 1.5 und 3.2.3.1 genannten Bedingungen in Nukleinsäuren eingebaut werden. Zusätzlich könnte durch Methylierung (mit z.B. Methyljodid) 2'OMe-RNA Nucleotide erhalten werden.

3.2.4.2 Synthese von 2'OH-pAzo und 2'OH-mAzo

Die Synthese von **2'OH-pAzo** und **2'OH-mAzo** startet ausgehend von 4-Iodazobenzol **114** bzw. 3-Iodazobenzol **119**. Diese wurden mit *n*BuLi in einem Lithium-Halogen-Austausch zu den Lithiumazobenzolen **115** und **120** umgesetzt. Metall-Halogen-Austausche am Azobenzol sind problematisch, da Organolithiumverbindungen an die Azo-Gruppe addieren können, wodurch mehrfach substituierte Hydrazine entstehen können.^[346] Kawashima *et al.*^[347] lithiierten Azobenzole bei Temperaturen von -105 °C in THF, während Dötz *et al.*^[348] beschrieben, dass bei der Verwendung von THF Reduktionen der Azo-Gruppe auf-

traten und empfahlen die Verwendung von Diethylether als Lösungsmittel.^[348] Da unter diesen Bedingungen von Dötz *et al.*^[348] jedoch nur ein geringer Umsatz beobachtet werden konnte, wurden die Synthesbedingungen von Hanaya *et al.*^[345] verwendet. Die Lithiierung des Iodazobenzols mit *n*BuLi erfolgte bei -78 °C, wobei das Reaktionsgemisch kurzzeitig auf -20 °C erwärmt wurde, um einen vollständigen Umsatz zu garantieren. Da der weitere Umsatz vom Lithiumazobenzol bei niedriger Temperatur durchgeführt werden sollte, wurde das Lithiumazobenzol erneut auf -78 °C gekühlt. Um eine möglichst inerte Atmosphäre zu garantieren, wurde das Lithiumazobenzol mit einer Doppelnadel zum 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo-1,4-lacton **116** bei -78 °C überführt. Durch das Justieren von Vakuum und Argon-Überdruck wurde ein ständiges Fließen der Lösung garantiert, da ansonsten die Kanüle schnell verstopfte. Die Produkte **117** und **121** wurden in 60% und 53% Ausbeute über zwei Schritte erhalten.

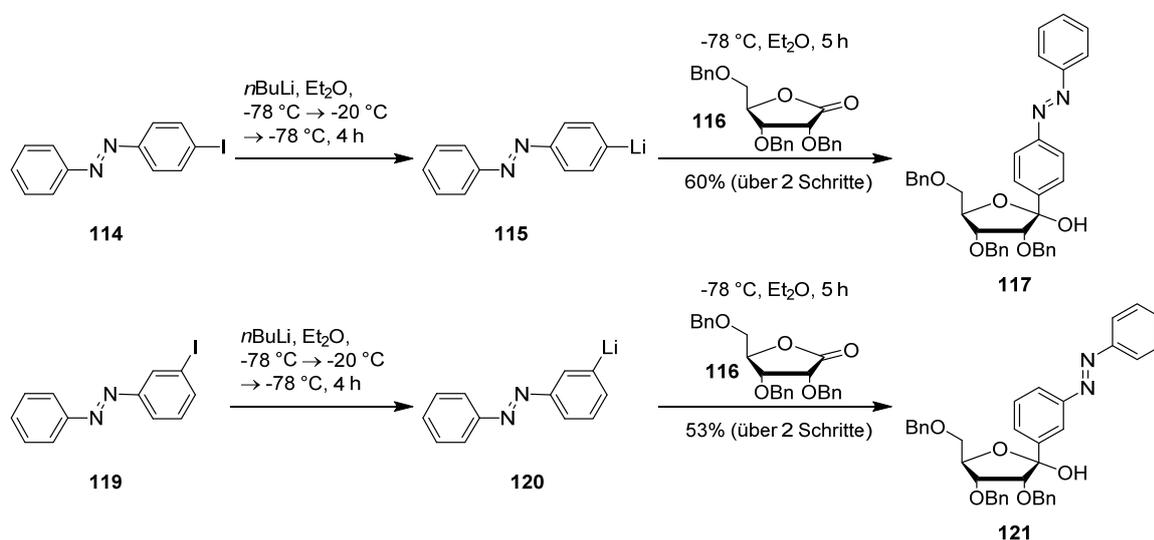
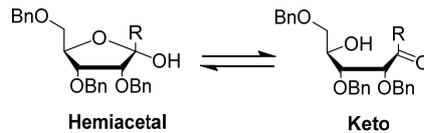


Abb. 143 Lithiierung von Iodazobenzol **114** und **119** mit *n*BuLi nach Hanaya *et al.*^[345] bei -78 °C → -20 °C (links). Die Umsetzung vom Benzyl-geschütztem 1,4-Ribonolacton **116** mit Lithiumazobenzol **115** und **120** bei -78 °C in Et₂O für 5 h. Die Gesamtausbeute beider Schritte betragen 60% für **117** und 53% für **120**.

Das instabile Halbacetal kann im Gleichgewicht zwischen offener (Keto) und geschlossener (Halbacetal) Form vorliegen.^[342] Im Falle von sehr elektronenreichen Aryl-Verbindungen wird häufig die Keto-Form als die stabil vorliegende erhalten.^[349] Bei der Addition von *meta*- und *para*-Azobenzol wurde nur das Halbacetal isoliert. Entscheidend ist zusätzlich die Stereoselektivität, um selektiv das β -Anomer zu erhalten. Die Selektivität ist abhängig von dem Aryl und besonders von den Schutzgruppen am 1,4-Ribonolacton.^[342,350,351] Bei der Verwendung von Benzyl-Schutzgruppen wird (fast) ausschließlich (meist >99%) das β -Anomer erhalten. Auch in diesen Studien wurde stereoselektiv das β -Anomer erhalten. Der Nachweis wurde von Nikolai Grebenovsky durchgeführt und erfolgte durch ROESY-NMR-Spektroskopie anhand der Verbindungen **2'OH-mAzo** und **2'OH-pAzo** (Daten nicht gezeigt).


Abb. 144 Hemiactal/Keto Gleichgewicht.^[342,349]

Die Reduktion des Halbacetals wurde unter milden Reduktionsbedingungen mit Triethylsilan und der starken Lewis-Säure Bortrifluoriddiethyletherat durchgeführt. Dadurch sollte eine Reduktion der Azo-Funktion verhindert werden.

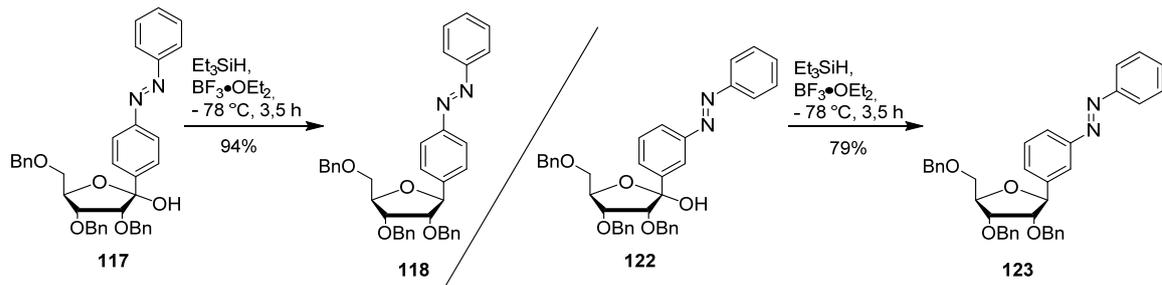


Abb. 145 Deoxygenierung von **117** und **122** zu **118** und **123** mit Triethylsilan und Bortrifluoriddiethyletherat. Die Synthese von **123** wurde von Nikolai Grebenovsky in einer von Autor dieser Arbeit betreuten Masterarbeit durchgeführt.

Es wurde zudem gezeigt, dass die Deoxygenierung mit Triethylsilan und Bortrifluoriddiethyletherat ohne vorherige säulenchromatographische Aufreinigung von **118** in annähernd gleichen Ausbeuten erhalten werden kann. Die Synthese von **2'OH-mAzo** wurde ab Verbindung **123** von Nikolai Grebenovsky in einer vom Autor dieser Arbeit betreuten Masterarbeit fertiggestellt und unter Anderem im Folgenden hier aufgeführt. Die Abspaltung der benzylicchen Schutzgruppen erfolgte nicht hydrogenolytisch mit Pd/C und H₂, da unter diesen Bedingungen die Azo-Funktion reduziert werden kann.^[352,353] Stattdessen wurden die Schutzgruppen in einer Etherspaltungsreaktion mit BBr₃ bei -78 °C entfernt. **2'OH-pAzo** und **2'OH-mAzo** wurden in Ausbeuten von 94% und 81% erhalten. Die Synthese von **2'OH-mAzo** wurde analog zu der oben beschriebenen von Nikolai Grebenovsky durchgeführt (siehe **Abb. 146**).

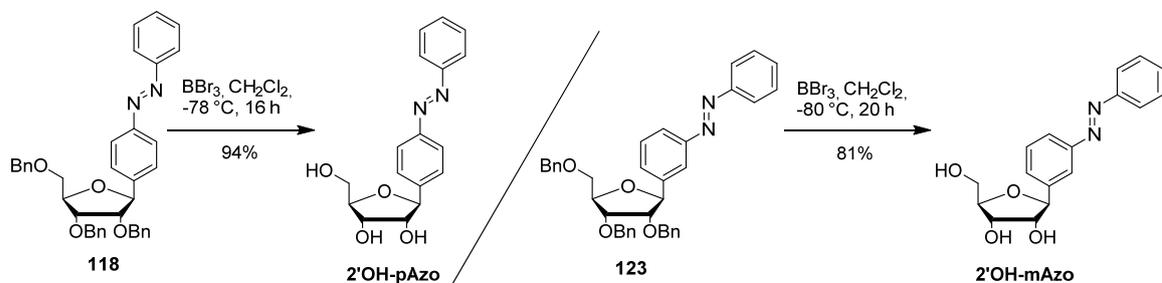


Abb. 146 Synthese von **2'OH-pAzo** (links) und **2'OH-mAzo** (rechts). Die Abspaltung der benzylicchen Schutzgruppen erfolgte mit BBr₃ in CH₂Cl₂ bei -78 °C (bzw. -80 °C) über Nacht in 94% (**2'OH-pAzo**) und 81% (**2'OH-mAzo**) Ausbeute. Die Synthese von **2'OH-mAzo** wurde von Nikolai Grebenovsky in einer vom Autor dieser Arbeit betreuten Masterarbeit durchgeführt.

Die Verwendung von **2'OH-pAzo** und **2'OH-mAzo** für den enzymatischen Einbau in RNA ist in Kapitel 4.2.5 beschrieben.

3.2.4.3 Synthese von **2'OMe-pAzo** und **2'OMe-mAzo** und die Verwendung von **2'OMe-mAzo** zur Lichtregulation von DNA Nanoarchitektur

In fortsetzenden Studien wurden **2'OH-mAzo** und **2'OH-pAzo** zum 2'-Methoxy-Derivat umgesetzt. Methoxy-RNA besitzt eine höhere Stabilität verglichen mit RNA und benötigt weniger spezielle Handhabung, was eine Anwendung im Bereich der DNA Nanoarchitektur erleichtert.

Zur Synthese von 2'-O-Methyl-substituierten Nukleosiden werden in der Literatur häufig die ungeschützten Nukleoside mit Natriumhydrid und Methyljodid bei 0 °C umgesetzt.^[354–356] Da die primäre 5'-OH-Gruppe häufig die reaktivste Gruppe ist, wurde in dieser Arbeit zuerst die 5'-OH Gruppe mit DMTrCl in Pyridin trityliert. Da dies ohnehin die nachfolgende Reaktion wäre, sollte dadurch ohne zusätzliche Syntheseschritte die Regioselektivität der Methylierung verbessert werden. Bei der nachfolgenden Umsetzung mit Natriumhydrid und Methyljodid wurde ein 2' & 3'-O-Methyl-Regiosomerengemisch (**125**, **126**) erhalten, welches nicht durch klassische Säulenchromatographie getrennt werden konnte. Die Synthese von **2'OMe-pAzo** und dessen Anwendung wurde von Nikolai Grebenovsky nicht weiterverfolgt, da **mAzo** in den vorhergehenden Studien effektivere Duplex (De-)Stabilisierungen zeigte.

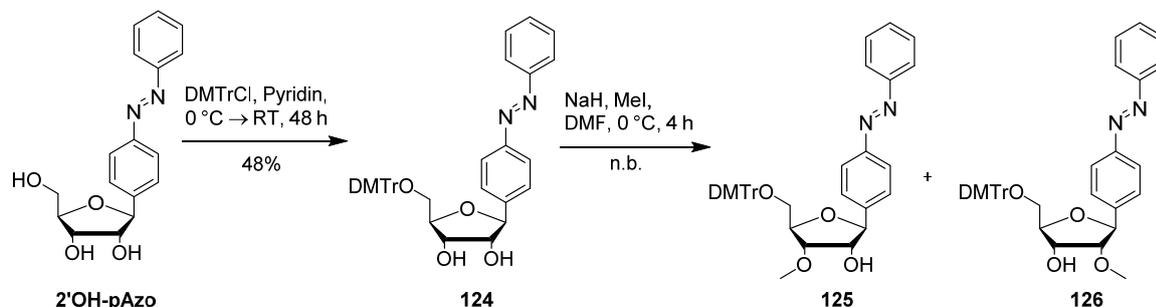


Abb. 147 Reaktionsschema zur Darstellung von **125**. Umsetzung von **2'OH-pAzo** mit DMTrCl in Pyridin ergab **124** in 48% Ausbeute. Bei der Methylierung von **124** mit Methyljodid zum 2'OMe-Derivat **125** wurde ein Gemisch aus den 2' und 3'-Regiosomeren erhalten.

2'OMe-mAzo wurde von Nikolai Grebenovsky in einer vom Autor dieser Arbeit betreuten Masterarbeit hergestellt (siehe Publikation^[322] für die Beschreibung der Synthesen) und im Folgendem hier kurz aufgeführt. Wie sich in den vorhergehenden Studien gezeigt hat, kann mit **mAzo** meist effektiver eine lichtinduzierte Hybridisierung kontrolliert werden. Die Synthese von **2'OMe-mAzo** (siehe **Abb. 148**) erfolgt in Anlehnung zu der Darstellung von **2'OMe-pAzo**. Zuerst wurde an der 5'-OH-Gruppe selektiv zu **127** trityliert. Anstatt mit Methyljodid wurde **127** mit Dimethylsulfat umgesetzt, wobei ein nicht trennbares 2' & 3'-Regiosomeren-Gemisch (**128**, **129**) erhalten wurde. Nach Entfernen der DMTr-Schutzgruppe

mit SSA (*silica sulfuric acid*, auf Kieselgel adsorbierte Schwefelsäure) konnte eine Trennung der Regioisomere per Säulenchromatographie erreicht werden. Nach erneuter Tritylierung der 5'-OH Gruppe, wurde die 3'-OH Gruppe im letzten Schritt unter Standardbedingungen zum Phosphoramidit **130** umgesetzt.

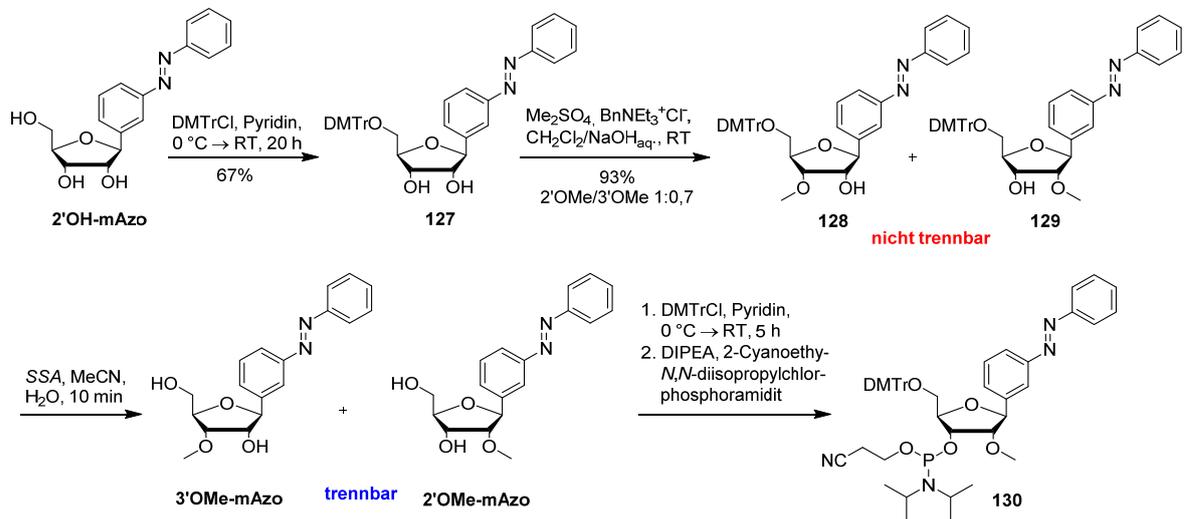


Abb. 148 Syntheseübersicht zur Darstellung vom DMTr-geschütztem Phosphoramidit von **2'OMe-mAzo** **130**. Die Synthesen wurden von Nikolai Grebenovsky durchgeführt.

Die Verwendung von **2'OMe-mAzo** für die Regulation von DNA Nanoarchitektur wurde vom Autor dieser Arbeit ausgearbeitet und von Nina Deussner in einer vom Autor dieser Arbeit betreuten Masterarbeit etabliert und von Nikolai Grebenovsky im Rahmen einer Doktorarbeit fortgeführt.

2'OMe-mAzo wurde von Nikolai Grebenovsky für eine lichtinduzierte Regulation von DNA-Ring-Dimerisierung verwendet. Das Schema der Dimerisierung ist in **Abb. 149** dargestellt. Die zu dimerisierenden DNA-Ringe bestehen aus einem inneren Ring (schwarz). An diesen hybridisieren die äußeren Ringe (pink, blau, gelb, türkis), wobei der pinke und türkise Strang einen Überhang haben, die miteinander hybridisieren können. Der türkise Strang hat einen größeren Überhang, wodurch bei Hybridisierung die Ringe dimerisieren. Im türkisen Strang sind Azobenzole eingebaut. Im *trans*-Zustand sollte eine Dimerisierung stattfinden, während im *cis*-Zustand einzelne Ringe vorliegen sollten.

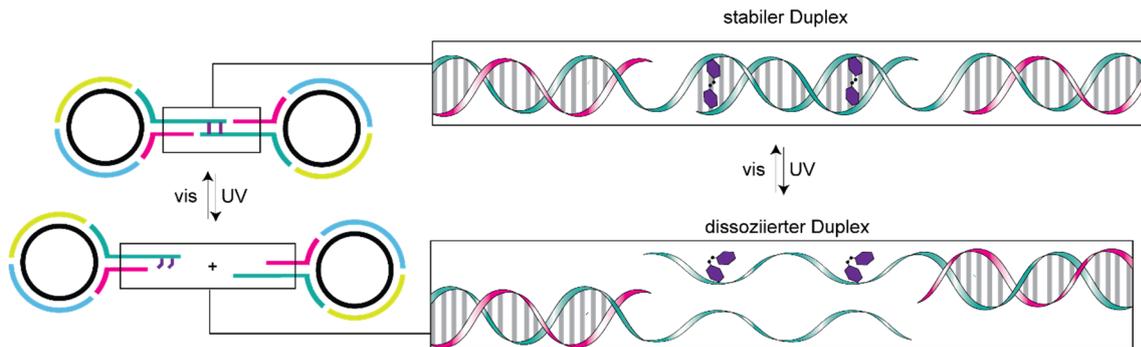


Abb. 149 Schematische Darstellung von lichtregulierter Dimerisierung von DNA-Ringen ist links und ein vergrößerter Ausschnitt der lichtinduzierten Dimerisierung durch Duplexbildung ist rechts gezeigt. Zwei Azobenzole C-Nukleoside (für **tAzo** vier) sind in einem der hybridisierenden Stränge (türkis) eingebaut. Im *trans*-Zustand wird ein stabiler Duplex gebildet und die Ringe dimerisieren. Durch Bestrahlung mit UV-Licht und der damit einhergehenden *trans*-zu-*cis* Isomerisierung wird der Duplex destabilisiert und die Ringe dissoziieren. Die Ringe bestehen aus einem inneren Ring (schwarz) und äußeren Strängen (gelb, hellblau, pink, türkis), die an den inneren Ring hybridisiert sind.

In der Studie wurden verschiedene Azobenzole (siehe **Abb. 150**) eingebaut und ihre Effizienz zur lichtinduzierten Dimerisierung verglichen (siehe **Abb. 151**).

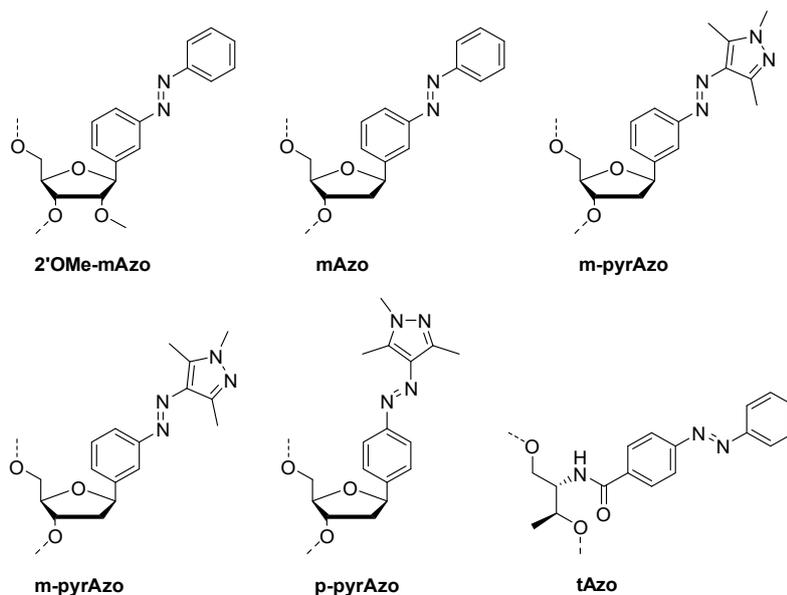


Abb. 150 Azobenzol C-Nukleoside und **tAzo**, die in einer vergleichenden Studie zur Regulation der Dimerisierung von DNA Ringen verwendet wurden. Die Studie wurde von Nikolai Grebenovsky durchgeführt.

Da der hybridisierende Überhang der DNA-Ringe nur ein 10mer ist, konnte mit dem unmodifizierten Duplex nur 44% Dimerisierung erreicht werden. Der Einbau von vier **tAzo** im „wedge Motiv“ steigerte die Dimerisierungsrate auf 51% im *trans*-Zustand. Nach UV-Bestrahlung wurde die Dimerisierungsrate auf 38% reduziert ($\Delta_{\text{Dimerisierung}} = 13\%$; $\Delta_{\text{Dimerisierung}} = \text{Dimerisierung}(\text{trans}) - \text{Dimerisierung}(\text{cis})$). Durch den Einbau von zwei **2'OMe-mAzo** gegenüber einer AP-Stelle im „Displacement Motiv“ wurde die Dimerisierungsrate im *trans*-Zustand auf 39% erniedrigt. Im *cis*-Zustand waren nur noch 11% dimerisiert ($\Delta_{\text{Dimerisierung}} = 28\%$). Am effektivsten ließ sich die Dimerisierungsrate mit **mAzo**, **p-pyrAzo** und **m-pyrAzo** regulieren. Im *trans*-Zustand dimerisierten 39-40% der Ringe. Dies ist nur etwas weniger als im nativen Duplex (44%). Dies war nicht unerwartet, da in den Studien in Abschnitt

3.2.3.3 auch für den Einbau von **mAzo** eine leichte Destabilisierung des Doppelstranges beobachtet werden konnte. Im *cis*-Zustand sank die Dimerisierungsrate auf 4-9% ($\Delta_{\text{Dimerisierung}} = 30\text{-}36\%$). Bei den Ergebnissen ist zu beachten, dass die Belichtung bei 20 °C durchgeführt wurde. Wie zuvor experimentell bewiesen, können die Azobenzol C-Nukleoside (**pAzo** und **mAzo**) im DNA Duplex vollständig von *trans*-zu-*cis* isomerisieren, während **tAzo** Bestrahlungstemperaturen über dem Schmelzpunkt benötigt.

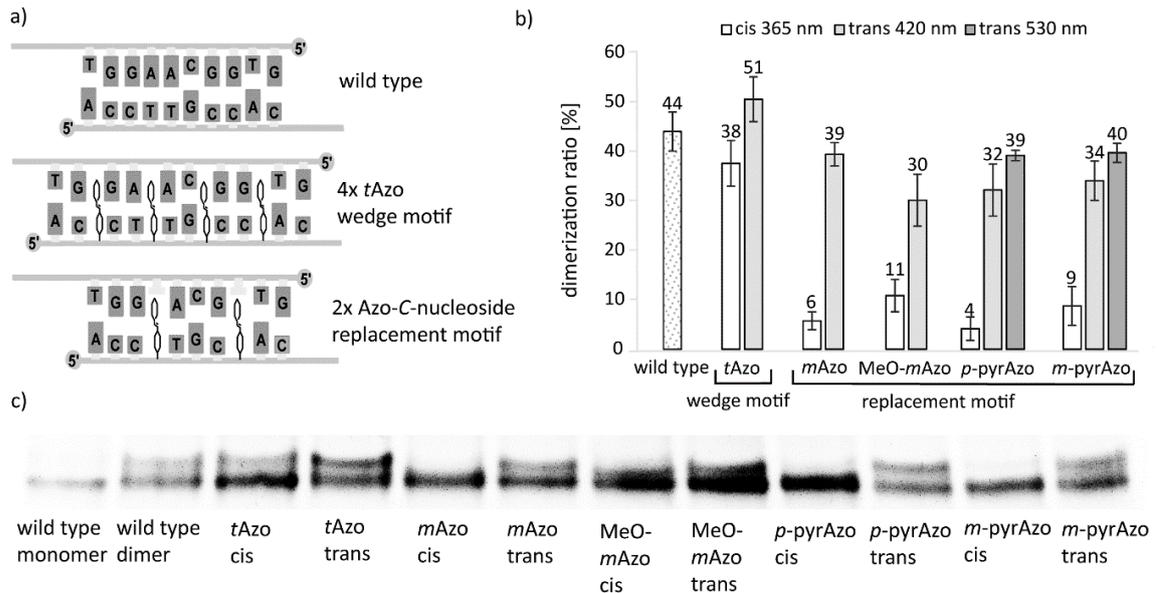


Abb. 151 Ergebnisse der lichtregulierbaren Dimerisierung von DNA Ringen. Die Sequenzen und die verwendeten Motive zum Einbau von Azobenzol-Linker Systemen ist in a) gezeigt. Die Dimerisierungsverhältnisse von DNA Ringen nach Bestrahlung mit UV- (365 nm) oder sichtbarem Licht (420 oder 530 nm) ist in b) gezeigt. Ein exemplarisches 5%iges natives Polyacrylamid-Gel zur Auswertung der Dimerisierungsverhältnisse (gefärbt mit *SYBR gold*) ist in c) gezeigt. Die Abbildung wurde aus Grebenovsky *et al.*^[322] entnommen.

3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die reversible Lichtregulation der Hybridisierung von Nukleinsäuren ist ein machtvolles Werkzeug, um biologische Prozesse selektiv zu studieren oder zu manipulieren. Azobenzol Photoschalter sind ideal dazu geeignet, da das unpolare und planare *trans*-Azobenzol in den Basenstapel interkalieren und dadurch den Nukleinsäuredoppelstrang stabilisieren kann. Durch UV-Licht und der damit einhergehenden *trans*-zu-*cis*-Isomerisierung wird der Doppelstrang durch das sterisch anspruchsvolle und gewinkelte *cis*-Azobenzol destabilisiert. Der Linker, der das Azobenzol kovalent mit der Nukleinsäure verknüpft, trägt einen wichtigen Teil zur effizienten Regulation der Duplexstabilität bei. Der Linker muss die Kraft der Isomerisierung auf die strukturelle Änderung der Nukleinsäure übertragen. Im *trans*-Zustand des Azobenzols sollte der Linker die native Struktur der Nukleinsäure nicht verändern. Diese Studie beschäftigt sich mit der Anwendung von Azobenzol C-Nukleosiden, bei denen das Azobenzol direkt mit einer (Desoxy-)Ribose-Einheit verknüpft wurde. Dadurch sollte eine möglichst geringe Änderung des Rückgrats und helikalen Natur bewirkt werden. Sowohl im RNA- als auch im DNA-Einzelstrang zeigten **pAzo** und **mAzo** eine hohe Schaltamplitude von über 90%, keine Ermüdung bei repetitiver Bestrahlung sowie eine hohe thermische Stabilität des *cis*-Isomers über einen breiten Temperaturbereich. Diese Eigenschaften schaffen ideale Voraussetzung für viele Anwendungen. Schmelzpunktstudien zeigten, dass RNA und DNA Doppelstränge effizient durch photoinduzierte *trans*-zu-*cis* Isomerisierung destabilisiert werden. Dabei wurde beobachtet, dass sowohl in RNA als auch in DNA **mAzo** effektiver die Hybridisierung regulieren kann. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass der Einbau gegenüber einer Base („*Displacement* Motiv“) einen höheren Effekt erzielte, als der zusätzliche Einbau („*wedge* Motiv“) eines Azobenzols. Während im Falle von RNA bei der Verwendung von nebeneinander und gegenüberliegenden Azobenzol C-Nukleosiden („*Dimer* Motiv“) hohe (De-)Stabilisierungseffekte erzielt werden konnten, zeigte dasselbe Motiv bei DNA nur mäßige Ergebnisse. Der Vergleich mit dem etablierten **tAzo** (D-Threoninol verknüpftes Azobenzol) zeigte, dass unter idealen Isomerisierungsbedingungen, **tAzo** einen RNA Doppelstrang effizienter (de-)stabilisieren kann. Allerdings müssen die Doppelstränge für eine effiziente *trans*-zu-*cis* Isomerisierung auf 75 °C erwärmt werden und bei Raumtemperatur isomerisiert **tAzo** im RNA Duplex nur zu 45%. **pAzo** und **mAzo** konnte im RNA Doppelstrang bei Raumtemperatur mit einer Schaltamplitude von über 90% isomerisiert werden. Im DNA Doppelstrang zeigten **pAzo** und **mAzo** sogar bessere lichtinduzierte Duplex(de)stabilisierungseffekte im Vergleich zu **tAzo**, selbst unter idealen Isomerisierungsbedingungen. Auch im Kontext von DNA zeigten **pAzo** und **mAzo** eine nahezu vollständige *trans*-zu-*cis* und *cis*-zu-*trans* Isomerisierung bei Raumtemperatur, während **tAzo** nur zu 55% isomerisierte. Simulationen zeigten, dass **pAzo** im *trans*-Zustand ideal in einen Doppelstrang eingebaut wird und eine sehr ähnliche Struktur zu

einem nativen Duplex zeigt. Weiter wurde eine neue Syntheseroute entwickelt, die es erlaubt 2'OH- und 2'OMe-substituierte Azobenzol C-Nucleoside darzustellen. Dies soll in Zukunft ermöglichen, den spezifischen Linker für die jeweilige Art der Nucleinsäure verwenden zu können, mit dem Ziel möglichst wenig Störung der helikalen Natur zu bewirken. Verschiedene Azobenzol C-Nucleosid-Derivate dieser Studie wurden verwendet, um DNA Nanoarchitektur bei Raumtemperatur lichtregulierbar zu machen. Die Azobenzol C-Nucleoside, **pAzo** und **mAzo**, sind aufgrund der thermischen Stabilität, Ermüdungsresistenz, hohen Schaltamplitude im Doppelstrang sowie der effizienten Regulation der Hybridisierung ideale Kandidaten für die Regulation von Nucleinsäuren bei niedriger Temperatur und setzen neue Maßstäbe. Besonders in biologischen Systemen, bei denen auf hohe Temperaturen verzichtet werden muss, können damit in Zukunft selektiv Prozesse untersucht und manipuliert werden. Durch die Reversibilität der Isomerisierung können biologische Prozesse gezielt an- und ausgeschaltet werden, um somit mehr Informationen über den zeitlichen Ablauf von Vorgängen eines biologischen Systems gewinnen zu können.

4 Chemoenzymatische Synthese von lichtaktivierbaren Nucleinsäuren

4.1 Motivation und Zielsetzung

Hybridisierung oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen sind fundamentale Eigenschaften von RNA, um biologische Prozesse zu regulieren. Photolabile Schutzgruppen oder Photoschalter sind ideal dazu geeignet, um die Funktion von Nucleinsäuren temporär zu inaktivieren. Licht als Triggersignal kann mit hoher Orts- und Zeitaufösung in einem nicht-invasiven Prozess die Nucleinsäuren aktivieren. Anders als bei der Zugabe von aktivierenden Reagenzien wird das biologische System durch Bestrahlung nicht verschmutzt. Der Einbau von photoaktivierbaren Nucleosiden in RNA erfolgt traditionell über Festphasensynthese. Die chemische Synthese von Nucleinsäure hat jedoch mehrere Nachteile: Zum einen werden relativ große Mengen der entsprechenden Phosphoramidite und Reagenzien benötigt, was zum Anstieg der Kosten führt. Zum anderen ist die Synthese längenbegrenzt, sodass nur Sequenzen bis ~80 Nucleotide effizient synthetisiert werden können. Die enzymatische Synthese von RNA unterliegt keiner Längenbegrenzung. Eine Limitierung von enzymatischer Synthese ist die positionsspezifische Einführung von Modifikationen. Wie in Kapitel 1.6.2 ausführlich beschrieben, können durch die Transkription mit unnatürlichen Basenpaaren selektiv funktionelle Gruppen eingeführt werden. Allerdings kann durch unnatürliche Basenpaare die native Struktur der RNA beeinflusst werden. Zudem muss der modifizierte DNA-Matrizenstrang entsprechend modifiziert werden, was nur über Festphasensynthese möglich ist. Die Desoxyribonucleotidyltransferase kann modifizierte Nucleosidtriphosphate an das 3'-Ende von RNA hängen. Dazu sind Optimierungen notwendig und häufig kommt es zu einem mehrfachen Einbau. Uhlenbeck *et al.* zeigten 1978, dass die *T4* RNA Ligase 1 verwendet werden kann, um ein einzelnes modifiziertes Nucleosid-3',5'-bisphosphat selektiv an das 3'-Ende von RNA zu ligieren. Ein Ziel dieses Projektes ist die Synthese von NPE-geschützten Nucleosid-3',5'-bisphosphaten und diese mittels *T4* RNA Ligase 1 selektiv das 3'-Ende von RNA zu addieren. Es soll untersucht werden, ob die *T4* RNA Ligase 1 Nucleosid-3',5'-bisphosphate mit photolabilen Schutzgruppen auf der Watson-Crick-Seite als Substrate akzeptiert. Da photolabil-geschützte Nucleotide am 3'-Ende von RNA nur in Ausnahmefällen einen biologischen Effekt zeigen können, sollen diese terminalen Modifikationen zu internen umgesetzt werden. Dazu muss das 3'-Phosphat durch alkalische Phosphatasen entfernt werden und der modifizierte RNA Strang mit einem weiteren RNA Strang ligiert werden. Auch bei diesen enzymatischen Schritten muss untersucht werden, ob die photolabilen Schutzgruppen kompatibel zu den jeweiligen enzymatischen Reaktionen sind.

Bei der Synthese von RNA für NMR-spektroskopische Untersuchungen wird besonders viel Material in hoher Reinheit benötigt, Bedingungen die häufig kritisch sind bei der Verwendung von Festphasensynthese. In diesem Projekt soll mit enzymatischen Methoden die Synthese eines lichtaktivierbaren 2'-Desoxyguansin (2'dG) selektiven Riboschalters aus *Mesoplasma Florum* gezeigt werden. Dabei soll eine einzelne photolabile Schutzgruppe die Ligandenbindung verhindern. Nach Bestrahlung soll durch NMR-Spektroskopie die Ligandenbindung nachgewiesen werden.

Neben photolabilen Schutzgruppen soll auch die Kompatibilität der enzymatischen Reaktionen mit Photoschalter-modifizierten Nukleotiden untersucht werden. Dafür sollen Azobenzol C-Nukleosid-3',5'-bisphosphate synthetisiert und analog positionsspezifisch in RNA eingebaut werden.

Seyfried *et al.* zeigten, dass durch Zyklisierung von DNA über photospaltbare Linker, die Anzahl an photolabilen Modifikationen drastisch verringert werden konnte, da die zyklisierte DNA nicht mit einer komplementären DNA hybridisieren kann. Belichtung führte zur Linearisierung und ermöglichte eine Hybridisierung. Die Zyklisierung erfolgte über zwei Alkin-modifizierte photolabile Schutzgruppen (NPBY) mit einem Bis-Azid-Linker mittels Click-Chemie. Ein weiteres Ziel dieses Teilprojektes ist es ein photoaktivierbares NPBY-modifiziertes Initiatornukleotid zu synthetisieren, welches selektiv durch die T7 RNA Polymerase am 5'-Ende von RNA eingebaut werden soll. Zusätzlich soll durch die Synthese eines NPBY-modifizierten Nukleosid-3',5'-bisphosphates das 3'-Ende von RNA funktionalisiert werden können. Dies soll eine Zyklisierung oder weitere Funktionalisierung von RNA ermöglichen.

Weiter sollen die in Kapitel 2 eingeführten Azobenzol C-Nukleoside zu den entsprechenden Triphosphaten umgesetzt werden. In einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Ciara O'Sullivan sollen verschiedene Polymerasen und Bedingungen für den Einbau der Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate in DNA untersucht werden.

Diese chemo-enzymatischen Methoden zur Einführung von photoaktivierbaren Nukleotiden sollen der Forschung einen schnellen und kostensparenden Zugang von lichtaktivierbarer RNA und DNA erlauben. Diese Methoden sollen keine speziellen Geräte wie einen Festphasen-Synthesizer benötigen, und in jedem Labor mit Standardausrüstung durchgeführt werden können.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

Das Projekt wurde in einer Kooperation mit Sara Keyhani aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Schwalbe (Universität Frankfurt am Main) geplant und durchgeführt. Anja Blümler absolvierte eine gemeinsam betreute Masterarbeit auf diesem Projekt und wird die hier etablierte chemo-enzymatische Methode im Rahmen ihrer Doktorarbeit weiterentwickeln.

4.2.1 Synthese der photolabil-geschützten Nucleosid-3',5'-bisphosphate

4.2.1.1 Synthese des NPE-geschützten Adenosin-3',5'-bisphosphates (pA^{NPEP})

Die Synthese bis zur Stufe des NPE-geschützten Adenosins **135** erfolgte nach Literaturvorschrift von Höbartner und Silverman^[357]. Ausgehend von Inosin **131** wurden im ersten Schritt die 2'-,3'-und 5'-OH-Gruppen mit TBDMS annähernd quantitativ geschützt. Die Aktivierung der Carbonylfunktion an Position 6 des TBDMS-geschützten Inosins **132** erfolgte mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TIBPSCI), Triethylamin und katalytischen Mengen 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP). Bei der Reaktion wurde ein Gemisch aus dem gewünschten O⁶- (**133**) und dem N¹-Regioisomer erhalten, die sich nur schwer durch säulenchromatographische Aufreinigung isolieren ließen. Die Ausbeute der Reaktion betrug 34%.

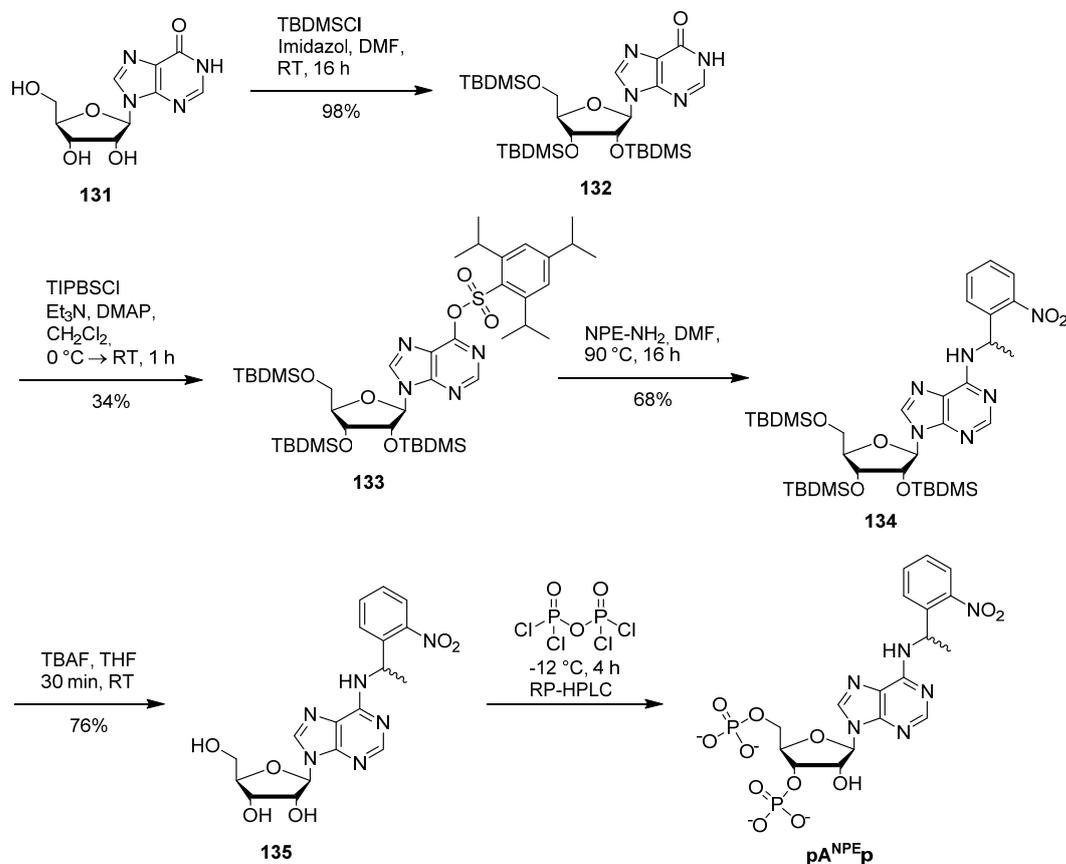


Abb. 152 Syntheseübersicht zur Darstellung vom NPE-geschützten Adenosin 3',5'-Bisphosphat. Die Synthese bis zur Stufe **135** erfolgte nach Höbartner und Silverman.^[357]

Die photolabile 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin- (**NPE-NH₂**) Schutzgruppe wurde nach der Literaturvorschrift von Mack^[358] und Buff^[359] zu Verbindung **138** und weiter nach der Anleitung von Höbartner und Silverman^[357] zu **NPE-NH₂** hergestellt (siehe **Abb. 153**). Dazu wurde *ortho*-Ethylnitrobenzol mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) und Dibenzoylperoxid (DBPO) in einer Wohl-Ziegler-Bromierungs-Reaktion^[360] zu 1-(1-Bromethyl)-2-nitrobenzol **136** in quantitativer Ausbeute umgesetzt. Da NBS nur gering löslich in Tetrachlormethan ist, bleibt die Konzentration von Br₂ niedrig, was Nebenreaktionen verhindert. Zudem ist NBS schwerer als Tetrachlormethan und bleibt somit am Boden des Reaktionsgefäßes, während das entstehende Succinimid schwerlöslich, aber leichter ist als Tetrachlormethan und sich oberhalb der Flüssigkeit absetzt. Dies erlaubt die optische Verfolgung des Reaktionsfortschritts. In einer Gabriel-Synthese^[361] wird **137** mit Kaliumphthalimid zu **138** mit 75% Ausbeute umgesetzt. Nach Hydrazinolyse wurde **NPE-NH₂** in 75% Ausbeute erhalten.

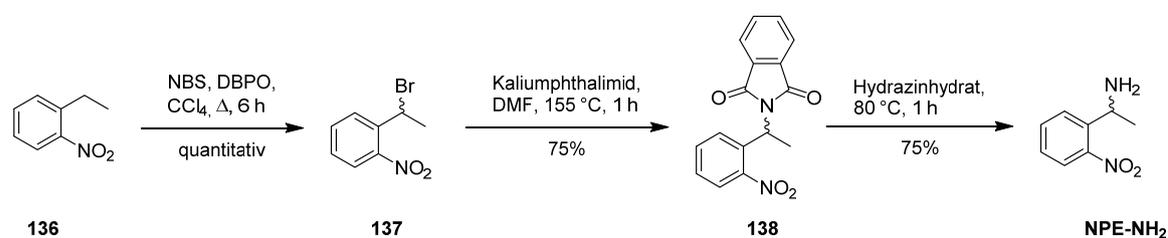


Abb. 153 Syntheseübersicht zur Darstellung von 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin **NPE-NH₂** nach Timo Mack^[358] sowie Höbartner und Silverman^[362].

Die Umsetzung von **133** mit **NPE-NH₂** zu **134** und die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) zu Verbindung **135** erfolgten in Ausbeuten von 68% und 76%. Die Phosphorylierung der 5'- und 3'-OH Gruppen erfolgte mit Diphosphorylchlorid in Anlehnung an Uhlenbeck *et al.*^[289]. Dabei wurde NPE-Adenosin **135** unter Schutzatmosphäre und ohne Lösungsmittel mit Diphosphorylchlorid versetzt und für vier Stunden bei -12 °C gerührt. Der Mechanismus der Reaktion ist nach Recherche des Autors dieser Arbeit noch nicht geklärt. Die Reaktion kann prinzipiell über zwei Intermediate ablaufen. Entweder wird ein zyklisches Intermediat **139** gebildet oder ein Diphosphorylchlorid-Molekül reagiert einzeln mit den OH-Gruppen **140** (siehe **Abb. 154**). Die höhere Geschwindigkeit von intramolekularen Reaktionen, sowie die Ähnlichkeit von Diphosphorylchlorid zu dem Markiewicz-Reagenz^[363] (siehe **Abb. 154**), welches ein zyklisches Produkt erzielt, lassen auf einen intermolekularen Mechanismus schließen. Zusätzlich konnten Sara Keyhani und Anja Blümmer bei der Synthese von Nukleosid Bisphosphaten massenspektrometrisch zyklische Intermediate beobachten (Ergebnisse nicht veröffentlicht). Durch die Tatsache, dass die Reaktion nicht regioselektiv abläuft, sondern ein Großteil des Reaktionsgemisches teilweise auch Nukleosid-2',5'-bisphosphat- und Nukleosidmonophosphat-Derivate enthält, könnten nicht-zyklisierte Intermediate wahrscheinlich sein. Zusätzlich konnte Sara

Keyhani auch die Darstellung von Uridin-3',5'-bisphosphat aus 5'-Uridinmonophosphat zeigen (persönliche Mitteilung; Daten nicht gezeigt).

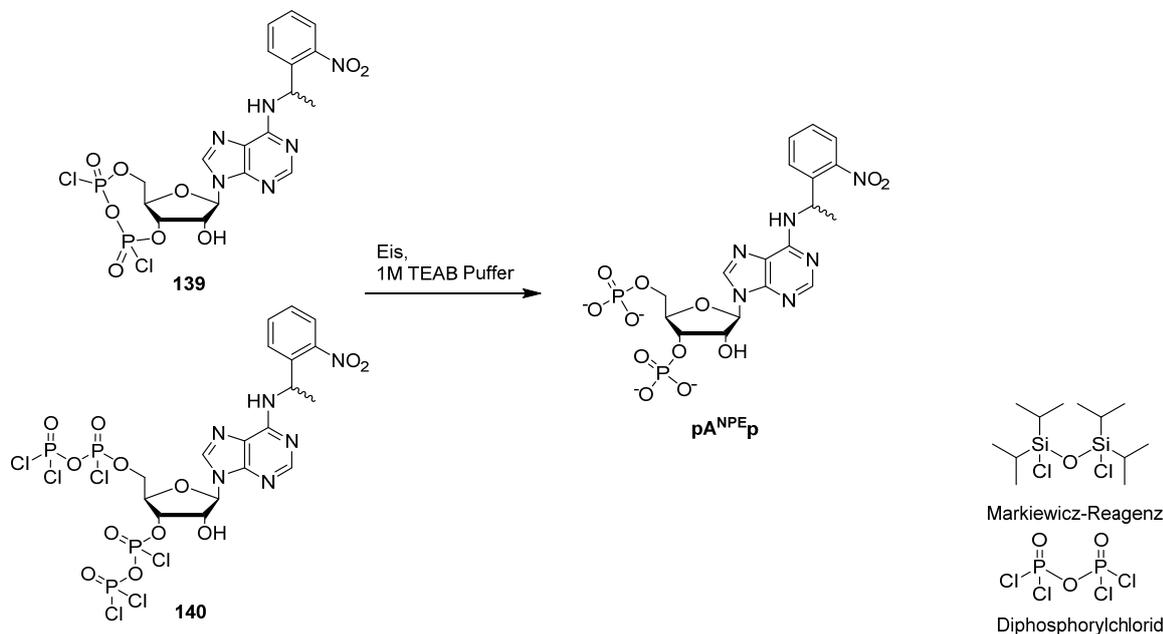


Abb. 154 Mögliche Intermediate **139** und **140** bei der Phosphorylierungsreaktion von NPE-geschütztem Adenosin mit Diphosphorylchlorid und deren Hydrolysierung zu pA^{NPE}p (links). Die möglichen Intermediate zur Bildung des Adenosin-2',5'-bisphosphates wurden aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt. Die strukturelle Ähnlichkeit des Markiewicz-Reagenzes und Diphosphorylchlorid ist rechts gezeigt.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Eis und eiskaltem Triethylammonium-Bicarbonat-Puffer beendet und mögliche (zyklische) Intermediate wurden hydrolysiert (siehe **Abb. 154**). Das Lösungsmittel wurde schonend bei 4 °C in einem Vakuumkonzentrator entfernt. Zur Trennung der 3',5'- und 2',5'-Regioisomere und Entfernung möglicher Nebenprodukte muss das Gemisch mittels HPLC gereinigt werden. In der Literatur^[274,288,290] wird dazu häufig eine Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Zellulose Säulen durchgeführt. Da diese Säulen nicht im Arbeitskreis verfügbare waren, wurde die Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie mit einer *Dionex DNAPac PA100* Säule (Chromatogramm nicht gezeigt) und über RP-HPLC (siehe **Abb. 155**) getestet. Die Aufreinigung über RP-HPLC war effizienter, sodass diese Methode auch für die weiteren modifizierten Nucleosid-Bisphosphate angewandt wurde. Das gewünschte Produkt war das Hauptprodukt der Reaktion (siehe grüner Peak in **Abb. 155**) und anders als in der Literatur beschrieben konnte die Bildung eines 2',5'-Bisphosphat-Regioisomeres nicht beobachtet werden. Lediglich die Bildung von NPE-geschütztem Adenosin-Monophosphat konnte beobachtet (siehe orangefarbener Peak in **Abb. 155**) und NMR spektroskopisch nachgewiesen werden. Für die Isolierung und Aufreinigung wurden verschiedene Bedingungen getestet, die zum Teil nicht erfolgreich verliefen, was zum Verlust von Produkt führte. Deshalb wurde auf die Angabe einer Ausbeute verzichtet.

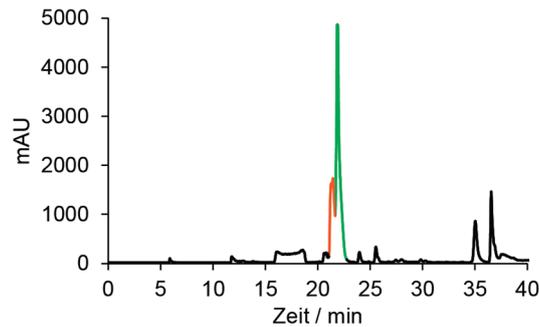


Abb. 155 RP-HPLC Chromatogramm zur Isolierung vom NPE-geschützten Adenosin-3',5'-bisphosphat pA^{NPEp} . Der grün gefärbte Peak hebt das korrekte Produkt hervor. Die Aufreinigung wurde an einem *YoungLin* Gerät mit einer Säule von *MultoKrom* (100-5 C18 250x20 mm) durchgeführt. Es wurde ein Puffersystem aus 0,4M TEAB (pH 8) und MeCN verwendet. Gradient: 0-40% MeCN in 39 min. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Durch mehrfaches koevaprieren mit Wasser wurde überschüssiges Triethylamin entfernt. Das Produkt mit vier Triethylammonium Gegenionen konnte eindeutig massenspektrometrisch, sowie per 1H - und ^{31}P - und 2D COSY-NMR Spektroskopie identifiziert werden (siehe **Abb. 156**).

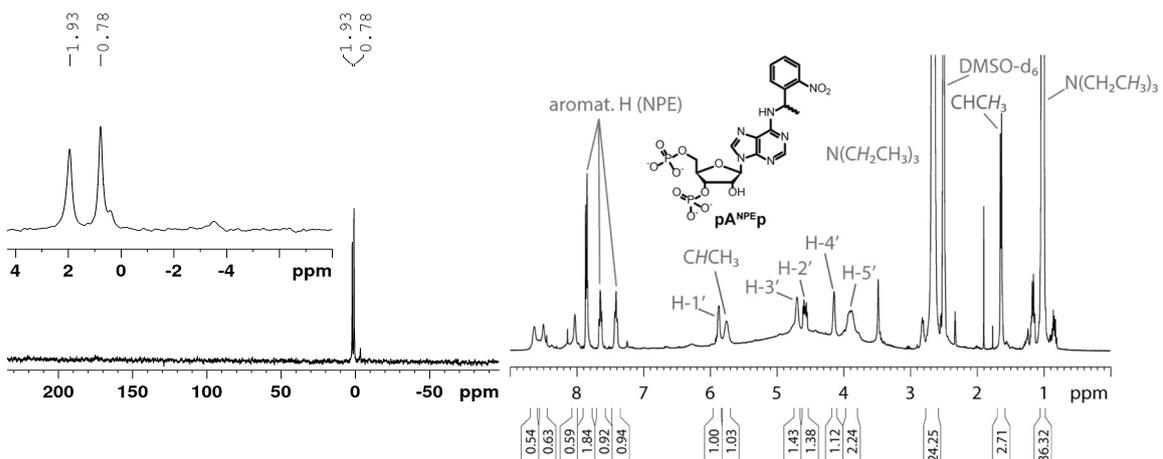


Abb. 156 ^{31}P -NMR (162 MHz) Spektrum (links) vom NPE-geschützten Adenosin-3',5'-bisphosphat pA^{NPEp} . Das auf Phosphorsäure kalibrierte Spektrum zeigt zwei für 3',5'-Bisphosphate typische Signale bei -1,93 und -0,78 ppm. Das korrespondierende 1H -NMR Spektrum (400 MHz) ist rechts gezeigt. Die Spektren wurden in $DMSO-d_6$ an einem AV400 der Firma *Bruker* aufgenommen.

4.2.1.2 Synthese des NPE-geschützten Cytidin-3',5'-bisphosphates (pC^{NPEp})

Die Synthese des NPE-geschützten Cytidin-3',5'-bisphosphates (siehe **Abb. 157**) startete ausgehend von Uridin. Nach Literaturvorschrift^[364] wurden die 2',3',5'-OH Gruppen von Uridin mit TBDMS-Cl in quantitativer Ausbeute geschützt. Die Aktivierung der Carbonylfunktion an Position 4 von **141** erfolgte im Basischen mit TIPBS-Cl und katalytischen Mengen 4-DMAP in 78% Ausbeute. Bei der Reaktion entsteht neben dem gewünschten O^4 -sulfo-nierten Produkt **142** auch das N^3 -sulfo-nierte Nebenprodukt **120** (siehe **Abb. 158**), welches nicht vollständig durch Säulenchromatographie abgetrennt werden konnte, sodass ein Gemisch mit 10% des N^3 -sulfo-nierten Nebenproduktes **145** vorlag. Allerdings reagierte nur

das O^4 -sulfonylierte Produkt **142** in der weiteren Umsetzung mit **NPE-NH₂**, weshalb auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde. Die Umsetzung von **142** mit (S)-NPE-NH₂ (erworben von *NetChem Inc.*) mit Hünigbase zu **143** verlief in 92% Ausbeute.

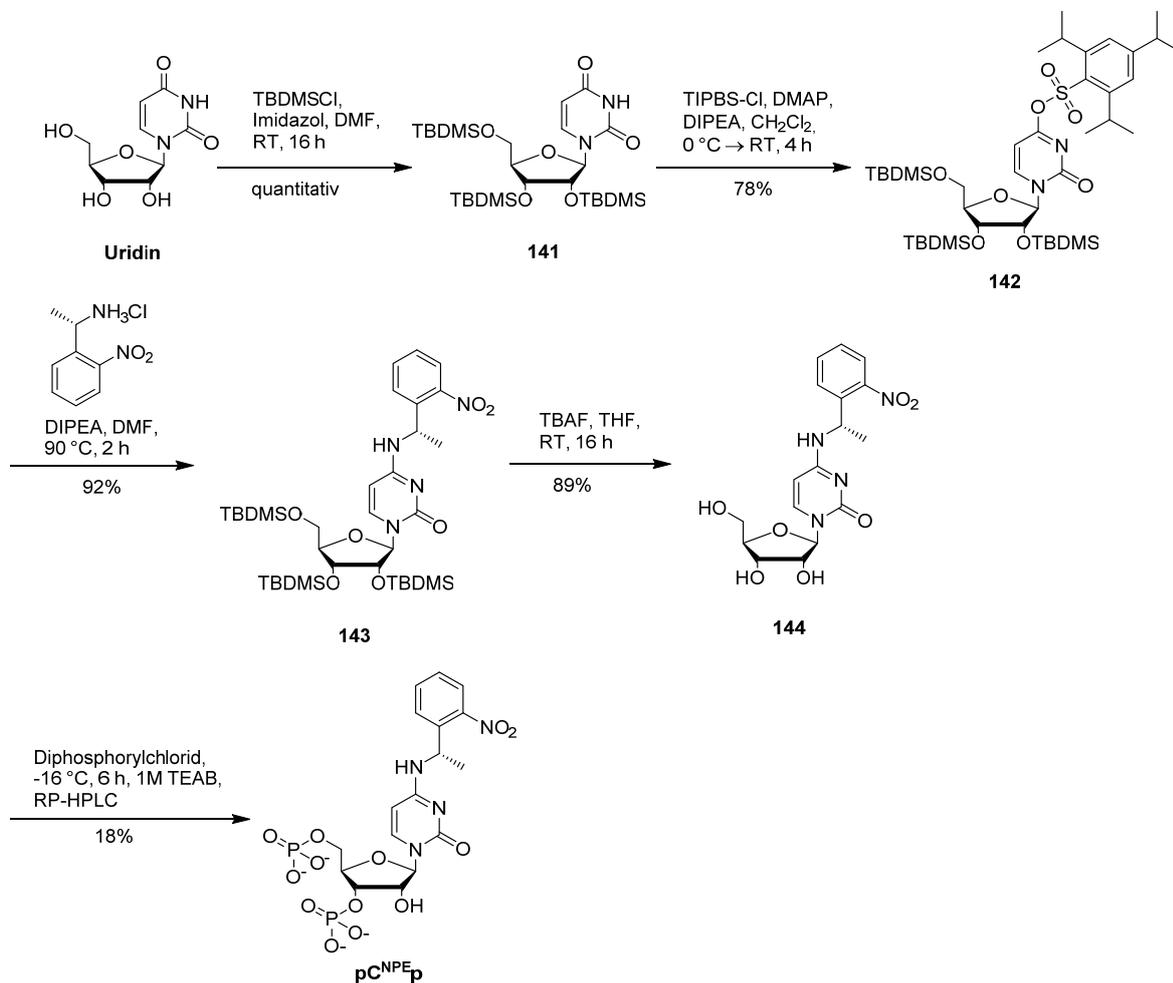


Abb. 157 Syntheseübersicht zur Darstellung des NPE-geschützten Cytidin-3',5'-bisphosphates **pC^{NPEp}**.

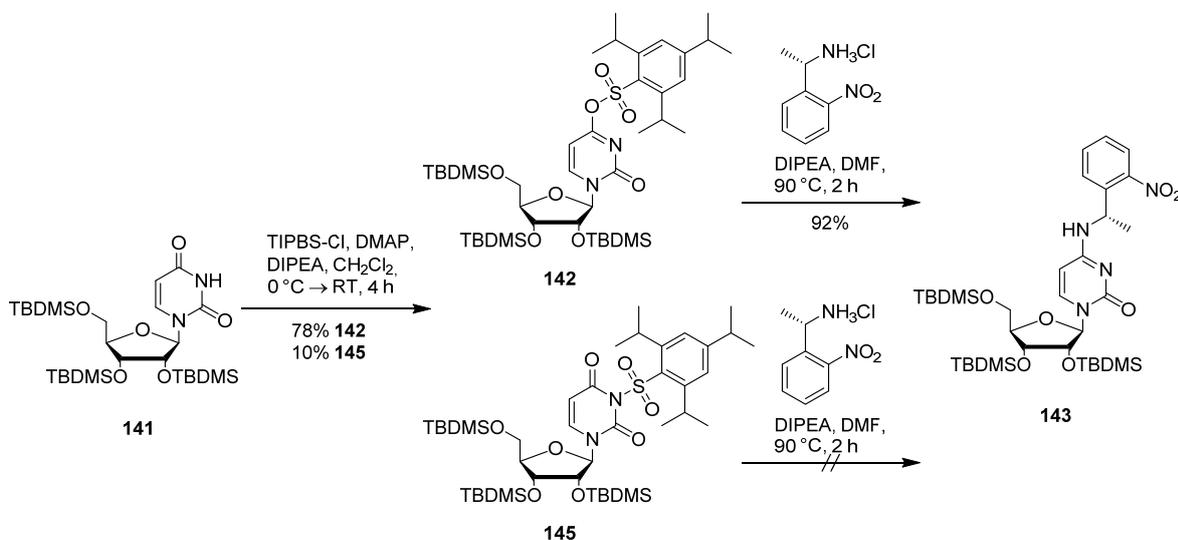


Abb. 158 Reaktionsschema zur Darstellung von Verbindung **143**. Bei der Aktivierung der Carbonylfunktion an Position 4 des TBDMS geschützten Uridin **141** entsteht neben dem gewünschten O^4 -sulfonylierten Produkt **142** auch das N^5 -sulfonylierte Nebenprodukt **145**, welches nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Nur das O^4 -sulfonylierte Produkt **142** konnte in der weiteren Umsetzung mit NPE-NH₂ reagieren.

Die Entfernung der TBDMS-Schutzgruppen erfolgte mit Tetrabutylammoniumfluorid in THF. Das NPE-geschützte Cytidin **144** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung nur verunreinigt mit Tetrabutylamin (TBA) (0,2 Eq.) und THF (0,5 Eq.) isoliert werden. Auch das Trocknen im Hochvakuum über Nacht konnte TBA und THF nicht entfernen. Da diese Verunreinigungen die folgende Umsetzung nicht beeinflusst, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet. In späteren Untersuchungen mit anderen Verbindungen wurde gezeigt, dass überschüssiges Tetrabutylamin durch Fällung aus Aceton/*n*-Hexan entfernt werden konnte. Die Umsetzung zum NPE-geschützten Cytidin-3',5'-bisphosphat **pC^{NPE}p** wurde von Anja Blümmer in einer mit Sara Keyhani und dem Autor dieser Arbeit gemeinsam betreuten Masterarbeit durchgeführt. Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Uhlenbeck *et al.*^[288] lösungsmittelfrei mit Diphosphorylchlorid bei -16 °C durchgeführt und analog zu der Darstellung des NPE-geschützten Adenosin-3',5'-bisphosphates **pA^{NPE}p** aufgereinigt.

4.2.1.3 Synthese des NPE-geschützten Guanosin-3',5'-bisphosphates (pG^{NPE}p)

Die Synthese des NPE-geschützten Guanosin-3',5'-bisphosphates erwies sich als problematisch, weshalb mehrere Synthesewege ausprobiert wurden. Die Synthese des 2',3',5'-Acetyl-geschützten Guanosins wurde in Anlehnung an die Literaturvorschrift von Pitsch *et al.*^[365] durchgeführt. Dazu wurde Guanosin in einer Mischung aus Pyridin, DMF und Essigsäureanhydrid gelöst und mit einer katalytischen Menge 4-DMAP zu Verbindung **146** umgesetzt. Die Ausbeute der Reaktion betrug 93%. In einer Mitsunobu-Reaktion^[311] mit racemischen NPE-OH, PPh₃ und DEAD wurde **146** zu **147** umgesetzt.

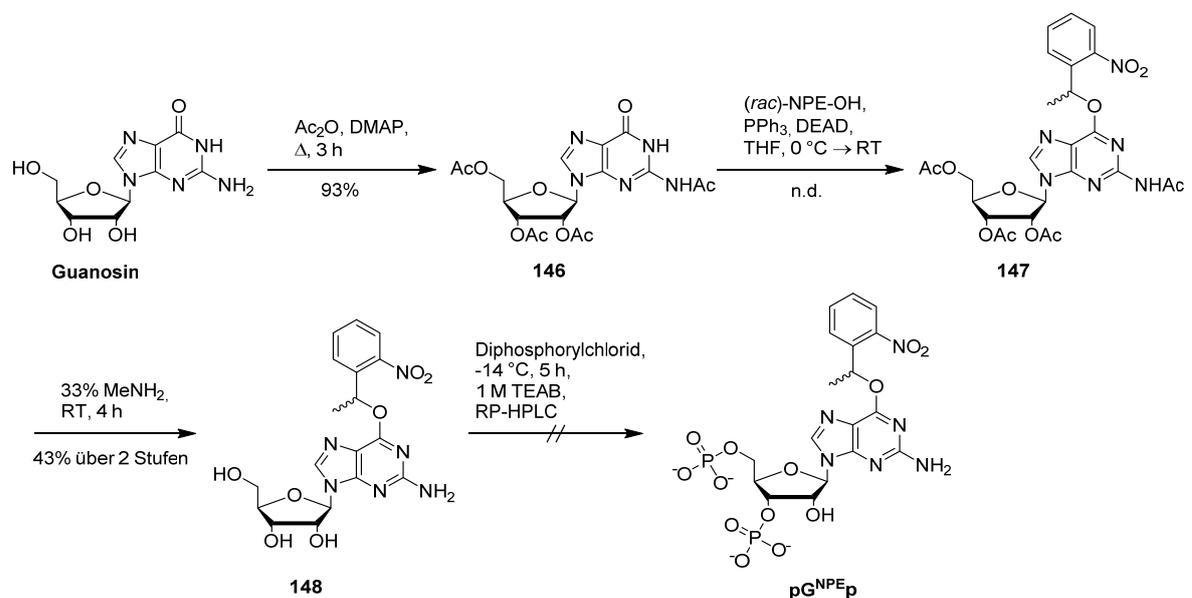


Abb. 159 Syntheseübersicht zur Darstellung des NPE-geschützten Guanosin-3',5'-bisphosphates (pG^{NPE}p).

Ohne weitere Analyse wurde das Produkt mit Methylamin zu Verbindung **148** in 43% Ausbeute (über zwei Stufen) umgesetzt. Die Reaktion mit Diphosphorylchlorid nach Uhlenbeck *et al.*^[289] wurde von Anja Blümmler durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte nach mehrmaligen Wiederholungen kein Produkt isoliert werden.

Anja Blümmler führte im Rahmen ihrer Masterarbeit einen alternativen Syntheseweg (siehe **Abb. 160**) durch, bei dem eine 3'-OH Silyl-Schutzgruppe die regioselektive Phosphorylierung mit Phosphoroxychlorid erlauben sollte. Die Synthese des 2'-TOM-O⁶-NPE Uridins **151** erfolgte analog zu der Darstellung von Verbindung **147** (siehe **Abb. 159**). Die Phosphorylierung wurde mit Phosphoroxychlorid bei tiefen Temperaturen in Anwesenheit der Base 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalen (Protonenschwamm) durchgeführt. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen nicht das gewünschte Produkt isoliert werden.

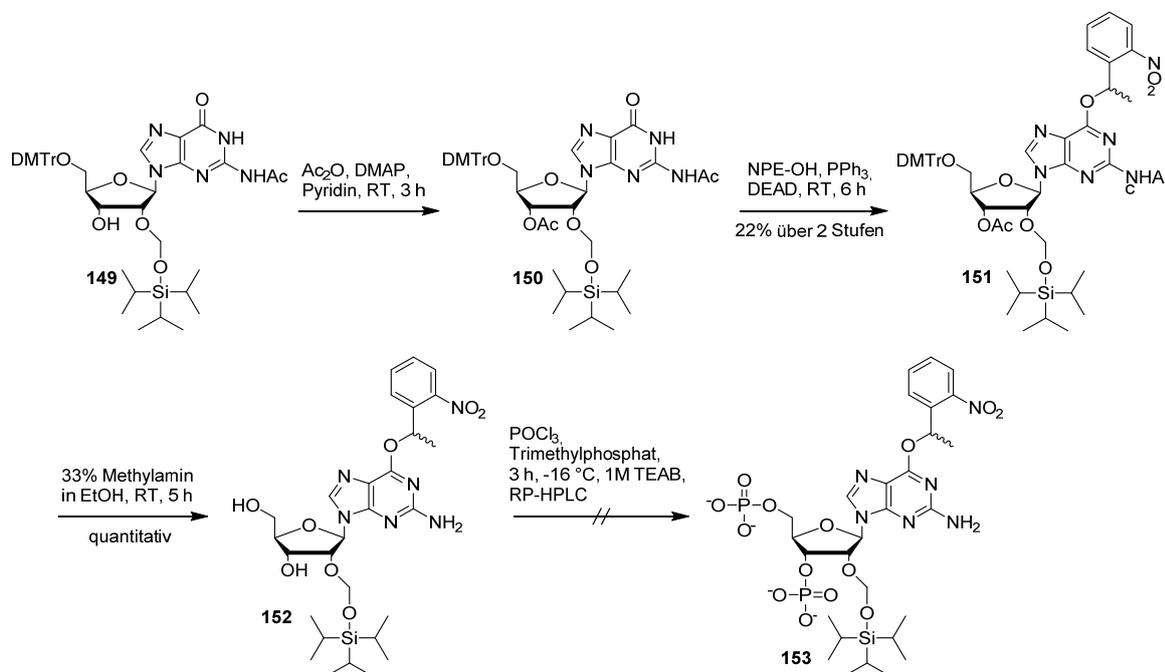


Abb. 160 Alternative Synthesestrategie zur Darstellung des NPE-geschützten Guanosin-3',5'-bisphosphates (**pGNPEp**). Die Synthesen wurden von Anja Blümmler im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt.

Daraufhin wurde vom Autor dieser Arbeit die Phosphorylierung nach einer anderen Methode in Anlehnung an Arenz *et al.*^[274] bzw. Sekine *et al.*^[293] durchgeführt. Dazu wurde Bis(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **154** mit Tetrazol aktiviert und an die 3'- und 5'-OH Gruppen von 2'-O-TOM-O⁶-NPE Guanosin **152** gekuppelt um **155** zu erhalten. Mit *tert.*-Butylhydroperoxid wurde Phosphor(III) zu Phosphor(V) oxidiert, wodurch **156** erhalten wurde. Die Cyanoethyl-Gruppen wurden im Basischen mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und *Bis*(trimethylsilyl)acetamide (BSA) in Pyridin entfernt. Die 2'-O-TOM Schutzgruppe wurde mit Triethylamin-Trihydrofluorid entfernt. Die Ausbeute der vierstufigen Reaktion betrug 10%. Anders als in der Literatur beschrieben, wurde auf eine Aufreinigung auf der Stufe von **155** verzichtet. Lediglich die Zielverbindung, das Guanosin-

3',5'-bisphosphat, wurde chromatographisch in zwei Stufen aufgereinigt. Zuerst wurde das Reaktionsgemisch mittels MPLC über eine Kunststoffpolymer-basierte RP-Säule (Source[®] 15RPC) gereinigt (siehe **Abb. 162**, links). Die Auftrennungsleistung ist im Vergleich zu RP-HPLC-Säulen geringer, allerdings kann das in der Reaktion verwendete Hydrofluorid die Silyl-basierte stationäre Phase von HPLC-Säulen beschädigen, während die polymerbasierte RPC-Säule mit fluoridhaltigen Reagenzien kompatibel ist. Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass unter diesen Chromatographie-Bedingungen **pG^{NPEp}** nicht sauber isoliert werden konnte. Deshalb wurde ein großzügiger Bereich (siehe blauer Bereich in **Abb. 162**, links) gesammelt. In der zweiten Reinigungsstufe wurde eine RP-HPLC durchgeführt, um die bis dahin verbliebenen Nebenprodukte zu entfernen (siehe **Abb. 162**, rechts). Der grün gefärbte Peak in **Abb. 162** zeigt das korrekte Produkt, welches eindeutig massenspektrometrisch und NMR spektroskopisch (siehe **Abb. 163**) identifiziert werden konnte.

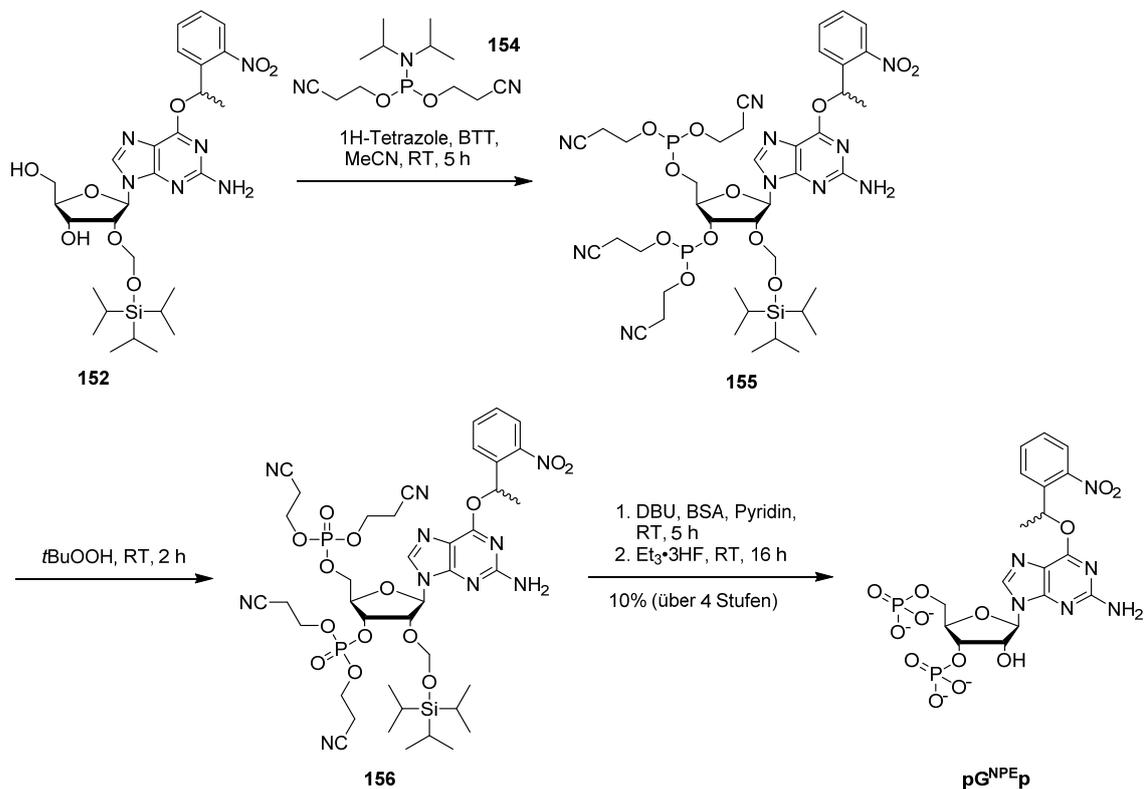


Abb. 161 Reaktionsschema zur Darstellung von **pG^{NPEp}** nach einem alternativen Syntheseweg in Anlehnung an Arenz *et al.*^[274] und Sekine *et al.*^[293].

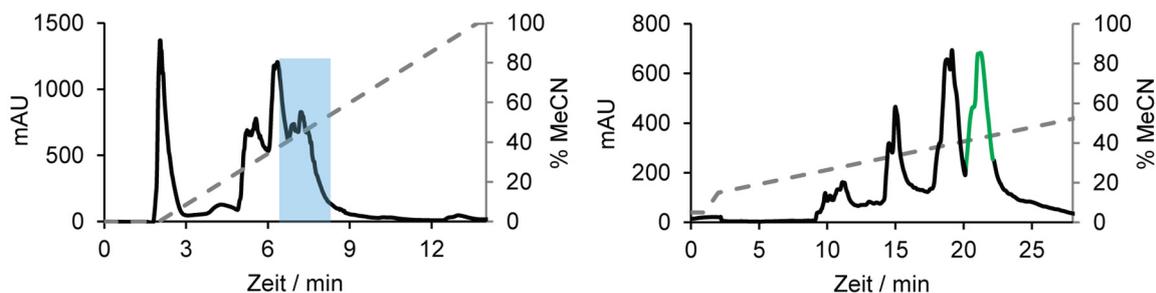


Abb. 162 Präparative RP-HPLC Chromatogramme zur Isolierung von $pGNPEp$. Das linke Chromatogramm zeigt die „grobe“ Reinigung über eine *Source*[®] 15RP Säule an einem *Äkta Purifier* Gerät. Der blaue Bereich wurde gesammelt und nach Aufkonzentrierung in einem Vakuumkonzentrierer über eine *Multokrom* 100-5 C18 (22x250 mm) RP-Säule an einem *YounLin* HPLC-Gerät gereinigt (rechtes Chromatogramm). Der grüne Peak zeigt das korrekte Produkt. Der Gradient der Eluenten MeCN und 0,1 M TEAB (pH 7) ist auf der Sekundärachse gezeigt.

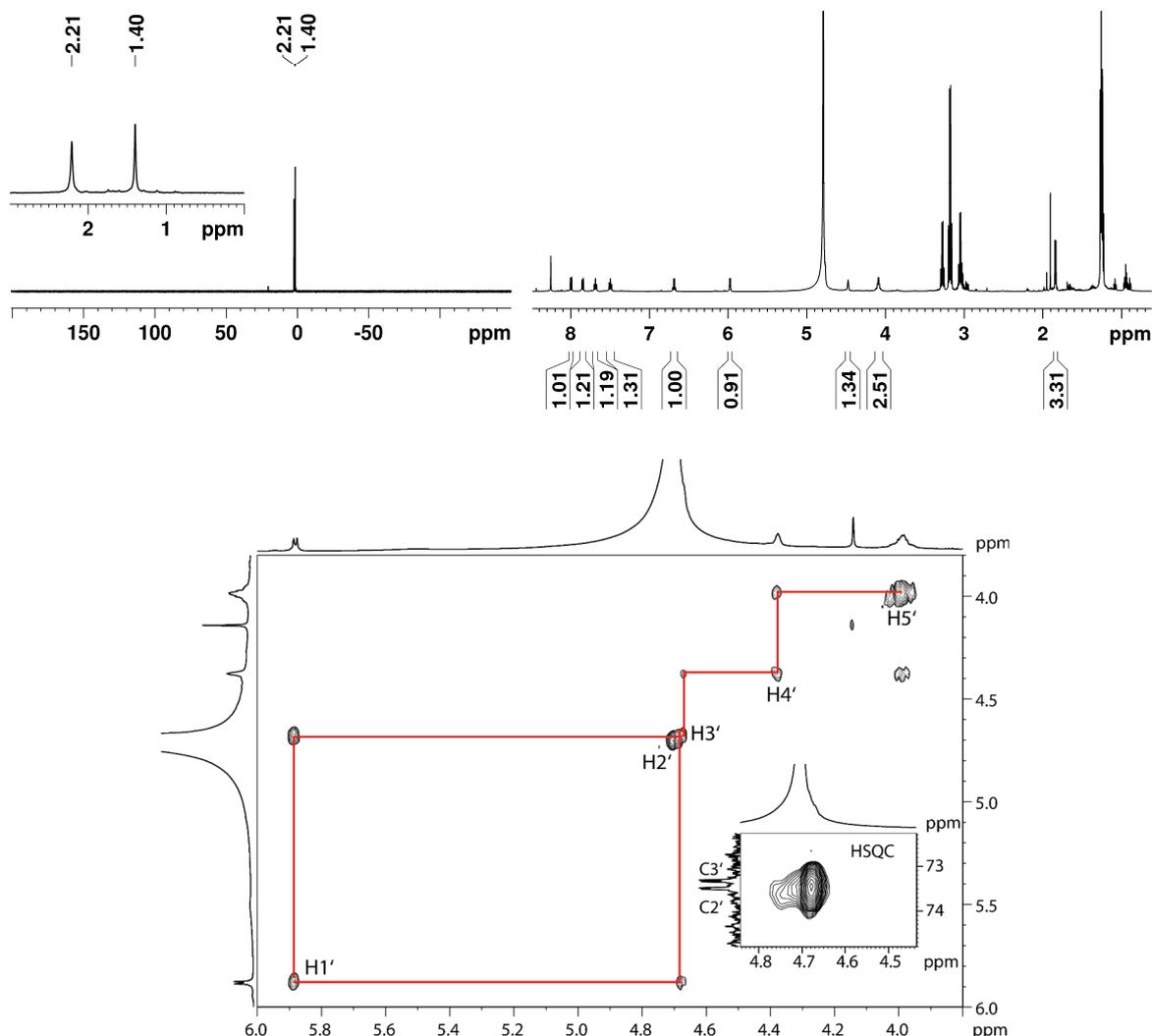


Abb. 163 ^{31}P -NMR Spektrum (202 MHz) von $pGNPEp$. Das auf Phosphorsäure kalibrierte Spektrum zeigt zwei für Nukleosid-3',5'-bisphosphate typische Signale bei -2,2 und -1,4 ppm. Das korrespondierende 1H -NMR Spektrum (500 MHz) ist rechts gezeigt. Das Signal von H2' und H3' liegen unter dem Wasser-Signal, weshalb eine Integration nicht möglich ist. Die Zuordnung der Signale ist im COSY-NMR Spektrum (500 MHz, unten gezeigt). Auch das HSQC-NMR Spektrum (siehe unten rechts im COSY-NMR Spektrum) zeigt, dass zwei Kohlenstoffatome zu den, unter dem Wasserpeak verdeckten, Signalen koppeln. Die Spektren wurden in D_2O an einem AV500 der Firma *Bruker* aufgenommen. Triethylammonium-Salze (Gegenionen) wurde nicht integriert.

Das ^{31}P -NMR Spektrum ist in **Abb. 163** (links oben) gezeigt und zeigt zwei für Nukleosid-3',5'-bisphosphate typische Signale bei -2,2 und -1,4 ppm. Das korrespondierende 1H -NMR

Spektrum ist in **Abb. 163** (rechts oben) gezeigt. Die Signale von H2' und H3' liegen unter dem Wasser-Signal (bei 4,7 ppm), weshalb eine Integration nicht möglich ist. Die Zuordnung der Signale ist im COSY- und HSQC-NMR Spektrum gezeigt.

4.2.1.4 Synthese des NPE-geschützten Uridin-3',5'-bisphosphates ($pU^{NPE}p$)

Die Synthese von $pU^{NPE}p$ startet ausgehend von Uridin und wie in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben wurden die 2',3',5'-OH Gruppen mit TBDMS-Schutzgruppen versehen. Analog zu der Synthese von NPE-geschütztem Guanodin (siehe Kapitel 4.2.1.3) wurde eine Mitsunobu-Reaktion mit Triphenylphosphin, DEAD und racematischen **NPE-OH** durchgeführt.

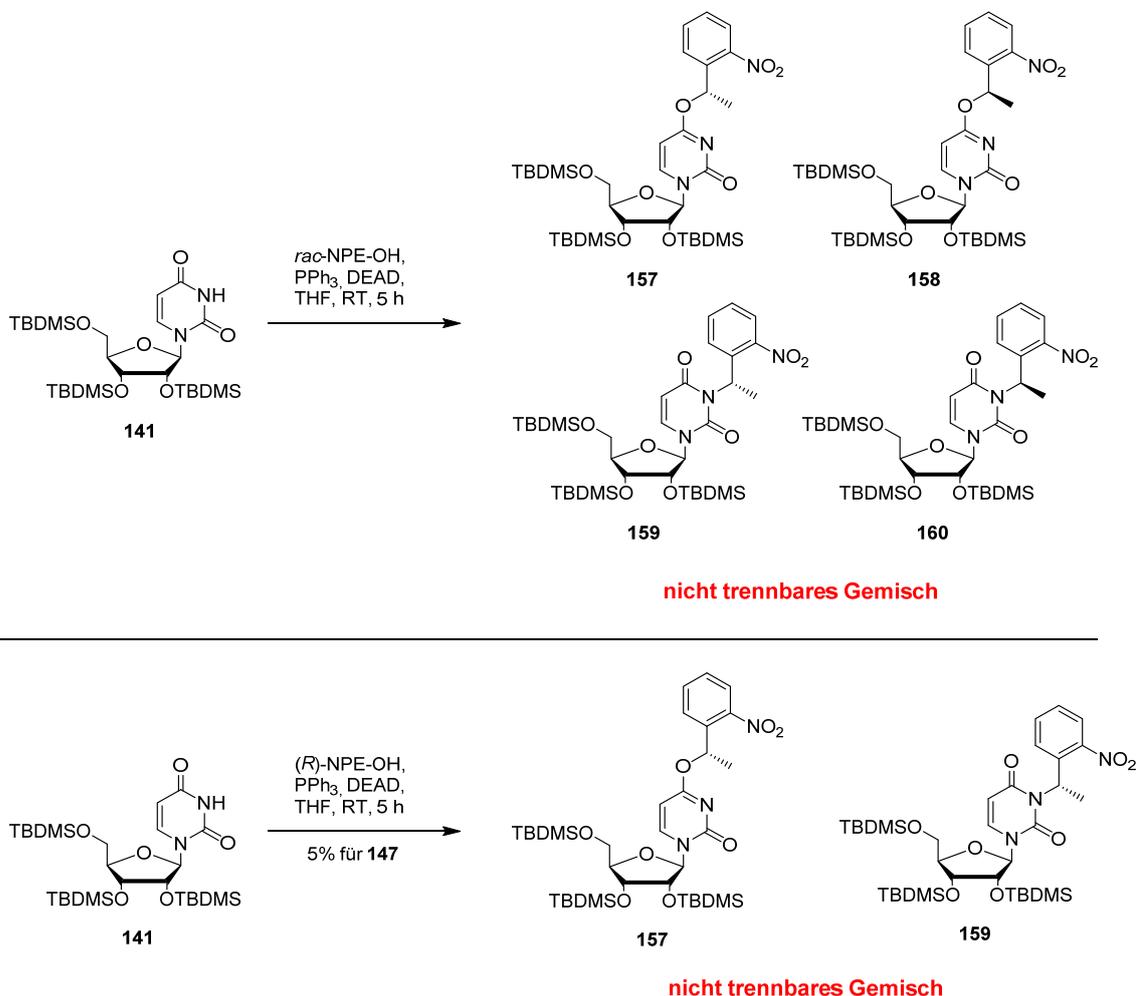


Abb. 164 Reaktionsschema zur Darstellung von $pU^{NPE}p$ in einer Mitsunobu-Reaktion mit dem TBDMS-geschützten Uridin **141** und NPE-OH. Das obere Reaktionsschema zeigt die Umsetzung mit $rac\text{-NPE-OH}$. Bei dieser Reaktion entstanden vier Isomere, die nicht durch Säulenchromatographie getrennt werden konnten. Die untere Reaktion zeigt die Umsetzung von TBDMS-geschützten Uridin mit dem enantiomerenreinen $(R)\text{-NPE-OH}$. Auch hier wird ein Gemisch erhalten, welches durch klassische Säulenchromatographie nicht getrennt werden konnte.

Es wurde ein Gemisch aus $O^4\text{-}(R)\text{-NPE-}$, $O^4\text{-}(S)\text{-NPE-}$, $N^3\text{-}(R)\text{-NPE-}$ und $N^3\text{-}(S)\text{-NPE-}$ Guanodin-Derivaten **157-160** erhalten, welches nicht durch Säulenchromatographie getrennt

werden konnte. Um die Zahl der entstehenden Isomere zu verringern, wurde die Enantiomere aus dem racemischen NPE-OH mittels chiraler HPLC getrennt. Um das gewünschte S-Enantiomer zu erhalten muss bei der Reaktion das (*R*)-NPE-OH Enantiomer verwendet werden, da die Mitsunobu-Reaktion einer Inversion^[366] unterliegt. Es wurde ein Gemisch aus *O*⁴- und *N*³-NPE-2',3',5'-TBDMS Uridin erhalten (siehe **Abb. 164** unten), welches nur schwer durch Säulenchromatographie getrennt werden konnte, sodass nur 5% des reinen *O*⁴-NPE geschützten Uridin Regioisomers **157** erhalten wurde. Auch Höbartner und Silverman^[362] erhielten bei der Umsetzung von NPE-OH mit 5'-DMTr-2'-TOM-geschützten Uridin ein Enantiomergemisch (~1:1), welches allerdings durch Säulenchromatographie getrennt werden konnte. Da die Synthese von 2'-TOM-geschützten Nucleosiden aufwendig ist, wurde in dieser Arbeit nach einem alternativen Syntheseweg gesucht.

Der alternative Syntheseweg startete mit der Aktivierung der Carbonylfunktion an Position 4 vom 2',3',5'-TBDMS Uridin **141** mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid zu **142**. Obwohl die Sulfonsäureaktivierung nicht regioselektiv abläuft, sondern auch hier *N*-sulfonyliertes Nebenprodukt erhalten wurde, kann eine nukleophile Substitution nur an der *O*⁴-sulfonsäureaktivierten Position stattfinden.

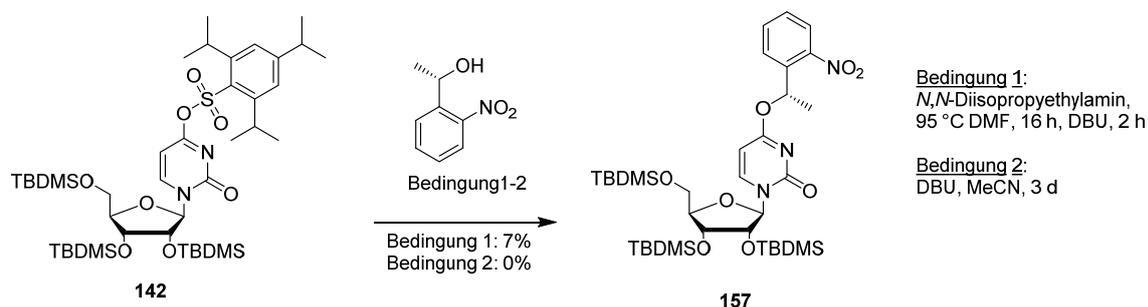


Abb. 165 Reaktionsschema zur Darstellung von **157**.

Unter diesen Bedingungen werden gewöhnlich nur Adenosin und Cytidin mit NPE-NH₂ geschützt. Für die Darstellung von NPE-geschütztem Uridin wird jedoch das im Vergleich zu NPE-NH₂ weniger nukleophile NPE-OH verwendet. Analog zu den Bedingungen zur Darstellung des NPE-geschützten Cytidins wurde die Reaktion bei 95 °C mit Hünig-Base durchgeführt. Da nach 16 Stunden kein Umsatz beobachtet werden konnte, wurde eine stärkere nicht-nukleophile Base, DBU, zugegeben und die Reaktion für weitere 2 Stunden gerührt. Unter diesen Bedingungen konnten nur 7% eines leicht verunreinigten Produktes **157** isoliert werden. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde die Reaktion von Beginn an mit DBU durchgeführt und die Reaktionszeit wurde auf drei Tage verlängert. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen kein Produkt isoliert werden. Da diese Syntheseroute kein robuster Weg ist, wurde nach einem alternativen Syntheseweg gesucht.

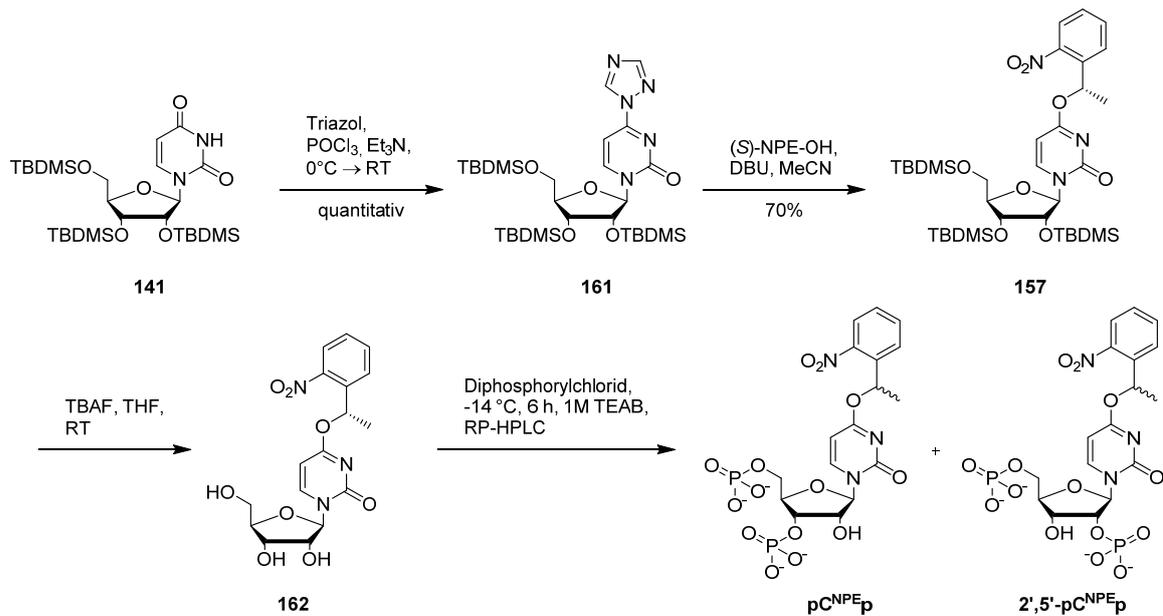


Abb. 166 Übersicht zur Darstellung von Uridin-3',5'-bisphosphat pC^{NPEp} nach einem alternativen Syntheseweg.

In der alternativen Synthesestrategie wurde anstatt einer Sulfonsäureaktivierung eine Aktivierung der Carbonylfunktion an Position 4 des TBDMS-geschützten Uridin **116** mit Triazol durchgeführt (siehe **Abb. 166**). Die Aktivierung der Carbonylfunktion erfolgte in Anlehnung an die Literaturvorschrift von Müller *et al.*^[367] mit $POCl_3$, Triethylamin und Triazol in quantitativer Ausbeute. Die Umsetzung von **161** mit enantiomerenreinem (*S*)-NPE-OH und DBU verlief in 70% Ausbeute. Unter diesen Synthesebedingungen konnten alle Nebenprodukte effizient durch säulenchromatische Aufreinigung abgetrennt werden. Die Entfernung der TBDMS-Schutzgruppen mit TBAF und die Umsetzung mit Diphosphorylchlorid wurde von Anja Blümmler (mit dem racematischen Derivat) durchgeführt und ergab ein Gemisch aus 2',5'- und 3',5'-Uridin-bisphosphat pC^{NPEp} und $2',5'-pC^{NPEp}$.

4.2.2 Einbau der NPE-geschützten Nucleosid-3',5'-Bisphosphate in RNA

Die Synthese von positionsspezifisch photolabil-geschützter RNA findet in drei Stufen statt (siehe **Abb. 167**). Im ersten Schritt wird das NPE-geschützte Nucleosidbisphosphat an das 3'-Ende der RNA mit *T4* RNA Ligase 1 (Rnl1) und ATP ligiert (3'-Extension). Um die terminal photolabil geschützte RNA in einer *Splint*-Ligation verwenden zu können, muss das 3'-Ende dephosphoryliert werden, was mit *shrimp alkaline phosphatase* (rSAP) durchgeführt wurde. Im letzten Schritt findet eine *Splint*-Ligation mit einer 5'-phosphorylierten Donor-RNA mit *T4* RNA Ligase 2 statt, sodass eine RNA mit einer internen photolabil-geschützten Nucleobase erhalten wird.

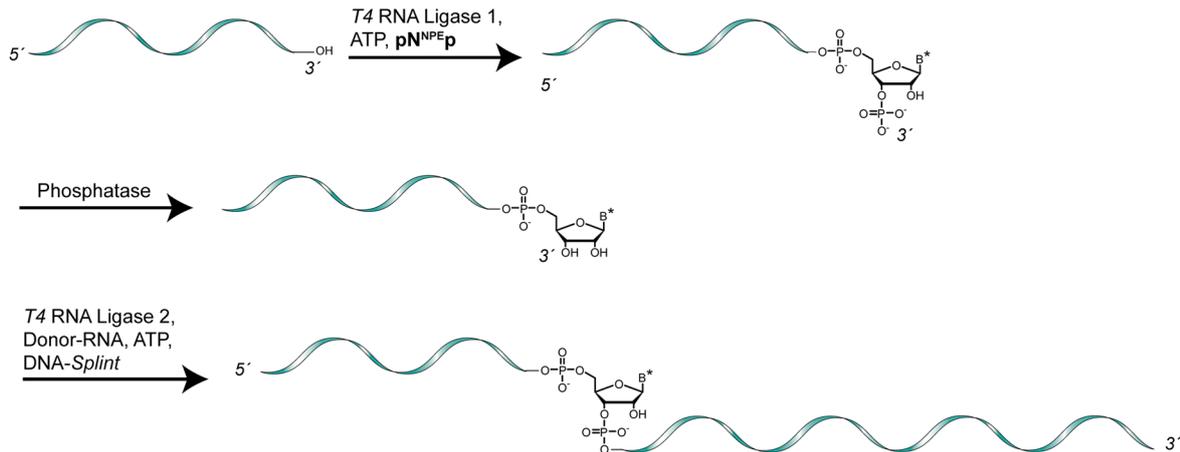


Abb. 167 Übersicht der chemo-enzymatischen Synthese von intern photolabil-geschützter RNA.

Der Einbau der Nukleosid-3',5'-bisphosphate in RNA wurde von Sara Keyhani und Anja Blümmer durchgeführt, während die Aufreinigung per HPLC auch zum Teil vom Autor dieser Arbeit durchgeführt wurde. Die, in Kapitel 4.2.1 synthetisierten, Nukleosid-3',5'-bisphosphate wurden mit *T4* RNA Ligase 1 und ATP an das 3'-Ende eines 12mer RNA Stranges mit der Sequenz 5'-GGA UAG UGA UCC-3' gegangen. Ein möglicher Mechanismus^[285,286,295] der 3'-Extension mit einem modifizierten Nukleosid-3',5'-bisphosphat, *T4* RNA Ligase 1 und ATP ist in **Abb. 168** gezeigt.

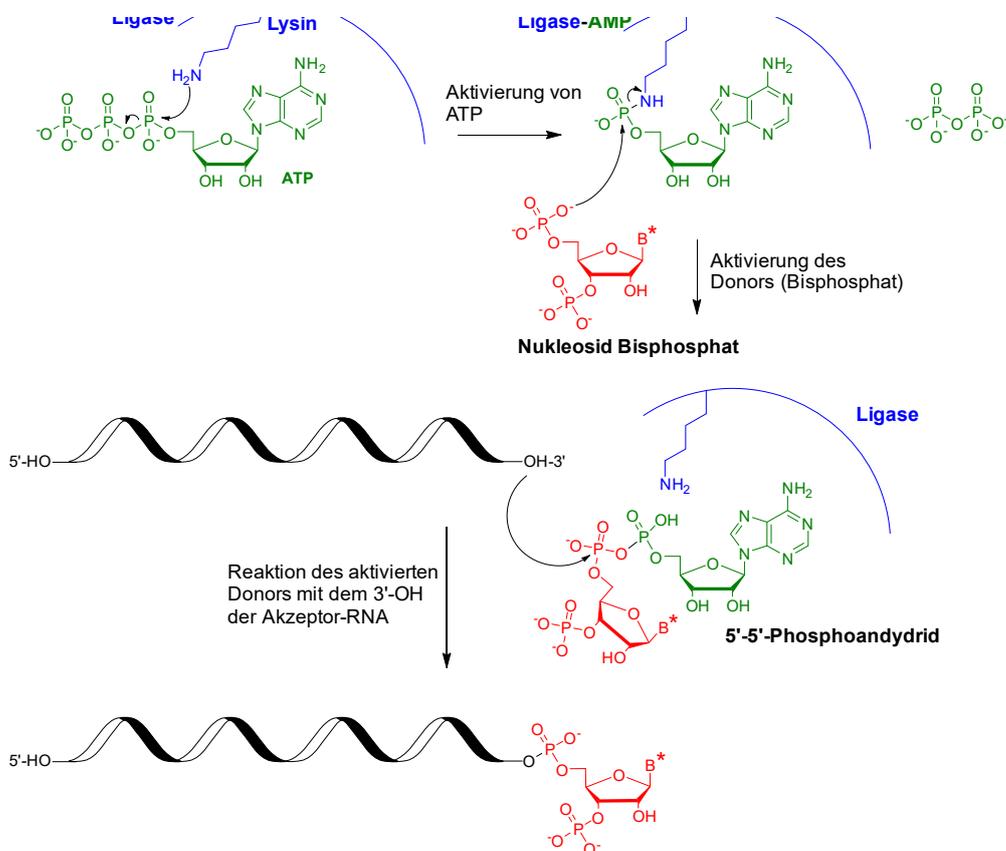


Abb. 168 Möglicher Mechanismus^[285,286,295] der 3'-Extension mit einem modifizierten Nukleosid-3',5'-bisphosphat, *T4* RNA Ligase 1 und ATP. Zur übersichtlichen Darstellung ist die Ligase kleiner und vereinfacht dargestellt, sodass ihre Funktion, die beteiligten Reaktionspartner räumlich zu koordinieren, nicht visualisiert wurde.

Im ersten Schritt reagiert ATP mit einer Lysin-Seitenkette der Ligase unter Freisetzung von Pyrophosphat. Das Nukleosidbisphosphat wird von der Ligase als Donor-RNA erkannt und bildet mit dem aktivierten AMP (Adenosin-Monophosphat) ein 5'-5'-Phosphoandrydrid. Dieses reaktive Intermediat kann mit dem 3'-OH der RNA reagieren. Als kleinstes Akzeptor-Substrat wird ein Trinukleotid und als kleinster Donor ein Nukleosid-3',5'-bisphosphat benötigt.^[295]

Alle vier NPE-geschützten Nukleosid-3',5'-bisphosphate (**pA^{NPE}p**, **pC^{NPE}p**, **pG^{NPE}p**, **pU^{NPE}p**) wurden erfolgreich und in guten Ausbeuten eingebaut. Dies konnte sowohl per RP-HPLC als auch über Gelelektrophorese (siehe **Abb. 169**) beobachtet werden. Besonders in der RP-HPLC konnte durch die unpolare NPE-Schutzgruppe und dem 3'-Phosphat (12mer-pNp) eine deutliche Verschiebung der Retentionszeit beobachtet werden (siehe **Abb. 169** als Beispiel für den Einbau von **pA^{NPE}p** an das 3'-Ende der RNA (12mer)), was eine leichte und effiziente Isolierung des Produktes erlaubte. Das Chromatogramm in **Abb. 169** zeigt zudem, dass der Umsatz vollständig war, da im Reaktionsmix (orangefarbene Spur) kein Edukt (12mer RNA) mehr vorhanden war (siehe **Abb. 235** im Anhang für weitere Chromatogramme zum Einbau der NPE-geschützten Nukleosid-3',5'-bisphosphate).

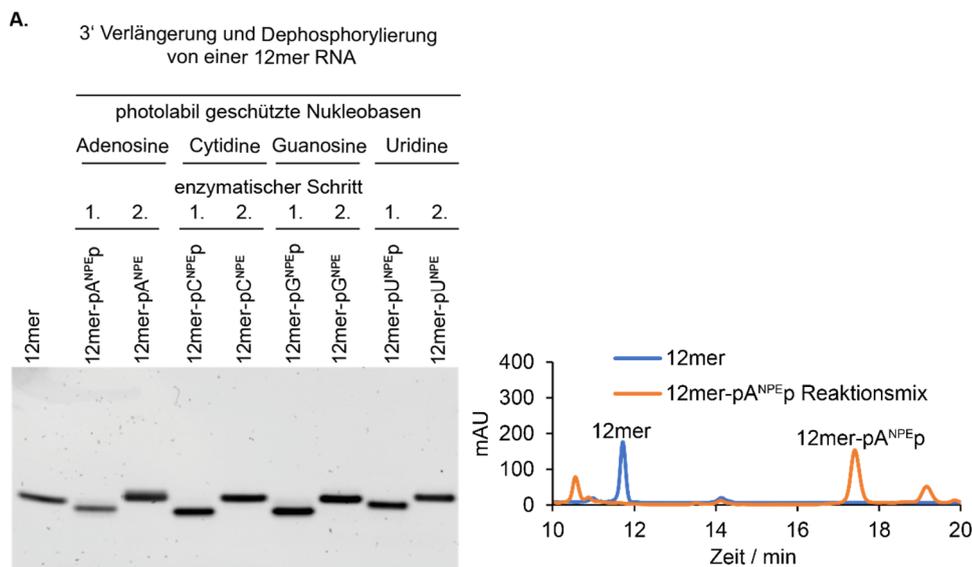


Abb. 169 Gelfoto des denaturierenden 20% PAA-Gels zur Visualisierung des Einbaus der photolabil geschützten Nukleosid-3',5'-bisphosphate in RNA (1.Schritt), sowie deren Dephosphorylierung (2.Schritt) (links). Die Abbildung wurde von Sara Keyhani übernommen. RP-HPLC Chromatogramm vom 12mer RNA Edukt (im Ligationpuffer mit ATP ohne Enzym, blaue Spur) und der 3'-Extension-Reaktion des 12mer mit **pA^{NPE}p**, T4 RNA Ligase 1 und ATP zur Synthese von **12mer-pA^{NPE}p** (orangefarbene Spur). Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Allgemein sind die Ausbeuten (siehe **Tabelle 12**) der 3'-Extension exzellent für **pA^{NPE}p** und **pG^{NPE}p** bis gut für **pC^{NPE}p** und **pU^{NPE}p**. Teilweise sind die Ausbeuten sogar besser als die von McLaughlin *et al.*^[295] publizierten für den Einbau von unmodifizierten Nukleosid-3',5'-bisphosphate und auch ähnlich zu dem von Arenz *et al.*^[274] Alkin-modifizierten Uridin-3',5'-

bisphosphat (siehe 1.6.2). Die Produkte konnten massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden (siehe **Tabelle 12**).

Tabelle 12 Sequenzen, Ausbeuten und massenspektrometrische Analyse (ESI⁻) der synthetisierten Oligonukleotiden. Die Ausbeuten wurden anhand der Integrale der HPLC-Signale bestimmt.

Sequenzen	Bezeichnungen	Ausbeute	berechnete Masse	gemessene Masse
5'-GGA UAG UGA UCC-pA ^{NPE} -3'	12mer-pA^{NPE}p	quantitativ	4391,6	4391,4
5'-GGA UAG UGA UCC-pA ^{NPE} -3'	12mer-pA^{NPE}	quantitativ	4311,7	4313,6
5'-GGA UAG UGA UCC-pC ^{NPE} -3'	12mer-pC^{NPE}p	56%	4367,6	4369,6
5'-GGA UAG UGA UCC-pC ^{NPE} -3'	12mer-pC^{NPE}	quantitativ	4287,6	4289,6
5'-GGA UAG UGA UCC-pG ^{NPE} -3'	12mer-pG^{NPE}p	99%	4410,6	4409,5
5'-GGA UAG UGA UCC-pG ^{NPE} -3'	12mer-pG^{NPE}	quantitativ	4330,7	4329,6
5'-GGA UAG UGA UCC-pU ^{NPE} -3'	12mer-pU^{NPE}p	48%	4368,6	4370,5
5'-GGA UAG UGA UCC-pU ^{NPE} -3'	12mer-pU^{NPE}	quantitativ	4288,6	4209,5

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass eine photolabile Schutzgruppe den Einbau von Nucleosid-3',5'-bisphosphaten nicht hinderte. Dies lässt darauf schließen, dass die Erkennung des Nucleosid-3',5'-bisphosphates von der *T4* RNA Ligase 1 hauptsächlich über die 3',5'-bisphosphorylierte Ribose abläuft und die Watson-Crick-Wechselwirkungen der Nucleobase eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Im nächsten Schritt wurden von Sara Keyhani und Anja Blümmler die terminal modifizierten RNAs mit *shrimp alkaline phosphatase* dephosphoryliert. Die Aufreinigung erfolgte erneut per RP-HPLC, kann bei einem 13mer RNA aber auch per Gelelektrophorese analysiert werden (siehe **Abb. 169**). Ein Beispiel eines HPLC-Chromatogramms für **12mer-pA^{NPE}p** (vor und nach Belichtung) und dem dephosphorylierten Produkt **12mer-pA^{NPE}** ist in **Abb. 170** (links) gezeigt. Die Ausbeuten der Dephosphorylierung sind quantitativ (siehe **Tabelle 12**) und die Produkte konnten eindeutig durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Auch bei diesem enzymatischen Schritt waren die NPE-Schutzgruppen vollständig kompatibel.

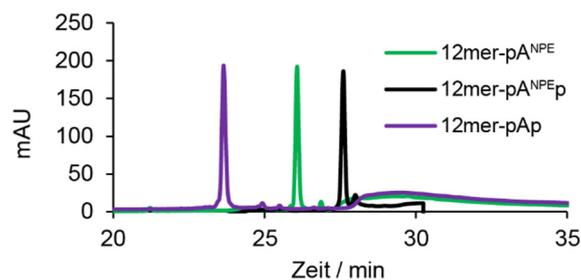


Abb. 170 RP-HPLC Chromatogramm von **12mer-pA^{NPE}p** (schwarz), sowie nach Dephosphorylierung (**12mer-pA^{NPE}**, grün) und Belichtung bei 365 nm (**12mer-pAp**, magenta). Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

4.2.3 *Splint*-Ligation der 12mer-pN^{NPE} RNA mit der 48mer RNA

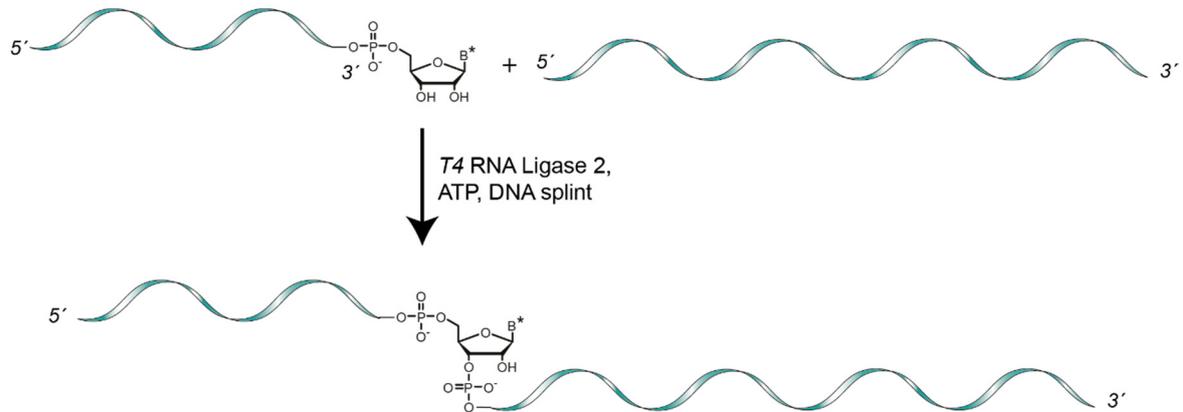


Abb. 171 Schematische Darstellung der *Splint* Ligation von **12mer-pN^{NPE}** mit einer 5'-phosphorylierten RNA, *T4* RNA Ligase 2, ATP und einem volllängen DNA *Splint*. B* steht für eine NPE-geschützte Nucleobase (A, C, G, U).

Da terminal photolabil-geschützte RNA nur in wenigen Fällen eine Anwendung finden kann, wurde als nächstes die terminal geschützte RNA in einer *Splint*-Ligation mit einer Donor-RNA (48mer) verwendet, wodurch eine intern photolabil-geschützte RNA (61mer) erhalten wurde.

4.2.3.1 Synthese der 48mer Donor RNA

Das 5'-phosphorylierte 48mer (5'-pGGC GGG AGU UGG GCU AGG GAG GAA CAG CCU UUU CUA GGC UAA GGC CCA-3') wurde vom Autor dieser Arbeit mittels Festphasensynthese hergestellt. Zur Einführung des 5'-Phosphates wurde das Phosphoramidit solid CPR (*Linktech Co.*, siehe **Abb. 172** rechts unten) verwendet. Das Phosphat-Phosphoramidit enthält Schutzgruppen, die erst nach Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen abgespalten werden können. Dies erlaubte nicht die Aufreinigung der RNA nach der DMTr-ON Methode, da unter basischen Bedingungen die entschützte RNA hydrolysieren könnte. Deswegen wurde nach der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe am Synthesizer mit Dichloressigsäure die Cyanoethyl-Schutzgruppen unter milden Bedingungen mit Diethylamin noch an der festen Phase entfernt und durch Waschen mit Acetonitril entfernt (siehe **Abb. 172**). Dies verhindert die Addition von Acrylnitril an die N³-Position von Uridin. Durch die Inkubation in ethanolischem/wässrigem Ammoniak wurden die Schutzgruppen auf den Nucleobasen und die Schutzgruppen der Phosphat-Modifikation entfernt.

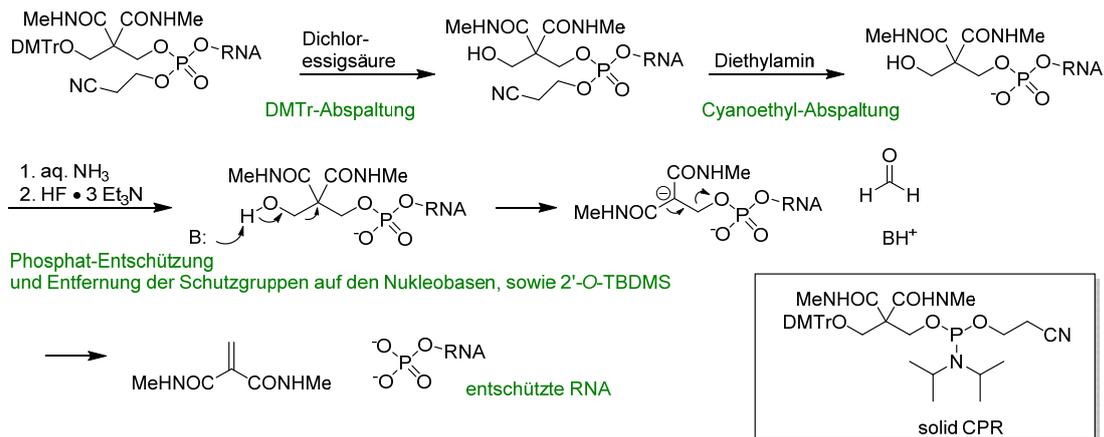


Abb. 172 Reaktionsschema (Mechanismus) der Entschützung einer RNA mit einer 5'-Phosphat Modifikation (solid CPR).

Im Anschluss wurden die 2'-O-TBDMS-Schutzgruppen mit Triethylamin-Trihydrofluorid entfernt und die RNA mit Ethanol gefällt. Die Aufreinigung erfolgte per Ionenaustauscherchromatographie und anschließender RP-HPLC. Das analytische HPLC Chromogramm ist in **Abb. 173** gezeigt. Die RNA konnte zudem massenspektrometrisch (MALDI) nachgewiesen werden.

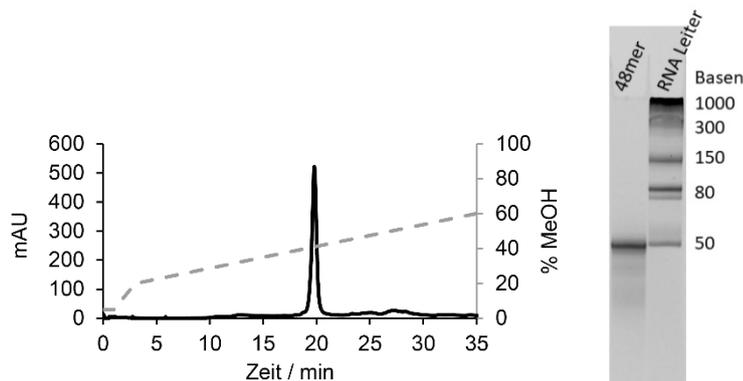


Abb. 173 Analytisches RP-HPLC Chromatogramm der 48mer RNA (links). Der Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt. Puffer A: 400mM HFIP, 16,3 mM TEA pH 8.0; Puffer B: MeOH. Die Detektion wurde bei 260 nm durchgeführt. Gelfoto des denaturierenden 20% PAA-Gels zur Analyse der 48mer RNA mit einer RNA Leiter (*ssRNA low range ladder*, NEB) ist in rechts gezeigt.

4.2.3.2 Mechanismus, Durchführung und Analytik der *Splint*-Ligation

Der Mechanismus^[285] der Ligation mit *T4* RNA Ligase 2 läuft ähnlich zu dem der *T4* RNA Ligase 1 ab. Im ersten Schritt reagiert ATP mit einer Lysin-Seitenkette der Ligase unter Freisetzung von Pyrophosphat und im zweiten Schritt wird AMP auf das 5'-Phosphat der Donor-RNA übertragen (5'-Adenylierung, AppRNA, siehe **Abb. 174**). Im dritten Schritt greift das 3'-OH der Akzeptor-RNA an das 5'-Phosphat der Phosphoanhydrid-Bindung von AppRNA an, wobei AMP freigesetzt wird und eine neue Phosphordiesterbindung gebildet wird.

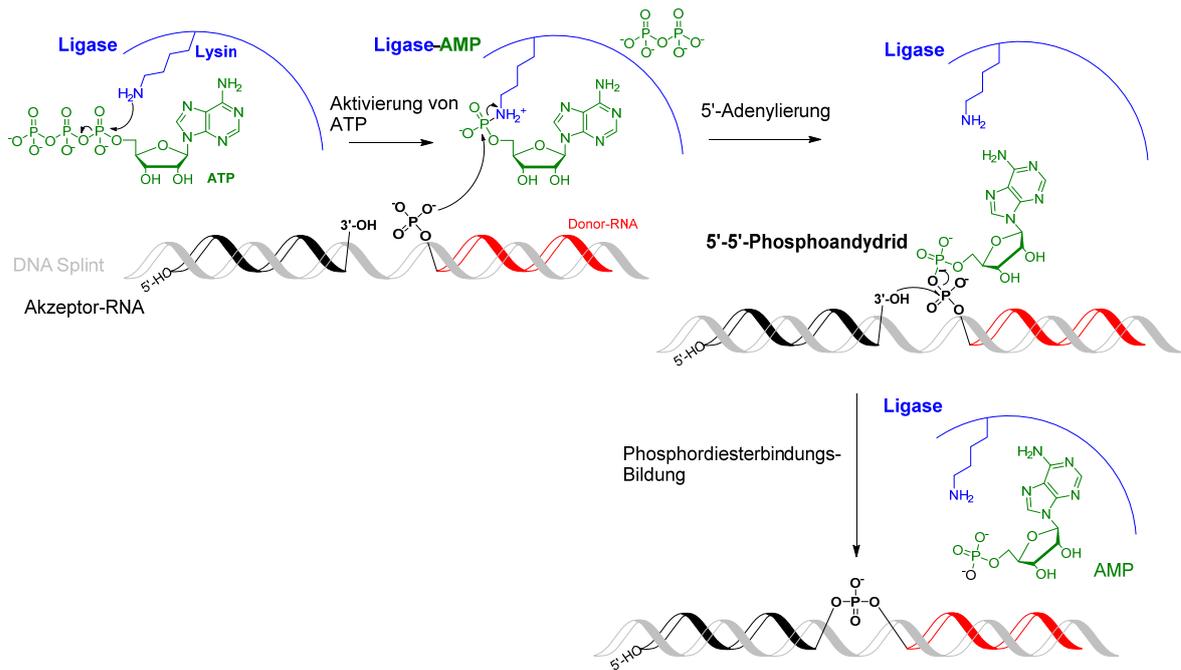


Abb. 174 Mechanismus der *Splint*-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2, ATP und einem DNA *Splint*.^[285]

Shuman *et al.*^[368] zeigten, dass eine Fehlbasenpaarung am 3'-Ende der Akzeptor-RNA mit dem *Splint* zu einer langsameren Reaktion führt, ohne die Gesamtausbeute zu beeinflussen. Im Vergleich zu den kanonischen Watson-Crick-Basenpaarungen führt eine A-A- und eine U-G-Fehlbasenpaarung im zweiten Schritt der Reaktion (Phosphoanhydrid Bildung) zu einer 65- und 30-fachen und im dritten Schritt zu einer 8- und 5-fachen Verlangsamung der Reaktion. Das bedeutet, dass die 5'-Adenylierung der Donor-RNA (Schritt 2) stärker beeinflusst wird, als die Knüpfung der Phosphordiesterbindung, was an der optimalen Positionierung der Akzeptor-RNA liegen kann. Zudem korreliert der Grad der strukturellen Störung (A-A stört stärker als ein G-U Fehlbasenpaar) des *Nicks* mit der Geschwindigkeit von Schritt 2. Wird die lokale Störung einer photolabilen Schutzgruppe ähnlich zu der einer Fehlbasenpaarung betrachtet, sollte die Reaktion zwar langsamer, jedoch vollständig ablaufen.

Die Ligation wurde mit einem Volllängen-*Splint* (Sequenzen siehe **Abb. 175**), ATP und *T4* RNA Ligase 2 von Sara Keyhani durchgeführt. Alle Ligationen wurden mit demselben *Splint* durchgeführt, welcher gegenüber der Nukleobase mit der NPE-Schutzgruppe eine Thymin-Base hat. Da die photolabile Schutzgruppe die Basenpaarung ohnehin stört, wurde darauf verzichtet (außer für **12mer-pU^{NPE}**) einen zu der Sequenz vollständig komplementären *Splint* zu verwenden.

DNA Splint



Abb. 175 Sequenzen der verwendeten Nukleinsäuren in der *Splint*-Ligation.

Die *Splint*-Ligation (mit anschließendem DNase Verdau) konnte erfolgreich mit allen vier NPE-geschützten RNAs (**12mer-pN^{NPE}**, N=A, C, G, U) durchgeführt werden (siehe PAGE Gel in

Abb. 176). Das Ligrationsprodukt (**61mer-N^{NPE}**) konnte effizient per RP-HPLC aufgereinigt werden (Chromatogramm des Reaktionsgemisches von **61mer-A^{NPE}** ist in

Abb. 176 gezeigt; für das RP-HPLC Chromatogramm des aufgereinigten 61mer-pA^{NPE} siehe **Abb. 177**). Die Ausbeuten wurden anhand der Intensitäten der Gelbanden bestimmt und betragen 49%, 9%, 46% und 47% für **61mer-A^{NPE}**, **61mer-C^{NPE}**, **61mer-G^{NPE}** und **61mer-U^{NPE}**. Die unterschiedlichen Ausbeuten waren nicht ungewöhnlich, da generell für jedes Konstrukt die Ligrationsbedingungen optimiert werden müssen, worauf an dieser Stelle verzichtet wurde.

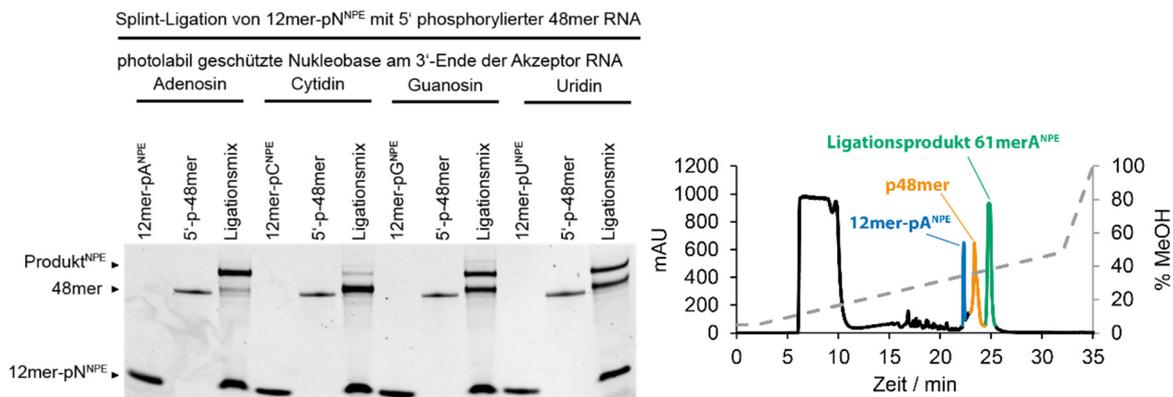


Abb. 176 Gelfoto des denaturierenden 20% PAA-Gels zur Analyse der *Splint*-Ligation nach DNase Verdau (links, aufgenommen und modifiziert übernommen von Sara Keyhani) und ein RP-HPLC Chromatogramm (rechts) des Reaktionsgemisches der *Splint*-Ligation von **12mer-pA^{NPE}** und der 5'-phosphorylierten RNA (48mer). Der Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt. Puffer A: HFIP 400 mM, TEA 16,3 mM (pH 8). Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Da die photolabil-geschützten Ligrationsprodukte (**61merN^{NPE}**, N=A, C, G, U) nicht massenspektrometrisch identifiziert werden konnten, wurde die korrekte Länge der RNAs über Gelelektrophorese (für ein Beispiel siehe **Abb. 177** rechts) und das Vorhandensein einer photolabilen Schutzgruppe über den Vergleich der Retentionszeit vor und nach Belichten mit UV-Licht (365 nm) (siehe **Abb. 170** rechts für ein Beispiel an **61merA^{NPE}**) nachgewiesen.

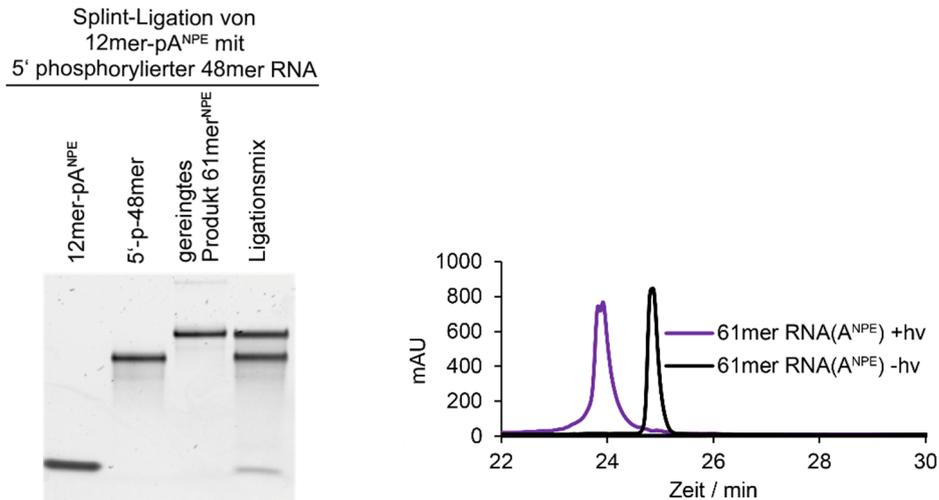


Abb. 177 Gelfoto eines denaturierenden 20% PAA-Gels zur Analyse der *Splint*-Ligation von **12mer-pA^{NPE}** mit einer 5'-phosphorylierten RNA (48mer) ist links gezeigt. Gezeigt sind die Edukte, der unaufgereinigte Ligationsmix und das HPLC gereinigte Produkt. Die Abbildung wurde von Sara Keyhani modifiziert übernommen. Das RP-HPLC Chromatogramm vom dem gereinigten Produkt der Ligation (61mer RNA) vor und nach Belichtung bei 365 nm ist rechts gezeigt. Die Verschiebung der Retentionszeit nach UV-Belichtung beweist das Vorhandensein einer photolabilen NPE-Schutzgruppe.

Auch bei diesen enzymatischen Reaktionen störten die photolabilen Schutzgruppen nicht und verhielten sich vermutlich ähnlich wie eine Fehlbasenpaarung am 3'-Ende der Akzeptor-RNA. Es wurde allerdings nicht untersucht, ob die Reaktionszeit im Vergleich zu unmodifizierter RNA länger sein muss. Dies steht auch im Einklang mit der Tatsache, dass für alle Ligationen derselbe *Splint* verwendet wurde, obwohl sich die Sequenzen an der 3'-Position der Akzeptor-RNA unterschieden.

4.2.3.3 Synthese einer lichtaktivierbaren Aptamerdomäne des 2'dG Riboschalters

Riboschalter sind genregulierende Elemente, die auf der 5'-untranslatierten Region (UTR) von mRNAs liegen.^[369] Dabei kann die Regulation der Genexpression auf der Ebene der Transkription oder Translation stattfinden. In Eukaroyten (Pflanzen, Pilze) konnte bislang nur wenige Riboschalter gefunden werden,^[370] welche alternatives Spleißen regulieren,^[371] auf was hier im Folgenden nicht weiter eingegangen wird. Riboschalter besitzen spezielle evolutionär konservierte Liganden-Bindungs-Domänen (Aptamer) und eine variable Sequenz, die Expressions-Plattform.^[369] Wie der Name Riboschalter schon sagt, besitzen sie die Funktion eines Gen-Schalters. Riboschalter sind *cis*-regulierende Elemente, das bedeutet, dass sie die Genexpression der mRNA regulieren, die wiederum an der Synthese des eigenen Metabolits beteiligt ist.^[372] Übersteigt ein Metabolit eine bestimmte Konzentration, kann dieser an die spezifische Ligandenbindungsstelle binden, was zu einer strukturellen Veränderung des Riboschalters führt.^[373]

Es werden zwei Varianten von Riboschaltern in Bakterien unterschieden: Bei einem ON-Schalter führt die Ligandenbindung zur Aktivierung und bei einem OFF-Schalter zur Terminierung der Genexpression. In **Abb. 178** ist die Funktion eines Riboschalters am Beispiel eines transkriptionellen OFF-Schalters dargestellt. In Anwesenheit des Liganden bildet sich ein Terminatorstamm, was zur Dissoziation der Polymerase führt und somit die Transkription terminiert. In Abwesenheit des Liganden bildet sich ein Antiterminatorstamm und die Transkription wird fortgesetzt. Typische Liganden sind Fluorid- und Magnesiumionen, Purine, Kofaktoren sowie Aminosäuren.

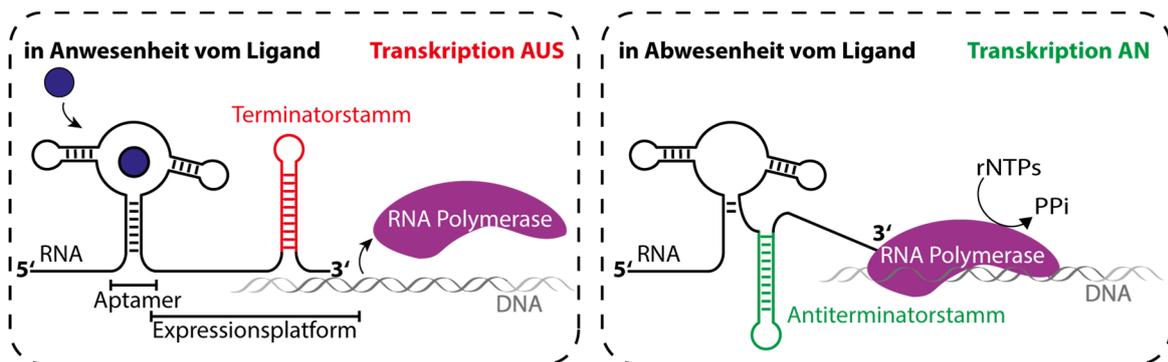


Abb. 178 Schematische Darstellung der Funktion eines transkriptionellen OFF-Riboschalters. Die Ligandenbindung in der Aptamer-Domäne führt zur Bildung eines Terminatorstammes und die Transkription wird terminiert (links). In Abwesenheit des Liganden bildet der Riboschalter einen Antiterminatorstamm und die Transkription der mRNA wird fortgesetzt (rechts).

Die meisten aller bekannten Riboschalter gehören zu der Gruppe der Purin-spezifischen (z.B. Guanosin, Adenin, 2'-Deoxyguanosin, preQ₁, SAM) Riboschalter.^[374] Der 2'-dG-spezifische I-A-Riboschalter aus dem Bakterium *Mesoplasma florum* bindet 2'-Deoxyguanosin mit einem K_D (*in vitro*) von ungefähr 150 nM.^[375] Besonders bedeutend für die Ligandenbindung ist die Ausbildung von Watson-Crick-Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und Cytidin an Position 61 (C61) (siehe **Abb. 179** links).^[376] Der transkriptionelle OFF-Typ Riboschalter reguliert die Genexpression der Ribonukleotid-Reduktase,^[377] ein Enzym welches die Umwandlung von Guanosin in 2'-Deoxyguanosin katalysiert (siehe **Abb. 179** rechts).^[378]

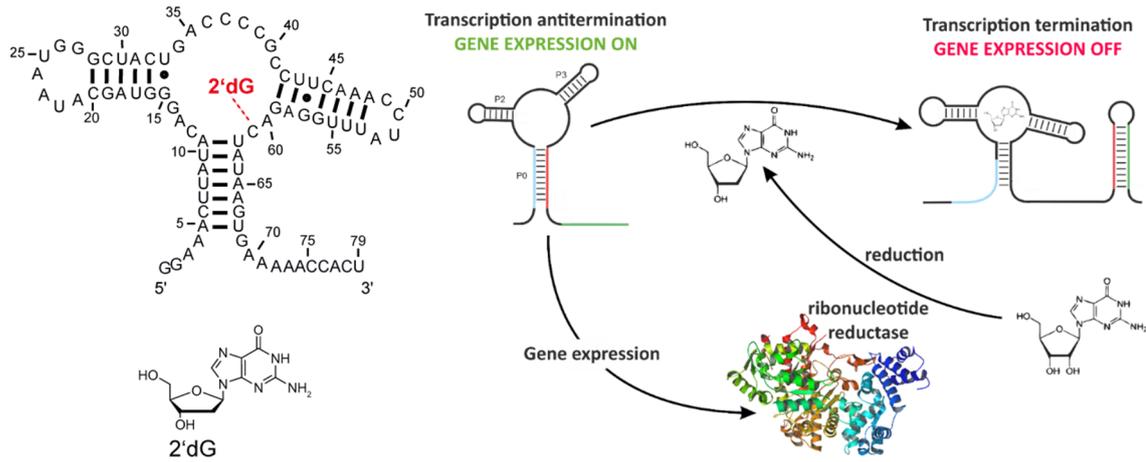


Abb. 179 Struktur der Aptamerdomäne des 2'dG Riboschalters (links). Entscheidend für die Ligandenbindung ist die Watson-Crick-Wechselwirkung mit C61. Die Abbildung wurde von Sara Keyhani übernommen und modifiziert. Die Funktion des 2'dG Riboschalters ist rechtst gezeigt. Im ON-Zustand exprimiert die durch den Riboschalter regulierte RNA das Enzym Ribonukleotid-Reduktase, welches die Dehydroxylierung von Guanosin zu 2'-Deoxyguanosin (2'dG) katalysiert. Der Metabolit (2'dG) kann an die Aptamer-Domäne binden, was zur Bildung eines Terminatorstamms führt und somit die Genexpression der Ribonukleotid-Reduktase und die Synthese von 2'-Deoxyguanosin inhibiert. Die rechte Abbildung wurde aus der Dissertation von Dr. Christina Helmeling entnommen.

Da aus einer vorangegangenen Studie^[376] bekannt war, dass das Cytidin an Position 61 entscheidend für die Ligandenbindung ist, sollte eine photolabile Schutzgruppe an dieser Position temporär die Ligandenbindung verhindern. Erst nach Belichtung, sollte der Ligand binden (siehe **Abb. 180**). NMR-spektroskopisch sollte das Vorhandensein der Ligandenbindung vor und nach Belichtung untersucht werden. Diese Anwendung sollte zugleich aufzeigen, dass die hier vorgestellte chemo-enzymatische Methode zur Einführung von photolabilen Schutzgruppen ideal geeignet ist, die für NMR benötigten größeren Mengen an RNA herzustellen, was über klassische Festphasensynthese oft problematisch ist.

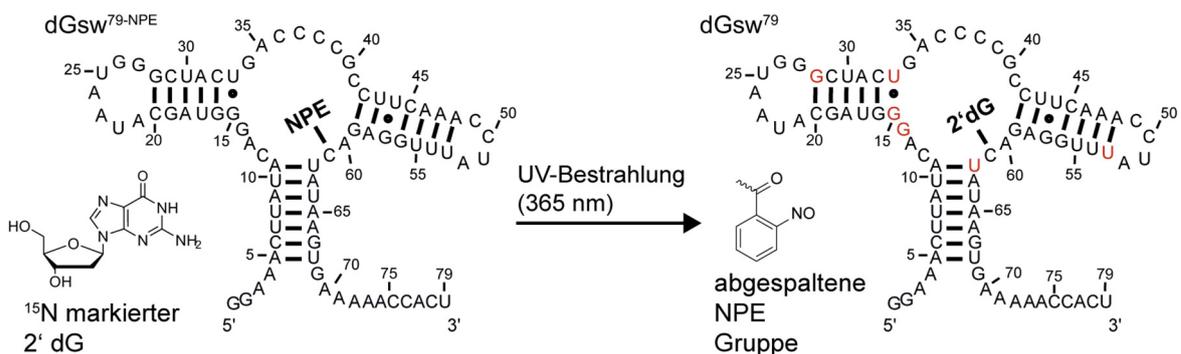


Abb. 180 Sekundärstruktur und Funktion des lichtaktivierbaren 2'dG Riboschalters vor (**dGsw^{80-NPE}**) und nach (**dGsw⁸⁰**) UV-Bestrahlung in Anwesenheit eines ¹⁵N markierten Liganden (2'dG). Der Riboschalter enthält ein zusätzliches G am 5'-Ende zur Steigerung der Transkriptionseffizienz. Die Abbildung von Sara Keyhani modifiziert übernommen.

Die Synthese des lichtaktivierbaren Riboschalters (siehe **Abb. 180** und **Abb. 181**) wurde von Sara Keyhani durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Aptamer bis zur Position 61 mit *T7* RNA Polymerase transkribiert und per RP-HPLC gereinigt (→ **dGsw⁶⁰**). Im nächsten Schritt wurde das (S)-NPE-geschützte Cytidin-3',5'-bisphosphat (**pN^{NPE}p**) mit *T4* RNA

Ligase 1 an das 3'-Ende der RNA geknüpft (\rightarrow **dGsw⁶¹-pC^{NPE}p**). Da die 3'-Extension mit **pC^{NPE}p** an das 12mer RNA nur mit mäßigen Ausbeuten ablief, wurde eine Optimierungsserie für dieses Konstrukt untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Optimierung der RNA Konzentration, sowie dem RNA/**pC^{NPE}p**-Verhältnis die Ausbeute von 8% auf 62% gesteigert werden kann (siehe **Tabelle 13**).

Tabelle 13 Optimierungsstudien der 3'-Modifizierung mit **pC^{NPE}p** für die chemo-enzymatische Synthese eines lichtaktivierbaren Riboschalters. Die Optimierungen wurden von Sara Keyhani durchgeführt.

RNA Konzentration	Ausbeute	RNA/ pC^{NPE}p Verhältnis	Ausbeute
5 μ M	8%	1:4	64%
12 μ M	19%	1:10	62%
20 μ M	49%	1:50	56%
50 μ M	62%	1:100	40%

Nach erfolgreicher Aufreinigung per RP-HPLC wurde das 3'-Phosphat von **dGsw⁶¹-pC^{NPE}p** mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*rSAP*) dephosphoryliert (\rightarrow **dGsw⁶¹-pC^{NPE}**). Im letzten Schritt wurde **dGsw⁶¹-pC^{NPE}** mit einer 5'-phosphorylierten Donor-RNA (18mer) in einer *Splint*-Ligation mit *T4 RNA Ligase 2* zu **dGsw⁷⁹-NPE** umgesetzt und über RP-HPLC aufgereinigt.

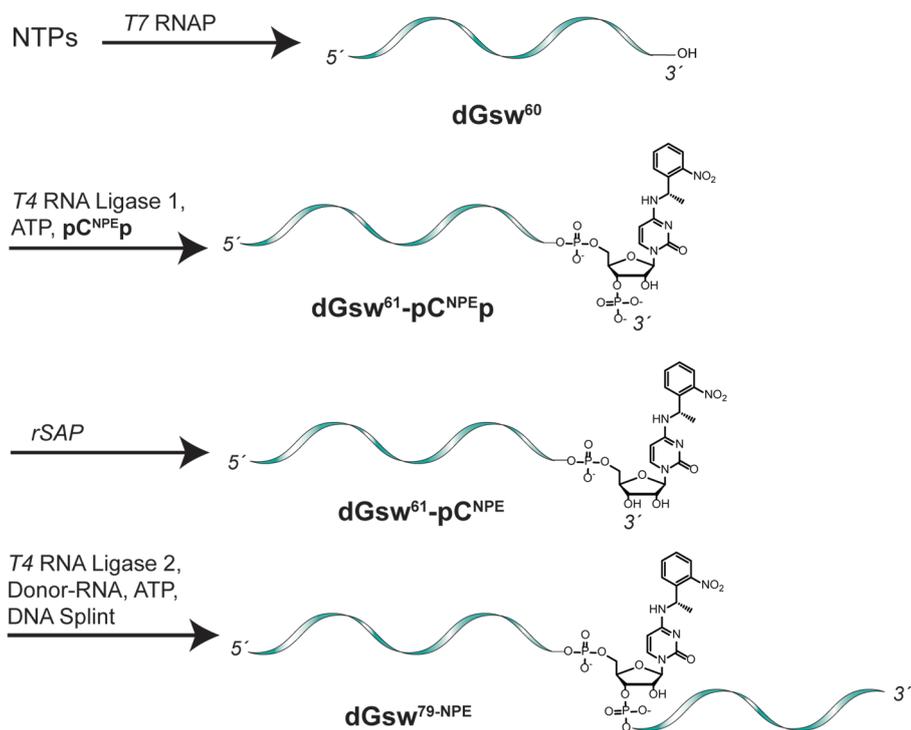


Abb. 181 Synthese des lichtaktivierbaren 2'-dG-Riboschalters (**dGsw⁷⁹-NPE**).

Die RNA Struktur und die Ligandenbindung wurden NMR-spektroskopisch von Sara Keyhani untersucht. Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte durch die Resonanzsignale der Iminprotonen (von Gs und Us) in der basenpaarenden Region bei 9-15ppm. Im Vergleich zu einem nicht-photolabil geschützten Riboschalter als Referenz **Ref-dGsw⁷⁹** (mit

anderen Überhängen), weist der photolabil geschützte Riboschalter **dGsw^{79-NPE}** eine andere Struktur auf (siehe **Abb. 182**).

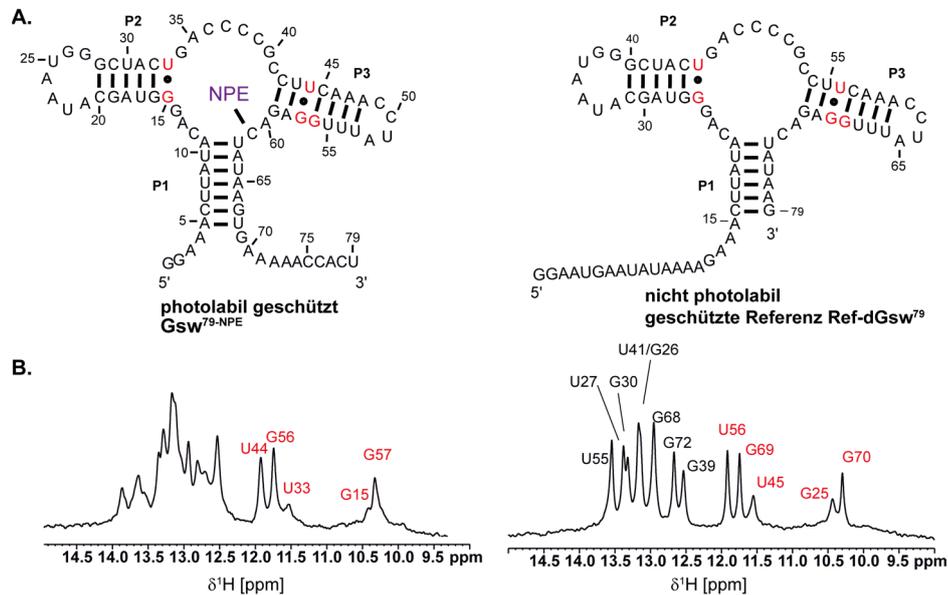


Abb. 182 A: Sekundärstruktur von **dGsw^{79-NPE}** (links) und einer nicht photolabil geschützten Referenz **Ref-dGsw⁷⁹** (rechts). B: ¹H-NMR Spektren (800 MHz, 298 K) von **dGsw^{79-NPE}** (links) und **Ref-dGsw⁷⁹** (rechts) (34 μM in NMR-Puffer). Die Basenpaarungen, die in beiden Spektren beobachtet wurde, sind rot markiert. Die Abbildung wurde von Sara Keyhani modifiziert übernommen.

Titration von **dGsw^{79-NPE}** mit 1 mM Mg²⁺ führte zu einer strukturellen Änderung (siehe **Abb. 183**). Nach Zugabe von 2,2 Äquivalenten des ¹⁵N-markierten Liganden (2'dG) änderte sich die Struktur nicht weiter, da der Ligand aufgrund der photolabilen Schutzgruppe nicht (ausreichend) mit dem Riboschalter wechselwirken konnte. Diese Annahme wurde durch die Abwesenheit eines Iminosignals im ¹⁵N-editierten ¹H-NMR Spektrum zusätzlich bewiesen. Nach UV-Belichtung mit einem Laser (365 nm, 4 W, 2x1 s) fand eine Umfaltung des Riboschalters statt (siehe **Abb. 183**, unten) und ein Iminosignals war im ¹⁵N-selektiven ¹H-NMR Spektrum detektierbar. Aufgrund der geringen Konzentration der Probe (34 μM) konnte die Kinetik der Faltung nicht beobachtet werden. Zudem war eine vollständige Zuordnung der Signale nicht möglich.

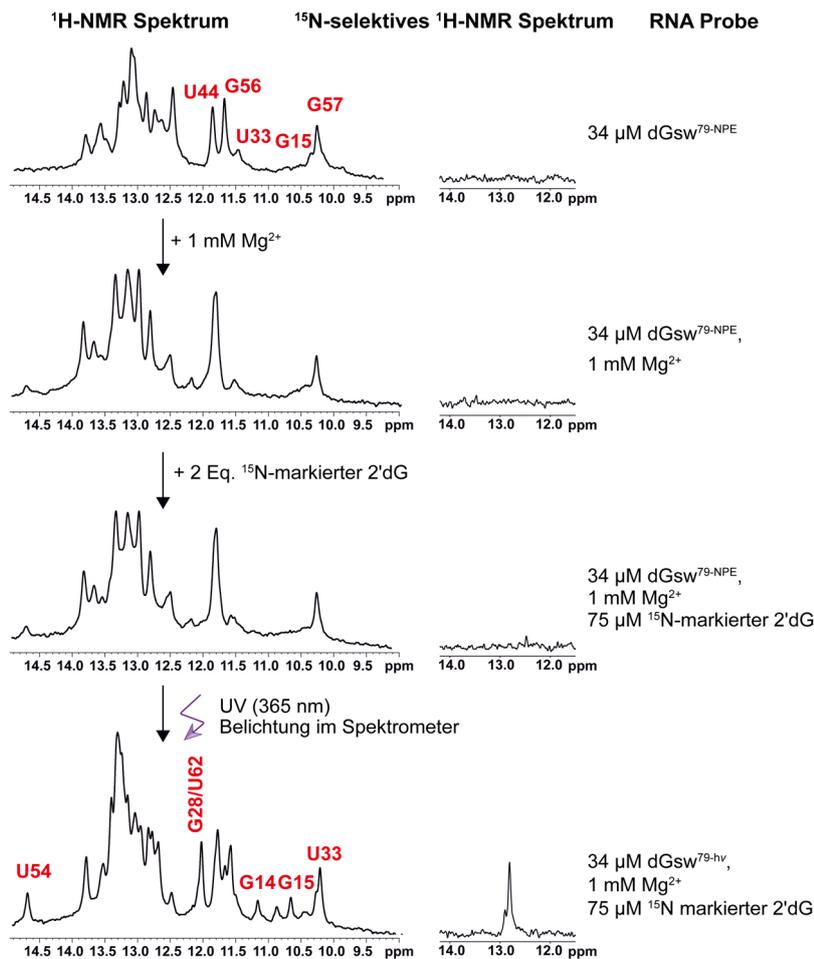


Abb. 183 $^1\text{H-NMR}$ und ^{15}N -selektives $^1\text{H-NMR}$ Spektren des $\text{dGsw}^{80\text{-NPE}}$ Riboschalters vor und nach Zugabe von Magnesium, Ligand, sowie nach Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm, 4 W, 1 s). Die Abbildung wurde von Sara Keyhani modifiziert übernommen.

4.2.4 Chemo-enzymatische Synthese von funktionalisierter RNA

Wie in Kapitel 1.6.2 ausführlich beschrieben erlaubt die *T7* RNA Polymerase den Einbau von modifizierten Initiatornukleotiden an das 5'-Ende von RNA während der Transkription. Bei diesem Konzept wird sich zu Nutzen gemacht, dass Guanodin oder Guanodin-Monophosphate (abhängig vom Promotor auch Adenosin Derivate) nur als Initiator verwendet werden können, nicht aber in der Elongation der transkribierenden RNA. Da Initiatornukleotide mit GTP um den Einbau am 5'-Ende konkurrieren, müssen die Initiatornukleotide im Überschuss eingesetzt werden, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Durch die selektive Einführung einer funktionalisierenden Gruppe kann RNA markiert werden, z.B. mit Fluorophoren oder immobilisiert^[281] werden, um eine bessere Aufreinigung zu erzielen. Click-Chemie bietet ideale Bedingungen für eine Modifizierung, da die Reaktionen selektiv und häufig quantitativ ablaufen und viele Modifikationen kommerziell erhältlich sind.^[379] Seyfried *et al.*^[128] verwendeten Alkin-modifizierte NPE-Schutzgruppen (1-(2-Nitrophenyl)but-3-in; NPBY) auf DNA Basen, um mit einem Bis-Azid-Linker unter Kupfer(I)-Katalyse DNA zu zyklisieren (siehe **Abb. 184**). Dadurch wurde das Oligonukleotid in eine global ungünstige

Konformation gezwungen, die es nicht mehr ermöglichte, die komplementäre Nucleinsäure oder ein Protein zu binden.

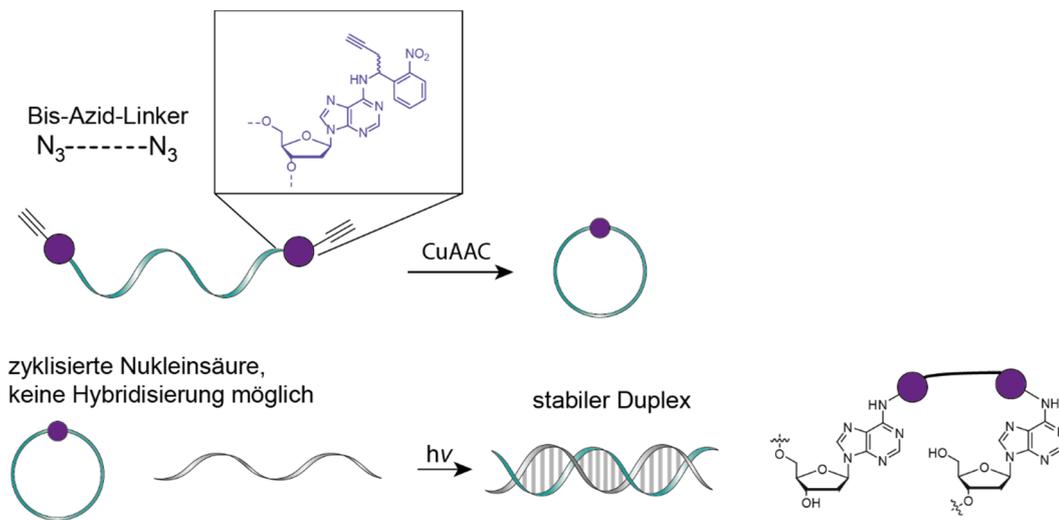


Abb. 184 Schematische Darstellung der (Ende-zu-Ende) Zyklisierung von photoaktivierbaren Nucleinsäuren nach Seyfried *et al.*^[128] Durch Festphasensynthese wurden NPBY-geschützte Nucleotide in DNA eingeführt. Die DNA wurde mit einem Bis-Azid-Linker unter Kupfer(I)-Katalyse zyklisiert. Im zyklisierten Zustand ist keine Hybridisierung möglich. UV-Belichtung führte zur Abspaltung des Linkers und somit zur Linearisierung der Nucleinsäure, was eine Bindung der komplementären Nucleinsäure ermöglichte.

Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines NPBY-modifizierten Initiatornucleotides (**NPBY-pG**, siehe **Abb. 185**), um das 5'-Ende von RNA mit einer chemo-enzymatischen Methode zu funktionalisieren. Um eine Zyklisierung zu ermöglichen sollte zudem ein NPBY-geschütztes Nucleosid-3',5'-bisphosphat synthetisiert werden, was eine Einführung am 3'-Ende von RNA ermöglichen und wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben auch zu einer internen Modifikation transformiert werden sollte. Beide Modifikationen schaffen die Möglichkeit RNA spezifisch temporär zu markieren oder funktionalisieren.

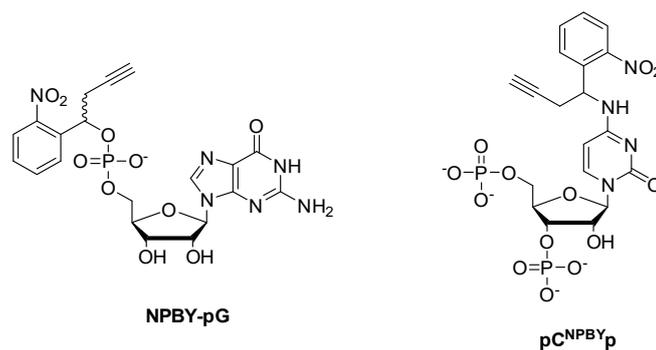


Abb. 185 Struktur des NPBY-geschützten Initiatornucleotides (**NPBY-pG**, links) und des NPBY-geschützten Cytidin 3',5'-Bisphosphates (**pC^{NPBY}p**, rechts).

4.2.4.1 Synthese des NPBY-geschützten Initiatornukleotides (NPBY-pG)

Obwohl die deutliche Mehrheit der publizierten Initiatornukleotide auf 5'-Guanosin-Monophosphat-Derivaten basiert (siehe Kapitel 1.6.2), gibt es Beispiele^[270,380], an denen die Modifikation direkt an der C5'-Position von Guanosin verknüpft ist. Ohne das 5'-Monophosphat könnte 5'-NPBY-5'-Deoxyguanosin **NPBY-G** in nur zwei Synthesestufen dargestellt werden (siehe **Abb. 186**). Im ersten Schritt wurde nach Literaturvorschrift^[381] Guanosin mit Iod, Triphenylphosphin und Imidazol zu 5'-Iodo-5'-Deoxyguanosin **163** in 40% Ausbeute umgesetzt. In der nachfolgenden nukleophilen Substitution mit NPBY-OH^[128] und DBU zu 5'-NPBY-5'-Deoxyguanosin **NPBY-G** konnte allerdings nicht das gewünschte Produkt isoliert werden, weshalb ein anderer Syntheseweg durchgeführt wurde.

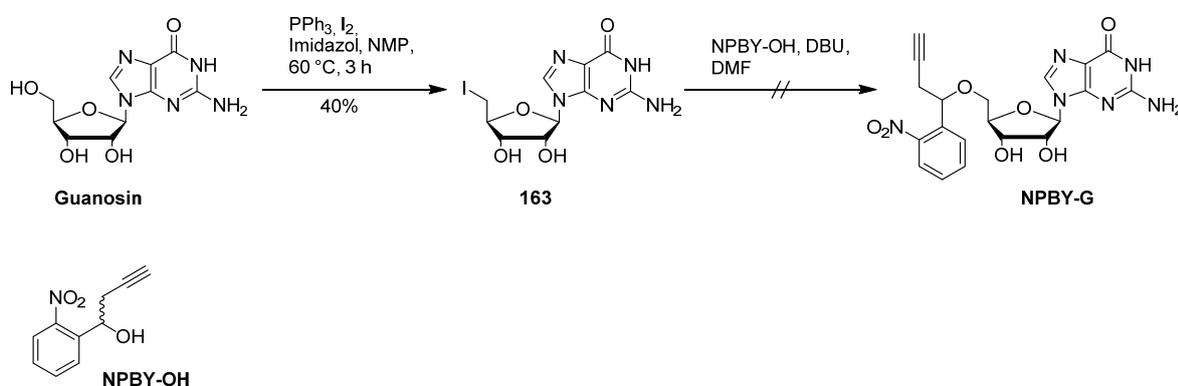


Abb. 186 Syntheseweg 1 zur Darstellung eines NPE-Alkin (NPBY) photolabil geschützten Guanosin Initiatornukleotides. Die Jodierung der 5'-Position von Guanosin erfolgte nach Literaturvorschrift.^[381] Eine anschließende nukleophile Substitution mit NPBY-OH und DBU ergab keinen Umsatz, weshalb nach einer anderen Syntheseroute gesucht wurde. NPBY-OH wurde nach der Literaturvorschrift von Seyfried *et al.*^[128] synthetisiert.

Im ersten Schritt wurde Guanosin nach Literaturvorschrift^[382] in annähernd quantitativer Ausbeute zu 2',3',5'-Tri-O-TBDMS-Guanosin **164** umgesetzt. Da primäre Silylether-Schutzgruppen leichter unter sauren Bedingungen abzuspalten sind,^[383] konnte im nächsten Schritt selektiv die 5'-TBDMS Schutzgruppe nach Literaturvorschrift^[384] mit verdünnter Trifluoressigsäure bei 0 °C abgespalten werden (85% Ausbeute). Zur Einführung einer Phosphatgruppe und der Möglichkeit zur dessen Modifizierung eignet sich ideal Phosphoramidit-Chemie. Dazu wurde nach Literaturvorschrift^[275] 2',3'-O-TBDMS Guanosin **165** mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit umgesetzt um Verbindung **142** in 70% Ausbeute zu erhalten. Im letzten Schritt wurde das Phosphoramidit **166** mit Dicyanoimidazol aktiviert und mit NPBY-OH umgesetzt. Durch Zugabe von *tert.*-Butylhydroperoxid wurde das Phosphit zum Phosphat oxidiert. Da in der Literaturvorschrift nicht angegeben war in welchem Lösungsmittel *tert.*-Butylhydroperoxid vorlag, wurde eine 70% wässrige Lösung verwendet. Allerdings zeigten die Analyse per DC-MS das Vorhandensein von nicht-oxidierten Spezies, sodass in zukünftigen Studien die Verwendung von *tert.*-Butylhydroperoxid in Decan getestet werden könnte. Nach Entfernung aller flüchtigen Bestandteile im Hochvakuum, wurde der Rückstand mit TBAF (in THF) aufgenommen und für 2 h bei

Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über eine kurze Schicht von RP-Kieselgel filtriert, um Fluorid-haltige Verbindungen zu entfernen, welche die RP-HPLC Säule schädigen könnten. Die Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC (siehe **Abb. 188**, links) mit 0,1 M TEAA Puffer und Acetonitril. Zur Entfernung der überschüssigen Triethylammonium(acetat)-Salze wurde eine RP-HPLC mit den Eluenten Wasser und Acetonitril durchgeführt (siehe **Abb. 188**, rechts). Das Produkt konnte eindeutig durch $^1\text{H-NMR}$ und $^{31}\text{P-NMR}$ Spektroskopie (siehe **Abb. 189**), sowie durch massenspektrometrische Analyse charakterisiert werden.

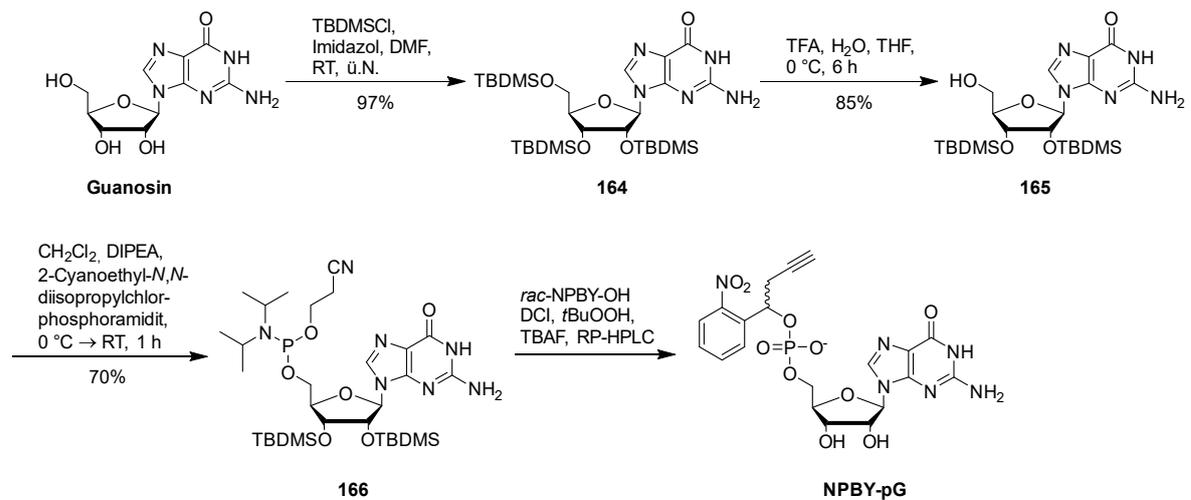


Abb. 187 Syntheseweg 2 zur Darstellung eines NPE-Alkin (NPBY) photolabil geschützten Guanosin-Initiator-nukleotides **NPBY-pG**. Die Darstellung von Verbindung **166** erfolgte nach Literaturvorschrift^[275].

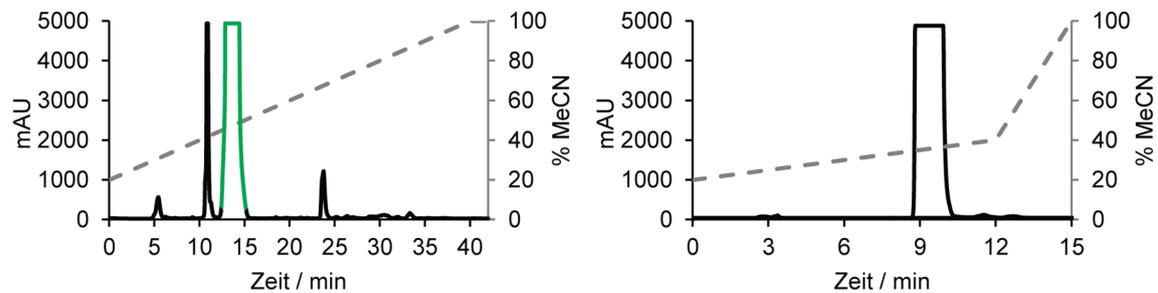


Abb. 188 RP-HPLC Chromatogramme zur Isolierung (links) und zur Entsalzung (rechts) von **NPBY-pG**. Der grün gefärbte Peak zeigt das gewünschte Produkt an. Die Gradienten sind auf der Sekundärachse gezeigt. Eluenten: 0,1 M TEAA (pH 7) und MeCN 10 mL·min⁻¹. Verwendete RP-HPLC Säule: *MultoKrom* 100-5 C18, 250x22 mm.

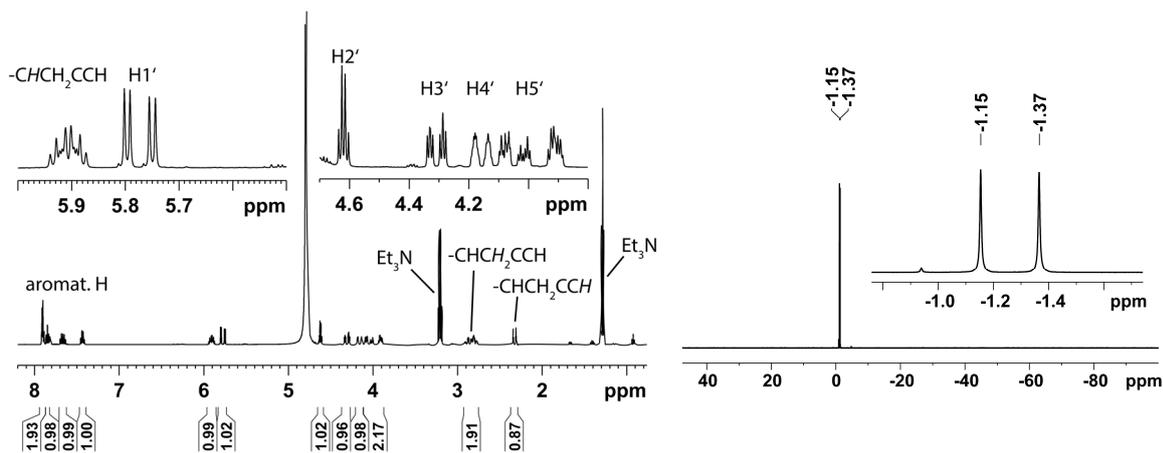


Abb. 189 ^1H -NMR (links, 500 MHz) und ^{31}P -NMR Spektrum (rechts, 202 MHz) von **NPBY-pG** in D_2O . Aufgrund der racemischen NPBY-Schutzgruppe, ist sowohl im ^1H -NMR als auch im ^{31}P -NMR Spektrum ein doppelter Signalsatz zu sehen.

4.2.4.2 Transkription mit dem lichtaktivierbaren Initiator nukleotid NPBY-pG

Die Transkription mit dem Initiator nukleotid wurde von Sara Keyhani am Beispiel des 2'dG Riboschalters (dGsw⁶⁰) durchgeführt (siehe **Abb. 190**). Da das Initiator nukleotid mit GTP um den Einbau am 5'-Ende konkurriert, wurde das Initiator nukleotid im 9-fachen Überschuss eingesetzt. Der erfolgreiche Einbau des Initiator nukleotides wurde per RP-HPLC mit 73% Effizienz quantifiziert (siehe **Abb. 190**), wobei keine Untersuchungen zur Bestimmung der totalen Transkriptionsausbeute durchgeführt wurden.

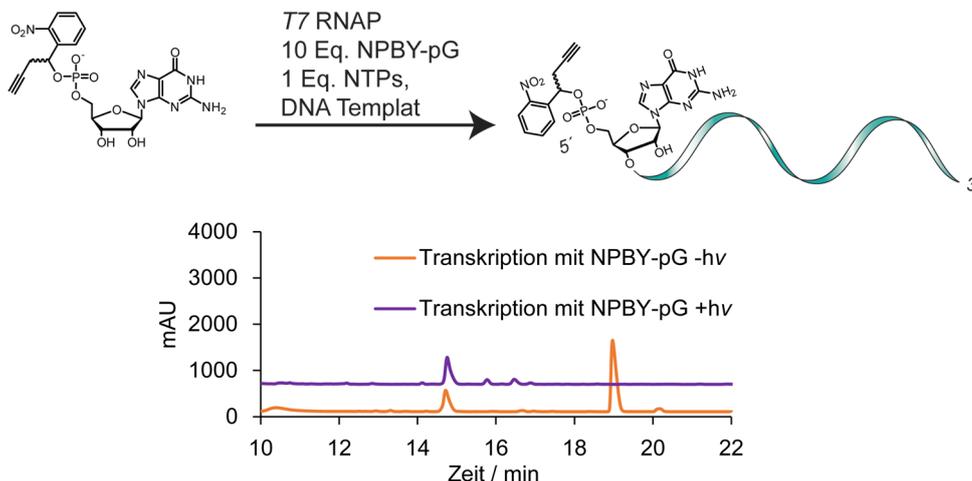


Abb. 190 Reaktionsschema der Transkription mit dem **NPBY-pG** Initiator nukleotid (oben). RP-HPLC Chromatogramm der Transkription von dGsw⁶⁰ mit der T7 RNA Polymerase und 10 Eq. des Initiator nukleotides (**NPBY-pG**) ohne (-hv, orange) und mit (+hv, magenta) vorhergehender UV-Bestrahlung (400 mW, 120 s) (unten). Durch Integration der Peaks im Chromatogramm ohne Bestrahlung bei min 14,6 und 19,0 konnte die Einbaueffizienz auf 73% quantifiziert werden.

Studien^[270,275,277,283] zeigten, dass häufig Optimierungen der NTP-Konzentration und des GTP- zu Initiator nukleotid-Verhältnis notwendig sind, um eine hohe Ausbeute bei hoher Einbaueffizienz zu erreichen und dass diese Optimierungen für jedes Initiator nukleotid neu durchgeführt werden müssen.

4.2.4.3 Synthese des NPE-Alkin modifizierten Cytidin-3',5'-bisphosphates (pC^{NPBYp})

Nach Literaturvorschrift^[385] wurde ausgehend von NPBY-OH in zwei Stufen NPBY-NH₂ (siehe **Abb. 191**) in Gesamtausbeute von 74% hergestellt. In einer nukleophilen Substitutionsreaktion wurde **142** (siehe Kapitel 4.2.1.2) mit NPBY-NH₂ unter basischen Bedingungen zu **167** umgesetzt. Durch Säulenchromatographie konnten zwei Diastereomere (als früh und spät eluierend bezeichnet) getrennt isoliert werden, die auf das racemische NPBY zurückzuführen sind. Da die Stereochemie der Diastereomere spektroskopisch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde im Folgenden nur mit dem früh eluierenden Isomer weitergearbeitet und die Diastereomerenreinheit mit einem Stern gekennzeichnet.

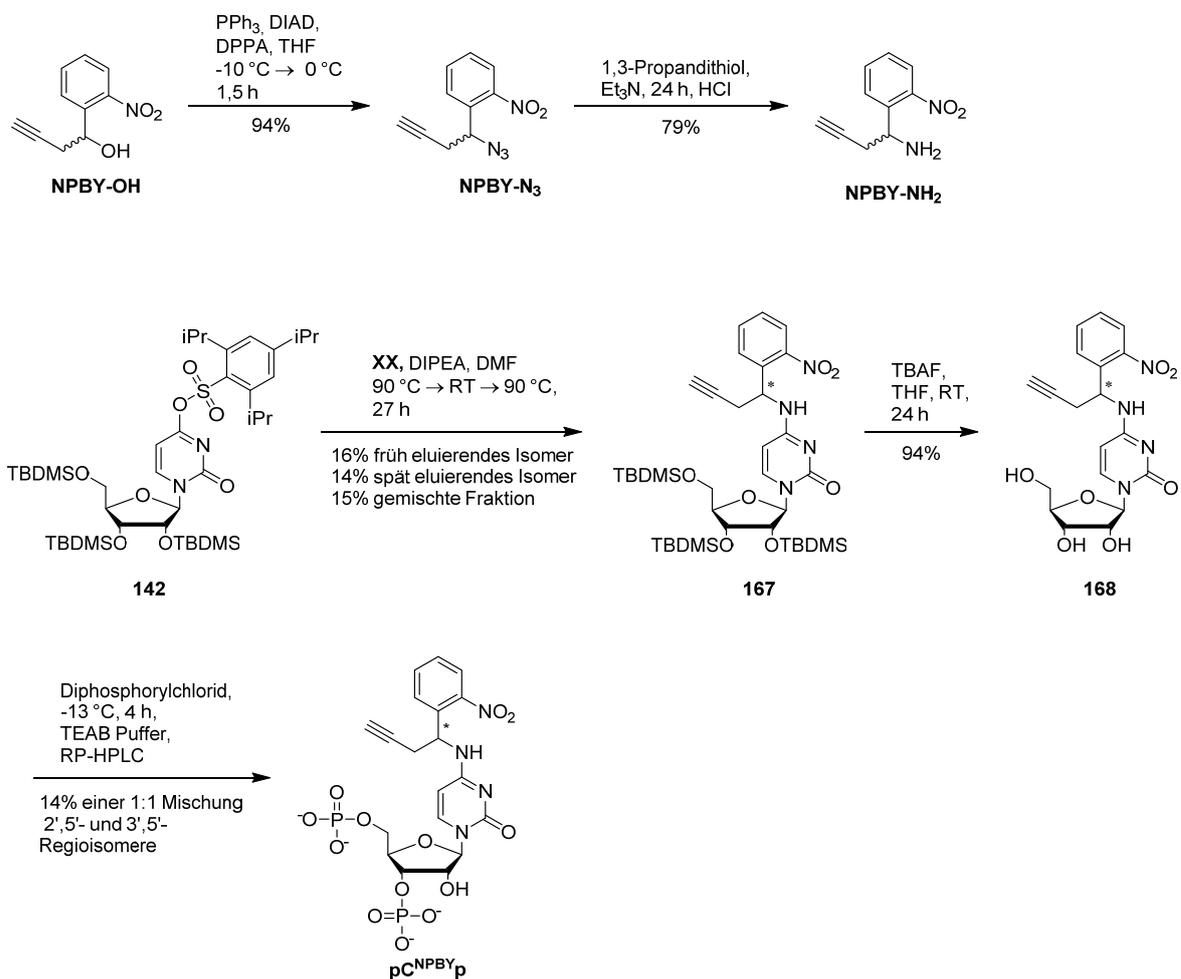


Abb. 191 Syntheseübersicht zur Darstellung von pC^{NPBYp} . Die Synthese von NPBY-NH₂ erfolgte nach Literaturvorschrift^[385].

Die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen erfolgte unter Standardbedingung mit TBAF in THF und ergab in 94% Ausbeute Verbindung **168**. Die Umsetzung zu pC^{NPBYp} erfolgte nach der Methode von Uhlenbeck *et al.*^[288] mit Diphosphorylchlorid und lösungsmittelfrei. Durch RP-HPLC konnten zwei Fraktionen isoliert werden: 14% einer 1:1 Mischung aus 3',5'- und 2',5'-Bisphosphat Regioisomeren und 15% einer Fraktion aus 3',5'-Bisphosphat mit ~38% 5'-Monophosphat und ~14% 2',5'-Bisphosphat NPBY-Cytidin.

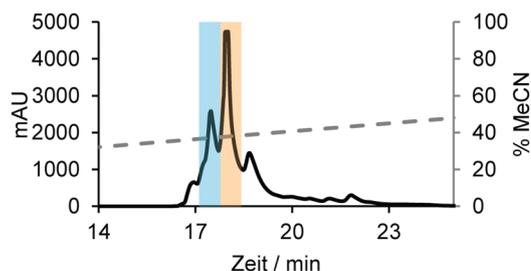


Abb. 192 RP-HPLC Chromatogramm zur Aufreinigung von $pC^{NPBY}p$. Die gesammelten Fraktionen, die analysiert wurden sind blau (Fraktion-1) und orange (Fraktion-2) markiert. Als Eluenten wurden 0,1 M TEAB (pH 8) und MeCN verwendet. Detektion erfolgte bei 260 nm. Gradient (siehe Sekundärachse): 0-1 min auf 5% MeCN, 1-2 min auf 15% MeCN und 2-24 min auf 55% MeCN; $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Verwendete RP-HPLC Säule: *MultoKrom 100-5 C18* (22x250 mm).

Die Zuordnung erfolgte über ^{31}P -HMBC-NMR Spektroskopie (siehe **Abb. 193** und **Abb. 194**). Da die Verunreinigung die Effizienz des Einbaus von $pC^{NPBY}p$ nicht beeinflusst, wurde auf weitere Auftrennung verzichtet. In den ^{31}P -NMR Spektren beider Fraktionen wurde zudem eine nicht zuordnungsable Verbindung im Bereich von -13ppm beobachtet, welche nicht weiter charakterisiert wurde. Da die *T4* RNA Ligase 1 selektiv nur das 3',5'-Isomer als Substrat verwendet, wurde auf eine weitere Auftrennung verzichtet.

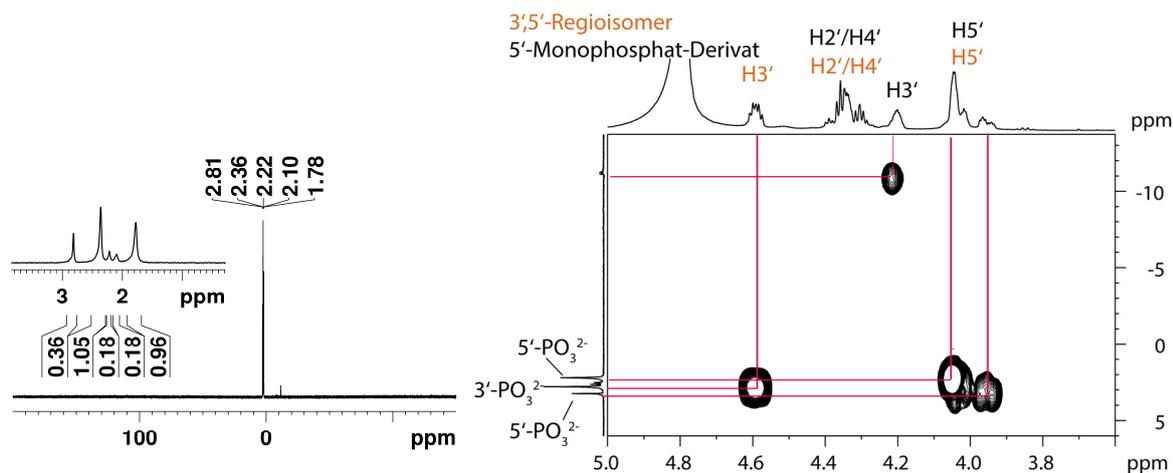


Abb. 193 ^{31}P -NMR Spektrum (links, 202 MHz) (Fraktion-2, siehe **Abb. 192**) eines Gemisches von 2',5'- $pC^{NPBY}p$ und 5'- pC^{NPBY} und das korrespondierende ^{31}P -HMBC NMR Spektrum für die Zuordnung der Signale (rechts). Die Spektren wurden in D_2O an einem AV500 der Firma *Bruker* aufgenommen und auf das Signal von Phosphorsäure in D_2O referenziert.

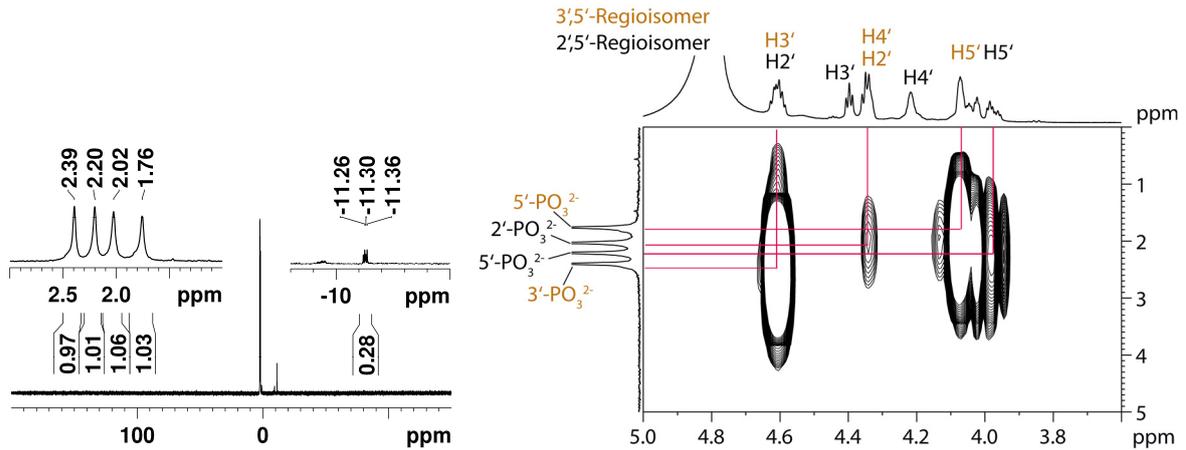


Abb. 194 ^{31}P -NMR Spektrum (links, 202 MHz) (Fraktion-1, siehe **Abb. 192**) eines 1:1 Gemisches von $2',5'$ - pC^{NPBYp} und $3',5'$ - pC^{NPBYp} und das korrespondierende ^{31}P -HMBC NMR Spektrum für die Zuordnung der Signale (rechts). Die Spektren wurden in D_2O an einem AV500 der Firma Bruker aufgenommen und auf das Signal von Phosphorsäure in D_2O referenziert.

Analog zu den Studien in Kapitel 4.2.2 wurden pC^{NPBYp} von Sara Keyhani mit *T4* RNA Ligase 1 und ATP an das 3'-Ende der 12mer RNA ($5'$ -GGA UAG UGA UCC- $3'$) addiert, um nach RP-HPLC Aufreinigung $12\text{mer-pC}^{\text{NPBYp}}$ zu erhalten.

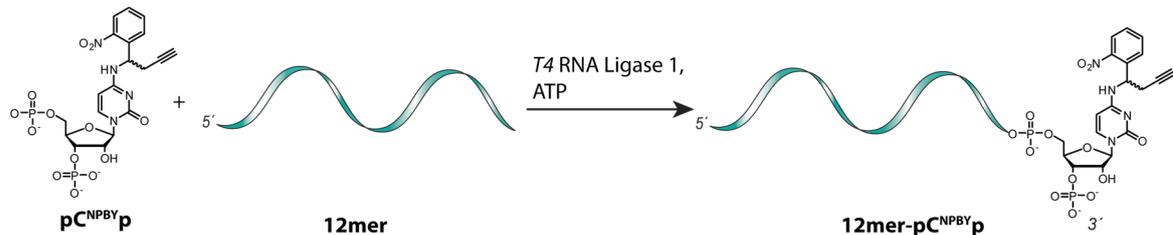


Abb. 195 Reaktionsschema zum enzymatischen Einbau von pC^{NPBYp} an das 3'-Ende einer 12mer RNA um $12\text{mer-pC}^{\text{NPBYp}}$ zu erhalten.

Der erfolgreiche Einbau von pC^{NPBYp} an das 3'-Ende des 12mer RNAs konnte nicht eindeutig per Gelelektrophorese analysiert werden, da das schnellere Migrationsverhalten durch das zusätzliche 3'-Phosphat vermutlich durch die Alkin-Gruppe kompensiert wurde (siehe **Abb. 196**, links). Allerdings konnte per RP-HPLC sehr effizient der erfolgreiche Einbau beobachtet und per Massenspektrometrie bewiesen werden (siehe **Abb. 196**, Mitte). Als nächstes wurde von Sara Keyhani $12\text{mer-pC}^{\text{NPBYp}}$ mit rSAP dephosphoryliert und mit einer 5'-phosphorylierten Donor-RNA (48mer) in einer *Splint*-Ligation mit einem DNA-*Splint* und *T4* RNA Ligase 2 verwendet. Das Ligationsprodukt $61\text{mer-pC}^{\text{NPBYp}}$ konnte dabei in geringen Ausbeuten (siehe **Abb. 196**, rechts) erhalten werden. Ein ähnlich geringer Umsatz konnte mit $12\text{mer-pC}^{\text{NPE}}$ erhalten werden (siehe **Abb. 176**). Bei der Synthese des Riboschalters konnte allerdings gezeigt werden, dass durch Optimierung der Ligationsbedingungen die Ausbeute deutlich gesteigert werden konnte (siehe Kapitel 4.2.3.3).

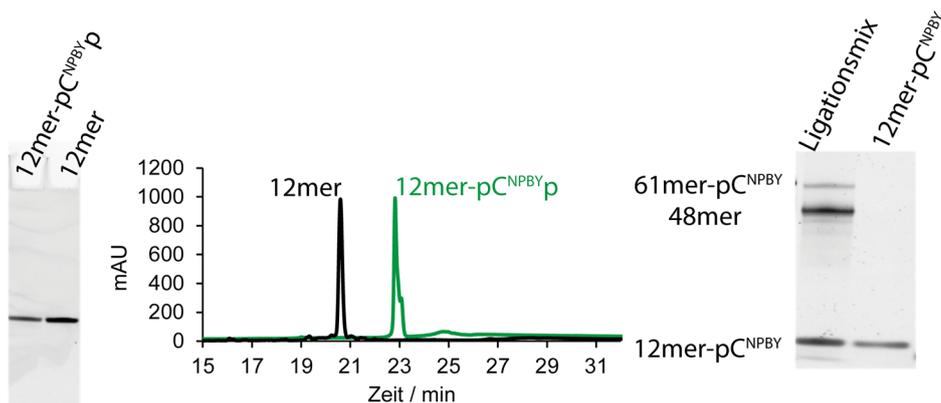


Abb. 196 Gelfoto eines denaturierenden 20% PAA-Gels zur Analyse der enzymatischen Ligation von $pC^{NPBY}p$ an das 3'-Ende eines 12mer RNA (links) mit *T4* RNA Ligase 1. Das unterschiedliche Migrationsverhalten im Gel ist nicht zu erkennen, da vermutlich die sterisch anspruchsvolle Alkin-Modifikation die schnellere Migration aufgrund des zusätzlichen 3'-Phosphates (im Vergleich mit $12mer-pC^{NPEp}$) kompensiert. Eindeutig konnte der erfolgreiche Einbau im RP-HPLC Chromatogramm (Mitte) beobachtet werden. Die Detektion erfolgte bei 260 nm. Eluenten: HFIP (400 mM, 16,3 mM TEA, pH 8) und MeCN. Gradient: 5% zu 45,5% MeCN in 28 min. Säule: *Waters* BEH300 C18 4,6x250 mm. Gelfoto des denaturierenden 20% PAA-Gels zur Analyse der *Splint*-Ligation von $12mer-p^{NPBY}$ mit der 5'-phosphorylierten 48mer Donor-RNA (rechts) und *T4* RNA Ligase 2 nach dem DNase Verdau des volllängen DNA-*Splints*. Die obere Bande im Ligationsmix zeigt das gewünschte Produkt ($61mer-pC^{NPBY}$). Die Ligationen und Gel-elektrophoretischen Analysen wurden von Sara Keyhani durchgeführt.

In fortsetzenden Studien könnte versucht werden das Initiator-nukleotid ($NPBY-pG$) mit der 3'-Modifikation ($pC^{NPBY}p$) zu kombinieren, um eine dual-modifizierte RNA zu erhalten (siehe Abb. 184). Damit könnte wie von Seyfried *et al.*^[128] für DNA gezeigt (siehe Abb. 184), auch RNA zyklisiert werden, um die Bindung einer komplementären RNA oder eines Proteins zu verhindern.

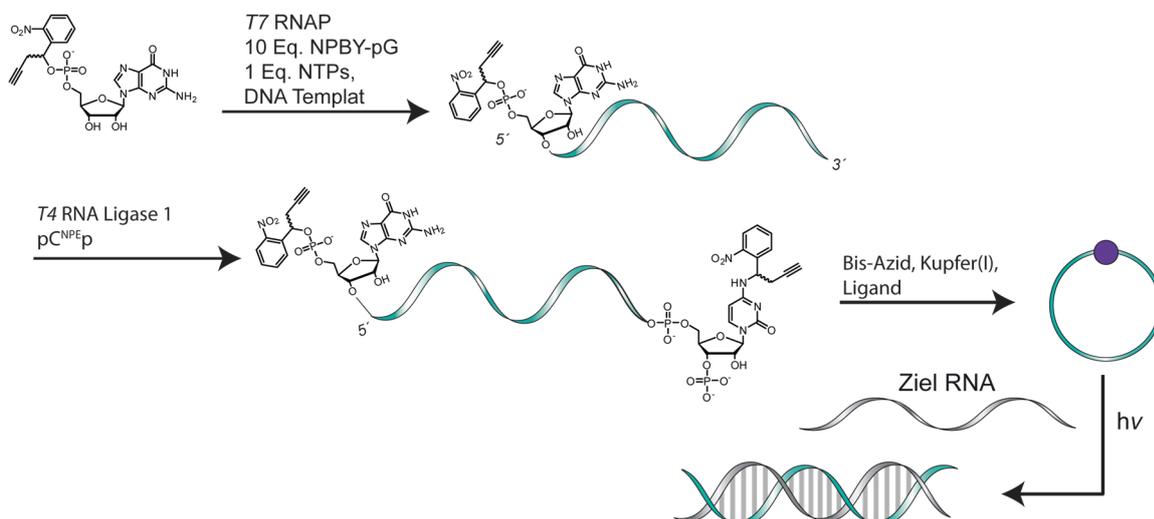


Abb. 197 Reaktionsschema zur Synthese einer lichtaktivierbaren, zyklisierten RNA mit chemo-enzymatischen Methoden. Belichtung der zyklisierten RNA würde zur Linearisierung führen und ermöglicht dadurch die Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure (grau).

Eine Herausforderung dabei ist die Verwendung von CuAAC mit RNA für Zyklisierungen. Seyfried *et al.* zeigten, dass die Zyklisierung mit einem Äquivalent des Bis-Azid-Linkers für ~16 Stunden durchgeführt werden muss, um Nebenreaktion wie Polymere zu vermeiden.^[128] Bei der CuAAC mit RNA werden standardmäßig Überschüsse eines Azides und

kurze Reaktionszeiten verwendet, um die Kupfer-katalysierte Hydrolyse von RNA zu vermeiden.^[386,387] Das *et al.*^[387] zeigten, dass unter Standardbedingungen bereits nach 5 h Reaktionszeit die RNA fast vollständig zersetzt wurde und schlugen Acetonitril als zusätzliches Lösungsmittel vor. In fortsetzenden Studien könnten Azid-modifizierte photolabile Schutzgruppen (**169** und **170**, siehe **Abb. 198**) verwendet werden, um diese zusammen mit einem bifunktionalen gespannten Alkin, wie DBCO (DBCO-PEG₄-DBCO, siehe **Abb. 198**), in einer Kupfer-freien Click Reaktion (SPAAC) zu verwenden.

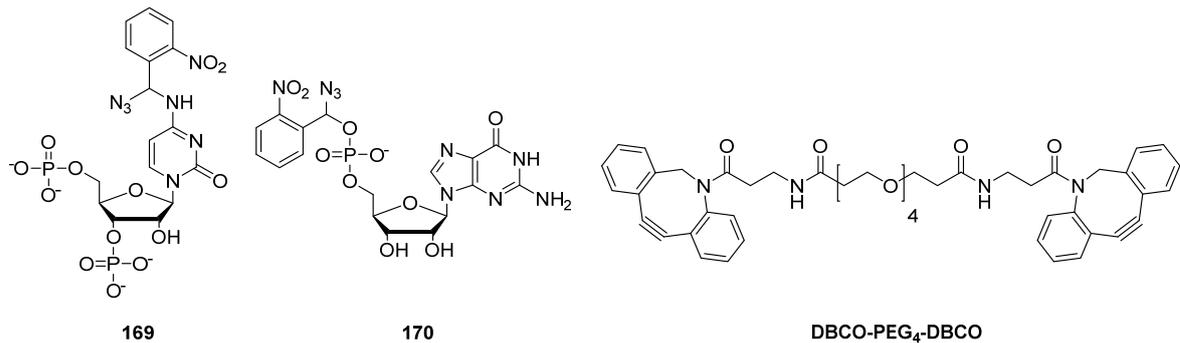


Abb. 198 Strukturen eines Azid-modifizierten photoaktivierbaren Initiatornucleotides **146**, eines Azid-modifizierten-NPE-geschützten Cytidinbisphosphates **145** und eines Bis-Alkin-Linkers **DBCO-PEG₄-DBCO** für die Anwendung von Kupfer-freier Click-Chemie zur temporären Zyklisierung von RNA.

4.2.5 Chemo-enzymatische Synthese von photoschaltbarer RNA

4.2.5.1 Synthese und Einbau von Azobenzol C-Nucleosidbisphosphaten in RNA

Die Azobenzol C-Nucleoside **2'OH-pAzo** und **2'OH-mAzo** (siehe Kapitel 3.2.4.2) wurden in einer von Sara Keyhani und dem Autor dieser Arbeit gemeinsam betreuten Masterarbeit von Anja Blümmler mit Diphosphorylchlorid zu den entsprechenden Nucleosidbisphosphaten (**p^{2'OH}pAzo** und **p^{2'OH}mAzo**, siehe **Abb. 199**) umgesetzt.

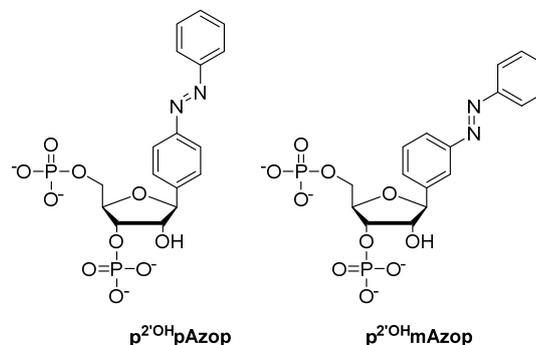


Abb. 199 Strukturen von **p^{2'OH}pAzo** und **p^{2'OH}mAzo** zur chemo-enzymatischen Einführung von Photoschalter in RNA.

Der enzymatische Einbau der photoschaltbaren Nucleosidbisphosphate an das 3'-Ende von RNA wurde von Sara Keyhani durchgeführt. In den Chromatogrammen der Reaktionen

(siehe **Abb. 200**, schwarze Spur) ist kein Edukt (12mer) bei Minute 20 zu erkennen, sodass von einem vollständigen Umsatz ausgegangen werden kann. Dies ist erstaunlich, denn anscheinend benötigt die *T4* RNA Ligase 1 keine stabilisierenden Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen der Nukleobase. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass entweder π - π -Wechselwirkungen der Azobenzole mit der Ligase entscheidend sind oder wahrscheinlicher sogar nur die 3',5'-bisphosphorylierte Ribose als Erkennungsmotiv dient.

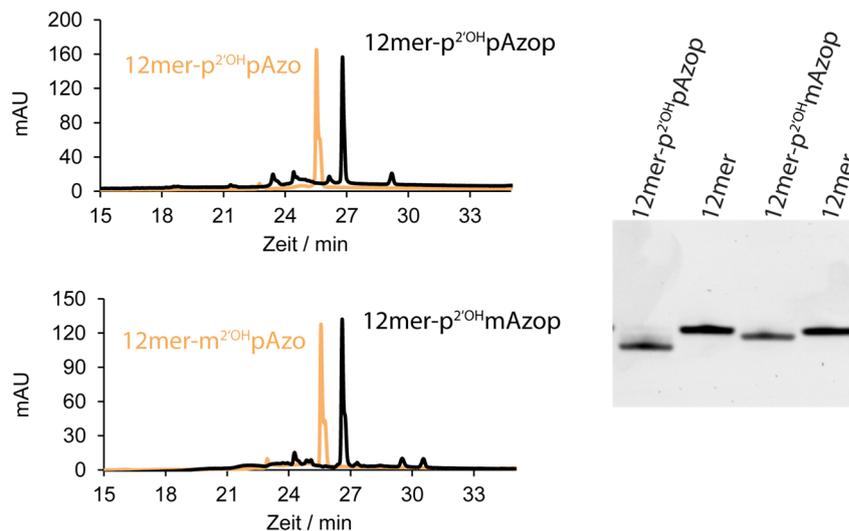


Abb. 200 RP-HPLC Chromatogramme zum Einbau der Azobenzol C-Nukleosidbisphosphate $p^{2OH}pAzop$ und $p^{2OH}mAzop$ an das 3'-Ende einer 12mer RNA (schwarze Spur) und die anschließenden Dephosphorylierungen (orange Spur). Da das 12mer RNA komplett verbraucht wurde bei der Reaktion (Retentionszeit 12mer liegt bei 20 min), kann von einem vollständigen Umsatz ausgegangen werden. Das korrespondierende 20%ige denaturierende PAA-Gel zur Analyse der enzymatischen Synthese von $12mer-p^{2OH}pAzop$ und $12mer-p^{2OH}mAzop$ ist rechts gezeigt. Das Gel wurde von Sara Keyhani aufgenommen.

Die von Sara Keyhani durchgeführte Dephosphorylierung verlief auch quantitativ und ist somit vollständig kompatibel zu Azobenzol C-Nukleosiden (siehe **Abb. 200**). Die *Splint*-Ligation von $12mer-p^{2OH}pAzo$ und $12mer-p^{2OH}mAzo$ wurden von Sara Keyhani unter den in Kapitel 4.2.3.2 genannten Bedingungen durchgeführt. Während für $12mer-p^{2OH}pAzo$ nur mäßige Ausbeuten erzielt werden konnten, konnte mit $12mer-p^{2OH}mAzo$ annähernd quantitativer Umsatz beobachtet werden. Das könnte auf die Stabilisierung des Duplex (*Splint*-48mer- $12mer-p^{2OH}mAzo$) durch das Azobenzol in der thermodynamisch stabilisieren *trans*-Konformation zurückzuführen sein, was im Einklang mit den Ergebnissen in Kapitel 3.2.2.1 ist. Die erhöhte Stabilität könnte eine bessere räumliche Nähe und somit bessere Bedingungen für die Phosphordiesterbindungsknüpfung schaffen. Eine weitere Erklärung ist, dass die *meta*-substituierte Azobenzol aus sterischen Gründen besser in die Bindungstasche der Ligase passt und eine effizientere räumliche Anordnung der Ligationskomponenten ermöglicht.

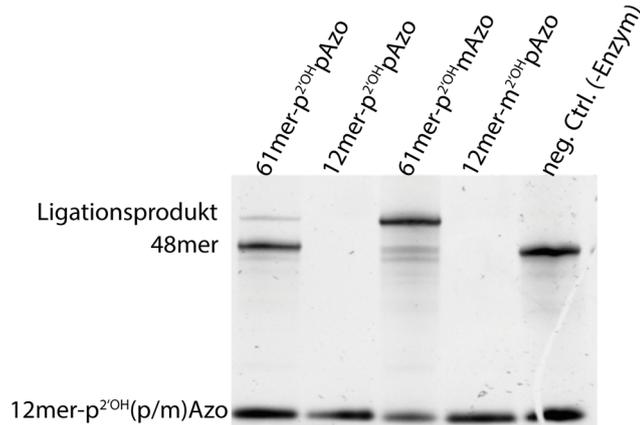


Abb. 201 Gelfoto eines denaturierenden 20% PAA-Gels zur Analyse der *Splint*-Ligation der terminal Azobenzol-modifizierten Stränge **12mer-p²OH-pAzo** und **12mer-p²OH-mAzo** mit einer Donor-RNA (48mer) und einem DNA-*Splint* nach DNase Verdau. Die Abbildung wurde von Sara Keyhani modifiziert übernommen.

Asanuma *et al.*^[207] untersuchten die Effizienz von einer *Splint*-Ligation (*Nick-Sealing*) von DNA mit *T4* DNA Ligase in Abhängigkeit von der Isomerisierung. Im *cis*-Zustand konnten sie eine erhöhte Ligationsrate messen, während im *trans*-Zustand fast kein Umsatz stattfand. Sie vermuteten, dass sich im *cis*-Zustand das Azobenzol aus dem Duplex drehte und somit räumlichen Platz für die Ligation schaffte. Im *trans*-Zustand zeigte **tAzo** in den Doppelstrang und störte die Ligation. Der Unterschied zu der hier vorliegenden Studie ist, dass im Fall von Asanuma *et al.*^[207] das Azobenzol als „wedge Motiv“ im Templat-Strang gegenüber der zur ligierenden Stelle verwendet wurde. Untersuchungen, ob UV-Licht induzierte Isomerisierung zu **cis-12mer-p²OH-mAzo** die Ligationseffizienz erniedrigt oder erhöht, war nicht Ziel dieser Studie und wurde nicht untersucht.

4.2.6 Ausblick einer Automatisierung zur chemo-enzymatischen Synthese von photoaktivierbarer RNA

Ein Nachteil der hier vorgestellten chemo-enzymatischen Synthese von photoaktivierbarer RNA sind die häufigen Aufreinigungsschritte. Diese sind notwendig, um die Enzyme, Reagenzien und nicht umgesetzte RNA vor der weiteren Umsetzung zu entfernen. Teilweise musste nach der 3'-Extension, der Dephosphorylierung und der *Splint*-Ligation eine Aufreinigung per RP-HPLC durchgeführt werden. Zur Lösung dieses Problems wird im Folgenden eine Methode für zukünftige Studien vorgeschlagen: Ähnlich zu den Studien^[281,283] in Kapitel 1.6.2 beschrieben, kann das **NPBY-pG** Initiator nukleotid durch Transkription an das 5'-Ende von RNA selektiv eingebaut werden und nach CuAAC mit Biotin-Azid an Streptavidin-modifizierten *Beads* immobilisiert werden. Dadurch könnten Enzyme, Puffer und Reagenzien nach einem enzymatischen Schritt durch Waschen entfernt werden. Zeitsparende Durchführung mehrerer enzymatischer Schritte (siehe **Abb. 202**) würde dadurch ermöglicht werden. Belichtung am Ende der Reaktionskaskade führt zur Freisetzung der RNA.

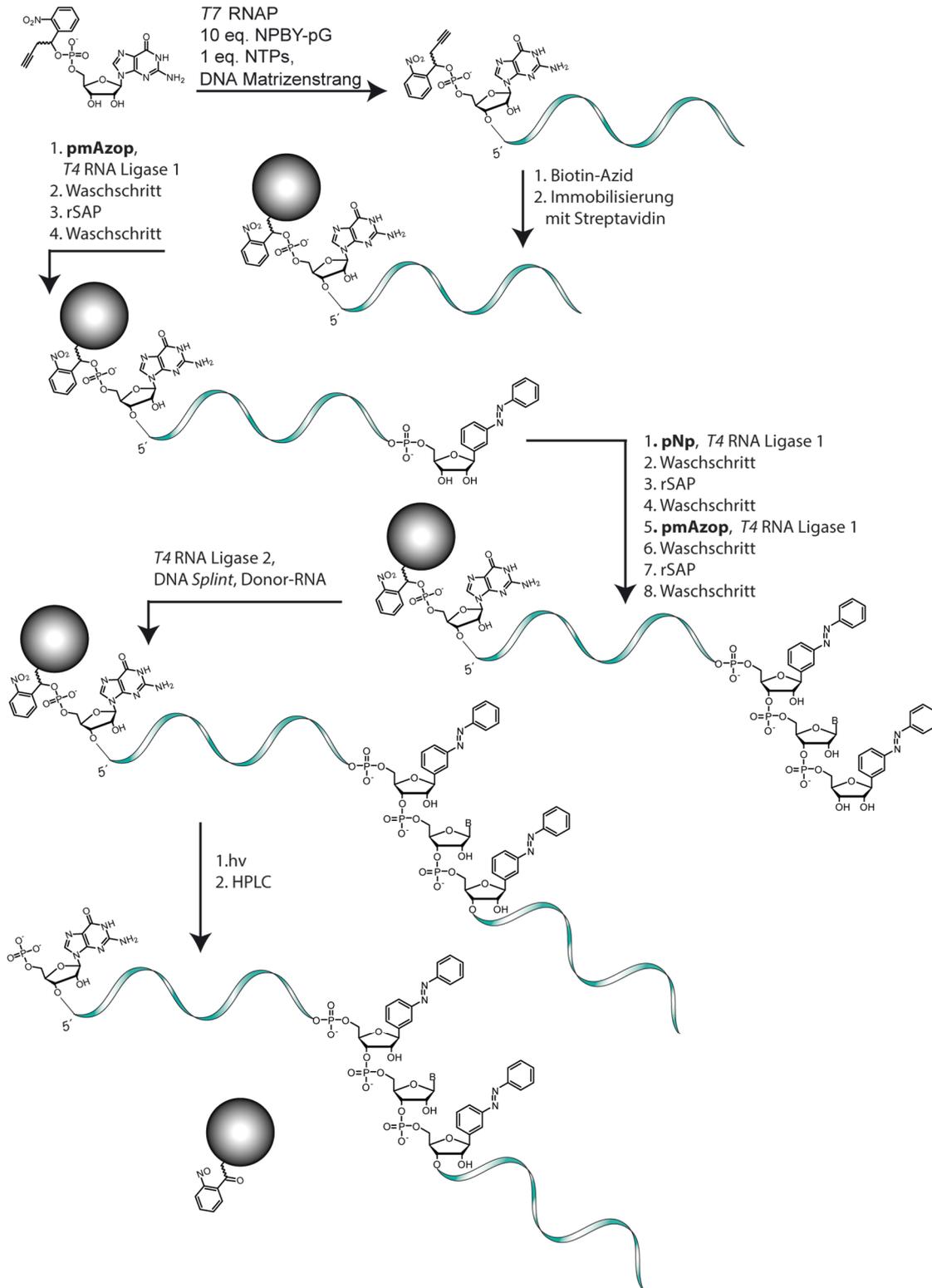


Abb. 202 Chemo-enzymatische Synthese von lichtaktivierbarer RNA an der festen Phase. Das durch Transkription am 5'-Ende eingebaute **NPBY-pG** Initiator-nukleotid kann durch Click-Chemie mit Biotin-Azid auf einer Streptavidin-modifizierten Oberfläche immobilisiert werden. In den folgenden Schritten können dann Enzyme, Puffer und Reagenzien in einem Waschschrift entfernt werden. Belichtung am Ende der Reaktionskaskade führt zur Freisetzung der RNA.

Besonders Azobenzol C-Nukleoside eignen sich dafür, da bei Photolyse des Linkers zur festen Phase diese nicht abgespalten werden können (siehe **Abb. 202**). Für die Anwendung von photolabilen Schutzgruppen müssen orthogonale oder sequenziell abspaltbare

Schutzgruppen verwendet werden. Ein mögliches Beispiel dafür wäre ein Cumarin-Alkin als Initiator-nukleotid, welches bei 450 nm abgespalten werden kann. NPE-Schutzgruppen auf den Nukleobasen würden unter diesen Bedingungen nicht photolysiert werden.

Der bedeutende Unterschied zu einem Oligo-Synthesizer ist der fehlende *Capping*-Schritt, bei dem nicht umgesetzte Sequenzen geschützt werden und somit nicht weiter an den Reaktionen teilnehmen können. Watanabe *et al.*^[388] zeigten, dass Natriumperiodat selektiv mit dem nicht-phosphorylierten 3'-Ende von RNA reagierte, da nur dort ein *cis*-Diol vorhanden war. Die Behandlung mit Natriumperiodat führte zur Spaltung der Ribose, sodass RNA, die nicht am 3'-Ende mit einem Nucleosidbisphosphat modifiziert wurde, nicht weiter in der Reaktionskaskade teilnehmen kann (siehe **Abb. 203**). Somit könnte die Anzahl der Nebenprodukte deutlich verringert und dadurch die Aufreinigung erleichtert werden. Dies ist besonders bei einer mehrstufigen Reaktion von Vorteil.

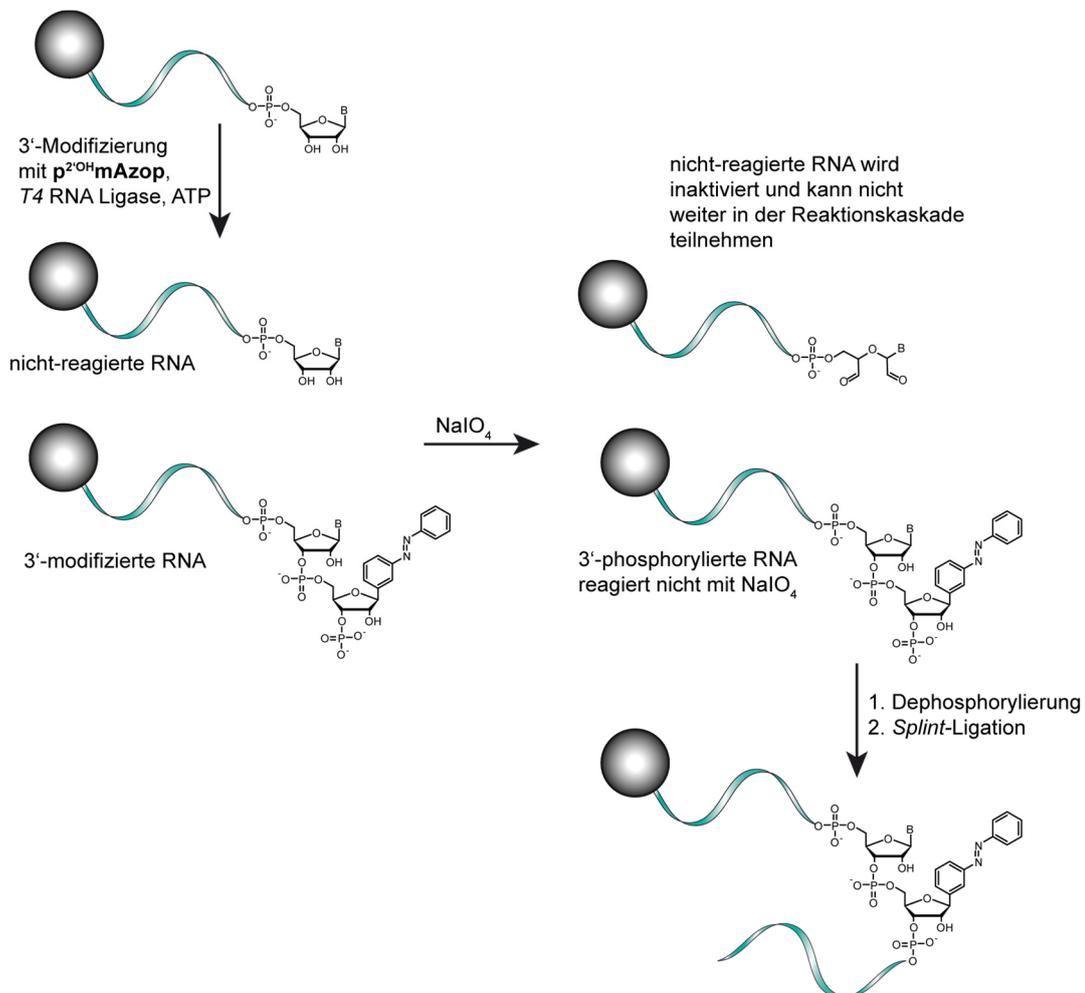


Abb. 203 Chemo-enzymatische Synthese von lichtaktivierbarer RNA an der festen Phase mit einem $NaIO_4$ -*Capping*-Schritt, um nicht reagierende RNA in der 3'-Extension zu inaktivieren.

Diese Methoden könnten dazu verwendet werden, um eine festphasen-basierende semi-automatische Version der chemo-enzymatischen Synthese zu entwickeln analog zu einem Oligonukleotid-Synthesizer (siehe **Abb. 204**). Die auf Streptavidin-Beads immobilisierte

Nucleinsäure wird im ersten Schritt mit einem Nucleosid-3',5'-bisphosphat umgesetzt. Im zweiten Schritt findet ein *Capping* der nicht-reagierten Nucleinsäure statt. Nach der Dephosphorylierung (3. Schritt) kann optional eine *Splint*-Ligation durchgeführt werden (4. Schritt). Der Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, bis die gewünschte Nucleinsäure erhalten wird. Im finalen Schritt findet durch Belichtung eine Abspaltung der Nucleinsäure von der festen Phase statt.

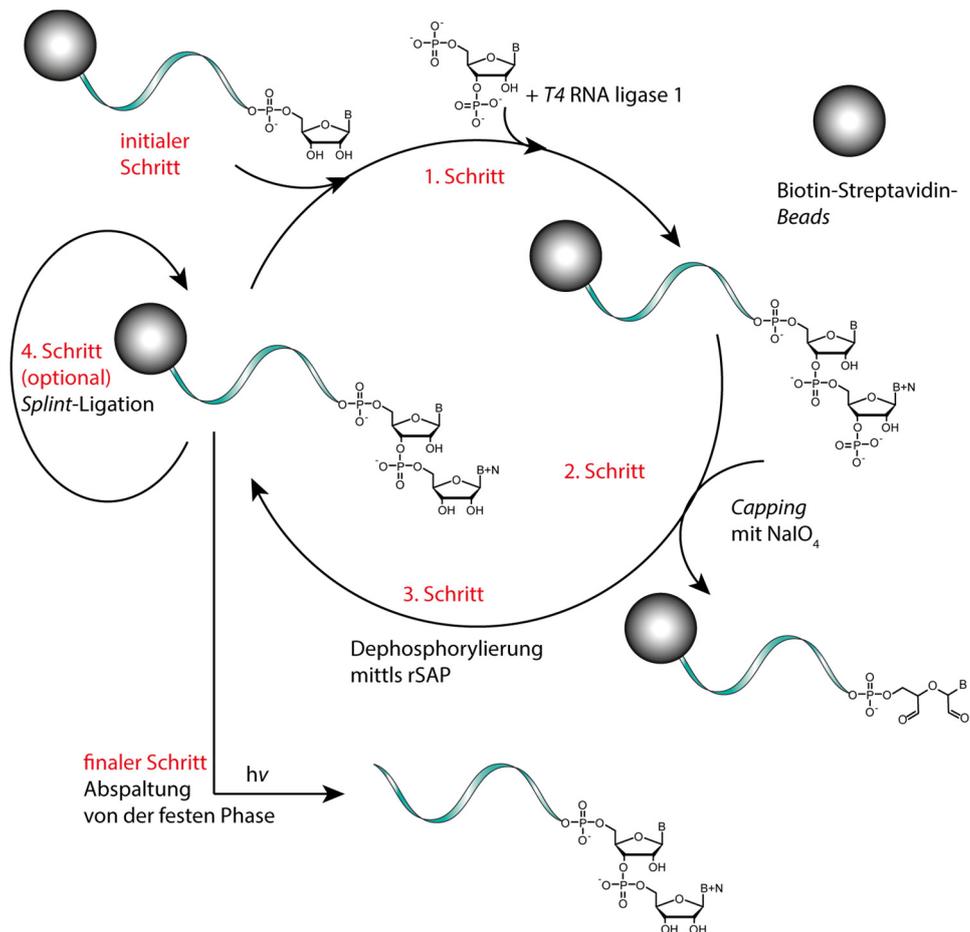


Abb. 204 Festphasen-basierte semi-automatische chemo-enzymatische Synthese von RNA. Nach Transkription mit dem NPBY-pG Initiatornucleotid, Click-Reaktion mit Biotin-Azid findet eine Immobilisierung auf Streptavidin-Beads statt (initialer Schritt). Der erste Schritt des Zyklus ist die Reaktion mit einem Nucleosid-3',5'-bisphosphat. Im zweiten Schritt findet ein *Capping* zur Schützung der nicht-reagierten Nucleinsäuren statt. Nach Dephosphorylierung (3. Schritt) kann optional eine *Splint*-Ligation (4. Schritt) durchgeführt werden. Der Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, bis die gewünschte Nucleinsäure hergestellt wurde. Im finalen Schritt wird die Nucleinsäure durch Belichtung von der festen Phase abgespalten und per HPLC aufgereinigt.

4.2.7 Synthese und Einbau von Azobenzol C-Nucleosindtriphosphate in DNA

Wie in Kapitel 1.4.4 und 2 ausführlich beschrieben eignen sich kovalent verknüpfte Azobenzole ideal, um die Duplexstabilität von DNA zu regulieren. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Synthese von Azobenzol C-Nucleosiden **pAzo** und **mAzo**, mit dem Ziel ein Linkersystem zu verwenden, welche die natürlichen Nucleobasen am besten nachahmt. Dadurch soll weniger Störung des Zuckerrückgrats und der helikalen Natur von

DNA und RNA Doppelsträngen erreicht werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Photoschalter besondere Isomerisierungseigenschaften haben, da sogar die *trans*-zu-*cis* Isomerisierung enorm effizient bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. In diesem Teilprojekt der Arbeit wurde untersucht, ob **pAzo** und **mAzo** zu den entsprechenden Triphosphaten (**pAzo-TP** und **mAzo-TP**) umgesetzt werden könne, um diese mittels DNA Polymerasen in DNA einzuführen. **pAzo** und **mAzo** sind die ersten Photoschalter bei denen das Azobenzol direkt mit der Deoxyribose C-nukelosidisch verknüpft ist, somit Basensuggorate darstellen und Voraussetzungen für einen möglichen Einbau mitbringen. Im Folgenden werden die Eigenschaften von Polymerasen zur Selektion eines Nukleotides mit den Strukturen von **pAzo** und **mAzo** verglichen.

Die Selektivität und Genauigkeit von Polymerase variiert stark und wurde ausführlich in Kapitel 1.6.1 behandelt. Da Azobenzole keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, fehlt diese Stabilisierung (siehe **Abb. 192**). Wasserstoffbrückenbindungen leisten jedoch ohnehin nur einen kleinen Beitrag zur Präzision von Polymerasen, sodass diese Eigenschaft den Einbau nicht verhindern sollte.^[235,243–245] Zusätzlich gibt es mehrere Beispiele in der Literatur, bei denen unnatürliche Basenpaare ohne Wasserstoffbrückenbindungen effizient in DNA eingebaut wurden (siehe Kapitel 1.6.1).

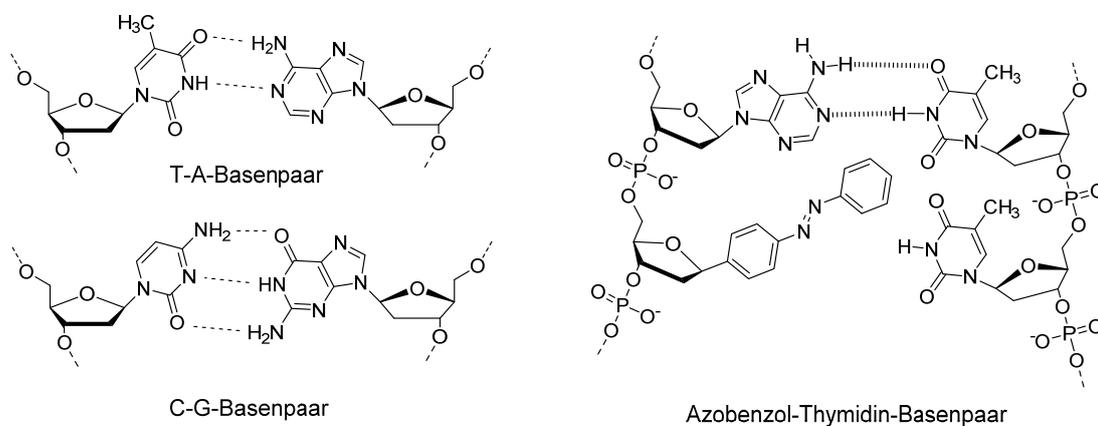


Abb. 205 Wasserstoffbrückenbindung eines T-A- und C-G-Basenpaare (links) und **pAzo** in einem DNA Duplex (rechts).

Bedeutender für den Einbau von modifizierten Nukleotiden mit Polymerasen ist das Hineinpassen in die Geometrie der Bindungstasche. Kool *et al.* zeigten, dass ein Pyren C-Nukleotid effizient gegenüber einer AP-Stelle (siehe **Abb. 206**) eingebaut werden kann. Der größere sterische Anspruch des Pyren wird durch die kleine AP-Stelle kompensiert, sodass die Gesamtlänge erhalten bleibt. Azobenzol C-Nukleoside haben im Vergleich zu den kanonischen Nukleobasen einen größeren sterischen Anspruch und können mit einem Pyren verglichen werden. Durch Überlagerung der von *cis*-**pAzo** (rot) mit dem Pyren in einer zweidimensionalen Darstellung in **Abb. 206** (unten) wird dies veranschaulicht.

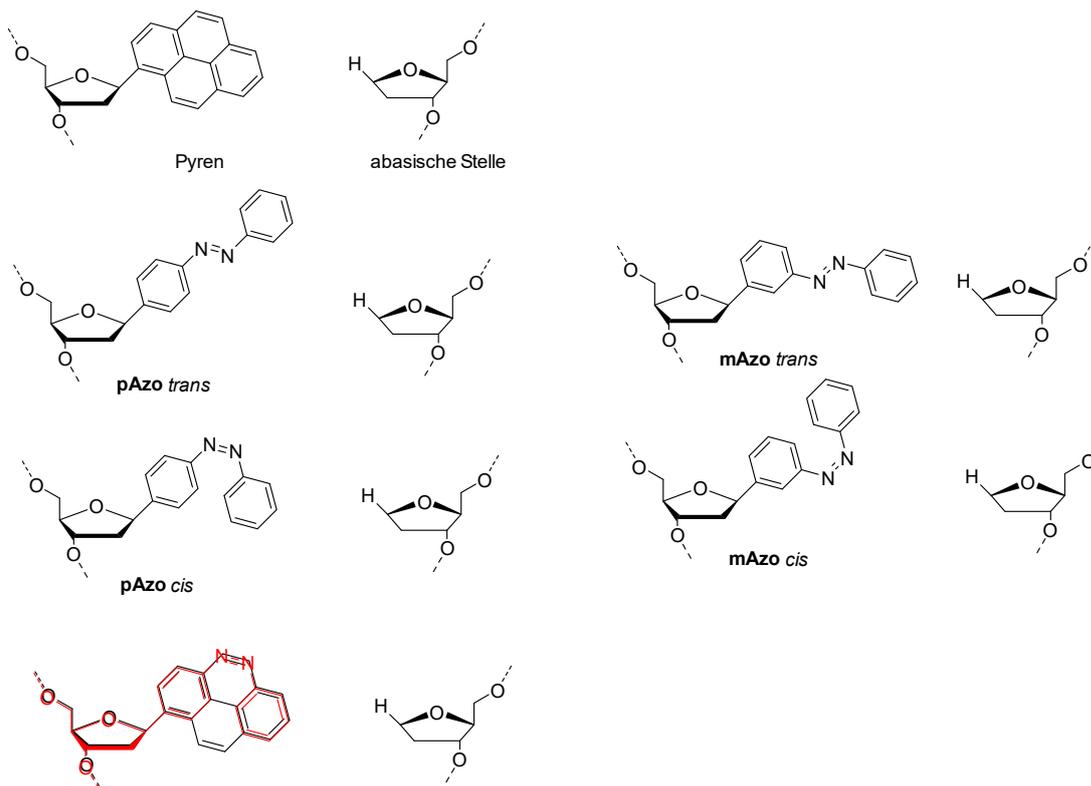


Abb. 206 Ein unnatürliches Basenpaar von Pyren und einer AP-Stelle, welches effizient mittels Polymerasen eingebaut werden konnte ist oben gezeigt. Der größere sterische Anspruch des Pyrens wird durch die AP-Stelle kompensiert, sodass dieses Basenpaar in die Bindungstasche der Polymerase passt. Zum Vergleich des sterischen Anspruches sind Azobenzol-AP-Stellen-Basenpaare gezeigt. Unten ist eine Überlagerung von *cis*-**pAzo** mit dem Pyren Nukleotid gezeigt. In dieser zweidimensionalen Darstellung überlappen die Strukturen perfekt.

Die *cis*-Konformation ist allerdings nicht planar, sondern hat eine gewinkelte Struktur (siehe **Abb. 207**, links). Da aber die Bindungstasche (siehe **Abb. 207**, rechts) nach Kool *et al.*^[248] nur die Höhe eines aromatischen π -Systems ($\sim 3,4$ Å) toleriert, kann es zu einer sterischen Hinderung mit *cis*-**pAzo** kommen.

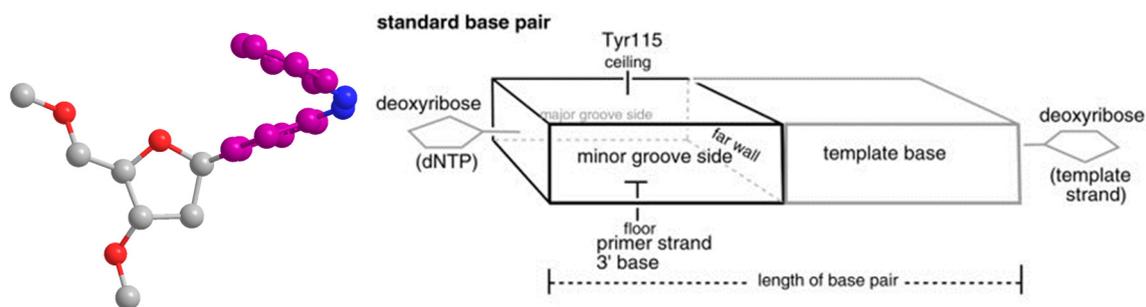


Abb. 207 Berechnete (MM-Geometrieoptimierung und Diederwinkel Berechnung) 3D-Struktur von **pAzo** zeigt die nicht-planare Struktur und dem damit einhergehenden höheren sterischen Anspruch (links). Rechts ist die Bindungstasche nach Kool *et al.*^[248] gezeigt. Sie zeigt die Begrenzung der Gesamtlänge des Basenpaares, sowie der Höhe (*floor-ceiling*) eines aromatischen π -Systems ($\sim 3,4$ Å). Die rechte Abbildung wurde von Kool *et al.*^[248] übernommen.

Ein weiterer Faktor für die Genauigkeit mancher^[235] Polymerasen ist das sogenannte *minor groove scanning*, bei dem Aminosäure-Seitenketten der Polymerase mit dem Stickstoff an Position 3 von Purin- und dem Sauerstoff an Position 2 von Pyrimidinbasen wechselwirken

(siehe **Abb. 208**, links; die wechselwirkenden Atome sind rot markiert).^[252,253] Ob ein Stickstoff der Azobrücke ähnliche Wechselwirkungen (siehe **Abb. 208**, rechts) eingehen kann, lässt sich nur schwer vorhersagen.

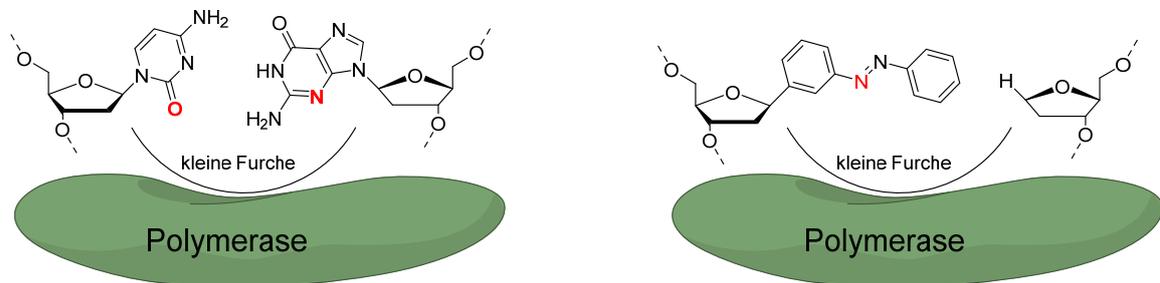


Abb. 208 Schematische Darstellung des *minor groove scanning* mit einem C-G-Basenpaar (links). Die Atome, die mit der Polymerase wechselwirken sind rot gefärbt. Ein Basenpaar von **mAzobenzol** mit einer abasischen Stelle ist rechts gezeigt. Das rot gefärbte Stickstoff-Atom könnte Wechselwirkungen mit der Polymerase eingehen.

Das wohl wichtigste Kriterium für den Einbau von Azobenzolen C-Nukleosiden ist die Fähigkeit aromatische π - π -Wechselwirkungen mit dem Basenstapel einzugehen. Dies könnte die für den Einbau notwendige Stabilisierung schaffen. *Molecular Modelling* Studien in Kapitel 3.2.2, zeigen am Beispiel von RNA deutlich, dass das *trans*-**pAzobenzol** ideal in einen Duplex interkalieren kann und den Duplex stabilisieren kann, besonders wenn gegenüber **pAzobenzol** eine AP-Stelle ist.

4.2.7.1 Synthese der Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate

In der Literatur sind viele Methoden zur Synthese von Nukleosidtriphosphaten beschrieben.^[389] Zwei der bekanntesten Methoden sind die Synthese nach Ludwig und Eckstein^[390], sowie Ludwig^[391] (häufig auch in der Literatur als Yoshikawa Methode bezeichnet, da die Synthese von Ludwig auf der Phosphorylierung der 5'-OH Gruppe nach der Methode von Yoshikawa^[392] basiert)^[389]. Da die publizierten Ausbeuten mit der Methode nach Ludwig und Eckstein^[390] höher sind und weniger Nebenprodukte entstehen im Vergleich zu der Synthese nach Yoshikawa,^[393] wurde die Synthese nach dem Protokoll von Ludwig und Eckstein durchgeführt. Da bei dieser Methode normalerweise die 3'-OH Gruppe geschützt vorliegen muss, wurde eine modifizierte Schutzgruppen-freie Methode^[394] durchgeführt. In dieser Prozedur reagiert zuerst Tributylammonium Pyrophosphat **172** mit Salicylchlorophosphit **171** in Anwesenheit von Tributylamin und formt ein zyklisches Intermediat, welches mit der 5'-OH Position des Nukleotides reagiert (siehe **Abb. 209**).^[394] Im nächsten Schritt wird das Phosphit **174** zu Phosphat **175** mit Iod oxidiert und das zyklische Triphosphat **176** hydrolysiert. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte allerdings kein Produkt isoliert werden. Da nur wenig Edukt (**pAzobenzol**) vorhanden war, mussten wenige Milligramm

des hoch-reaktiven und hygroskopischen Salicylchlorophosphits (an Luft) abgewogen werden. Die dabei eintretende Hydrolyse war vermutlich der Grund für das Scheitern der Reaktion.

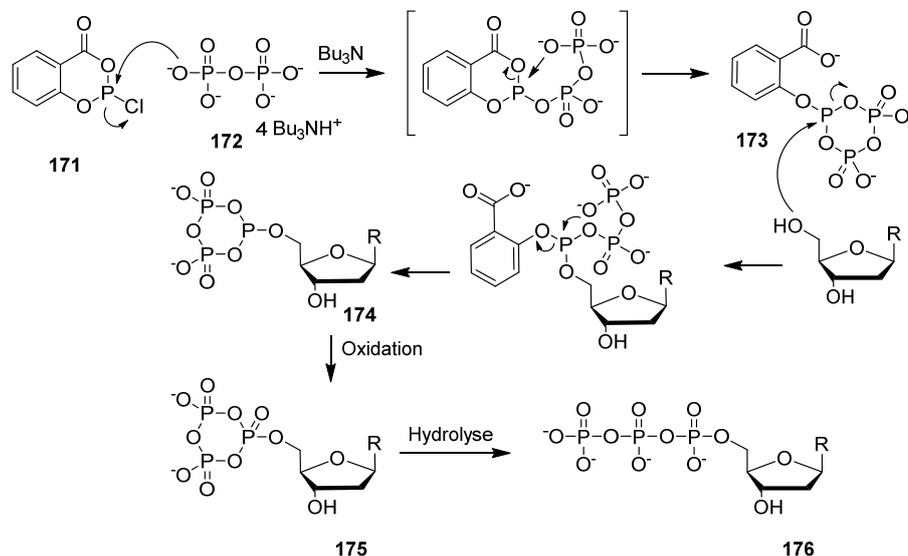


Abb. 209 Reaktionsmechanismus^[394] zur Darstellung von Nucleosidtriphosphaten nach der Methode von Ludwig und Eckstein^[390].

Aufgrund der einfacheren Handhabung von POCl₃ im Vergleich zu Salicylchlorophosphit wurde die Synthese der **pAzo-TP** und **mAzo-TP** nach der Methode von Ludwig^[391] durchgeführt (siehe **Abb. 210**). Um Hydrolyse auszuschließen mussten alle festen Reagenzien mindestens 24 Stunden im Hochvakuum getrocknet und alle flüssigen Reagenzien mehrere Tage über Molekularsieb gelagert werden. Zudem musste Phosphorylchlorid frisch destilliert werden.

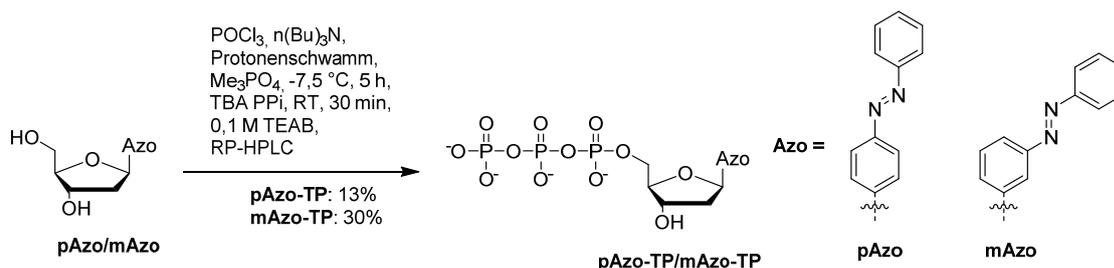


Abb. 210 Reaktionsschema zur Darstellung der Azobenzol C-Nucleosidtriphosphate **pAzo-TP** und **mAzo-TP** nach der Methode von Yoshikawa/Ludwig^[391] und Anleitung von Wagenknecht *et al.*^[395].

Die Azobenzol C-Nucleoside (**pAzo** und **mAzo**) und Protonenschwamm wurden unter Argonatmosphäre mit Phosphorylchlorid bei -7,5 °C für mehrere Stunden versetzt, um die 5'-OH Gruppe zu phosphorylieren (siehe **177** in **Abb. 211**). Da die Reaktion gewöhnlich nicht vollständig abläuft, wurde analog zur Literatur^[395] nach 4 Stunden weiteres Phosphorylchlorid zugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach der Zugabe von Tributylamin und Tributylammonium Pyrophosphat wurde das entstandene zyklische Triphosphat **175** (siehe **Abb. 211**) durch langsame Zugabe in 0,1 M TEAB Puffer hydrolysiert.

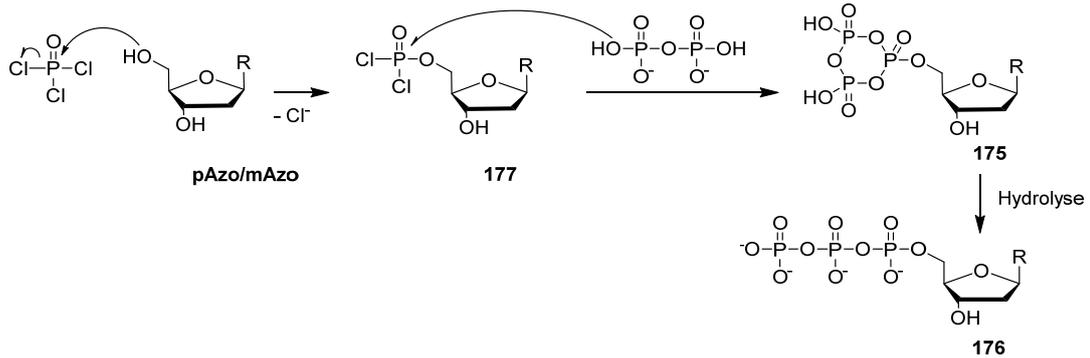


Abb. 211 Mechanismus^[389] zur Darstellung von Nucleosidtriphosphaten nach der Yoshikawa Methode.

Die Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC (siehe **Abb. 212**). Zur Reduzierung der Triethylammonium-Salze wurden die Verbindungen drei Mal mit NaOAc/EtOH gefällt. **pAzo-TP** und **mAzo-TP** konnten in Ausbeuten von 13% und 30% isoliert werden. Die analytischen HPLC-Chromatogramme sind in **Abb. 212** und die NMR Spektren (¹H und ³¹P) in **Abb. 213** und **Abb. 214** gezeigt. Die Analysen zeigen, dass **pAzo-TP** und **mAzo-TP** in sehr hoher Reinheit dargestellt werden konnten. Im ³¹P-NMR Spektrum von **mAzo-TP** sind mehr Signale als erwartet zu sehen. Dies kann durch die *cis*- und *trans*-Isomere und auf das Vorhandensein von zwei Gegenionen (Triethylammonium und Natrium) erklärt werden. Anscheinend ist die dreimalige Fällung von **mAzo-TP** nicht ausreichend, um selektiv das Natrium-Gegenion zu erhalten. Da durch die Studien von dem enzymatischen Einbau der Nucleosidbisphosphate bekannt war, dass Triethylammonium Gegenionen die enzymatische Reaktion nicht beeinflusst, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Fällung verzichtet.

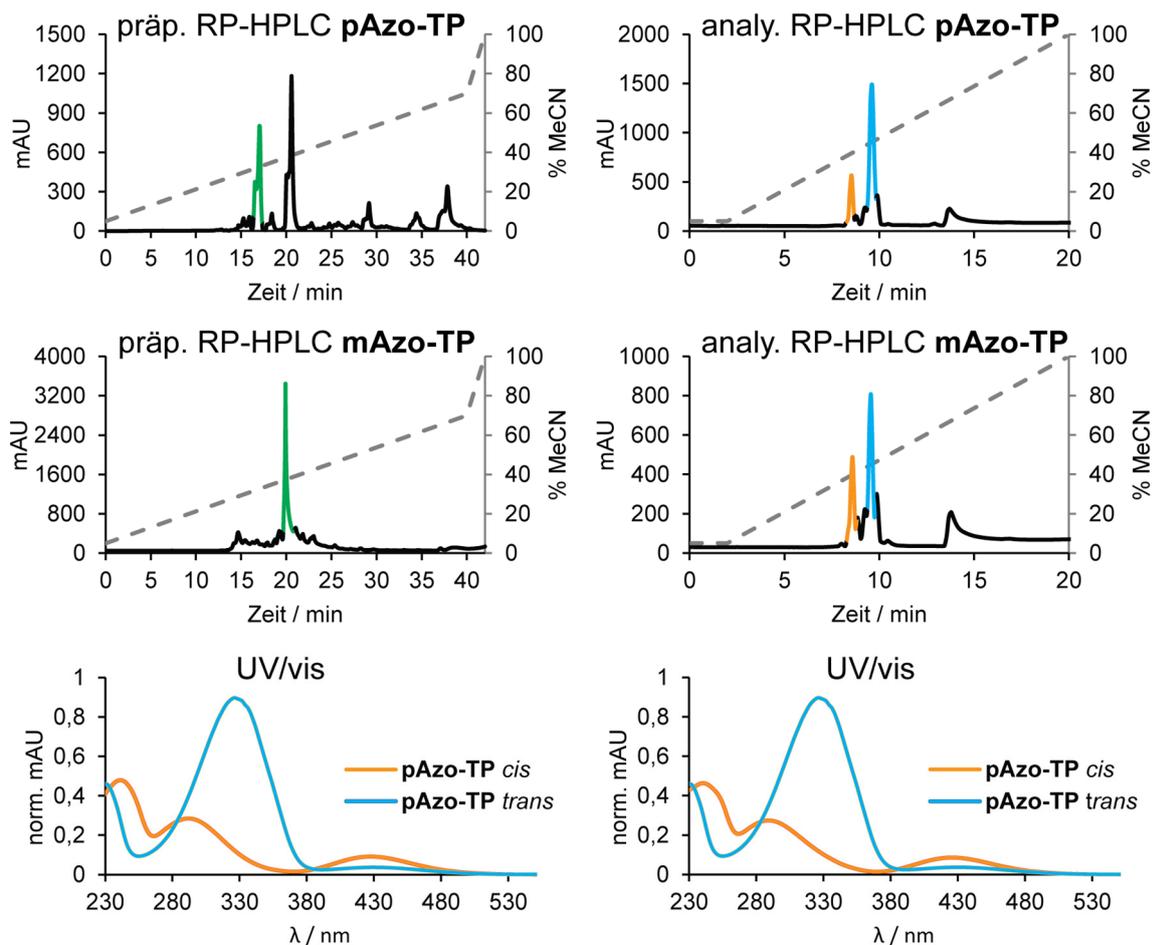


Abb. 212 RP-HPLC Chromatogramme zur Aufreinigung von **pAzo-TP** (oben, links) und **mAzo-TP** (Mitte, links). Der Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt. Eluenten: MeCN und 0,1 M TEAB; $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Säule: *MultoKrom* 100-5 C18 (250x22mm). Detektion erfolgte bei 330 nm. Der grün markierte Peak enthält das gewünschte Produkt. Analytische RP-HPLC Chromatogramme von **pAzo-TP** und **mAzo-TP** sind rechts (oben und Mitte) gezeigt. Die zwei Hauptsignale (orange, hellblau) gehören zu den *cis*- und *trans*-Isomeren der entsprechenden Verbindungen. Die Signale bei Minute 14 haben Absorptionsmaxima bei 230 nm, sodass diese Lösungsmittel-effekte der Eluenten zurückzuführen sind und für die Analyse der Reinheit vernachlässigt werden können. Die kleinen Signale neben den farblich markierten Hauptsignalen sind vermutlich die Monophosphate der entsprechenden Verbindung. Der Gradient ist auf der Sekundärachse gezeigt. Eluenten: MeCN und 0,1 M TEAA; $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Säule: *MultoKrom* 100-5 C18 (250x4,6mm). Detektion erfolgte bei 330 nm. Unten sind die UV/vis Absorptionsspektren gezeigt, die von den entsprechenden Signalen (orange, hellblau) während der analytischen HPLC aufgenommen wurden.

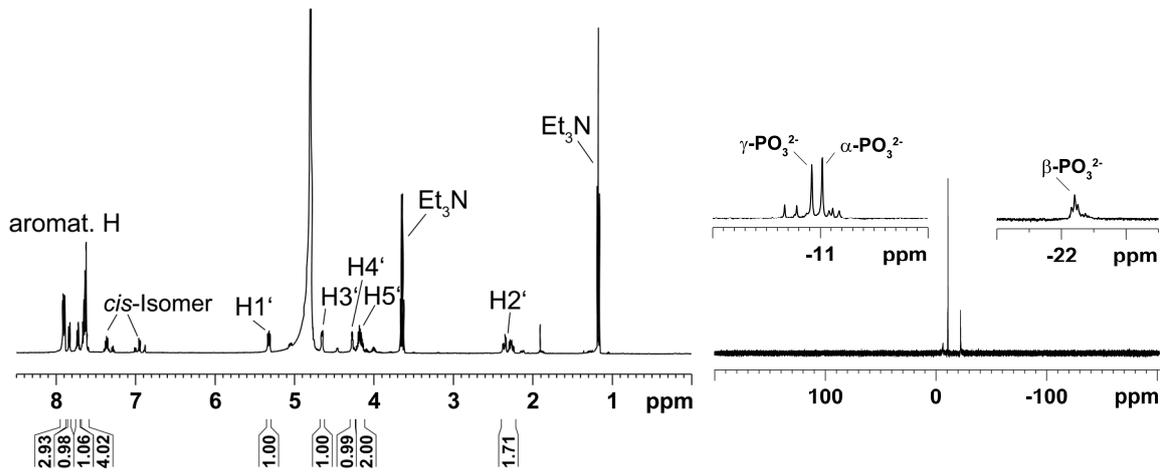


Abb. 213 ^1H -NMR (500 MHz) und ^{31}P -NMR Spektrum (202 MHz) von **mAzo-TP** in D_2O (links). Das Spektrum zeigt eine ~4:1 Mischung aus *trans* und *cis*-Isomer. Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers zugeordnet. Aufgrund der *cis*- und *trans*-Isomere und der verschiedenen Gegenionen (siehe ^1H -NMR) sind mehrere Spezies im ^{31}P zu beobachten.

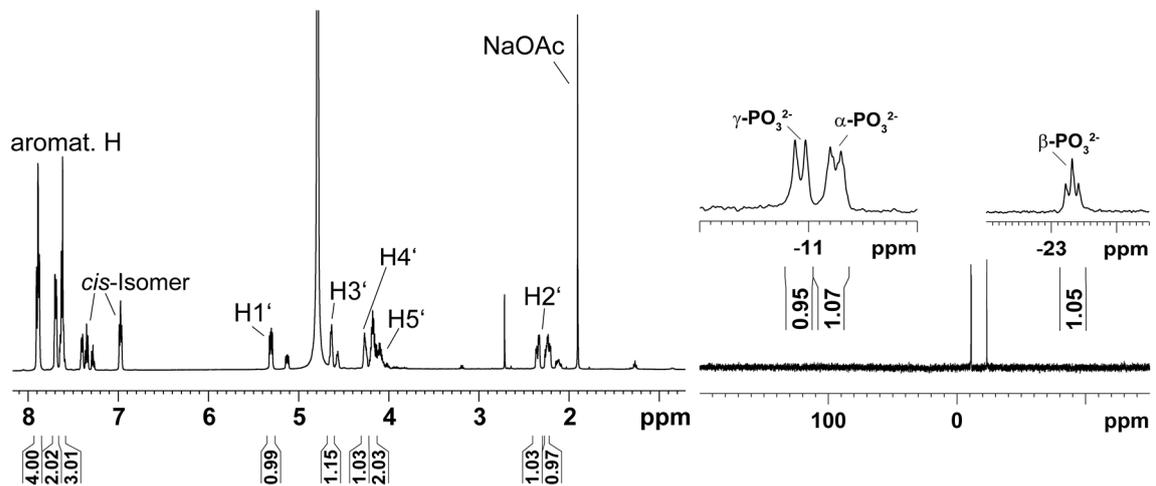


Abb. 214 ^1H -NMR (500 MHz) und ^{31}P -NMR Spektrum (202 MHz) von **pAzo-TP** in D_2O (links). Das Spektrum zeigt eine ~4:1 Mischung aus *trans* und *cis*-Isomer. Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers zugeordnet. Das ^{31}P -NMR Spektrum wurde vor der Fällung mit NaOAc aufgenommen. Zudem wurde das Spektrum direkt nach Bestrahlung mit vis-Licht (420 nm) aufgenommen, um das *trans*-Isomer anzureichern.

4.2.7.2 Einbau der Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate in DNA mittels Polymerasen

Der Einbau der Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate **pAzo-TP** und **mAzo-TP** in DNA mittels Polymerasen wurde in Zusammenarbeit mit Mayreli Ortiz aus dem Arbeitskreis Ciara O'Sullivan in einem vier wöchigen Aufenthalt in Tarragona, Spanien durchgeführt. Die Experimente wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt.

Der Einbau von **pAzo-TP** und **mAzo-TP** wurde mittels PCR in ein 120mer DNA mit den Polymerasen *Kapa2G robust* und *KOD XL (Merck)* untersucht. *KOD XL* wird standardmäßig^[396] vom Arbeitskreis Ciara O'Sullivan zum Einbau von modifizierten Triphosphaten mittels PCR verwendet. Zuerst wurde analysiert, ob **pAzo-TP** oder **mAzo-TP** ein natürliches

dNTP ersetzen kann. Dazu wurden PCR-Reaktionen durchgeführt bei denen drei natürlichen dNTPs verwendet und das vierte dNTP durch ein Azobenzol Triphosphat (**Azo-TP**; **Azo** = **mAzo**, **pAzo**) vollständige oder teilweise (Verhältnis von dNTP/**Azo-TP** 80:20, 50:50, 20:80 und 0:100) ersetzt wurde. Die Analyse der Amplifikation erfolgte per Agarose Gelelektrophorese (siehe **Abb. 215**, links, für ein exemplarisches Gel am Beispiel des dGTP Verhältnis). Die Ergebnisse (siehe **Tabelle 14**) zeigten, dass ein dNTP nicht vollständig von **pAzo-TP** oder **mAzo-TP** substituiert werden kann. Nur bei den Fällen, bei denen ein natürliches dNTP zu 80% oder weniger von **mAzo-TP** oder **pAzo-TP** ersetzt wurde, fand eine Amplifikation statt. Da aber die Primer Konzentration 1000-fach niedriger war als die dNTP Konzentration, war bei einer Reduzierung eines dNTPs von 80% immer noch eine ausreichende Konzentration der natürlichen dNTPs vorhanden für eine erfolgreiche Amplifikation ohne den Einbau von **pAzo-TP** oder **mAzo-TP**.

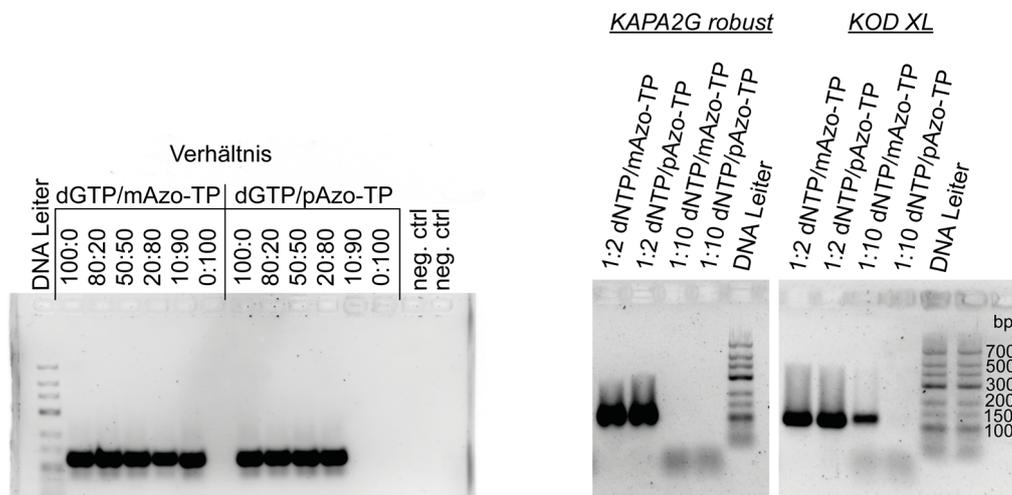


Abb. 215 Gelfoto eines 2,6%igen Agarose Gels (TBE-Puffer, 90V, ~20 min) zur Untersuchung der erfolgreichen Amplifikation mit *Kapa2G robust* (5 μ M Primer, 5 nM DNA-Konzentration, 20 Zyklen) in Anwesenheit von dATP, dCTP, dUTP und verschiedene Verhältnissen an dGTP zu **Azo-TP** (links). Die linke Negativkontrolle ist die Amplifikation ohne dGTP, die rechte Negativkontrolle ist ohne Templat. DNA-Leiter: *O'GeneRuler Low Range DNA Ladder* von *ThermoFisher Scientific*. Das rechte Gelfoto eines 2,6%igen Agarose Gels (TBE-Puffer, 90V, ~20 min) zeigt die Analyse einer PCR-Reaktion mit *Kapa2G robust* und *KOD XL* und mit verschiedenen dNTP/**Azo-TP** Verhältnissen. Bei dem rechten Gel wurde nicht ein einzelnes dNTP substituiert, sondern die **Azo-TP** wurde im Überschuss zu allen dNTPs eingesetzt. DNA-Leiter: *O'GeneRuler Low Range DNA Ladder* von *ThermoFisher Scientific*.

Der Einbau von **pAzo-TP** oder **mAzo-TP** konnte allerdings nicht über Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Für diese Analyse eignete sich RP-HPLC insbesondere, weil die modifizierten Stränge von den nativen abgetrennt werden könnten und zugleich durch UV/vis Absorptionsspektroskopie die charakteristische Absorption des Azobenzol-Chromophors beobachtet werden könnte.

Tabelle 14 Untersuchungen der Stöchiometrie von dNTP und Azo-TP zum Einbau von **Azo-TP** in DNA mit den Polymerasen *KAPA2G robust* und *KOD XL*. Grüne Felder kennzeichnen die erfolgreiche Amplifikation, während rote Felder nicht-erfolgreiche Amplifikation (kein PCR Produkt) darstellen.

Verhältnis	<i>KAPA 2G</i>		<i>KOD XL</i>	
	mAzo	pAzo	mAzo	pAzo
dATP/Azo	80/20	Grün	Grün	Grün
	50/50	Grün	Grün	Grün
	20/80	Grün	Grün	Grün
	10/90	Rot	Rot	Rot
	0/100	Rot	Rot	Rot
dCTP/Azo	80/20	Grün	Grün	Grün
	50/50	Grün	Grün	Grün
	20/80	Grün	Grün	Grün
	10/90	Rot	Rot	Rot
	0/100	Rot	Rot	Rot
dGTP/Azo	80/20	Grün	Grün	Grün
	50/50	Grün	Grün	Grün
	20/80	Grün	Grün	Grün
	10/90	Rot	Rot	Rot
	0/100	Rot	Rot	Rot
dTTP/Azo	80/20	Grün	Grün	Grün
	50/50	Grün	Grün	Grün
	20/80	Grün	Grün	Grün
	10/90	Rot	Rot	Rot
	0/100	Rot	Rot	Rot

Da für die effiziente Analyse per HPLC mehrere hundert Pikomol an PCR-Produkt benötigt werden, musste zunächst die PCR-Reaktion hochskaliert werden. Dazu wurde die Primer-Konzentration von 0.2 μM auf 5 μM und die Target-Konzentration von 50 pM auf 5 nM erhöht. Zudem wurde die Anzahl der Zyklen von 20 auf 40 erhöht. Da aus den Untersuchungen zu den Verhältnissen der einzelnen dNTPs und Azo-TPs keine eindeutigen Ergebnisse erhalten wurden, welches dNTP am besten substituiert werden kann, wurde in den künftigen Studien verschiedenen Verhältnisse aller dNTPs mit **pAzo-TP** und **mAzo-TP** untersucht. Es wurden die Verhältnisse dNTPs zu Azo-TP von 1:2 und 1:10 für *KAPA2G robust* und *KOD XL* untersucht. Gelelektrophoretische Analysen (siehe **Abb. 215** rechts) zeigten, dass bei der Verwendung von *KAPA2G robust* oder *KOD XL* und einem Verhältnis von dNTPs/**Azo-TP** von 1:2 PCR-Produkte erhalten wurden. Bei einem Verhältnis von dNTP/**pAzo-TP** 1:10 konnte für beide Polymerasen kein PCR-Produkt beobachtet werden, während bei dNTP/**mAzo-TP** 1:10 nur im Falle von *KOD XL* PCR-Produkt erhalten wurde, wenn auch mit einer geringeren Ausbeute als bei einem Verhältnis von 1:2. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels RP-HPLC. Ein exemplarisches Chromatogramm des PCR-Produktes mit *KOD XL* und einem dNTP/**mAzo-TP** Verhältnis von 1:2 ist in **Abb. 216** gezeigt. Im Vergleich zu der Positivkontrolle (PCR ohne **mAzo-TP**; orange Spur) ist eine signifikante Verschiebung der Retentionszeit zu erkennen. Das in der HPLC gemessene UV/vis Absorptionsspektrum zeigt zudem eine charakteristische Bande des Azobenzols bei 420 nm.

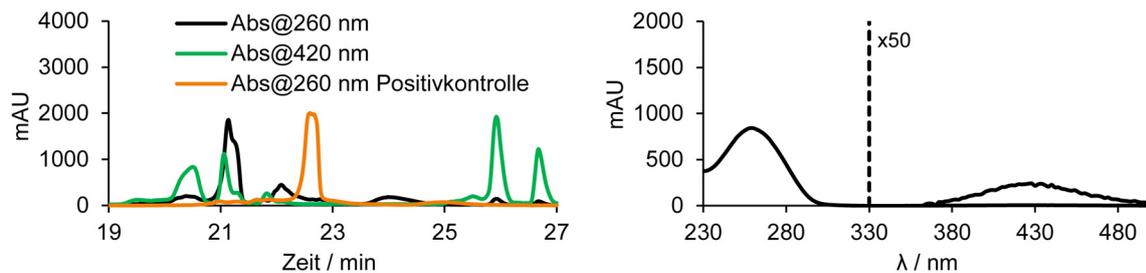


Abb. 216 RP-HPLC Chromatogramme des PCR-Produktes mit der Verwendung von KOD XL und **mAzo-TP** (NTP/**mAzo-TP** 1:2). Die Signale bei Minute 26 und 26,8 sind den Isomeren von **mAzo-TP** zuzuordnen. Die HPLC erfolgte an einer Waters Xbridge BEH300 C18, 3,5 μm , 250x4,6 mm bei 60 °C mit HFIP-Puffer (400 mM HFIP, 16,3 mM TEA, pH 8) und MeOH. Gradient: von 5 auf 54,5% MeOH in 28 min.

Die Amplifikation mittels PCR stellt eine größere Herausforderung dar, als der Einbau durch *Primer Extension*. Aus diesem Grund wurde von Mayreli Ortiz der Einbau von **pAzo-TP** und **mAzo-TP** mittels *Primer Extension* mit der Klenow-Fragment-Polymerase untersucht. Studien von Hollenstein *et al.*^[397] zeigten, dass das Klenow-Fragment dazu verwendet werden kann, um Pyren C-Nukleosidtriphosphate in DNA einzuführen. Es wurde untersucht ob **pAzo-TP** oder **mAzo-TP** anstelle von dCTP in der *Primer Extension* Reaktion verwendet werden kann. Eine Analyse per Gelelektrophorese zeigte, dass bei der Verwendung von **mAzo-TP** anstatt von dCTP ein Volllängenprodukt erhalten werden konnte (siehe Bahn 3 in **Abb. 217**), welches ein identisches Migrationsverhalten zeigte wie eine Positivkontrolle (siehe Bahn 1 in **Abb. 217**) nur mit den natürlichen dNTPs. Bei der Substitution von dCTP durch **pAzo-TP** kam es zu einem Abbruch, sodass kein Volllängenprodukt (siehe Bahn 5 in **Abb. 217**) enthalten werden konnte.

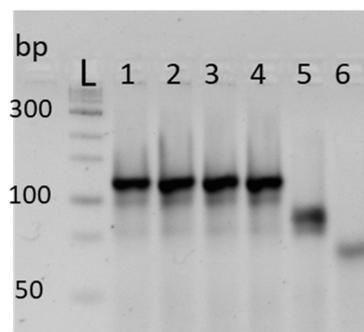


Abb. 217 Gelfoto eines 4%igen Agarose Gels (TBE-Puffer, 90V, 90 min) zur Untersuchung des Einbaus von **pAzo-TP** und **mAzo-TP** in DNA durch Substitution mit dCTP mittels *Primer Extension* mit dem Klenow Fragment. L: DNA-Leiter (*O'GeneRuler Low Range DNA Ladder* von *ThermoFisher Scientific*). Bahn 1: Positivkontrolle ohne **Azo-TP**. Bahn 2: 50% dCTP und 50% **mAzo-TP**. Bahn 3: 0% dCTP und 100% **mAzo-TP**. Bahn 4: 40% dCTP und 50% **pAzo-TP**. Bahn 5: 0% dCTP und 100% **pAzo-TP**. Bahn 6: ssDNA zum Vergleich. Die Abbildung wurde von Mayreli Ortiz erstellt.

Die Studie konnte aufgrund der begrenzten Zeit nicht beendet werden und wird von Mayreli Ortiz weitergeführt. Weitere Untersuchungen sind notwendig um den Einbau und die Häufigkeit des Einbaus zu beweisen. Dazu müssen die Produkte der *Primer Extension* aus den Gel isoliert werden und spektroskopisch auf die charakteristische Azobenzol-Absorption untersucht werden.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die enzymatische Synthese von Nukleinsäuren bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Darstellung mittels Festphasensynthese. Lange RNA kann fehlerfrei in großen Maßstäben günstig und schnell hergestellt werden. Spezielle Geräte wie ein Festphasen-Synthesizer werden dabei nicht benötigt, sodass enzymatische Synthesen in jedem Labor durchgeführt werden können. Photolabile Schutzgruppen oder Photoschalter eignen sich ideal für die ort- und zeitaufgelöste Regulation von Struktur und Funktion von Nukleinsäuren. Dieses Teilprojekt beschäftigte sich mit der chemo-enzymatischen Synthese von photoregulierbarer RNA und DNA.

Dazu wurden im ersten Teil dieses Projektes in Zusammenarbeit mit Sara Keyhani und Anja Blümmler NPE-geschützte Nukleosid-3',5'-bisphosphate (**pA^{NPE}p**, **pC^{NPE}p**, **pG^{NPE}p**, **pU^{NPE}p**) synthetisiert und mit *T4* RNA Ligase 1 selektiv an das 3'-Ende einer RNA eingebaut. Obwohl die photolabilen Schutzgruppen die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindung blockieren, wurden alle Nukleosid-3',5'-bisphosphate in hohen Ausbeuten eingebaut. Da die photolabilen Schutzgruppen am 3'-Ende nur in speziellen Fällen einen regulierenden Effekt zeigen würden, wurden im nächsten Schritt die terminalen Photoschutzgruppen in interne transformiert. Dazu wurde das 3'-Phosphat in hohen Ausbeuten dephosphoryliert und die RNA mit einer 5'-phosphorylierten Donor-RNA in einer *Splint*-Ligation umgesetzt. Dies ist die erste Methode, die es erlaubt positionsspezifisch und enzymatisch photolabile Schutzgruppen in RNA einzuführen. Die hohe Effizienz dieser Methode wurde an der Synthese des lichtaktivierbaren 2'dG Riboschalters gezeigt, bei dem ein 79mer RNA mit einer internen photolabilen Schutzgruppe hergestellt und NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Photoschutzgruppe die Ligandenbindung vollständig blockierte. Erst nach Belichtung fand eine Bindung des Liganden und eine Umfaltung des Riboschalters statt.

Zur weiteren Funktionalisierung von RNA wurde ein Initiator-nukleotid mit einer Alkin-modifizierten Photoschutzgruppe (**NPBY-dG**) dargestellt. **NPBY-pG** konnte mit einer Selektivität von 73% an das 5'-Ende einer RNA während der Transkription mit der *T7* RNA Polymerase eingebaut werden. Zusammen mit dem synthetisierten Alkin-modifizierten Nukleosid-3',5'-bisphosphat (**pC^{NPBY}p**) könnte in zukünftigen Studien RNA mittels Click-Chemie temporär funktionalisiert werden. Eine Möglichkeit dazu wäre eine Zyklisierung mit einem bifunktionalen Azid-Linker. Vorangegangene Studien an DNA zeigten, dass Zyklisierung zu einer globalen strukturellen Änderung von Nukleinsäuren führen kann, was die Anzahl an Photoschutzgruppen deutlich reduzieren kann.

Der zweite Teil dieses Projektes beschäftigte sich mit dem enzymatischen Einbau von Azobenzol Photoschaltern in DNA und RNA. Für den Einbau in RNA wurden Azobenzol C-Nukleosid-3',5-bisphosphate ($p^{2'OH}pAzop$, $p^{2'OH}mAzop$) hergestellt und mit *T4* RNA Ligase 1 an das 3'-Ende von RNA eingebaut, anschließend dephosphoryliert und mittels *Splint*-Ligation zu einer internen Modifikation umgewandelt. Trotz der Abwesenheit einer natürlichen Nukleobase liefen alle enzymatischen Schritte in guten bis exzellenten Ausbeuten ab. Zusätzlich wurden Azobenzol C-Nukleosidtriphosphate (**pAzo-TP** und **mAzo-TP**) dargestellt und in Kooperation mit dem Arbeitskreis Ciara O'Sullivan versucht mittels Polymerasen in DNA einzubauen. Dabei konnten erste Hinweise auf einen erfolgreichen Einbau gesammelt werden.

In zukünftigen Studien könnte ein mehrfacher Einbau von modifizierten Bisphosphaten untersucht werden. Um den Durchsatz zu erhöhen, könnten die enzymatischen Reaktionen an einer festen Phase durchgeführt werden. Dies würde das Entfernen der Enzyme, Puffer usw. in einem Waschschrift erlauben. Die Immobilisierung der RNA könnte mittels dem Alkin-modifizierten Initiatornukleotid (**NPBY-pG**) erfolgen. Nach der Ligation mit einem Nukleosid-3',5'-bisphosphat könnten die nicht-reagierten Stränge durch die Verwendung eines *Capping*-Reagenzes (z.B. Natriumperodat) an den weiteren Reaktionen gehindert werden. Durch Automatisierung könnte somit lichtaktivierbare RNA, analog wie bei einem Festphasen-*Synthesizer*, jedoch chemo-enzymatisch, hergestellt werden. Abschließende Belichtung würde die modifizierte RNA freisetzen. Die Verwendung von Azobenzol-3',5'-bisphosphaten oder orthogonalen (bzw. wellenlängenselektive) Schutzgruppen für das Initiatornukleotid würde eine Abspaltung von der festen Phase erlauben, ohne die Nukleobasen der RNA zu entschützen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Methoden

Allgemeine Arbeitsbedingungen

Bei Bedarf wurden die Reaktionen unter Argon durchgeführt und die benutzten Apparaturen wurden im Hochvakuum mit dem Heißluftfön getrocknet. Instabile Verbindungen wurden unter Argon bei -20 °C gelagert.

Lösungsmittel

Lösungsmittel der Qualität p.a. (*pro analysis*) wurden von den Firmen *Acros*, *Roth*, *VWR* und *Fluka* bezogen und ohne weitere Aufreinigung in den Synthesen eingesetzt. Wasserfreie Lösungsmittel über Molekularsieb wurden von *Sigma Aldrich* und *Acros* bezogen. Zur Säulenchromatographie wurden technische Lösungsmittel eingesetzt.

Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen *Sigma Aldrich*, *Fluka*, *Alfa Aeser*, *Acros*, *TCl*, *Linktech*, *Carbosynth*, *Glen Research* und *Merck* und wurden ohne Aufreinigung verwendet. Bei Bedarf wurde beim Umgang mit der Chemikalie Luft- oder Lichtabschluss gewährleistet.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit den Geräten AM 250 (^1H : 250 MHz; ^{13}C : 63 MHz), AM 300 (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 75 MHz, ^{31}P : 121 MHz) und AV400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, ^{31}P : 162 MHz), AV500 und AV600 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 162 MHz, ^{31}P : 202 MHz) der Firma *Bruker* aufgenommen. Deuterierte Lösungsmittel wurden von *Deutero* bezogen. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben und auf $[\text{D}_6]\text{DMSO}$: $\delta = 2,50$ ppm, D_2O $\delta = 4,79$ ppm, CDCl_3 : $\delta = 7,26$ ppm, $[\text{D}_4]\text{MeOD}$: $\delta = 3,31$ ppm bezogen.^[398] Die chemische Verschiebung der ^{31}P -Signale wurde auf 85%ige Phosphorsäure als externer Standard bezogen. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Die Feinstruktur der ^1H -Signale wurde mit s für Singulett, bs für breites Singulett, d für Dublett, dd für Doppeldublett, td für Triplett von Duplett, qd für Quartett von Duplett, t für Triplett, q für Quartett, qn für Quintett und m für Multipllett angegeben. Für die Zuordnung der Signale wurden zusätzliche 2D-Experimente (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC) durchgeführt. Bei der Zuordnung sind die entsprechenden Protonen kursiv geschrieben. Alle Messungen erfolgten bei 298 K.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (*Merck* Nr. 5554; 0.2 mm Schichtdicke) oder SIL G ALUGRAM® XTRA SIL G (*Macherey Nagel*, 0,2 mm, 5-17 µm Partikelgröße) Kieselgel-Platten. Die Laufstecke betrug zwischen 2,0 und 4,5 cm. Sämtliche R_F-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Es wurden technische Lösungsmittel verwendet. UV aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei der Wellenlänge von 254 nm und 365 nm sichtbar gemacht. Das Anfärben der Substanzen erfolgte mit einem Anisaldehyd-Reagenz (84 mL Ethanol, 1 mL Eisessig, 3 mL Schwefelsäure und 2 mL Anisaldehyd) und Erhitzen mit einem Heißluftfön.

Präparative Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße: 40– 63 µm) der Firma *Macherey-Nagel* als stationäre Phase benutzt.

Massenspektrometrie

Die ESI-MS-Massenspektrometrie der Oligonukleotide erfolgte mit einem *Bruker micro-TOF-Q* Gerät. Die Aufnahme der Spektren wurde von Patrizia Müller, Martin Held oder Christian Grünewald durchgeführt.

Die ESI-MS-Massenspektrometrie chemischer Verbindungen erfolgte an einem *Thermo-Fisher Surveyor MSQ*.

Die hochauflösende Massenspektrometrie erfolgte mit einem *MALDI LTQ Orbitrap XL* Gerät der Firma *Thermo Fisher Scientific* mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix.

Belichtung

Die Belichtung der Azobenzol-modifizierten DNA und RNA Stränge erfolgte mit einem *Thorlabs LED driver DC2100* und einem Küvettenhalter *CVH100/M* (Thorlabs). Für eine zeitabhängige Bestrahlung wurde der Küvettenhalter auf einer Schüttelplatte befestigt, so dass eine homogene Bestrahlung der Probe garantiert werden konnte. Eine *Thorlabs M365L2 LED* ($\lambda=365$ nm, 300 mW) und eine *Thorlabs M420L2 LED* ($\lambda=420$ nm, 300 mW) wurde verwendet. Die Bestrahlung während der Schmelzpunktstudien erfolgte mit dem Gerät der Firma *Thorlabs LED Driver DC2100* mit Küvettenhalter *CV100/M*. Die Belichtung der lichtaktivierbaren AntimiR-Sonden erfolgte entweder mit einer Thorlabs LED (365 nm, 300 mW) oder mit einem selbstgebautes Gerät (365 nm) zur Bestrahlung von Mikrotiterplatten mit 96-wells. Die Bestrahlung der chemo-enzymatisch hergestellten RNA erfolgte

mit einem selbstgebauten Gerät (365 nm, 500 mA, 15 V, 7 W) und einem *Prozessor Netzteil PPS 5330* von *ELV*.

DEPC-H₂O

Zur Herstellung von RNase-freien Wassers wurde 1 L Milli-Q-Wasser mit 1 mL DEPC (Diet-hyldicarbonat) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert (130 °C; 25 min).

Puffer-Lösungen

1M TEAA-Puffer (pH 7): 57,2 mL Essigsäure (100%) wurden zu 500 mL Milli-Q-Wasser hinzugefügt. Unter starkem Rühren wurden 138,6 mL destilliertes Triethylamin hinzugefügt. Durch Zugabe von Essigsäure oder Triethylamin wurde der pH auf 7 eingestellt. Das Volumen wurde mit MilliQ-H₂O auf 1 L aufgefüllt.

10xPBS-Puffer: Der 10x-PBS Puffer bestand aus NaCl (1,37 mM), KCl (27 mM), KH₂PO₄ (14 mM) und Na₂HPO₄ (100 mM).

HFIP-Puffer: 41,5 mL HFIP (400 mM) wurden zu 950 mL Milli-Q-Wasser gegeben. Unter starkem Rühren wurden 2,3 mL Triethylamin (16,3 mM) zugegeben. Das Volumen wurde auf 1L aufgefüllt. Die Lösungen wurden für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, damit ein vollständiges Mischen garantiert werden konnte.

RP-HPLC

Die RP-HPLC wurden an dem Gerät *Agilent Technologies 1260 Infinity* oder *Agilent Technologies 1200 series* durchgeführt. Die verwendeten Säulen und Gradienten stehen an den entsprechenden Chromatogrammen oder Vorschriften.

Spektroskopische Untersuchungen

Die UV/Vis-Spektren und Schmelzpunktmessungen der Azobenzol C-Nukleoside wurden an einem JASCO V650 Spektrometer mit einem programmierbaren Küvettenhalter (JASCO PAC-743) aufgenommen. Für die Schmelzpunktmessungen wurde die Änderung der Absorption der Proben (5 µM, in PBS-Puffer, pH 7,4) bei $\lambda = 260$ nm in Abhängigkeit der Temperatur (von 20 bis 60 °C) gemessen. Die Temperaturrampe betrug 1 °C·min⁻¹. Die Proben wurden solange mit UV (365 nm) oder sichtbarem Licht (420 nm) bei 75 °C bestrahlt, bis sich die Absorption bei $\lambda = 322$ nm nicht mehr änderte. Der Schmelzpunkt wurde aus der ersten Ableitung der Kurve bestimmt. Mindestens drei unabhängige Messungen (jede Messung entspricht einem Zyklus von Hochheizen und Abkühlen) wurden durchgeführt und für die Berechnung der Schmelzpunkte verwendet. Ermüdungsstudien der

Azobenzol C-Nukleoside wurden an einem selbstgebauten UV/vis Spektrometer mit einem *Ocean Optics Inc. USB4000* Detektor und einem *Ocean Optics DH-mini* durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmungen der Oligonukleotide wurde an einer *Nanodrop2000* Gerät von *Thermo Scientific* durchgeführt.

Fluoreszenzstudien der lichtaktivierbaren AntimiR-Sonden wurde an einem *Platereader* Gerät der Firma *Tecan* durchgeführt. Dabei betrug die Konzentration standardmäßig 1 μM (100 μL).

Berechnung der Photoisomere anhand von Reinspektren

Die Auftrennung der *cis* und *trans* Photoisomere der Azobenzol-modifizierten DNA und RNA Stränge und Aufnahme der UV/vis Absorptionsspektren der reinen Isomere erfolgte per AE-HPLC an einem *Agilent Technologies 1260 Infinity* Gerät mit einer *DNAPac PA-100* (250x4 mm) Säule der Firma *Dionex*. Da Nukleinsäuren nicht bei 332 nm absorbieren, kann die Absorption bei 332 nm (A_{332}) aus der Summe des *cis*- und *trans*-Isomers berechnet werden:

$$A_{332} = A_{332(\text{trans})} + A_{332(\text{trans+cis})}$$

$$A_{332} = A_{332(\text{trans})} \cdot R_{\text{trans}} + A_{332(\text{cis})} \cdot R_{\text{cis}} \quad \text{mit } R_{\text{trans}} = 1 - R_{\text{cis}}$$

$$A_{332} = A_{332(\text{trans})} \cdot (1 - R_{\text{cis}}) + A_{332(\text{cis})} \cdot R_{\text{cis}}$$

$$A_{332} = A_{332(\text{trans})} - A_{332(\text{trans})} \cdot R_{\text{cis}} + A_{332(\text{cis})} \cdot R_{\text{cis}}$$

$$A_{332(\text{trans})} \cdot R_{\text{cis}} - A_{332(\text{cis})} \cdot R_{\text{cis}} = A_{332(\text{trans})} - A_{332}$$

$$R_{\text{cis}} \cdot (A_{332(\text{trans})} - A_{332(\text{cis})}) = A_{332(\text{trans})} - A_{332}$$

$$\text{Formel 1} \quad R_{\text{cis}} = \frac{A_{332(\text{trans})} - A_{332}}{A_{332(\text{trans})} - A_{332(\text{cis})}}$$

5.2 Oligonukleotidsynthesen

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an dem Gerät *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems*. Es wurden Polystyrol- oder CPG-Säulen der Firma *Applied Biosystems*, *Linktech* oder *Glen Research* verwendet. Die Konzentration der verwendeten Phosphoramidite betrug 0.11 M in trockenem Acetonitril. Als Aktivator diente eine 0.3 M BTT (5-Benzylthio-1H-tetrazole; teilweise von *EMP Biotech* bezogen) Lösung in Acetonitril, die bei Bedarf mit Molekularsieb 4Å von *EMP Biotech* getrocknet wurde. Zur Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe wurde *TCA debloc* (3% Trichloressigsäure in Dichlormethan) der Firma *Proligo* verwendet. Die nicht abreagierten, freien 5'OH-Gruppen wurden mit den

„Cappingreagenzen“, bestehend aus 10% Essigsäureanhydrid und 10 % 2,6-Lutidin in THF (CapA) oder unter UltraMild Bedingungen (THF/Pyridin/Pac-Anhydrid 85:10:5) von Linktech und (CapB), bestehend aus 10% 1-Methylimidazol in THF, geschützt. Für die Oxidation wurde eine Lösung, bestehend aus 3% Iod, 2% Wasser und 20% Pyridin in THF, verwendet. Bei Bedarf wurde nach der Synthese eine selektive Abspaltung der Cyanoethyl-Schutzgruppen durchgeführt. Dabei wurde die Säule für 20 min mit einer 20% Diethylamin-Lösung von *EMP Biotech* gespült und anschließend mit Acetonitril gewaschen und im Hochvakuum für 15 min getrocknet.

Zum Entfernen des Lösungsmittels während der Aufarbeitung der Oligonukleotide, wurde eine Vakuumkonzentrator *Concentrator 5301* der Firma *Eppendorf* verwendet.

5.2.1 Festphasensynthese der lichtaktivierbaren AntimiR-Sonden

Die Synthesen erfolgten an einem *ABI392 Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* im DMTr-ON Modus unter UltraMild Bedingungen durchgeführt. Die Kupplungszeit der 2'OMe-Phosphoramidite (*Linktech Co. Ltd.*) betrug 6 min. Bei Bedarf wurde die Kupplungszeit der Modifikationen nach den Herstellerangaben verändert. Die Abspaltung vom Festphasenmaterial und die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation mit NH_3 (aq. 32%) für 2 h bei Raumtemperatur. Das Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde in einem Vakuumkonzentrator (*Eppendorf*) bei 4 °C durchgeführt. Eine zu starke Trocknung zu Problemen bei erneuten lösen führen. Die Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC mit HFIP-Puffer (400 mM HFIP, 16,3 mM TEA pH 8) und MeOH an einer Säule von *Waters (Xbridge BEH 300, 3,5 µm, 4,6 x 250 mm)* bei 60 °C mit Flussrate von $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe erfolgte durch Inkubation mit 80% Essigsäure für 20 min bei Raumtemperatur. Nach Entfernung aller flüchtigen Bestandteile in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C, wurden die Stränge erneut per RP-HPLC aufgereinigt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem *Bruker micrOTOF-Q* Gerät. Die Stränge, die in Neuronen transfizierte wurde, wurden zusätzlich mit einer Natriumacetat-Lösung (3 M; 0,1 Volumen, pH 5,6) und EtOH (3 Volumen) versetzt und bei -20 °C für 16 h gefällt und durch Zentrifugation (22000 g) bei 4 °C pelletiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Überschüssiges Salz wurde durch zehnfaches Waschen (je 5 mL Wasser) über einen Zentrifugalfilter (1K Membran; *Macrosep Advance (MAP001)* der Firma *Pall*) entfernt.

5.2.2 Festphasensynthese und Aufreinigung der Azobenzol-modifizierten RNA Stränge

Die Festphasensynthese der RNA Stränge erfolgte an einem *Expedite 8909 (PerSeptive Biosystems)* im DMTrOFF-Modus. Die Kupplungszeit von **101** und **105** wurde von 12 min

auf 30 min verlängert. Die Abspaltung vom Festphasenmaterial und die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation mit NH_3 (aq. 25%) und EtOH (3:1) für 24 h bei Raumtemperatur. Nachdem alle flüchtigen Bestandteile in einem Vakuumkonzentrator entfernt wurde, wurden die TBDMS-Schutzgruppen mit 150 μL einer frisch angesetzten Mischung aus Et_3N , $\text{HF}\cdot 3\text{Et}_3\text{N}$ in *N*-Methyl-2-pyrrolidin entfernt (6:3:4; 60 °C, 90 min). Die RNA wurde durch mit 1,4 mL 1-Butanol bei -80 °C gefällt und durch Zentrifugation (12500 g) für 30 min bei 4 °C pelletiert. Die Aufreinigung der Stränge erfolgte per Ionenaustauscher-HPLC (*JASCO 2000er Serie*; Säule: *DNAPac PA-100* (250x9 mm) von *Dionex*) mit 1M LiCl-Lösung und DEPC- H_2O als Eluate. Die Oligonukleotide wurden durch RP-HPLC an einem *JASCO 900er Serie* Gerät mit einer Jupiter 4 μm Proteo 90 Å Säule (150x12 mm) von *Phenomenex* aufgereinigt und entsalzt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem *Bruker micrOTOF-Q* Gerät. Die Oligonukleotide **RNA1(AP)** und **RNA2(AP)** wurden von *IBA GmbH*, Deutschland bezogen. **RNA1(tAzo)** und **RNA2(tAzo)** wurde von *Nihon Techno Service Co., Ltd.*, Japan bezogen.

5.2.3 Festphasensynthese und Aufreinigung der Azobenzol-modifizierten DNA Stränge

Die Synthese wurde an einem *ABI392 Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* im DMTr-ON Modus unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Kupplungszeit der Azobenzol C-Nukleosid Phosphoramidite **101** und **105** wurde von 38 auf 440 s verlängert. Die Abspaltung vom Festphasenmaterial und die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation mit NH_3 (aq. 32%) für 16 h bei Raumtemperatur. Die Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC mit 1M TEAA-Puffer (pH 7) und MeCN (linearer Gradient: 5→40% MeCN in 40 min). Die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe erfolgte durch Inkubation mit 80% Essigsäure für 20 min bei Raumtemperatur. Nach Entfernung aller flüchtigen Bestandteile in einem Vakuumkonzentrator, wurden die Stränge erneut per RP-HPLC unter denselben Bedingungen aufgereinigt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem *Bruker micrOTOF-Q* Gerät. Die unmodifizierten Stränge wurden von *biomers.net GmbH* bezogen.

5.2.4 Synthese der 48mer RNA für die Splint-Ligation in der chemo-enzymatischen Synthese von photoaktivierbarer RNA

Die Synthese wurde an einem *ABI392 Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* im DMTr-OFF Modus unter UltraMild Bedingungen durchgeführt. Die Kupplungszeit der Amidite betrug 12 min.

Sequenz: 5'-pGGC GGG AGU UGG GCU AGG GAG GAA CAG CCU UUU CUA
GGC UAA GGC CCA-3'

Das Festphasematerial wurde in 500 µL einer 3:1 Mischung aus NH₃ (33%) und Ethanol für 24 h bei Raumtemperatur bei 1000rpm im Thermoschüttler inkubiert. Das Festphasenmaterial wurde über eine 0,45µM Zentrifugalfilter (von VWR) entfernt und das Filtrat in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C entfernt. Der Rückstand wurde in 100 µL DMSO gelöst und mit 125 µL Et₃N·3HF versetzt und für 2,5 h bei 60 °C bei 1000 rpm inkubiert. 25 µL 3 M NaOAc und 1 mL Ethanol (-20 °C gekühlt) wurden zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde zweimal invertiert und die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Der Fällungsschritt wurde zweimal wiederholt, um Rückstände von Fluorid-Salzen zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC an *Agilent 1200* Gerät mit einer *MultoKrom 100-5 C18* Säule (10x250mm, 4 ml·min⁻¹, RT). Die Fraktionen, die das Produkte enthalten wurden vereint und in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde zweimal mit Wasser koevaporiert.

Tabelle 15 Gradient für die Aufreinigung der 48mer RNA
Mittels RP-HPLC

Zeit (min)	%Eluent A (400 mM HFIP 16.3 mM Et ₃ N pH 8.3)	% Eluent B (MeOH)
0	95	5
1	95	5
3	80	20
35	40	60

Masse berechnet: 15669, gefunden: 15710. Siehe **Abb. 173** für ein analytisches RP-HPLC Chromatogramm und gelelektrophoretische Analyse.

5.2.5 PCR-Reaktionen

Für die PCR Reaktionen wurde ein 120mer DNA Templat mit der folgenden Sequenz verwendet:

Templat: 5'-GTA ATA GGT TAT AACCAG CGC TTT TCT ATG CCA TAT ATT GGA CTT
GCA GGC CAG TAT CGC ATT AAT GAT TTT GAG TTA AAT GCA TTA TTT AAA TTC
AGC GAC TGG GTT CGG GCA CAT GAT-3'

Als Primer wurden Stränge mit folgenden Sequenzen verwendet:

Vorwärtsprimer (23-mer): 5'-GTAATAGGTTATAACCAGCGCTT-3'

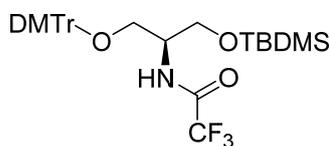
Rückwärtsprimer (31-mer): 5'- ATCATGTGCCCGAACCCAGTCGCTGAATTTA-3'

Entweder wurden 50 pM Templat, 0,2 µM Primer, 1,25 Units der Polymerase und 200 µM dNTPs mit 20 Zyklen oder 5 nM Templat, 5 µM Primer, 1,25 Units der Polymerase und 200 µM dNTPs mit 30 Zyklen verwendet. Es wurde die Polymerasen *KOD XL* (*Merck*) und *Kapa2G robust* (*KAPA BIOSYSTEMS*) verwendet. Das Gesamtvolumen der Reaktionen betrug 100 µL.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	120 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing	58 °C	30 s	20/30
Elongation	72 °C	20 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1

5.3 Chemische Synthesen

5.3.1 Synthese von (S)-N²-TFA-O¹-DMTr-O³-TBDMS-Serinol (**73**)



73

9,71 g (S)-O¹-DMTr-O³-TBDMS-Serinol **67**^[90] (19,12 mmol) wurden in 80 mL MeOH gelöst und mit 3,36 mL Et₃N (23,90 mmol, 1,25 Eq.) und 4,55 mL Trifluoressigsäuremethylester (38,23 mmol, 2,0 Eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH/EtOAc 20:1 → 10:1) gereinigt. Das Produkt **73** enthält EtOAc, welches auch nach 24 h im Hochvakuum nicht entfernt werden konnte. Die Ausbeute wurde entsprechend angepasst.

Ausbeute: 10,72 g (93%)

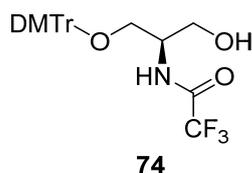
DC (CH/EtOAc 8:1): R_f = 0,52

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz) δ = 8,65 (d, 1H, NH), 7,34-7,39 (m, 2H, H_{ar}), 7,65 (t, J(H,H)=8,6 Hz, 2H, H_{ar}), 7,19-7,24 (m, 4H, H_{ar}), 6,85-6,89 (m, 5H, H_{ar}), 4,07-4,15 (m, 1H, CH), 3,73 (s, 6H, 2xOCH₃), 3,64-3,69 (m, 1H, CH₂), 3,56-3,61 (m, 1H, CH₂), 3,09-3,15 (m, 1H, CH₂), 2,97-3,03 (m, 1H, CH₂), 0,76 (s, 9H, CH₃ TBDMS), -0,07-0,0ppm (m, 6H, CH₃ TBDMS).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 126 MHz) δ = 158,1; 156,3 (q, ²J(C,F)=36,0 Hz); 144,9; 135,5; 135,5; 129,6; 129,6; 127,8; 127,8; 126,7; 116,0 (q, ¹J(C,F)=288,5 Hz); 113,1; 85,3; 61,8; 61,2; 55,1; 52,2; 25,6; 17,7; -5,6; -5,6ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₃₂H₄₀F₃N₁O₅Si +Na⁺ [M+Na⁺]⁺. 626,25201; gemessen: 626,25121 (Δm = 0,0008, Fehler 1,2ppm).

5.3.2 Synthese von (*R*)-*O*¹-DMTr-*N*²-TFA-*O*³-Serinol (**74**)



10,54 g (*S*)-*N*²-TFA-*O*¹-DMTr-*O*³-TBDMS-Serinol **73** (17,45 mmol, 1.0 Eq.) wurden in 50 mL trockenem THF gelöst und mit 34,9 mL TBAF (1,0 M im THF; 34,91 mmol, 2,0 Eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit 50 mL Wasser versetzt und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das auf Kieselgel adsorbierte Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EtOAc 4:1 → 2:1). Das Produkt enthält EtOAc Rückstände, die auch nach 24 h im Hochvakuum nicht entfernt werden konnten. Das Produkt **74** wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur^[88,399] überein.

Ausbeute: 6,67 g (78%)

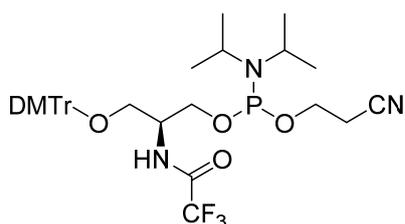
DC (CH/EtOAc 2:1): $R_f = 0,28$

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 75 MHz) $\delta = 9,25$ (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,6$ Hz, 1H, NH), 7,15-7,41 (m, 9H, H_{ar}), 6,81-6,94 (m, 4H, H_{ar}), 4,71-4,85 (m, 1H, OH), 4,06-4,17 (m, 1H, CH), 3,73 (s, 6H, OCH₃), 3,44-3,55 (m, 2H, CH₂-O-DMTr), 2,91-3,19 ppm (m, 2H, CH₂-OH).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 126 MHz) $\delta = 158,6; 156,8$ (q, $^2J(\text{C,F}) = 35,9$ Hz); 145,4; 136,1; 130,1; 128,3; 128,0; 127,1; 116,5 (q, $^1J(\text{C,F}) = 288,5$ Hz); 113,6; 85,8; 62,7; 60,5; 55,5; 53,0 ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₂₆H₂₆F₃N₁O₅ + Na⁺ [M+Na⁺]⁺ 512,16553; gemessen: 512,16412 ($\Delta m = 0,0014$, Fehler 2,7 ppm).

5.3.3 Synthese von (S)-O¹-DMTr-N²-TFA-O³-(N,N-diisopropyl-2-cyanoethylphosphoramidit)Serinol (**62**)

**62**

Die Synthese wurde nach einer leicht abgewandelten Vorschrift von Seitz *et al.*^[88] durchgeführt. Es wurden die Äquivalente des Phosphoramidit-Reagenzes von 2,0 auf 1,2 Eq. verringert, da der Überschuss häufig nicht vollständig entfernt werden kann und zu einer verringerten Kupplung der Amidite führt.

1,0 g (*R*)-O¹-DMTr-N²-TFA-O³-Serinol **74** (2,04 mmol, 1,0 Eq.) wurden in 10 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und mit 1,78 mL trockenem DIPEA (10,21 mmol, 5,0 Eq.) versetzt. Nach 5 min wurden 0,55 mL 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (2,45 mmol, 1,2 Eq.) zugegeben. Nachdem die Reaktion 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde sie durch die Zugabe von NaHCO₃ beendet. Die Lösung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (*n*-Hexan/Aceton 4:1 → 2:1).

Ausbeute: 1,11 g (78%)

DC (*n*-Hexan/Aceton 2:1): R_f= 0,36 (Verbindung zersetzt sich auf der DC)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz) δ= 7,16-7,43 (m, 9H, H_{ar}), 6,79-6,95 (m, 4H, H_{ar}), 4,15-4,34 (m, 1H, CH), 3,73 (s, 6H, OCH₃), 3,58-3,70 (m, 2H, CH₂), 3,41-3,56 (m, 2H, CH₂), 3,10-3,22 (m, 1H, CH₂), 2,98-3,10 (m, 1H, CH₂), 2,67-2,75 (m, 2H, 2xCHCH₃ TBDMS), 0,98-1,14ppm (m, 12H, 4xCH₃ TBDMS).

³¹P-NMR ([D₆]DMSO, 201 MHz) δ=147,5; 147,3ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur^[88] überein.

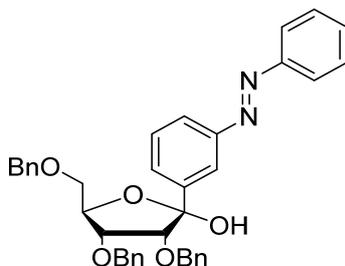
5.3.4 Thiazolorange-Markierung der Serinol-markierten 2'OMe-RNA Stränge

Die Synthese erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Seitz *et al.*^[88] Generelle Anleitung für die Markierung eines Serinol-modifizierten Stranges mit Thiazolorange:

Synthese von TO-NHS: 21,4 mg TO-COOH^[302] (50 μmol , 1.0 Eq.) und 12,5 mg Pyridinium *p*-Toluolsulfonsäure (PPTS) (50 μmol , 1.0 Eq.) wurden in 2,5 mL DMF suspensiert und für 10 min im Ultraschallbad inkubiert bis alles gelöst vorlag. 11,5 mg *N*-Hydroxysuccinimid (100 μmol , 1.0 Eq.) und 7,6 μL DIC (40 μmol , 0,8 Eq.) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 30 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert (800 rpm).

Der Serinol-modifizierte 2'OMe RNA Strang (2 nmol, 1.0 Eq.) wurde in 10 μL einer 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. 10 μL von des TO-NHS-Reaktionsgemisches (200 nmol, 80 Eq.) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur bei 800 rpm inkubiert. Zur Fällung der 2'OMe RNA wurde -20 °C kaltes Isopropanol hinzugefügt und die Mischung über Nacht bei -20 °C stehen gelassen. Die RNA wurde durch Zentrifugation (22000-g) bei 4 °C pelletiert. Die Aufreinigung erfolgte per RP-HPLC (siehe Kapitel 2.2.2).

5.3.5 Synthese von 1'-(*m*-Azobenzol)-1'-hydroxyl-2',3',5'-tris-O-benzyl-D-ribose (121)



121

3-Iodazobenzol **119** wurde nach Literaturvorschrift^[327] dargestellt.

Unter Argonatmosphäre wurden 3,3 g 3-Iodazobenzol **119** (10,7 mmol, 1,0 Eq.) in 300 mL abs. Et₂O gelöst und auf -78 °C gekühlt. Es wurden 7 mL *n*BuLi (1,6 M in *n*-Hexan, 11,2 mmol, 1,05 Eq.) hinzugefügt. Nachdem das Reaktionsgemisch für 3,5 h bei -78 °C gerührt wurde, wurde es auf -30 °C erwärmt und erneut auf -78 °C gekühlt. Die rotbraune Lösung wurde mit einer Überführungskanüle zu einer Lösung aus 3,1 g 2',3',5'-Tri-O-benzyl-D-ribo- γ -lacton **116** (7,5 mmol, 0,7 Eq.) in 100 mL trockenem Et₂O bei -78 °C gegeben. Dabei ist durch die Einstellung von Argon-Überdruck und Vakuum auf einen permanenten Fluss zu achten, da ansonsten die Kanüle verstopfen kann. Die Reaktion wurde für 1,5 h

bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zuhabe von 2mL gesättigter NH_4Cl -Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden. Zur analytischen Zwecke erfolgte die Aufreinigung säulenchromatographisch (SiO_2 , CH/EtOAc 10:1 \rightarrow 5:1).

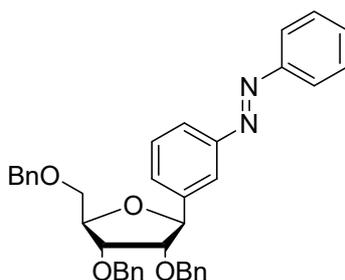
Ausbeute: 3,43 g (76%)

DC (CH/EtOAc 2:1): $R_f = 0.62$

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz) $\delta = 6,74\text{-}8,18$ (m, 24H, H_{ar}), 5,00 (d, $^3J(\text{H,H}) = 4,9$ Hz, 1H (0,2H gemessen), OH-1'), 4,42-4,71 (m, 7H, 3x OCH_2Ph & H-4'), 4,00-4,15 (m, 1H, H-3'), 3,87-3,99 (m, 1H, H-2'), 3,52-3,78ppm (m, 1H, H-5'). Das Spektrum ist mit EtOAc verunreinigt. Diese Signale wurden nicht angegeben. Eine Zuordnung der Signale des *trans* und *cis*-Isomers war nicht möglich.

$^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 126 MHz) $\delta = 152,0; 151,9; 151,7; 151,4; 144,6; 142,9; 138,4; 138,3; 138,2; 138,1; 137,9; 137,8; 131,6; 130,7; 129,6; 129,5; 129,5; 129,0; 128,9; 128,5; 128,3; 128,3; 128,2; 128,2; 128,0; 128,0; 127,9; 127,8; 127,8; 127,8; 127,7; 127,6; 127,6; 127,6; 127,5; 127,5; 127,4; 127,3; 127,3; 122,8; 122,7; 122,6; 122,6; 122,4; 122,3; 121,3; 120,2; 119,8; 106,0; 102,8; 82,9; 82,4; 81,7; 80,8; 80,3; 80,3; 76,8; 72,7; 72,5; 72,5; 72,3; 72,3; 72,3; 71,9; 71,6; 71,5; 70,1; 68,8; 20,8\text{ppm}$.

5.3.6 Synthese von 1'-(*m*-Azobenzol)-2',3',5'-tris-*O*-benzyl-D-ribose (**123**)

**123**

Zu einer Lösung aus 3,21 g **122** (5,3 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ bei -78 °C wurden 1,4 mL Triethylsilan (8,6 mmol, 1,6 Eq.) und 2,0 mL BF₃·OEt₂ (16,0 mmol, 3,0 Eq.) über einen Zeitraum von 20 min zugefügt und für 4 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung beendet. Die Reaktionslösung wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (von Nikolai Grebenovsky) aufgereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 3:1).

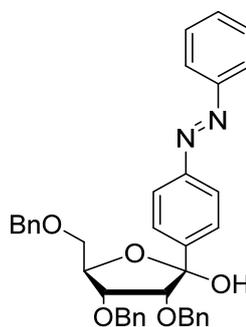
Ausbeute: 96% (mehrere Ansätze wurden vereint)

DC (CH/EtOAc 3:1): R_f= 0,68

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz) δ= 7,94-7,99 (m, 1H, H(Azobenzol)_{ar}), 7,79-7,88 (m, 3H, H(Azobenzol)_{ar}), 7,51-7,63 (m, 5H, H(Azobenzol)_{ar}), 7,21-7,40 (m, 15H, H(3xBenzyl)_{ar}), 5,02 (d, ³J(H,H)=6,7 Hz, 1H, OH-1'), 4,47-4,63 (m, 6H, -OCH₂Ph), 4,28-4,33 (m, 1H, H-4'), 4,11-4,16 (m, 1H, H-3'), 3,95-4,01 (m, 1H, H-2'), 3,63-3,74ppm (m, 2H, H-5').

¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 126 MHz) δ= 151,9; 151,9; 142,3; 138,2; 138,2; 138,0; 131,5; 129,5; 129,3; 129,2; 128,8; 128,3; 128,3; 128,2; 128,2; 128,1; 128,0; 127,8; 127,8; 127,6; 127,6; 127,5; 127,5; 127,4; 127,3; 122,5; 121,9; 120,0; 83,6; 81,5; 81,3; 77,3; 72,5; 71,2; 71,0; 70,3ppm. Die NMR-Spektren wurden von Nikolai Grebenovsky im Rahmen einer von dem Autor dieser Arbeit betreuten Masterarbeit aufgenommen und aufgrund der Vollständigkeit hier aufgeführt.

5.3.7 Synthese von 1'-(*p*-Azobenzol)-1'-hydroxyl-2',3',5'-tris-*O*-benzyl-D-ribose (117)



117

4-Iodazobenzol **114** wurde nach Literaturvorschrift^[326] dargestellt.

Unter Argonatmosphäre wurden 6 g 4-Iodazobenzol **114** (19,5 mmol) in 350 mL trockenem Et₂O gelöst und auf -78 °C gekühlt. 12,8 mL *n*BuLi (1,6 M in *n*-Hexan, 20,5 mmol, 1,05 Eq.) wurden hinzugefügt und die Reaktion bei -78 °C für 4 h gerührt. Die Lösung wurde auf -20 °C erwärmt, für 15 min gerührt und auf -78 °C gekühlt. Die rot-braune Lösung wurde mit einer Überführungskanüle zu einer Lösung aus 5,7 g 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-D-ribo- γ -lacton **116** (13,6 mmol, 0,7 Eq.) in 300 mL trockenem Et₂O bei -78 °C gegeben. Dabei ist durch die Einstellung von Argon-Überdruck und Vakuum auf einen permanenten Fluss zu achten, da ansonsten die Kanüle verstopfen kann. Die Reaktion wurde für 5 h bei -78 °C und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zuhabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Die wässrige Phase wurde mit Et₂O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden. Für analytische Zwecke wurde es per Säulenchromatographie aufgereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 10:1). Das Produkt **117** wurde als oranger Feststoff erhalten. Aufgrund der *cis*- und *trans*-Isomere und den Benzyl-Schutzgruppen war eine Zuordnung aller Signale schwierig, weshalb eine exakte Quantifizierung der Reinheit nicht möglich war.

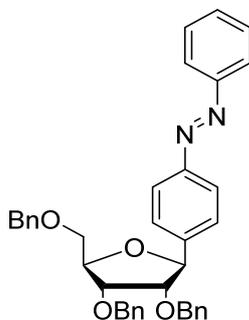
Ausbeute: 6.95 g (60%)

DC (CH/EtOAc 3:1): R_f= 0.55

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz) δ = 7,55-7,94 (m, 9H, H(Azobenzol)_{ar}), 7,30-7,39 (m, 15H, H(3x Benzyl)_{ar}), 5,00 (d, ³J(H,H)=6,7 Hz, 1H, OH-1'), 4,47-4,62 (m, 6H, 3x OCH₂Ph), 4,27-4,31 (m, 1H, H-4'), 4,10-4,12 (m, 1H, H-3'), 3,94-3,97 (m, 1H, H-2'), 3,64-3,73 ppm (m, 1H, H-5'). Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers zugeordnet.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $C_{38}H_{36}N_2O_5 + Na^+$ $[M+Na^+]$. 623,25164; gemessen: 623,25072 ($\Delta m = 0,00092$, Fehler 1,5ppm).

5.3.8 Synthese von 1'-(*p*-Azobenzol)-2',3',5'-tris-*O*-benzyl- β -D-ribofuranose (**118**)



118

Zu einer Lösung aus 6,19 g **117** (10,3 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 bei $-78^\circ C$ wurden 4,9 mL Triethylsilan (30,9 mmol, 3,0 Eq.) und 3,82 mL $BF_3 \cdot OEt_2$ (30,9 mmol, 3,0 Eq.) zugefügt und für 3,5 h bei $-78^\circ C$ gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter wässriger $NaHCO_3$ -Lösung beendet. Die Reaktionslösung wurde mit CH_2Cl_2 verdünnt und organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , $CH/EtOAc$ 20:1 \rightarrow 10:1). Das Produkt **118** wurde als ein 75:25 Gemisch aus *trans* und *cis*-Isomer erhalten.

Ausbeute: 5,69 g (94%)

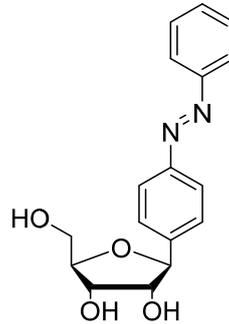
DC ($CH/EtOAc$ 10:1): $R_f = 0,40$

1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 500 MHz) $\delta = 7,88$ - $7,92$ (m, 2H, H(Azobenzol)_{ar}), $7,81$ - $7,85$ (m, 2H, H(Azobenzol)_{ar}), $7,55$ - $7,63$ (m, 5H, H(Azobenzol)_{ar}), $7,23$ - $7,40$ (m, 15H, H(3x Benzyl)_{ar}), 5,00 (d, $^3J(H,H) = 6,6$ Hz, 1H, H-1'), 4,48-4,63 (m, 6H, 3x OCH_2Ph), 4,28-4,31 (m, 1H, H-4'), 4,09-4,13 (m, 1H, H-3'), 3,93-3,98 (m, 1H, H-2'), 3,64-3,73 ppm (m, 2H, H-5'). Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers zugeordnet.

^{13}C -NMR ($[D_6]DMSO$, 126 MHz) $\delta = 151,9$; 151,4; 144,3; 138,3; 138,2; 138,0; 129,5; 128,3; 128,2; 128,2; 127,9; 127,6; 127,5; 122,6; 122,4; 83,5; 81,4; 81,4; 77,3; 72,5; 71,2; 71,0; 70,2 ppm. Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers (mittels HSQC) zugeordnet.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $C_{38}H_{36}N_2O_4 + H^+$ $[M+H^+]$. 585,27478; gemessen: 585,27406 ($\Delta m = 0,00072$, Fehler 1,2ppm).

5.3.9 Synthese von 2'OH-pAzo



2'OH-pAzo

215 mg **118** (368 μmol) wurden unter Argon Atmosphäre in 3 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. 3 mL BBr_3 (1,0 M in CH_2Cl_2 , 3000 μmol , 8,2 Eq.) wurden über einen Zeitraum von 20 min zugegeben und die Reaktion bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gerührt. Zugabe von 10 mL Wasser beendete die Reaktion. Die wässrige Phase wurde mit 3x20 mL CH_2Cl_2 extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , CH/EtOAc 1:4).

Ausbeute: 102 mg (88%)

DC (CH/EtOAc 1:4): $R_f = 0,43$

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 400 MHz) $\delta = 7,85\text{-}7,92$ (m, 4H, H_{ar}), $7,56\text{-}7,65$ (m, 5H, H_{ar}), 5,05 (m, 1H, 4'-OH), 4,93-5,02 (m, 1H, 3'-OH), 4,81-4,88 (m, 1H, 5'-OH), 4,67 (d, $^3J(\text{H},\text{H})=7,2\text{Hz}$, 1H, H-1'), 3,91-3,97 (m, 1H, H-3'), 3,85-3,90 (m, 1H, H-4'), 3,70-3,78 (m, 1H, H-2'), 3,54-3,64ppm (m, 2H, H-5'). Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers zugeordnet.

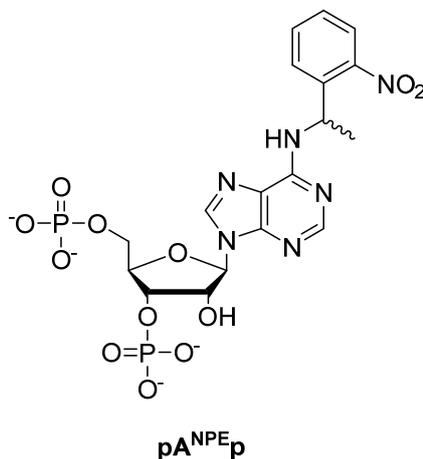
$^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 101 MHz) $\delta = 152,0$; 151,3; 145,3; 131,4; 129,4; 127,0; 122,5; 122,3; 85,4; 82,5; 77,8; 71,5; 62,0ppm. Es wurden nur die Signale des *trans*-Isomers zugeordnet.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}^+]$. 315,13393; gemessen: 315,13381 ($\Delta m = 0,00012$, Fehler 0,4ppm).

5.3.10 Synthese von pA^{NPE}p

Die Synthese von 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert.*-Butyldimethylsilyl)-N⁶-[(*R,S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]adenosin wurde nach Literaturvorschrift^[362] dargestellt, aber anstatt (*S*)-1-(2-Nitrophenyl)ethylamin wurde (*rac*)-1-(2-Nitrophenyl)ethylamin verwendet.

5.3.10.1 Synthese von pA^{NPE}p



100 mg N⁶-(*rac*)-1-(2-Nitrophenyl)ethyladenosin^[362] **135** (0,240 mmol, 1 Eq.) wurden unter Argonatmosphäre auf -12 °C gekühlt und 332 µL Diphosphorylchlorid (2,40 mmol, 10 Eq.) wurden hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei -12 °C für 4 h gerührt. Die Reaktion wurde mit Eis beendet und der pH-Wert durch Zugabe von eiskaltem 1 M TEAB Puffer (pH 8) auf 6,5 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C entfernt und das Produkt per RP-HPLC (MultoKrom 100-5 C18 250x20 mm, *YoungLin* Semi-Päparative HPLC) aufgereinigt. Gradient: 0-1 min 5% MeCN, 1-5 min auf 15% MeCN, 5-30 min auf 40% MeCN in 0,4 M TEAB.

Ausbeute: 30,2 mg (22%)

RP-DC (*i*PrOH/NH₃/H₂O 6:3:1): R_f= 0,16

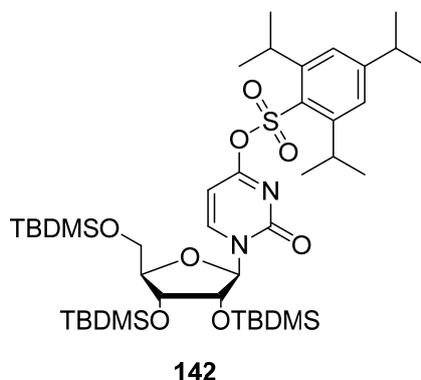
¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz) δ= 8,64 (bs, 1H, CH₃CHNH), 8,50 (bs, 1H, H-8), 8,03 (bs, 1H, H-2), 7,82-7,88 (m, 2H, H_{ar}), 7,61-7,68 (m, 1H, H_{ar}), 7,37-7,46 (m, 1H, H_{ar}), 5,84-5,94 (m, 1H, H-1'), 5,70-5,83 (m, 1H, CH₃CHNH), 4,64-4,75 (m, 1H, H-3'), 4,53-4,62 (m, 1H, H-2'), 4,10-4,18 (m, 1H, H-4'), 3,80-3,97 (m, 2H, H-5'), 1,58-1,70ppm (m, 3H, CH₃CHNH).

³¹P-NMR ([D₆]DMSO, 162 MHz) δ= 1,94, 0,78ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₁₈H₂₂N₆O₁₂P₂ + H⁺ [M+H⁺] 577,08437; gemessen: 577,08330 (Δm= 0,00107, Fehler 1,9ppm).

5.3.11 Synthese von pC^{NPE}p

5.3.11.1 Synthese von 2',3',5'-Tris-O-(*tert.*-butyldimethylsilyl)-O⁴-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)uridin (**142**)



7,9 g 2',3',5'-Tris-O-TBDMS Uridin^[364] **141** (13.5 mmol, 1.0 Eq.) wurden in trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf 0 °C gekühlt. 11,72 mL trockenes DIPEA (67,3 mmol, 5,0 Eq.), 181 mg 4-DMAP (1,5 mmol, 0,1 Eq.) und 5.3 g 2,4,6-Trisopropylbenzolsulfonylchlorid (17,5 mmol, 1,3 Eq.) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 0 °C und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gestoppt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. (Cyclohexan: EtOAc 50:1 → 40:1).

Ausbeute: 8.96 g (78%, mit 10% vom *N*-sulfonylierten Isomer verunreinigt)

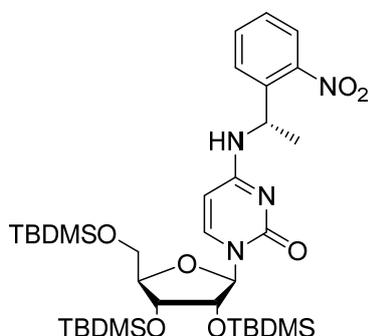
DC (CH₂Cl₂/MeOH 98:2): R_f= 0,72

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz) δ= 7,76 (d, 1H, ³J(H,H)= 8,1Hz, H-5), 5,81 (d, 1H, ³J(H,H)= 5,9 Hz, H-1'), 5,65-5,63 (m, 1H, H-6), 4,61-4,54 (m, 2H, *i*Pr-TIPS), 4,24-4,21 (m, 1H, H-2'), 4,08-4,06 (m, 1H, H-3'), 3,95-3,94 (m, 1H, H-4'), 3,88-3,84 (m, 1H, H-5'), 3,73-3,70 (m, 1H, H-5'), 2,83-2,76 (m, 1H, *i*Pr-TIPS), 1,17-1,09 (m, 18H, *i*Pr-TIPS), 0,91-0,83 (m, 27H, TBDMS), 0,10-(-0,03)ppm (m, 18H, TBDMS).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 101 MHz) δ= 132,8; 160,4; 150,6; 147,4; 146,8; 139,9; 121,4; 101,9; 86,9; 84,8; 74,5; 71,7; 62,3; 33,3; 28,0; 25,8; 25,8; 25,7; 25,5; 24,8; 23,8; 18,1; 18,0; 17,7; 17,6; 17,6; -4,6; -4,8; -4,9ppm. Die Analyse mittels NMR (¹H und ¹³C) wurde von Anja Blümler nach erneuter Aufreinigung durchgeführt.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $C_{42}H_{76}N_2O_8SSi_3 + Na^+$ $[M+H^+]$ 875,45224; gemessen: 875,45131 ($\Delta m = 0,00093$, Fehler 1,1ppm).

5.3.11.2 Synthese von 2',3',5'-Tri-*O*-TBDMS-*N*⁴-[(*S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]cytidin (**143**)



143

712 mg (*S*)-1-(2)-Nitrophenyl)ethylamine Hydrochlorid (von *NetChem Inc.*) (3,52 mmol, 2 Eq.) wurden in 5 mL abs. DMF gelöst. 1,84 mL abs. DIPEA (10,54 mmol, 6.0 Eq.) und 1,5 g 2',3',5'-Tri-*O*-(*tert.*-butyldimethylsilyl)-*O*⁴-(2,4,6-trisopropylbenzolsulfonyl)uridin **142** (1,76 mmol, 1 Eq.) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 5%iger Zitronensäurelösung, ges. NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , CH/EtOAc 2:1) als hellgelber Schaum isoliert.

Ausbeute: 1,18 g (92 %)

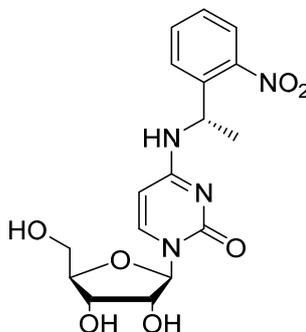
DC (CH/EtOAc 2:1): $R_f = 0,43$

¹H-NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) $\delta = 8,36$ (d, $^3J(H,H) = 7,3$ Hz, 1H, $NHCHCH_3$), 7,89-7,95 (m, 1H, H_{ar}), 7,78 (d, $^3J(H,H) = 7,5$ Hz, 1H, H-5), 7,68-7,74 (m, 1H, H_{ar}), 7,58-7,63 (m, 1H, H_{ar}), 7,45-7,51 (m, 1H, H_{ar}), 5,80 (d, $^3J(H,H) = 7,5$ Hz, H-6), 5,69 (d, $^3J(H,H) = 4,1$ Hz, 1H, H-1'), 5,5 (quin, $^3J(H,H) = 6,9$ Hz, $NHCHCH_3$), 3,98-4,04 (m, 1H, H-2' & H-3'), 3,86-3,92 (m, 2H, H-4' & H-5'), 3,66-3,72 (m, 1H, H-5'), 1,48 (d, $^3J(H,H) = 6,9$ Hz, 3H, $NHCHCH_3$), 0,91 (s, 9H, $3 \times CH_3$ TBDMS), 0,85 (s, 9H, $3 \times CH_3$ TBDMS), 0,74 (s, 9H, $3 \times CH_3$ TBDMS), 0,07-0,12 (m, 6H, $2 \times CH_3$ TBDMS), 0,01-0,06 (m, 6H, $2 \times CH_3$ TBDMS), -0,06 (s, 3H, CH_3 TBDMS), -0,11ppm (s, 3H, CH_3 TBDMS).

¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz) $\delta = 162,3; 154,6; 148,1; 139,9; 139,8; 133,7; 128,0; 127,5; 124,2; 94,3; 88,1; 83,5; 75,2; 70,7; 61,8; 45,0; 25,8; 25,7; 25,6; 21,8; 18,0; 17,7; 17,6; -4,5; -4,9; -5,0; -5,1; -5,5; -5,7$ ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $C_{35}H_{61}N_3O_8Si_3 + Na^+$ 757,38185 ($M+Na^+$); gemessen: 757,38130 ($\Delta m = 0,00055$, Fehler 0,7ppm).

5.3.11.3 N^4 -[(S)-1-(2-Nitrophenyl)ethyl]cytidin (**144**)



144

500 mg 2',3',5'-O-TBDMS- N^4 -[(S)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]cytidin **143** (0,68 mmol, 1,0 Eq.) wurden in 3 mL abs. THF gelöst und 2,38 mL TBAF (1,0 M in THF, 2,38 mmol, 3,5 Eq.) wurden hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 \rightarrow 8:2) aufgereinigt. Das Produkt enthielt geringe Mengen an Tetrabutylamin und THF, die auch nicht durch Trocknen am Hochvakuum für 48 h entfernt werden konnten. Es wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

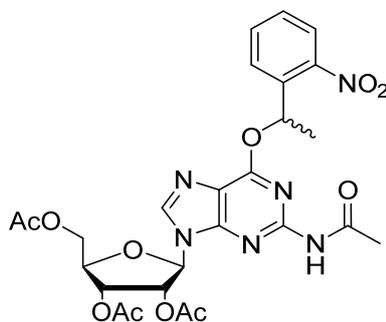
Ausbeute: 238 mg (89%; Verunreinigungen wurden abgezogen)

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1): $R_f = 0,62$

1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 500 MHz) $\delta =$ 8,4 (d, $^3J(H,H) = 7,3$ Hz, 1H, $NHCHCH_3$), 7,9-7,96 (m, 1H, H_{ar}), 7,79-7,84 (m, 1H, H_{ar}), 7,81 (d, $^3J(H,H) = 7,5$ Hz, 1H, H-5), 7,70-7,76 (m, 1H, H_{ar}), 7,62-7,67 (m, 1H, H_{ar}), 7,46-7,52 (m, 1H, H_{ar}), 5,81 (d, $^3J(H,H) = 7,5$ Hz, 1H, H-6), 5,69 (d, $^3J(H,H) = 4,2$ Hz, 1H, H-1'), 5,51 (qn, $^3J(H,H) = 7,0$ Hz, 1H, $NHCHCH_3$), 5,22 (d, $^3J(H,H) = 5,2$ Hz, 1H, C2'-OH), 5,02 (t, $^3J(H,H) = 5,3$ Hz, 1H, C5'-OH), 4,94 (d, $^3J(H,H) = 5,2$ Hz, 1H, C3'-OH), 3,84-3,90 (m, 2H, H-2' & H-3'), 3,76-3,81 (m, 1H, H-4'), 3,60-3,65 (m, 1H, H-5'), 3,48-3,55 (m, 1H, H-5'), 1,49ppm (d, 3H, $NHCHCH_3$). Tributylamin und THF Verunreinigungen wurden nicht zugeordnet.

^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 126 MHz) $\delta =$ 162,3; 154,9; 148,1; 141,0; 139,9; 133,8; 128,1; 127,5; 124,2; 94,3; 89,1; 84,1; 73,9; 69,5; 60,7; 44,9; 21,9ppm.

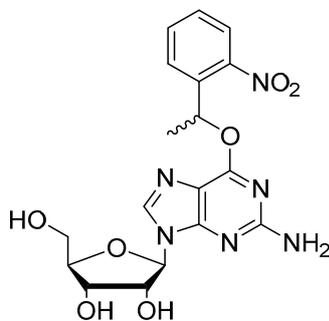
HRMS (MALDI): m/z berechnet für $C_{17}H_{20}N_4O_7 + H^+$ 393,14048 ($M+H^+$); gemessen: 393,14037 ($\Delta m = 0,00011$, error 0,3ppm).

5.3.12 Synthese von pG^{NPEp}5.3.12.1 Synthese von 2',3',5'-Tris-O-Acetyl-*N*⁴-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]guanosin (**147**)**147**

2,2 g 2',3',5'-Tris-O-Acetylguanosin^[400] **146** (4,87 mmol, 1.0 Eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 30 mL abs. THF gelöst und mit 879 mg 1-(2-Nitrophenyl)ethanol (5,26 mmol, 1,06 Eq.) sowie 1,91 g (7,30 mmol, 1,5 Eq.) Triphenylphosphin versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, bevor 3,32 mL DEAD (40% in Toluol, 7,30 mmol, 1,5 Eq.) zugefügt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol gestoppt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mit Toluol koevaporiert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) aufgereinigt. Triphenylphosphin(oxid) koeluiert in der Säulenchromatographie und konnte deswegen nicht vollständig abgetrennt werden. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

Ausbeute: n.d.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): R_f= 0,80

5.3.12.2 Synthese von *N*⁴-[1-(2-Nitrophenyl)ethyl]guanosin (**148**)**148**

500 mg 2',3',5'-Tris-O-Acetyl-*N*⁴-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]guanosin **147** (833 μmol, 1.0 Eq.) wurden in 10 mL Methylamin (33% in EtOH) gelöst und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt.

Alle flüchtigen Bestandteile wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 95:5 →9:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 154 mg (43% über 2 Stufen)

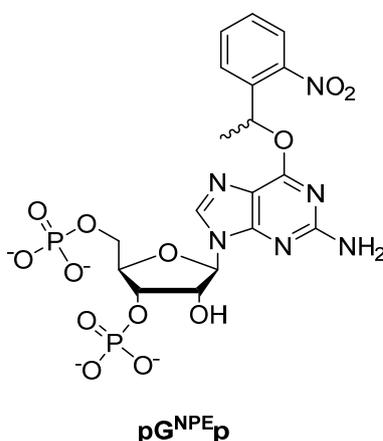
DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1): R_f= 0,48

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz) δ= 8,11 (s, 1H, H-8), 7,98-8,01 (m, 1H, H_{ar}), 7,72-7,82 (m, 2H, H_{ar}), 7,52-7,57 (m, 1H, H_{ar}), 6,69 (q, ³J(H,H)=6,4 Hz), 1H, CHCH₃), 6,14 (s, 2H, -NH₂), 5,74 (d, ⁴J(H,H)=6,05 Hz, 1H, H-1'), 5,35-5,39 (m, 1H, 2'-OH), 5,10 (t, ⁴J(H,H)=4,3 Hz, 1H, 3'-OH), 5,50 (t, ⁴J(H,H)=4,3 Hz, 1H, 5'-OH), 4,41-4,48 (m, 1H, H-2'), 4,06-4,10 (m, 1H, H-3'), 3,69 (q, J=3,68 Hz, 1H, H-4'), 3,48-3,64 (m, 2H, H-5'), 1,74-1,78ppm (m, 3H, CHCH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz) δ= 159,3; 159,1; 159,1; 154,6; 154,6; 148,1; 148,1; 138,4; 138,4; 137,5; 134,0; 128,9; 127,3; 127,3; 124,1; 124,1; 114,0; 139,9; 86,5; 86,5; 85,3; 85,3; 73,4; 73,3; 70,4; 70,4; 68,9; 61,4; 61,4; 25,4; 22,5; 21,8; 21,1ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₁₈H₂₀N₆O₇ + H⁺ 433,14662 (M+H⁺); gemessen: 433,14630 (Δm = 0.00032, Fehler 0.74ppm).

5.3.12.3 Synthese von pG^{NPE}p



Die Synthese wurde in Anlehnung an die Vorschrift ähnlicher Verbindungen von Sekine *et al.*^[293] and Arenz *et al.*^[274] durchgeführt.

Zu einer Lösung aus 82 mg 2'-TOM-O⁶-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]guanosine **152** (138 μmol, 1,0 Eq.; Verbindung wurde von Anja Blümmler hergestellt) und 43 mg 1*H*-Tetrazole (620 μmol, 4,5 eq.) in 1,5 mL abs. MeCN und 0,7 mL abs. CH₂Cl₂ wurden 108 μL Bis(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (413 μmol, 3,0 Eq.) zugefügt. Da nach 1 h fast kein Umsatz per DC (CH/EtOAc 1:3) beobachtet wurde, wurden 0,7 mL 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (0,4 M, 3,17 mmol, 23 Eq.) in abs. MeCN zugefügt und die Reaktion für weitere 2,5

h gerührt bis die Analyse per DC vollständigen Umsatz des Edukts zeigte. 751 μl *tert.*-Butylhydroperoxid (~ 5.5 M in Dekan, 4,1 mmol, 30 Eq.) wurden zugefügt und die Lösung wurde für 1,5 h gerührt. Durch Zugabe von CH_2Cl_2 wurde die Lösung verdünnt und die organische Phase wurde mit NaHCO_3 und H_2O gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 15 mL abs. Pyridin gelöst und 1,26 mL *N,O*-Bis(Trimethylsilyl)acetamid (BSA) (5,26 mmol, 37,5 Eq.), sowie 246 μl DBU (1,65 mmol, 12 Eq.) wurden zugefügt. Die Reaktion wurde 5 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von 30 mL Wasser beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Et_2O gewaschen und am Rotationsverdampfer bei <35 °C mit angeschlossenem Hochvakuum entfernt (Lösung schäumt stark). Der Rückstand wurde zweimal mit 10 mL abs. Pyridin und zweimal mit abs. Toluol koevaporiert. 4,0 mL Triethylamin Trihydrofluorid (24,7 mmol, 180 Eq.) wurden hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde vorsichtig durch Zugabe von 0,4 M TEAB (pH 8) Puffer beendet. Die Aufreinigung per RP-HPLC erfolgte in zwei Stufen. Zuerst wurde an einem *ÄKTA Purifier* Gerät eine grobe Trennung über eine Polymer-basierte Säule (*Source*[®] 15RPC) durchgeführt, da diese kompatibel mit Fluorid ist. Zweitens erfolgte die Aufreinigung per RP-HPLC mit einer C18 Kieselgel basierten HPLC-Säule (100-5 C18, 22x250 mm) von *MultoKrom* an einem Gerät von *YoungLin*. In beiden Fällen waren die Eluenten 0,4 M TEAB (pH 8) und MeCN.

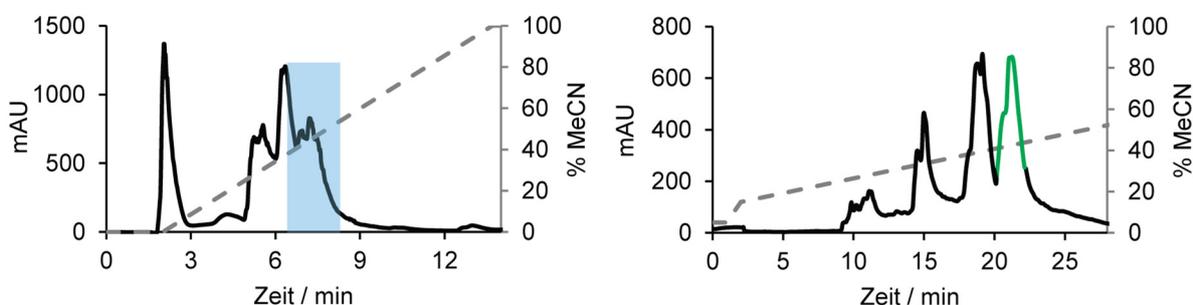


Abb. 218 Präparative RP-HPLC Chromatogramme zur Isolierung von pGNPEp . Das linke Chromatogramm zeigt die „grobe“ Reinigung über eine *Source*[®] 15RP Säule an einem *Äkta Purifier* Gerät. Der blaue Bereich wurde gesammelt und nach Aufkonzentrierung in einem Vakuumkonzentratoren über eine *MultoKrom* 100-5 C18 (22x250 mm) RP-Säule an einem *YoungLin* HPLC-Gerät gereinigt (rechtes Chromatogramm) gereinigt. Der grüne Peak zeigt das korrekte Produkt. Der Gradient der Eluenten MeCN und 0,4 M TEAB (pH 7) ist auf der Sekundärachse gezeichnet.

Ausbeute: 10% (über 4 Stufen; Ausbeute wurde über die Absorption von Guanosin bei 283 nm mit $\epsilon = 11,2 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bestimmt)

¹H-NMR (D_2O , 500 MHz) $\delta =$ 8,25 (s, 1H, H-8), 7,97-8,02 (m, 1H, H_{ar}), 7,83-7,87 (m, 1H, H_{ar}), 7,66-7,71 (m, 1H, H_{ar}), 7,47-7,52 (m, 1H, H_{ar}), 6,68 (q, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})=6,5$ Hz, 1H, $-\text{CHCH}_3$), 5,95-6,00 (m, 1H, H-1'), 4,73-4,90 (H-2', H3', verdeckt von H_2O -Signal), 4,46-4,49 (m, 1H, H-4'), 4,05-4,13 (m, 2H, H-5'), 1,84 ppm (d, $\text{J}(\text{H},\text{H})=6,5$ Hz, 3H, $-\text{CHCH}_3$). Triethylammonium wurde nicht zugeordnet.

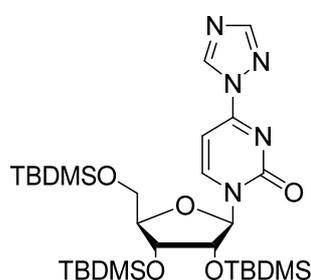
³¹P-NMR (D₂O, 162 MHz) δ= 2,2 (3'-PO₃²⁻); 1,4ppm (5'-PO₃²⁻).

¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz) δ= 159,9; 153,7; 148,0; 139,0; 137,4; 134,3; 128,8; 127,3; 124,1; 114,4; 86,5; 83,4; 73,4; 73,4; 70,4; 64,1ppm. Triethylammonium wurde nicht zugeordnet.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₁₈H₂₂N₆O₁₃P₂ + H⁺ 593,07928 (M+H⁺); gemessen: 593,07816 (Δm = 0,0012, Fehler 1,9ppm).

5.3.1 Synthese von pU^{NPE}p

5.3.1.1 Synthese von 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)-3'-5'-bis-O-(tert.-butyldimethylsilyl)-4-desoxyuridin (**161**)



161

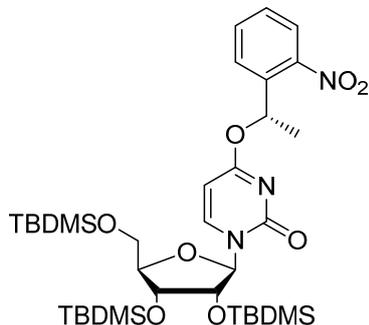
Die Reaktion wurde in Anlehnung an die Literaturvorschrift^[367] durchgeführt.

4,71 g 1,2,4-Triazol (67,1 mmol, 20 Eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 80 mL abs. MeCN suspensiert und auf 0 °C gekühlt. 1,59 mL Phosphorylchlorid (17,0 mmol, 5 Eq.) wurden unter starkem Rühren langsam hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Eine Lösung aus 2 g 2',3',5'-Tris-O-TBDMS Uridin^[364] **141** (3,4 mmol, 1 Eq.) in 20 mL abs. MeCN wurden innerhalb von 30 min zugetropft und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **161** wurde quantitativ erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

DC (CH/EtOAc 4:1): R_f= 0,45

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₂₉H₅₅N₅O₅Si₃ + Na⁺ 660,34032 (M+Na⁺)⁺; gemessen: 660,33987 (Δm = 0,0005, Fehler 0,7ppm).

5.3.1.1 Synthese von 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*O*⁴-[1-(2-nitrophenyl)ethyl]uridin (**162**)

**162**

1,8 g 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)-3'-5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-desoxyuridin **161** (2,28 mmol, 1.0 Eq.) und 485,7 mg (*S*)-NPE-OH (2,91 mmol, 1,03 Eq.) wurden unter Argonatmosphäre in 30 mL abs. MeCN gelöst und mit 0,76 mL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (5,08 mmol, 1,8 Eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ges. NH₄Cl-Lösung gestoppt. Die organische Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ gelöst, auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (SiO₂, CH/EtOAc 40:1→10:1) gereinigt. Das Produkt enthält Rückstände von Cyclohexan (6%), die auch nicht durch Trocknen im Hochvakuum für 24 h entfernt werden konnten.

Ausbeute: 1,463 g

DC (CH/EtOAc 10:1): R_f = 0,21

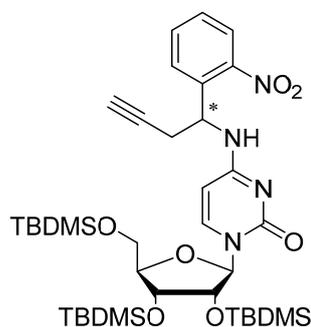
¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz) δ = 8,13 (d, ³J(H,H)=7,4 Hz, 1H, H-5), 7,97-8,01 (m, 1H, H_{ar}), 7,72-7,79 (m, 2H, H_{ar}), 7,53-7,60 (m, 1H, H_{ar}), 6,48 (q, ³J(H,H)=6,4 Hz, 1H, -CHCH₃), 6,06 (d, ³J(H,H)=7,4 Hz, 1H, H-6), 5,72 (d, ³J(H,H)=4,2 Hz, 1H, H-1'), 4,20 (t, ³J(H,H)=4,2 Hz, 1H, H-2'), 4,02 (d, ³J(H,H)=4,4 Hz, 1H, H-3'), 3,90-3,97 (m, 2H, H-4' & H-5'), 3,69-3,74 (m, 1H, H-5'), 1,67 (d, ³J(H,H)=6,4 Hz, 3H, -CHCH₃), 0,72-0,92 (m, 27H, TBDMS), -0,159-0,11ppm (m, 9H, TBDMS).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 126 MHz) δ = 169,5; 154,2; 147,6; 144,0; 136,8; 134,1; 129,0; 127,5; 124,3; 94,7; 88,7; 84,0; 75,0; 69,3; 61,6; 25,8; 25,7; 25,6; 21,5; 18,1; 17,7; 17,5; -4,5; -5,0; -5,0; -5,1; -5,5; -5,6ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₃₅H₆₁N₃O₈Si₃ + Na⁺ 758,36587 (M+Na⁺)⁺; gemessen: 758,36518 (Δm = 0,0007, Fehler 0,9ppm).

5.3.2 Synthese von pC^{NPBY}p

5.3.2.1 Synthese von 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*⁴-(NPBY)cytidin (167)



167

2.0 g **142** (2,34 mmol, 1 Eq.) und 892 mg **NPBY-NH₂** (4,69 mmol, 2 Eq.) wurden in 20 mL abs. DMF unter Argonatmosphäre gelöst und mit 1,22 mL DIPEA (7,03 mmol, 3.0 Eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 6 h bei 90 °C, 16 h bei Raumtemperatur und weitere 5 h bei 90 °C gerührt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und mit ges. NaHCO₃- und ges. NH₄Cl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 4:1 → 2:1). Die Diastereomere von der NPE-Gruppe konnten dabei getrennt werden. Die folgenden Stufen wurden mit dem früher-eluierenden Isomer (Isomer-1) durchgeführt. Eine Bestimmung der Konfiguration wurde nicht durchgeführt.

Ausbeute: **Isomer-1** (früh-eluierend): 278 mg (16%)

Isomer-2 (spät-eluierend): 245 mg (14%)

gemischte Fraktion: 263 mg (15%)

Analytische Daten für Isomer-1:

DC (CH/EtOAc 2:1): R_f = 0,43

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 600 MHz) δ = 8,49 (d, ³J(H,H) = 7,6 Hz, 1H, NH), 7,97-8,00 (m, 1H, H_{ar}), 7,87 (d, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H-5), 7,73-7,77 (m, 1H, H_{ar}), 7,66-7,69 (m, 1H, H_{ar}), 7,53-7,57 (m, 1H, H_{ar}), 5,86 (d, ³J(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H-6), 5,62-5,67 (m, 1H, CHCH₂CCH), 5,61 (d, ³J(H,H) = 3,2 Hz, 1H, H-1'), 4,06-4,10 (m, 1H, H-2'), 4,02-4,05 (m, 1H, H-3'), 3,89-3,95 (m, 2H, H-4' & H-5'), 3,67-3,73 (m, 1H, H-5'), 2,94 (t, ⁴J(H,H) = 2,5 Hz, CHCH₂CCH), 2,67-2,82 (m, 2H, CHCH₂CCH), 0,91 (s, 9H, TBDMS), 0,86 (s, 9H, TBDMS), 0,84 (s, 9H, TBDMS), 0,02-0,11 ppm (m, 18H, TBDMS).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 126 MHz) δ= 162,8; 154,6; 148,3; 140,1; 136,6; 133,7; 128,8; 128,2; 124,4; 94,0; 88,8; 82,9; 80,7; 75,3; 73,4; 70,0; 61,3; 48,5; 25,9; 25,9; 25,7; 24,8; 18,1; 17,8; 17,7; -4,4; -4,5; -5,2; -5,5; -5,7ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₃₇H₆₂N₄O₇Si₃ + Na⁺ 781,38185 (M+Na⁺)⁺; gemessen: 781,38242 (Δm = 0,00057, Fehler 0,7ppm).

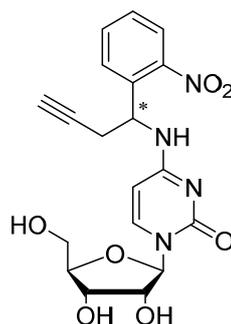
Analytische Daten für Isomer-2:

DC (CH/EtOAc 2:1): R_f= 0,38

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 600 MHz) δ= 8,46 (d, ³J(H,H)= 7,7 Hz, 1H, NH), 7,96-8,00 (m, 1H, H_{ar}), 7,82 (d, ³J(H,H)= 7,5 Hz, 1H, H-5), 7,73-7,78 (m, 1H, H_{ar}), 7,67-7,70 (m, 1H, H_{ar}), 7,52-7,57 (m, 1H, H_{ar}), 5,87 (d, ³J(H,H)= 7,5 Hz, 1H, H-6), 5,63-5,73 (m, 2H, CHCH₂CCH & H-1'), 4,02-4,05 (m, 1H, H-2'), 3,99-4,02 (m, 1H, H-3'), 3,88-3,94 (m, 2H, H-4' & H-5'), 3,66-3,73 (m, 1H, H-5'), 2,93 (t, ⁴J(H,H)= 2,5 Hz, CHCH₂CCH), 2,68-2,82 (m, 2H, CHCH₂CCH), 0,91 (s, 9H, TBDMS), 0,85 (s, 9H, TBDMS), 0,75 (s, 9H, TBDMS), 0,09-0,11ppm (m, 18H, TBDMS).

¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 126 MHz) δ= 126,8; 154,6; 148,4; 140,1; 136,4; 133,6; 128,7; 128,3; 124,4; 94,2; 88,3; 83,4; 80,6; 75,3; 73,4; 70,5; 61,7; 48,4; 25,8; 25,7; 25,6; 18,1; 17,7; 17,6; -4,5; -4,8; -5,0; -5,1; -5,5; -5,7ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₃₇H₆₂N₄O₇Si₃ + Na⁺ 781,38185 (M+Na⁺)⁺; gemessen: 781,38214 (Δm = 0,00029, Fehler 0,4ppm).

5.3.2.2 Synthese von *N*⁴-(NPBY)cytidin (**168**)**168**

228 mg **167** (Isomer-1) (301 μmol , 1 Eq.) wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF gelöst und mit 1,8 mL TBAF (1,0 M, 1,8 mmol, 6.0 Eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Dünnschichtchromatographische Analyse zeigte keinen vollständigen Umsatz, weshalb 0,5 mL TBAF (1,0 M, 0,5 mmol, 1.67 Eq.) zugefügt wurden und die Reaktion weitere 7 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1 \rightarrow 4:1) isoliert. Um das koeluiierende Tetrabutylammonium zu entfernen, wurde der Rückstand in 5 mL Aceton gelöst und mit 40 mL *n*-Hexan bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gefällt und durch Zentrifugation (6500 \times g) abgetrennt. Der Fällungsschritt wurde zweimal wiederholt. Trotzdem konnte Tetrabutylamin nicht vollständig entfernt werden (0,4 Eq.). Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet.

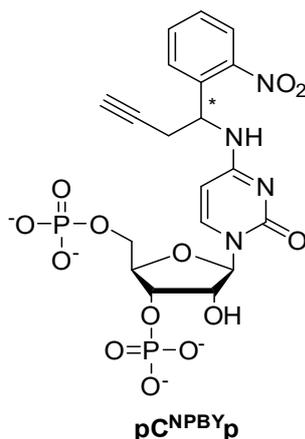
Ausbeute: 117 mg (94%; Tetrabutylamin wurde für die Ausbeutebestimmung abgezogen)

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1): $R_f = 0,38$

¹H-NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz) $\delta =$ 8,48 (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,6$ Hz 1H, $\text{NHCHCH}_2\text{CCH}$), 7,94-8,02 (d, 1H, H_{ar}), 7,86 (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,5$ Hz, 1H, H-5), 7,73-7,79 (m, 1H, H_{ar}), 7,68-7,71 (m, 1H, H_{ar}), 7,52-7,58 (m, 1H, H_{ar}), 5,86 (d, $^3J(\text{H,H}) = 7,5$ Hz, 1H, H-6), 5,62-5,71 (m, 1H, H-1' & $\text{NHCHCH}_2\text{CCH}$), 5,29 (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,1$ Hz, 1H, C3'-OH), 5,02 (t, $^3J(\text{H,H}) = 5,3$ Hz, 1H, C5'-OH), 4,96 (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,2$ Hz, 1H, C2'-OH), 3,88-3,94 (m, 2H, H-2' & H-3'), 3,76-3,82 (m, 1H, H-4'), 3,47-3,66 (m, 2H, H-5'), 2,92-2,95 (t, $^4J(\text{H,H}) = 2,5$ Hz, 1H, $\text{NHCHCH}_2\text{CCH}$), 2,67-2,82 ppm (m, 2H, $\text{NHCHCH}_2\text{CCH}$).

¹³C-NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz) $\delta =$ 162,8; 154,8; 148,3; 141,2; 136,6; 133,7; 128,8; 128,2; 124,4; 94,2; 889,3; 84,1; 80,8; 74,0; 73,4; 69,4; 60,5; 54,9; 48,5; 24,8 ppm.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_7 + \text{H}^+$ 417,14048 ($\text{M} + \text{H}^+$)⁺; gemessen: 417,14024 ($\Delta m = 0,00024$, Fehler 0,6 ppm).

5.3.2.3 Synthese von N^4 -(NPBY)cytidin-3',5'-O-bisphosphat ($pC^{NPBY}p$)

34,4 mg N^4 -(NPBY)cytidin **168** (92 μmol , 1 eq.) wurden über Nacht im Hochvakuum getrocknet und 300 μL Diphosphorylchlorid (2200 μmol , 24 Eq.) wurden bei $-13\text{ }^\circ\text{C}$ hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 4 h gerührt und DC-Analyse ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) zeigte den vollständigen Verbrauch des Startmaterials an. 15 mL eiskalter 1M TEAB Puffer (pH 8) wurde hinzugefügt und der pH-Wert vorsichtig auf 6,5 eingestellt. Alle flüchtigen Bestandteile wurde in einem Vakuumkonzentrator bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ entfernt und das Produkt wurde per RP-HPLC mit den Eluenten 0.4 M TEAB und MeCN isoliert und in einem Vakuumkonzentrator bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ eingengt. Dabei wurden eine Fraktion aus dem 3',5'-Bisphosphat Regioisomer und 5'-Monophosphat, sowie eine Fraktion aus 3',5'-Bisphosphat und 2',5'-Bisphosphat isoliert. Zur Entfernung der Triethylammonium Salze wurden die Fraktionen mit 0,3 M NaOAc (pH 5,5) und $-20\text{ }^\circ\text{C}$ kaltem Ethanol bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gefällt. Die Fällungen sollten Triethylammonium für analytische Zwecke entfernen. Für die enzymatischen Synthesen kann dieser Schritt vernachlässigt werden.

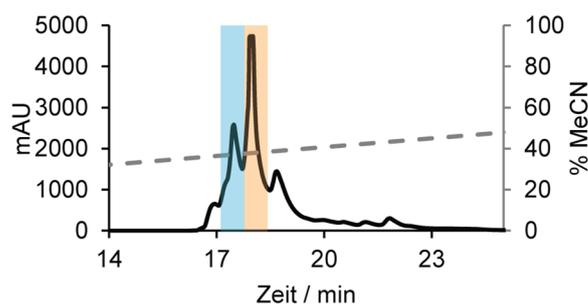


Abb. 219 RP-HPLC Chromatogramm zur Aufreinigung von $pC^{NPBY}p$. Die gesammelten Fraktionen, die analysiert wurden sind blau (Fraktion-1) und orange (Fraktion-2) markiert. Als Eluenten wurden 0,1 M TEAB (pH 8) und MeCN verwendet. Detektion erfolgte bei 260 nm. Gradient (siehe Sekundärachse): 0-1 min auf 5% MeCN, 1-2 min auf 15% MeCN und 2-24 min auf 45% MeCN. *MultoKrom* 100-5 C18, 10x250mm, 10 ml \cdot min $^{-1}$.

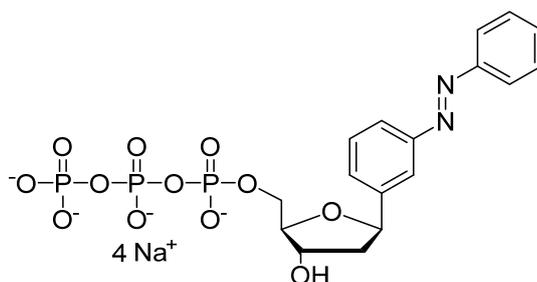
Ausbeute: Fraktion-1: 7,1 mg (14% eines 1:1 Gemisches aus 2',5'-Bisphosphat und 3',5'-Bisphosphat)
Fraktion-2: 8,2 mg (15% einer Mischung aus 3',5'-Bisphosphat Regioisomer mit $\sim 38\%$ von 5'-Monophosphat Isomer)

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz) δ= 8,05-8,08 (m, 1H, H_{ar}), 7,99-8,02 (m, 1H, H-5), 7,69-7,75 (m, 2H, H_{ar}), 7,51-7,57 (m, 1H, H_{ar}), 6,16-6,23 (m, 1H, H-6), 5,94-5,99 (m, 1H, H-1'), 5,79-5,85 (m, 1H, NHCHCH₂CCH), 4,55-4,64 (m, 1H, H-3'), 4,26-4,41 (m, 1H, H-2' & H-4'), 3,93-4,09 (m, 2H, H-5'), 3,01-3,05 (m, 1 H, NHCHCH₂CCH), 2,84-3,00ppm (m, 2H, NHCHCH₂CCH). Die Angaben beziehen sich nur auf das 3',5'-Isomer.

³¹P-NMR (D₂O, 202 MHz) δ= 3,2 (5'-Monophosphat), 2,8 (3'-PO₃²⁻ des 3',5'-Isomers), 2,6 (3'-PO₃²⁻ des 2',5'-Isomers), 2,5 (5'-PO₃²⁻ des 2',5'-Isomers), 2,2ppm (5'-PO₃²⁻ des 3',5'-Isomers). (siehe **Abb. 193** und **Abb. 194** für eine Diskussion der NMR-Spektren)

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₁₉H₂₂N₄O₁₃P₂ + H⁺ 577,07314 (M + H⁺)⁺; gemessen: 577,07244 (Δm= 0,0007, Fehler 1,2ppm).

5.3.3 Synthese von mAzo-TP



mAzo-TP

98 mg **mAzo** (329 μmol) und 106 mg frisch gemörserter Protonenschwamm (493 μmol, 1,5 Eq.) wurden in einem vorgetrockneten Rundkolben über Nacht im Hochvakuum getrocknet und in 3 mL trockenem Trimethylphosphat (über 4Å Molsieb getrocknet für 4 Tage) unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde auf -7,5 °C gekühlt, bevor 32 μL frisch destilliertes POCl₃ (345 μmol, 1,05 Eq.) schnell hinzugefügt wurden. Nach 5 h wurden 12 μL POCl₃ (131 μmol, 0,4 Eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für weitere 60 min gerührt. 343 μL Tributylamin und 4,9 mL einer 0,4M Lösung von Tributylamin Pyrophosphat in trockenem DMF wurden zugegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über 45 min in eine schnell rührende 0,1 M TEAB Puffer-Lösung (pH 8, 18 mL) getropft. Nachdem die Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Lösung in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C eingengt und das Produkt per RP-HPLC (0,02 M TEAB / MeCN) isoliert. Die Fraktionen, die das gewünschte Produkt erhalten, wurden in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C getrocknet. Um überschüssiges Triethylamin zu entfernen und das Gegenion zu Natrium auszutauschen wurde der Rückstand in 2 mL NaOAc (0,3 M, pH 5,5) aufgenommen und mit 10 mL -20 °C kaltem Ethanol

für 16 h bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation bei 7400-g bei 4 °C wurde das Pellet mit -20 °C kaltem Ethanol gewaschen. Die Fällung wurde zweimal wiederholt. Das Produkt wurde für 16 h im Hochvakuum getrocknet

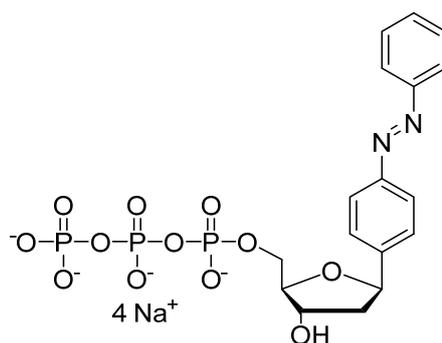
Ausbeute: 53,5 mg (30%)

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ= 7,88–7,95 (m, 3H, H_{ar}), 7,81–7,86 (m, 1H, H_{ar}), 7,70–7,75 (m, 1H, H_{ar}), 7,59–7,68 (m, 4H, H_{ar}), 5,30–5,35 (m, 1H, H-1'), 4,62–4,68 (m, 1H, H-3'), 4,23–4,30 (m, 1H, H-4'), 4,12–4,23 (m, 2H, H-5'), 2,21–2,40 ppm (m, 2H, H-2').

³¹P NMR (203 MHz, D₂O): δ= -22,4 (t, β-PO₃²⁻), -10,6–(-)11,2 (m, α-PO₃²⁻, γ-PO₃²⁻). Aufgrund der *cis*- und *trans*-Isomere und der verschiedenen Gegenionen (Et₃NH⁺, Na⁺) sind mehrere Signale im ³¹P-NMR sichtbar.

HRMS (MALDI): m/z berechnet für C₁₇H₂₁N₂O₁₂P₃ + H⁺ 539,03801 (M+H⁺); gemessen: 539,03621 (Δm = 0,0018, Fehler 3,3ppm).

5.3.4 Synthese von pAzo-TP



pAzo-TP

69 mg **pAzo** (231 μmol) und 74 mg frisch gemörserter Protonenschwamm (347 μmol, 1,5 Eq) wurden in einem vorgetrockneten Rundkolben über Nacht im Hochvakuum getrocknet und in 2,2 mL trockenem Trimethylphosphat (über 4Å Molsieb getrocknet für 4 Tage) unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde auf -7,5 °C gekühlt, bevor 23 μL frisch destilliertes POCl₃ (243 μmol, 1,05 Eq.) schnell hinzugefügt wurden. Nach 5 h wurden 9 μL POCl₃ (93 μmol, 0,4 Eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde für weitere 60 min gerührt. 241 μL Tributylamin und 3,5 mL einer 0,4 M Lösung von Tributylamin Pyrophosphat in trockenem DMF wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend langsam in eine schnell rührende Lösung 0,1 M TEAB Puffer (pH 8) getropft. Nachdem die Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Lösung lyophilisiert und das Produkt per RP-HPLC isoliert. Die Fraktionen, die das gewünschte Produkt enthielten, wurden in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 mL 0,3 M NaOAc (pH 5,5) aufgenommen und mit 10 mL -20 °C

kaltem EtOH gefällt. Nach 16 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Gemisch bei $6500\cdot\text{g}$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Fällungsschritt wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Ethanol gewaschen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Vakuumkonzentrator für 10 min und für 24 h im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 16 mg (13%)

HRMS (MALDI): m/z berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_3 + \text{H}^+$ 539,03801 ($\text{M}+\text{H}^+$); gemessen: 539,03658 ($\Delta m = 0,00143$, Fehler 2,7ppm).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 7,86\text{--}7,91$ (m, 4 H, H_{ar}), $7,67\text{--}7,72$ (m, 2 H, H_{ar}), $7,58\text{--}7,66$ (m, 3H, H_{ar}), $5,28\text{--}5,33$ (m, 1 H, $\text{H-1}'$), $4,61\text{--}4,66$ (m, 1H, $\text{H-3}'$), $4,23\text{--}4,29$ (m, 1 H, $\text{H-4}'$), $4,13\text{--}4,22$ (m, 2H, $\text{H-5}'$), $2,32\text{--}2,38$ (m, 1H, $\text{H-2}'\text{a}$), $2,22\text{--}2,28\text{ppm}$ (m, 1 H, $\text{H-2}'\text{b}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 151,2$; $151,9$; $144,3$; $131,7$ (C_{ar}); $129,5$ (C_{ar}); $127,6$ (C_{ar}); $122,7$ (C_{ar}); $122,3$ (C_{ar}); $86,0$ ($\text{C-4}'$); $80,4$ ($\text{C-1}'$); $73,0$ ($\text{C-3}'$); $66,1$ ($\text{C-5}'$); $42,1\text{ppm}$ ($\text{C-2}'$).

$^{31}\text{P NMR}$ (203 MHz, D_2O): $\delta = -22,4$ (t, 1P, $\beta\text{-PO}_3^{2-}$), $-11,0$ (d, 1P, $\alpha\text{-PO}_3^{2-}$), $-10,7\text{ppm}$ (d, 1P, $\gamma\text{-PO}_3^{2-}$).

6 Anhang

Tabelle 17 Massenspektrometrische Analyse von **pAzo** und **mAzo** in RNA.
Die Massenspektren wurden an einem micrOTOF-Q von Bruker aufgenommen

Bezeichnungen	berechnet	gemessen
RNA1(pAzo)	4899	4899
RNA2(pAzo)	4664	4664
RNA1(mAzo)	4900	4899
RNA2(mAzo)	4664	4664

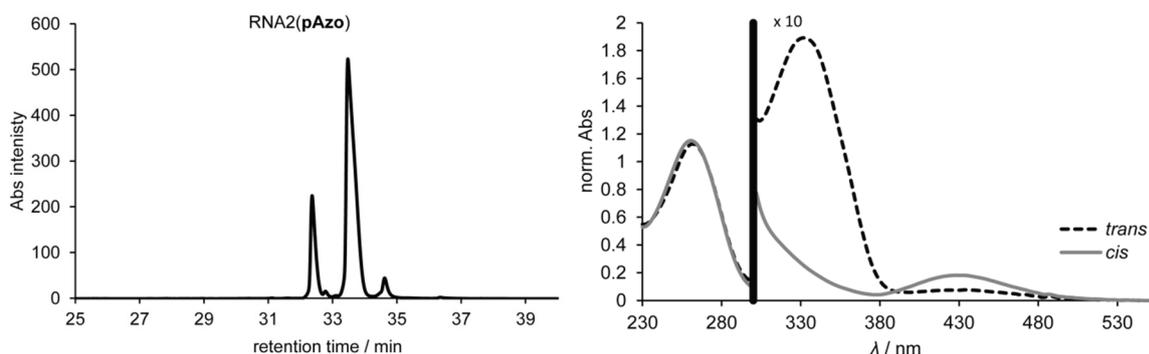


Abb. 220 AE-HPLC Chromatogramm von **RNA2(pAzo)** für die Auftrennung der Photoisomere vom Azobenzol. Die Absorption der Reinspektren wurde während der HPLC aufgenommen (DAD). Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt auf 1 normiert $R_f(\text{trans})=33,5$ min; $R_f(\text{cis})=32,4$ min. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linear Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Säule: DNAPac™ PA100 von Dionex; 4,6x250 mm.

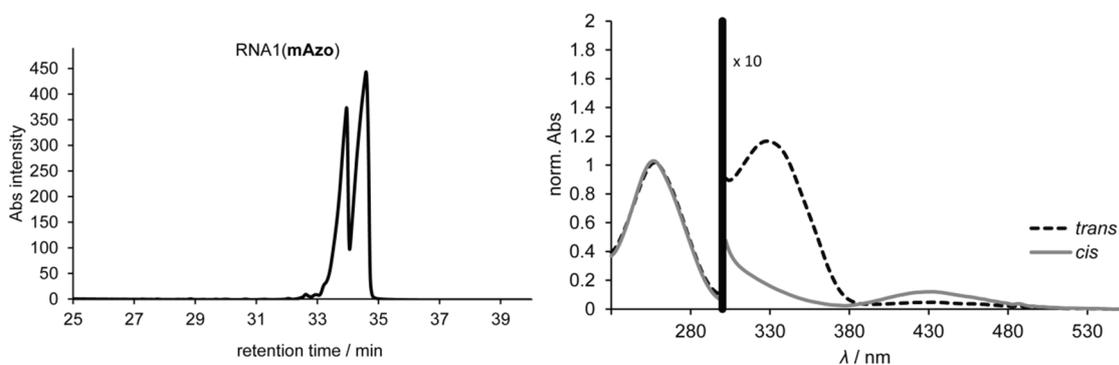


Abb. 221 AE-HPLC Chromatogramm von **RNA1(mAzo)** für die Auftrennung der Photoisomere vom Azobenzol. Die Absorption der Reinspektren wurde während der HPLC aufgenommen (DAD). Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt auf 1 normiert $R_f(\text{trans})=34,6$ min; $R_f(\text{cis})=33,6$ min. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linear Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Säule: DNAPac™ PA100 von Dionex; 4,6x250 mm.

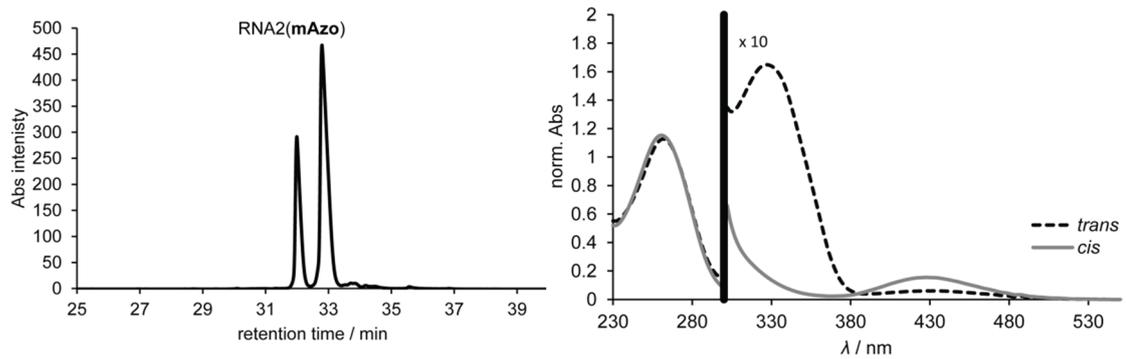


Abb. 222 AE-HPLC Chromatogramm von **RNA2(mAzo)** für die Auftrennung der Photoisomere vom Azobenzol. Die Absorption der Reinspektren wurde während der HPLC aufgenommen (DAD). Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt auf 1 normiert $R_f(\text{trans})=32,8$ min; $R_f(\text{cis})=32,0$ min. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linear Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Säule: DNAPac™ PA100 von Dionex; 4,6x250 mm.

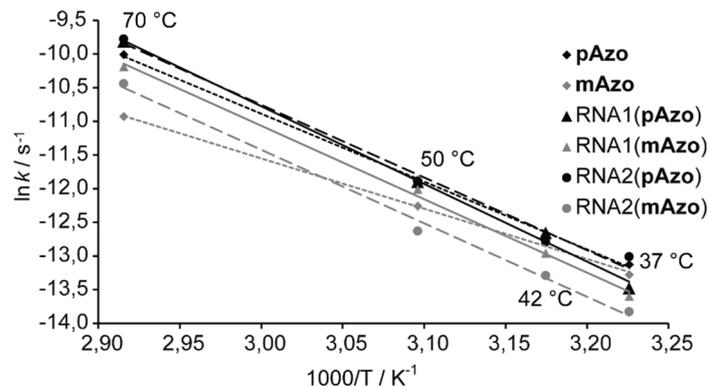


Abb. 223 Arrhenius Diagramm der thermischen *cis*-zu-*trans* Relaxation von **pAzo** und **mAzo** in **RNA1**, **RNA2** und als reine Monomere bei 37 °C, 42 °C, 50 °C und 70 °C. Konzentration von **pAzo** und **mAzo** war 30 µM und von **RNA1(Azo)**, **RNA2(Azo)** 5 µM in PBS Puffer (pH 7.4). Die Messungen wurden teilweise von Dr. Sabrina Steinwand durchgeführt.

Tabelle 18 Thermische Relaxationsraten und Aktivierungsenergien von **pAzo** und **mAzo** in **RNA1** und **RNA2**. Konzentration von **pAzo** und **mAzo** war 30 µM und von **RNA1(Azo)**, **RNA2(Azo)** 5 µM in PBS Puffer (pH 7.4). Die Messungen wurden teilweise von Sabrina Steinwand durchgeführt.

	37 °C		42 °C		50 °C		70 °C		E _A [kJ/mol]	ΔE _A [kJ/mol]
	k [s ⁻¹]	Δk [s ⁻¹]	k [s ⁻¹]	Δk [s ⁻¹]	k [s ⁻¹]	Δk [s ⁻¹]	k [s ⁻¹]	Δk [s ⁻¹]		
pAzo	1,986·10 ⁻⁶	1,1·10 ⁻⁸	---	---	6,73·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁸	4,482·10 ⁻⁵	1,7·10 ⁻⁷	84	4
mAzo	1,703·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁸	2,722·10 ⁻⁶	1,4·10 ⁻⁸	4,742·10 ⁻⁶	6·10 ⁻⁹	1,7942·10 ⁻⁵	1,3·10 ⁻⁸	62,3	1,7
RNA1(pAzo)	1,40·10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁸	3,163·10 ⁻⁶	6·10 ⁻⁹	6,823·10 ⁻⁶	1,5·10 ⁻⁸	5,46·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁷	96	5
RNA1(mAzo)	1,24·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁸	2,353·10 ⁻⁶	7·10 ⁻⁹	6,06·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁸	3,745·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁸	91	4
RNA2(pAzo)	2,24·10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁸	2,794·10 ⁻⁶	7·10 ⁻⁹	6,869·10 ⁻⁶	1,5·10 ⁻⁸	5,676·10 ⁻⁵	1,3·10 ⁻⁷	90	7
RNA2(mAzo)	9,81·10 ⁻⁷	1,4·10 ⁻⁸	1,69·10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁸	3,253·10 ⁻⁶	1,2·10 ⁻⁸	2,923·10 ⁻⁵	6·10 ⁻⁸	91	5

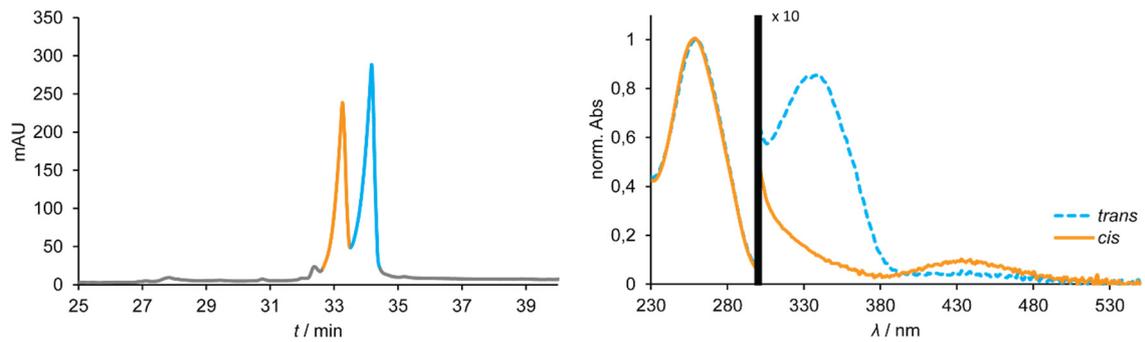


Abb. 224 AE-HPLC Chromatogramme (links) für die Trennung der *cis*- und *trans*-Photoisomere von **pAzo** im RNA Duplex **RNA1/RNA2(pAzo)** ($R_f(\text{trans})=34,2$ min; $R_f(\text{cis})=33,3$ min). Die Trennung und Aufnahme der UV/vis Absorptionsspektren der reinen Isomere (rechts) erfolgte in der AE-HPLC mit LiCl. Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt bei 270 nm auf 1 normiert. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linearer Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Es wurden 2 nmol des Duplexes injiziert.

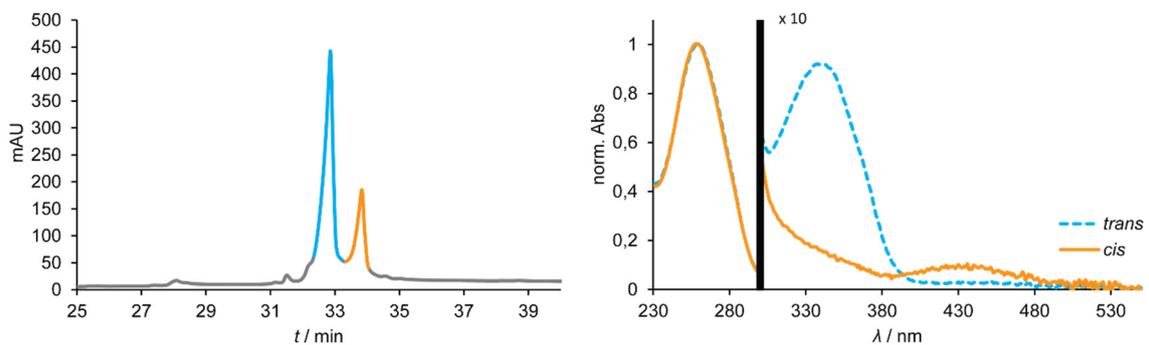


Abb. 225 AE-HPLC Chromatogramme (links) für die Trennung der *cis*- und *trans*-Photoisomere von **tAzo** im RNA Duplex **RNA1/RNA2(tAzo)** ($R_f(\text{trans})=32,9$ min; $R_f(\text{cis})=33,9$ min). Die Trennung und Aufnahme der UV/vis Absorptionsspektren der reinen Isomere (rechts) erfolgte in der AE-HPLC mit LiCl. Die Absorption wurde am isosbestischen Punkt bei 270 nm auf 1 normiert. Gradient: 0-2 min 100% MilliQ-H₂O; 2-42 min linearer Anstieg auf 53,7% 1M LiCl in MilliQ-H₂O. Es wurden 2 nmol des Duplexes injiziert.

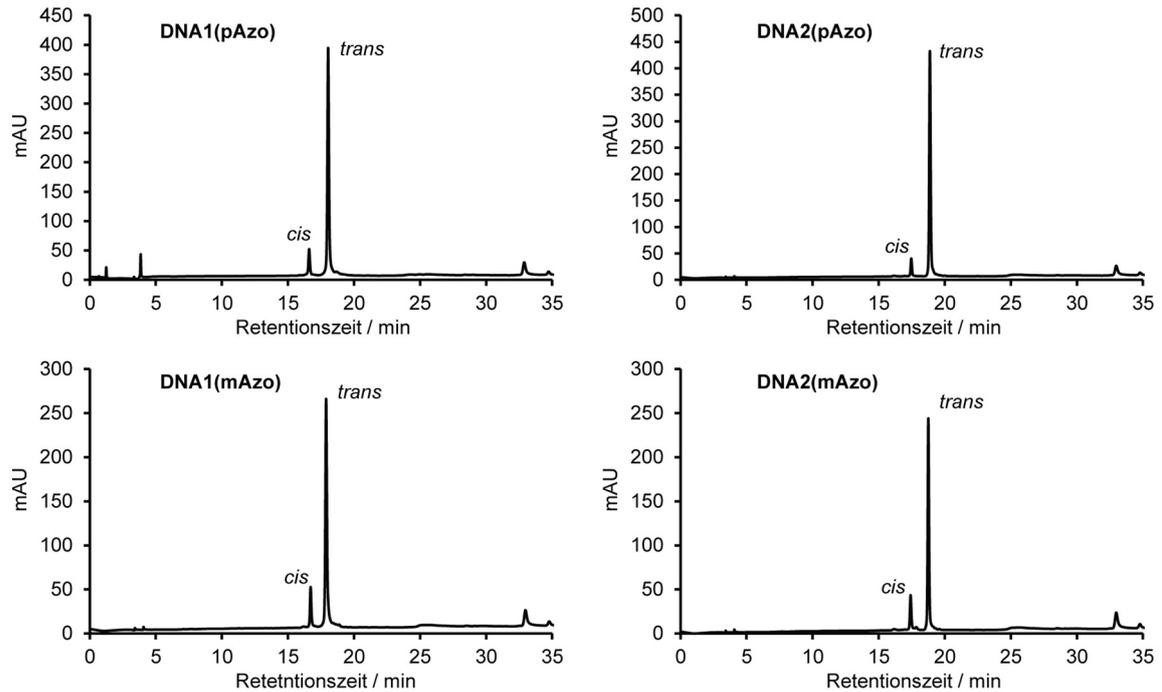


Abb. 226 Analytische RP-HPLC Spektren von **DNA1(pAzo)** (oben, links), **DNA2(pAzo)** (oben, rechts), **DNA1(mAzo)** (unten, links) und **DNA2(mAzo)** (unten rechts). Die Oligonukleotide wurden über eine 250 x 4,6 mm *Nucleosil* 100-5 C18 Säule mit einem linearen Gradienten von 5-35% MeCN in 0,1 M TEAA in 35 min analysiert.

Tabelle 19 Massenspektrometrische Analyse von **pAzo** und **mAzo** in DNA.
Die Massenspektren wurden an einem micrOTOF-Q von Bruker aufgenommen

Bezeichnungen	berechnet	gemessen
DNA1(pAzo)	4703	4703
DNA2(pAzo)	4538	4538
DNA1(mAzo)	4703	4703
DNA2(mAzo)	4538	4538

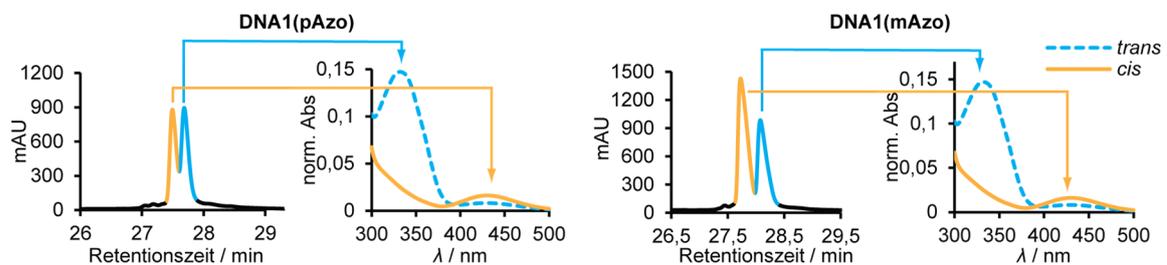


Abb. 227 AE-HPLC Chromatogramm (bei 260 nm) von **DNA1(pAzo)** (links) und **DNA1(mAzo)** (rechts) mit den dazugehörigen und in der HPLC aufgenommenen UV/vis Absorptionsspektren der reinen isomeren Formen vom Azobenzol C-Nukleosid. Die Absorptionsspektren wurden am experimentell bestimmten isosbestischen Punkt ($\lambda = 248$ nm) auf eins normiert. Die Hälfte des injizierten Materials wurde zuvor mit UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) für 5 min bestrahlt. Gradient: Linearer Anstieg von 0-80% 1M LiCl in H₂O in 53 min.

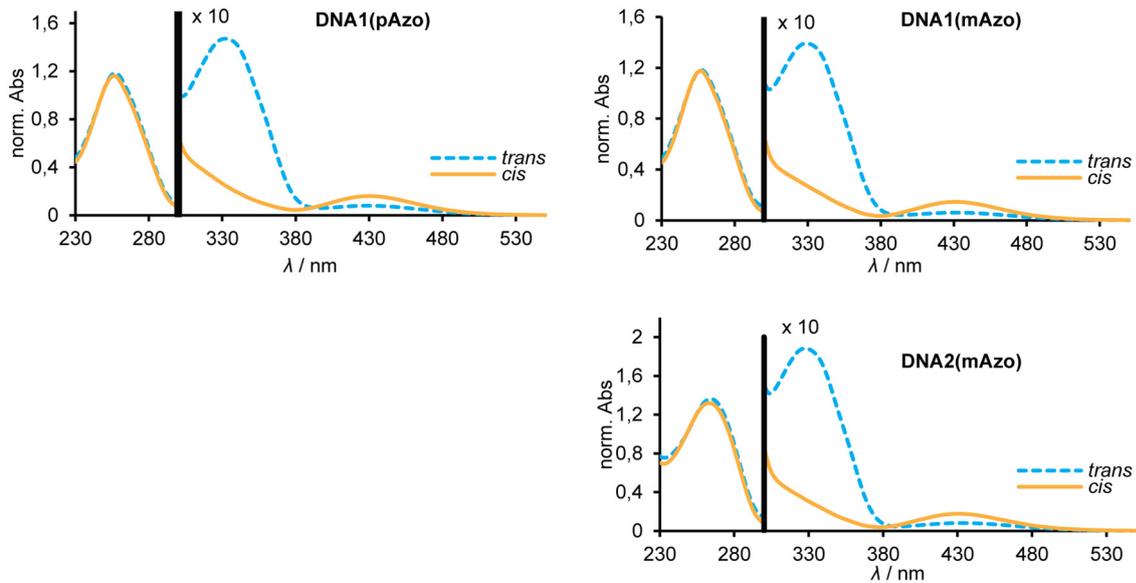


Abb. 228 UV/vis Absorptionsspektren von **DNA1(pAzo)** (oben, links), **DNA1(mAzo)** (oben, rechts) und **DNA2(mAzo)** (unten, rechts), der in der AE-HPLC (siehe **Abb. 227**) aufgenommen Reinspektren der Azobenzol Photoisomere.

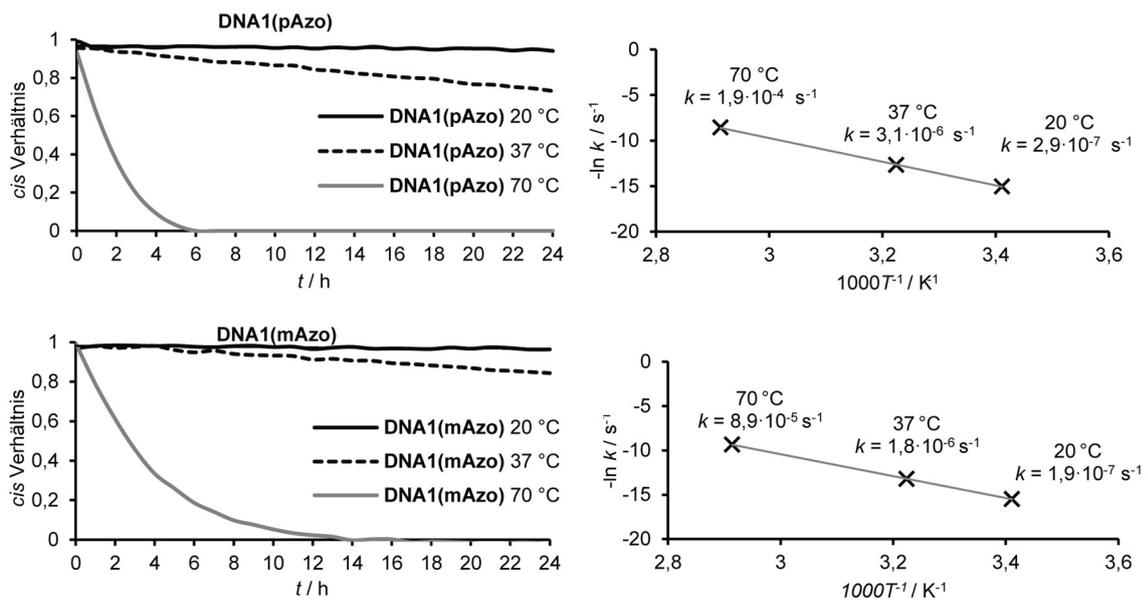


Abb. 229 Thermische *cis*-zu-*trans* Relaxation von **DNA1(pAzo)** (oben) **DNA1(mAzo)** (unten) bei 20 °C, 37 °C und 70 °C (links) und das Arrhenius Diagramm (rechts). Die Messungen erfolgten in PBS Puffer (pH 7,4) und die Konzentration betrug 7 μM .

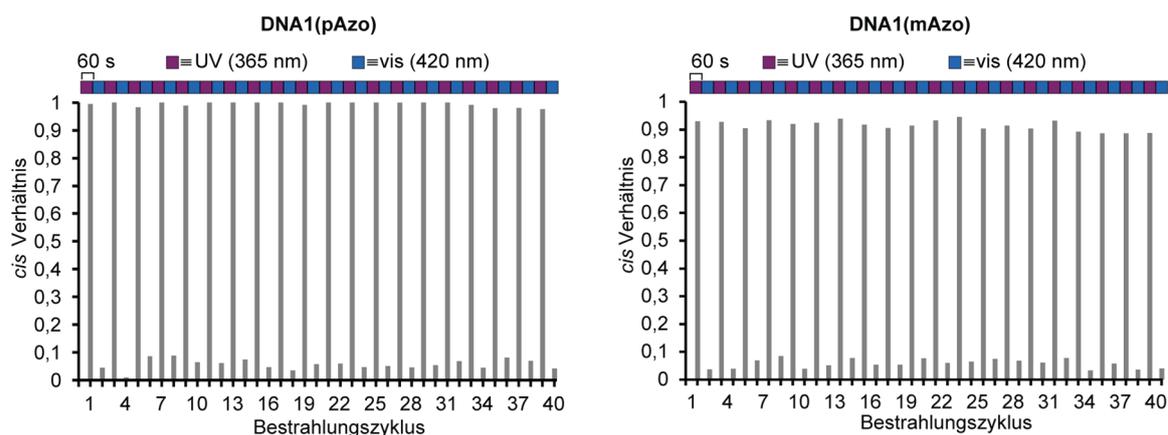


Abb. 230 Ermüdungsresistenzstudien von **DNA1(pAzo)** und **DNA1(mAzo)**. Die DNA Stränge (7 μ M) wurden abwechselnd mit UV-Licht (365 nm, 300 mW, 60s) oder sichtbarem Licht (420 nm, 300 mW, 60s) bestrahlt. Das *cis*-Verhältnis wurde anhand **Formel 1** mit den normalisierten UV/*vis* Absorptionsspektren berechnet. Das entsprechende Spektrum von **DNA1(mAzo)** befindet sich in **Abb. 136**).

Tabelle 20 Sequenzen und massenspektrometrische Analyse der synthetisierten Oligonukleotide vor und nach Markierung mit TO. Siehe **Abb. 54** für die Strukturen der Modifikationen L, X, Y, F und Z. Die mit *-markierten Massen wurde mittels MALDI gemessen, die anderen über ESI-MS.

Sequenzen	Bezeichnungen	berechnet	gemessen
3'- LUU GUX AGU UGC GAC AGC CAC UCA F-5'	d-Ser1	8108	8124*
3'- LUU GUA AGU XGC GAC AGC CAC UCA F-5'	d-Ser2	8131	8162*
3'- LUU GUA AGU UXC GAC AGC CAC UCA-5'	d-Ser3	7559	7553*
3'- LUU XGU AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ -5'	w-Ser1	8248	8247
3'- LUU GXU AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ -5'	w-Ser2	8248	8243
3'- LUU XGU AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ -5'	w-Ser2-TO	8579	8579
3'- LUU GUX AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ -5'	w-Ser3	8428	8427
3'- LUU GUX AAG UUG CGA CAG CCA CUC AZ -5'	w-Ser3-TO	8579	~8600

Tabelle 21 Massenspektrometrische Analyse der synthetisierten MBs.

Bezeichnungen	berechnet	gemessen
MB1	11000	11003
MB1-Atto488	11570	11574
MB2	12342	12344
MB2-Atto488	12912	12914
c^{7a}MB1	12353	12358
c^{7a}MB1 (-NPE)	12204	12206
c^{7b}MB1	12353	12355
c⁸MB1	12502	12508
c⁸MB1.2	13259	13260

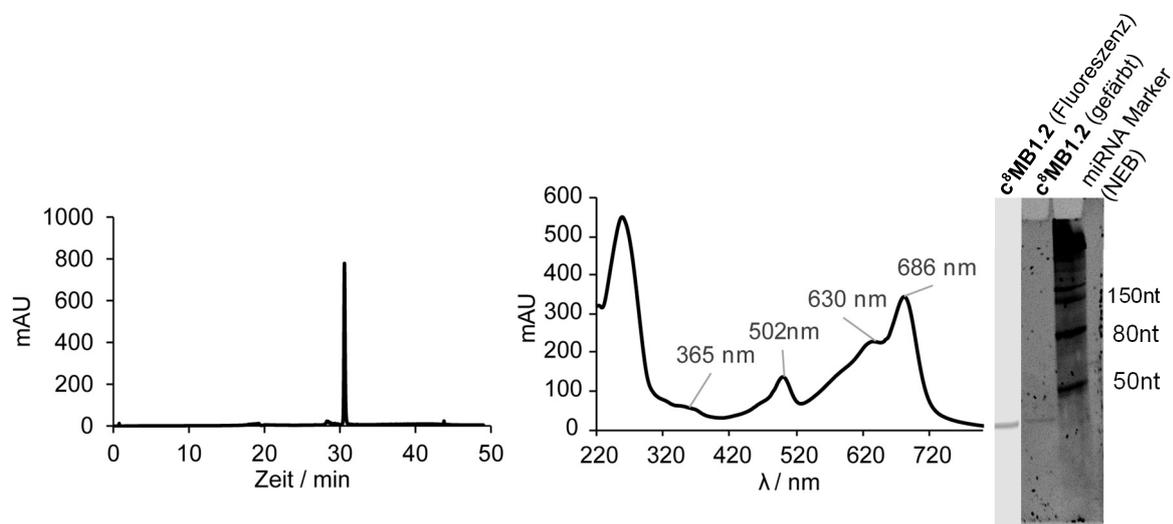


Abb. 231 Analytisches RP-HPLC Chromatogramm (links) und das in der HPLC gemessene UV/vis Absorptionsspektrum (Mitte), sowie ein PAA-Gel (20%, TBE, 220V, 20 min, rechts) von **c⁸MB1.2** zur Verifizierung der Reinheit. Die Fluoreszenz von **c⁸MB1.2** wurde von dem Tracking-Fluorophor (Fluorescein) gemessen.

Tabelle 22 Massenspektrometrische Analyse der synthetisierten LHS		
Bezeichnungen	berechnet	gemessen
LHS-4	15479	15485
LHS-6	15329	15355
LHS-6 (zykl. Fr.3)	15517	15528
LHS-7	15329	15344
LHS-7 (zykl. Fr.1)	15517	15566
LHS-8	21309	21314
LHS-9	23337	23346
LHS-10	21567	21579
Anti-miR-181	8297	8298
Kontrolle-1 (Blockierstrang)	4022	4021
Kontrolle-2 (Blockierstrang, rechts)	3929	3929
Kontrolle-3 (Blockierstrang, Mitte)	1941	1942
Kontrolle-3 (Blockierstrang, rechts)	1606	1607
Kontrolle-4 (Blockierstrang)	8210	8210
Kontrolle-5 (Blockierstrang)	8104	8104
LHS-11	18244	18240
LHS-12	21116	21119

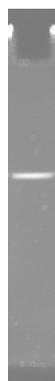


Abb. 232 20% Denat. PA-Gel (TBE, 220 V, ~30 min) zur Analyse der Reinheit von **LHS-4**.

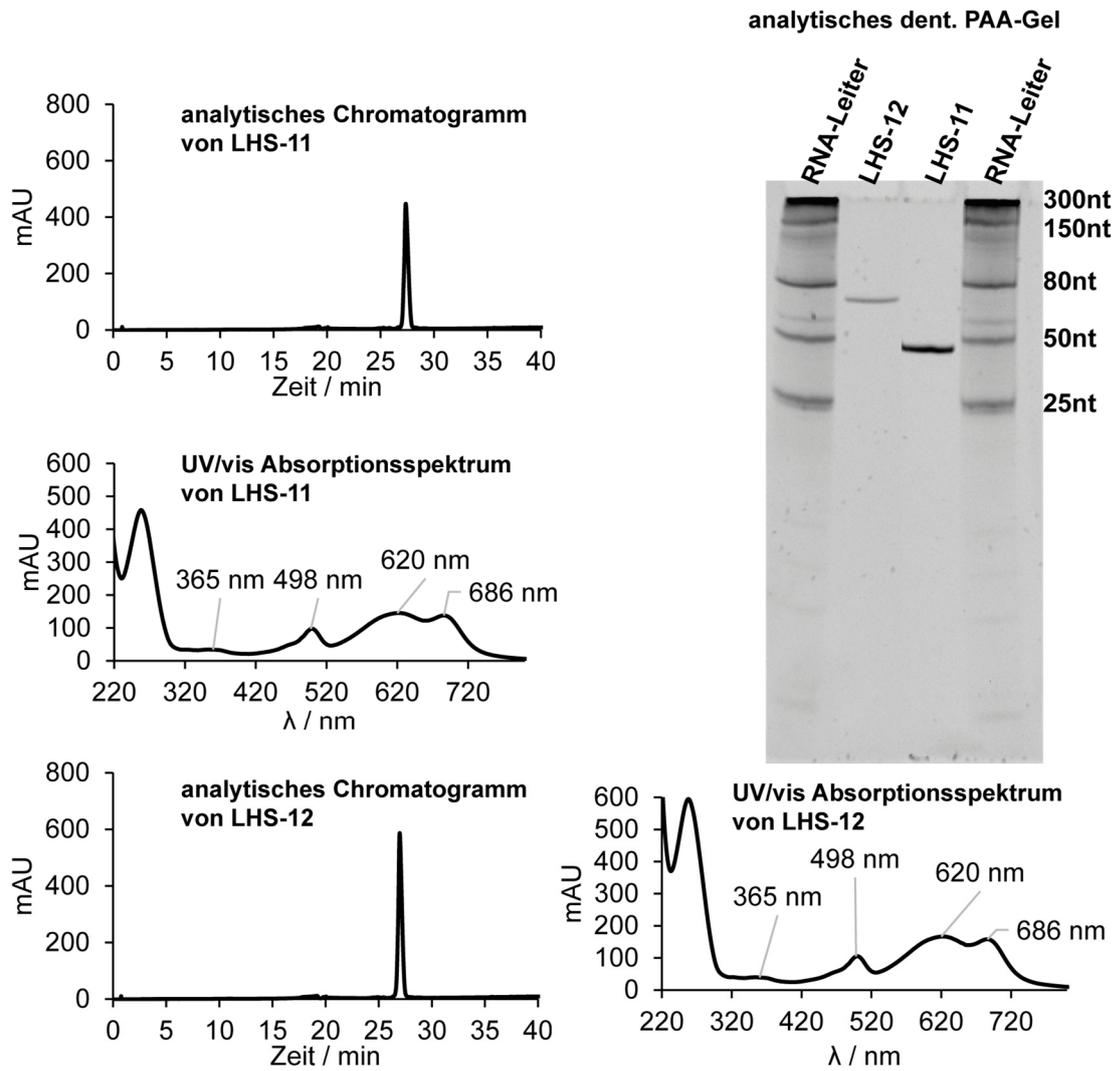


Abb. 233 Analytische RP-HPLC Chromatogramme von **LHS-11** und **LHS-12**, sowie UV/vis Absorptionsspektren die während der HPLC aufgenommen wurden, also auch ein Gelfoto eines 20%igen denat. PAA Gel (TBE, 220 V, 5 W).

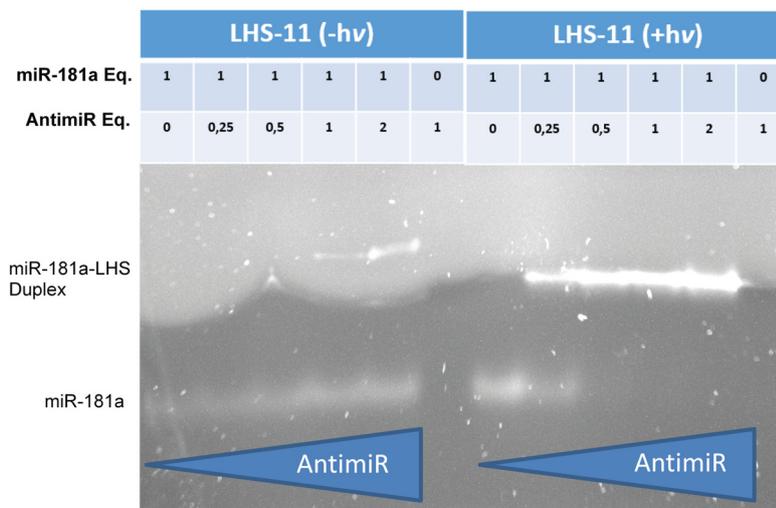


Abb. 234 15%iges natives Polyacrylamid Gel (TA, 2 W, RT) zur Untersuchung der Hybridisierung von **LHS-11** mit miR-181 vor (links) und nach (rechts) UV-Bestrahlung (365 nm)

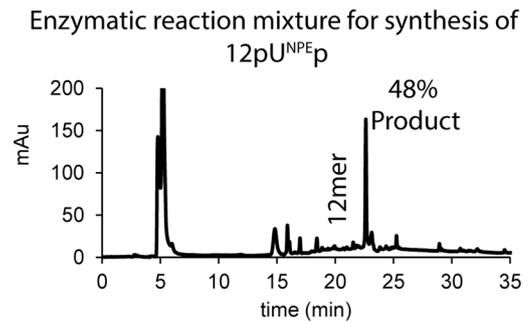
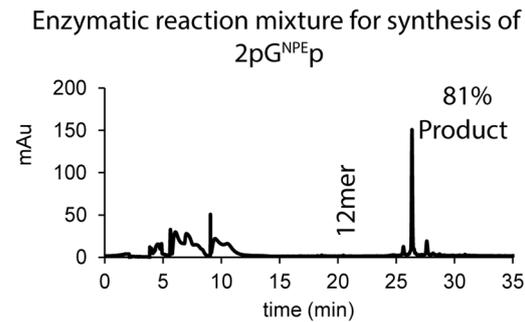
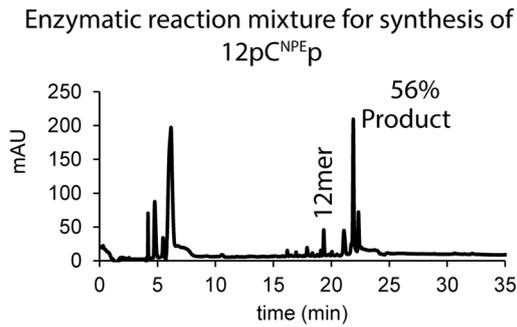


Abb. 235 3'-Extension der entsprechenden Nucleosid Bisphosphaten. Die Ausbeuten wurden durch Integration der Peaks von Edukt (**12mer**) und Produkt (**12mer-p^{NPE}p**) bestimmt. Die Abbildung wurde von Sara Keyhani erstellt.

Tabelle 23 Sequenz und massenspektrometrische Analyse von **13mer-p^{NPBY}p**

Sequenzen	Bezeichnungen	berechnet	gemessen
5'-GGA UAG UGA UCC-p ^{NPBY} p-3'	13mer-p^C^{NPBY}p	4392	4393

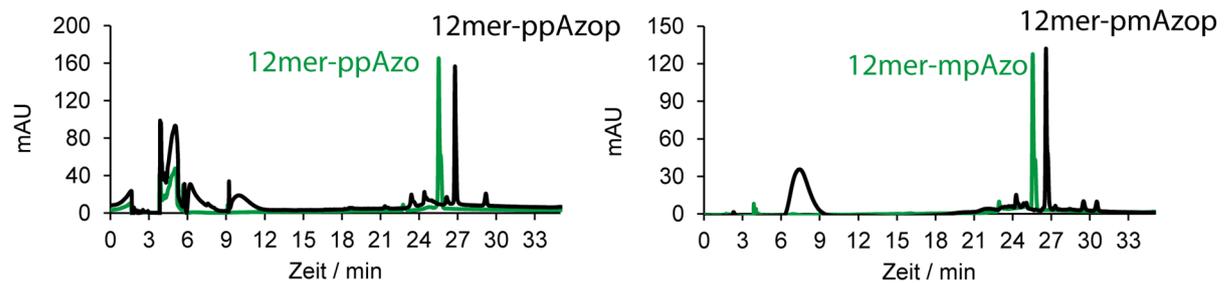


Abb. 236 RP-HPLC Chromatogramme zum Einbau und Dephosphorylierung der Azobenzol C-Nucleosid Bisphosphate **ppAzop** (links) und **pmAzop** (rechts).

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] F. A. C. Azevedo, L. R. B. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. L. Ferretti, R. E. P. Leite, W. J. Filho, R. Lent, S. Herculano-Houzel, *J. Comp. Neurol.* **2009**, *513*, 532–541.
- [2] S. B. Laughlin, T. J. Sejnowski, *Science* **2003**, *301*, 1870–1874.
- [3] R. E. Brown, P. M. Milner, *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 1013–1019.
- [4] R. G. M. Morris, *Brain Res. Bull.* **1999**, *50*, 437.
- [5] T. V. P. Bliss, T. Lømo, *J. Physiol.* **1973**, *232*, 331–356.
- [6] T. Lomo, *Acta Physiol Scand* **1966**, *68*, 28.
- [7] W. C. Abraham, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2003**, *358*, 735–744.
- [8] B. E. Herring, R. A. Nicoll, *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 351–365.
- [9] J. Z. Tsien, P. T. Huerta, S. Tonegawa, *Cell* **1996**, *87*, 1327–1338.
- [10] L. R. Squire, *Neuron* **2009**, *61*, 6–9.
- [11] G. Voglis, N. Tavernarakis, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 1104–1110.
- [12] J. M. Henley, K. A. Wilkinson, *Nat. Rev. Neurosci.* **2016**, *17*, 337–350.
- [13] W. Lu, Y. Shi, A. C. Jackson, K. Bjorgan, M. J. DURING, R. Sprengel, P. H. Seeburg, R. A. Nicoll, *Neuron* **2009**, *62*, 254–268.
- [14] R. J. Wenthold, R. S. Petralia, I. B. J., A. S. Niedzielski, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1982–1989.
- [15] S.-H. Shi, Y. Hayashi, J. A. Esteban, R. Malinow, *Cell* **2001**, *105*, 331–343.
- [16] B. J. Wiltgen, G. A. Royle, E. E. Gray, A. Abdipranoto, N. Thangthaeng, N. Jacobs, F. Saab, S. Tonegawa, S. F. Heinemann, T. J. O’Dell, et al., *PLOS ONE* **2010**, *5*, e12818.
- [17] C. Lüscher, R. C. Malenka, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a005710.
- [18] A. E. West, W. G. Chen, M. B. Dalva, R. E. Dolmetsch, J. M. Kornhauser, A. J. Shaywitz, M. A. Takasu, X. Tao, M. E. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 11024–11031.
- [19] “How Neurons Communicate,” <http://tea.cnx.org/contents/zHcoAZ7Q@4/How-Neurons-Communicate>, zuletzt aufgerufen am 25.03.2018.
- [20] M. Matsuzaki, N. Honkura, G. C. R. Ellis-Davies, H. Kasai, *Nature* **2004**, *429*, 761–766.
- [21] J. Lisman, H. Schulman, H. Cline, *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 175–190.
- [22] B. Feng, S. Raghavachari, J. Lisman, *Brain Res.* **2011**, *1419*, 46–52.
- [23] M. B. Kennedy, M. K. Bennett, N. E. Erongdu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 7357–7361.
- [24] M. B. Kennedy, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1993**, *3*, 732–737.
- [25] J. Lisman, R. Yasuda, S. Raghavachari, *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 169–182.
- [26] M. Bhattacharyya, M. M. Stratton, C. C. Going, E. D. McSpadden, Y. Huang, A. C. Susa, A. Elleman, Y. M. Cao, N. Pappireddi, P. Burkhardt, et al., *eLife* **2016**, *5*, e13405.
- [27] G. C. Faas, S. Raghavachari, J. E. Lisman, I. Mody, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 301–306.
- [28] S. G. Miller, M. B. Kennedy, *Cell* **1986**, *44*, 861–870.
- [29] S. S. Molloy, M. B. Kennedy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 4756–4760.
- [30] S.-J. R. Lee, Y. Escobedo-Lozoya, E. M. Szatmari, R. Yasuda, *Nature* **2009**, *458*, 299–306.
- [31] K. Shen, T. Meyer, *Science* **1999**, *284*, 162–167.
- [32] A. S. Leonard, I. A. Lim, D. E. Hemsworth, M. C. Horne, J. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 3239–3244.
- [33] J. C. Poncer, J. A. Esteban, R. Malinow, *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 4406–4411.
- [34] J. M. Henley, K. A. Wilkinson, *Dialogues Clin Neurosci* **2013**, *15*, 11–27.
- [35] P. Opazo, D. Choquet, *Mol. Cell. Neurosci.* **2011**, *46*, 1–8.
- [36] S. Tomita, V. Stein, T. J. Stocker, R. A. Nicoll, D. S. Bredt, *Neuron* **2005**, *45*, 269–277.
- [37] D. Panja, C. R. Bramham, *Neuropharmacology* **2014**, *76*, 664–676.
- [38] J. N. Bourne, K. M. Harris, *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, *31*, 47–67.
- [39] H. Kang, E. M. Schuman, *Science* **1996**, *273*, 1402–1406.
- [40] G. Leal, P. M. Afonso, I. L. Salazar, C. B. Duarte, *Brain Res.* **2015**, *1621*, 82–101.
- [41] X. Tao, S. Finkbeiner, D. B. Arnold, A. J. Shaywitz, M. E. Greenberg, *Neuron* **1998**, *20*, 709–726.
- [42] M. A. Sutton, E. M. Schuman, *Cell* **2006**, *127*, 49–58.
- [43] C. R. Bramham, D. G. Wells, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 776.
- [44] S.-E. Sim, J. Bakes, B.-K. Kaang, *Mol. Cells* **2014**, *37*, 511–517.

- [45] G. J. Hannon, L. He, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522.
- [46] M. Ha, V. N. Kim, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 509.
- [47] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
- [48] R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Genome Res.* **2009**, *19*, 92–105.
- [49] A. Lujambio, S. W. Lowe, *Nature* **2012**, *482*, 347.
- [50] M. V. Iorio, C. M. Croce, *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 143–159.
- [51] H.-I. Im, P. J. Kenny, *Trends Neurosci.* **2012**, *35*, 325–334.
- [52] Y. Lee, K. Jeon, J.-T. Lee, S. Kim, V. N. Kim, *EMBO J.* **2002**, *21*, 4663–4670.
- [53] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim, *EMBO J.* **2004**, *23*, 4051–4060.
- [54] X. Zhou, J. Ruan, G. Wang, W. Zhang, *PLOS Comput. Biol.* **2007**, *3*, e37.
- [55] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 3011–3016.
- [56] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, *115*, 199–208.
- [57] M. Ghildiyal, P. D. Zamore, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 94.
- [58] L.-A. MacFarlane, P. R. Murphy, *Curr. Genomics* **2010**, *11*, 537–561.
- [59] E. Izaurralde, S. Jonas, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 421.
- [60] D. P. Bartel, *Cell* **2009**, *136*, 215–233.
- [61] G. Schratt, *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 842.
- [62] B. Ryan, G. Joilin, J. M. Williams, *Front. Mol. Neurosci.* **2015**, *8*, 4.
- [63] K. Wibrand, D. Panja, A. Tiron, M. L. Ofte, K.-O. Skaftnesmo, C. S. Lee, J. T. G. Pena, T. Tuschl, C. R. Bramham, *Eur. J. Neurosci.* **2010**, *31*, 636–645.
- [64] M. M. Ryan, B. Ryan, M. Kyrke-Smith, B. Logan, W. P. Tate, W. C. Abraham, J. M. Williams, *PLOS ONE* **2012**, *7*, e40538.
- [65] G. Lugli, J. Larson, M. P. Demars, N. R. Smalheiser, *J. Neurochem.* **2012**, *123*, 459–466.
- [66] G. Lugli, J. Larson, M. E. Martone, Y. Jones, N. R. Smalheiser, *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 896–905.
- [67] S. Sambandan, G. Akbalik, L. Kochen, J. Rinne, J. Kahlstatt, C. Glock, G. Tushev, B. Alvarez-Castelao, A. Heckel, E. M. Schuman, *Science* **2017**, *355*, 634–637.
- [68] R. Saba, P. H. Störchel, A. Aksoy-Aksel, F. Kepura, G. Lippi, T. D. Plant, G. M. Schratt, *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 619–632.
- [69] Y. Ye, H. Xu, X. Su, X. He, *Neural Plast.* **2016**, *495923*, 1–13.
- [70] J. Stenvang, A. Petri, M. Lindow, S. Obad, S. Kauppinen, *Silence* **2012**, *3*, 1.
- [71] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 74–81.
- [72] A. Petri, C. O. dos Santos, C. Fu, C. Ruse, D. Pappin, E. M. Straarup, G. J. Hannon, H. F. Hansen, J. Stenvang, M. Heidenblad, et al., *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 371.
- [73] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [74] C. Querfeld, T. Pacheco, F. M. Foss, A. S. Halwani, P. Porcu, A. G. Seto, J. Ruckman, M. L. Landry, A. L. Jackson, L. A. Pestano, et al., *Blood* **2016**, *128*, 1829–1829.
- [75] G. K. Marinov, B. A. Williams, K. McCue, G. P. Schroth, J. Gertz, R. M. Myers, B. J. Wold, *Genome Res.* **2014**, *24*, 496–510.
- [76] B. Juskowiak, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 3157–3176.
- [77] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, *0*, 5487–5502.
- [78] C. Wu, C. Wang, L. Yan, C. J. Yang, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5*, 495–504.
- [79] L. M. Wilhelmsson, *Q. Rev. Biophys.* **2010**, *43*, 159–183.
- [80] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228–1237.
- [81] M. E. Hawkins, *Cell Biochem. Biophys.* **2001**, *34*, 257–281.
- [82] D. A. Berry, K.-Y. Jung, D. S. Wise, A. D. Sercel, W. H. Pearson, H. Mackie, J. B. Randolph, R. L. Somers, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2457–2461.
- [83] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2803–2812.
- [84] H. P. Spielmann, D. E. Wemmer, J. P. Jacobsen, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8542–8553.

- [85] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 318–330.
- [86] V. Karunakaran, J. L. Pérez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954–2962.
- [87] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, *46*, 39–51.
- [88] F. Hövelmann, I. Gaspar, J. Chamiolo, M. Kasper, J. Steffen, A. Ephrussi, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 128–135.
- [89] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69–77.
- [90] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2439–2448.
- [91] F. Hövelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19025–19032.
- [92] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, nbt0396-303–303.
- [93] Q. Li, G. Luan, Q. Guo, J. Liang, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e5.
- [94] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [95] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [96] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [97] J. C. Griepenburg, B. K. Ruble, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6198–6204.
- [98] A. P. Gorka, R. R. Nani, J. Zhu, S. Mackem, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [99] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J Med Chem* **1977**, *20*, 907–911.
- [100] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [101] M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schwoerer, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 33–42.
- [102] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwoerer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581–4595.
- [103] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2002**, *1*, 441–58.
- [104] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [105] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [106] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [107] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [108] J. Hemphill, J. Govan, R. Uprety, M. Tsang, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7152–7158.
- [109] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pöttsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [110] Y. M. Li, J. Shi, R. Cai, X. Chen, Z. F. Luo, Q. X. Guo, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2010**, *211*, 129–134.
- [111] X. Wang, M. Feng, L. Xiao, A. Tong, Y. Xiang, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 444–451.
- [112] M. Feng, Z. Ruan, J. Shang, L. Xiao, A. Tong, Y. Xiang, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 549–555.
- [113] Y. Li, J. Shi, Z. Luo, H. Jiang, X. Chen, F. Wang, X. Wu, Q. Guo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5368–5371.
- [114] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328–1332.
- [115] S. Shah, S. H. Friedman, *Oligonucleotides* **2007**, *17*, 35–43.
- [116] N. Ankenbruck, T. Courtney, Y. Naro, A. Deiters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *5*, 2768–2798.
- [117] T. Lucas, F. Schäfer, P. Müller, S. A. Eming, A. Heckel, S. Dimmeler, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15162.
- [118] F. Schäfer, J. Wagner, A. Knau, S. Dimmeler, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13558–13561.
- [119] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–2748.
- [120] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570–9571.

- [121] K. Zhang, J.-S. Taylor, *Biochemistry* **2001**, *40*, 153–159.
- [122] X. M. M. Weyel, M. A. H. Fichte, A. Heckel, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2183–2190.
- [123] G. Zheng, L. Cochella, J. Liu, O. Hobert, W. Li, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1332–1338.
- [124] X. Tang, I. J. Dmochowski, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 3041–3048.
- [125] D. Lovatt, B. K. Ruble, J. Lee, H. Dueck, T. K. Kim, S. Fisher, C. Francis, J. M. Spaethling, J. A. Wolf, M. S. Grady, et al., *Nat. Methods* **2014**, *11*, 190–196.
- [126] X. Tang, J. Swaminathan, A. M. Gewirtz, I. J. Dmochowski, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 559–569.
- [127] X. Tang, S. Maegawa, E. S. Weinberg, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11000–11001.
- [128] P. Seyfried, L. Eiden, N. Grebenovsky, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 359–363.
- [129] L. Zhang, D. Liang, Y. Wang, D. Li, J. Zhang, L. Wu, M. Feng, F. Yi, L. Xu, L. Lei, et al., *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 44–51.
- [130] A. Rodrigues-Correia, T. Stoess, J. Wilhelm, B. Berlin, A. Heckel, *Indian J. Chem. Sect. Inorg. Bio-Inorg. Phys. Theor. Anal. Chem.* **2013**, *52A*, 1014–1018.
- [131] J. M. Govan, M. O. Lively, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13176–13182.
- [132] C. M. Connelly, R. Uprety, J. Hemphill, A. Deiters, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 2987–2993.
- [133] E. van Rooij, W. S. Marshall, E. N. Olson, *Circ. Res.* **2008**, *103*, 919–928.
- [134] F. Schäfer, Licht-induzierbare AntimiRs und wellenlängenselektive Entschützung von DNA, Dissertation, Goethe Universität Frankfurt, **2013**.
- [135] Y. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [136] G. Zheng, L. Cochella, J. Liu, O. Hobert, W. Li, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1332–1338.
- [137] S. Ikeda, T. Kubota, D. O. Wang, H. Yanagisawa, T. Umemoto, A. Okamoto, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2871–2880.
- [138] C. Wang, Z. Zhu, Y. Song, H. Lin, C. J. Yang, W. Tan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5708–5710.
- [139] J. S. Rinne, T. P. Kaminski, U. Kubitscheck, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5375.
- [140] Y. Hirshberg, *Compt Rend* **1950**, *231*, 903–904.
- [141] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1683–1684.
- [142] M. Kathan, S. Hecht, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5536–5550.
- [143] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114–6178.
- [144] R. Eelkema, M. M. Pollard, J. Vicario, N. Katsonis, B. S. Ramon, C. W. M. Bastiaansen, D. J. Broer, B. L. Feringa, *Nature* **2006**, *440*, 163.
- [145] A. S. Lubbe, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1052–1079.
- [146] S. Ogasawara, I. Saito, M. Maeda, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2479–2482.
- [147] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8839–8842.
- [148] S. Ogasawara, M. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6671–6674.
- [149] S. Ogasawara, M. Maeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5457–5459.
- [150] A. Jäschke, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2106–2111.
- [151] H. Cahová, A. Jäschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3186–3190.
- [152] S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 905–914.
- [153] T. Stafforst, D. Hilvert, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 287–288.
- [154] C. Özçoban, T. Halbritter, S. Steinwand, L.-M. Herzig, J. Kohl-Landgraf, N. Askari, F. Groher, B. Fürtig, C. Richter, H. Schwalbe, et al., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1517–1520.
- [155] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2010**, *9*, 1371–1376.
- [156] C. Brieke, A. Heckel, *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 15726–15734.
- [157] P. Kočalka, N. K. Andersen, F. Jensen, P. Nielsen, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2106–2116.
- [158] T. Nguyen, A. Brewer, E. Stulz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1974–1977.
- [159] M. E. Østergaard, P. Kumar, B. Baral, D. C. Guenther, B. A. Anderson, F. M. Ytreberg, L. Deobald, A. J. Paszczyński, P. K. Sharma, P. J. Hrdlicka, *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 3157–3165.
- [160] A. A. Beharry, G. Andrew Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.

- [161] J. Griffiths, *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1*, 481–493.
- [162] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809–1825.
- [163] F. Hamon, F. Djedaini-Pilard, F. Barbot, C. Len, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10105–10123.
- [164] A. R. Dias, M. E. Minas Da Piedade, J. A. Martinho Simões, J. A. Simoni, C. Teixeira, H. P. Diogo, Y. Meng-Yan, G. Pilcher, *J. Chem. Thermodyn.* **1992**, *24*, 439–447.
- [165] H. Rau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1973**, *12*, 224–235.
- [166] H. Fliegl, A. Köhn, C. Hättig, R. Ahlrichs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9821–9827.
- [167] L. Briquet, D. P. Vercauteren, E. A. Perpète, D. Jacquemin, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *417*, 190–195.
- [168] T. Cusati, G. Granucci, M. Persico, G. Spighi, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 194312.
- [169] N. Nishimura, T. Sueyoshi, H. Yamanaka, E. Imai, S. Yamamoto, S. Hasegawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 1381–1387.
- [170] S. Samanta, A. Babalhavaeji, M. Dong, G. A. Woolley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14127–14130.
- [171] S. Samanta, A. A. Beharry, O. Sadovski, T. M. McCormick, A. Babalhavaeji, V. Tropepe, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9777–9784.
- [172] M. Dong, A. Babalhavaeji, M. J. Hansen, L. Kálmán, G. A. Woolley, *Chem Commun* **2015**, *51*, 12981–12984.
- [173] M. Dong, A. Babalhavaeji, S. Samanta, A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662–2670.
- [174] C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 868–878.
- [175] A. Bergen, S. Rudiuk, M. Morel, T. Le Saux, H. Ihmels, D. Baigl, *Nano Lett.* **2016**, *16*, 773–780.
- [176] L. Wu, Y. He, X. Tang, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1070–1079.
- [177] R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 811–812.
- [178] L. Wu, K. Koumoto, N. Sugimoto, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 1915–1917.
- [179] L. Wu, Y. Wu, H. Jin, L. Zhang, Y. He, X. Tang, *MedChemComm* **2015**, *6*, 461–468.
- [180] J. Thevarpadam, I. Bessi, O. Binas, D. P. N. Gonçalves, C. Slavov, H. R. A. Jonker, C. Richter, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2738–2742.
- [181] S. Mori, K. Morihira, S. Obika, *Molecules* **2014**, *19*, 5109–5118.
- [182] S. Mori, K. Morihira, Y. Kasahara, S. Tsunoda, S. Obika, *Chemosensors* **2015**, *3*, 36–54.
- [183] K. Morihira, O. Hasegawa, S. Mori, S. Tsunoda, S. Obika, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5209–5214.
- [184] S. Keiper, J. S. Vyle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3306–3309.
- [185] H. Asanuma, T. Yoshida, T. Ito, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7995–7998.
- [186] M. Liu, H. Jinmei, H. Abe, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2964–2967.
- [187] J. Li, X. Wang, X. Liang, *Chem. – Asian J.* **2014**, *9*, 3344–3358.
- [188] X. Liang, H. Asanuma, H. Kashida, A. Takasu, T. Sakamoto, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16408–16415.
- [189] H. Asanuma, T. Ito, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9015–9018.
- [190] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393–2395.
- [191] H. Asanuma, X. Liang, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1055–1058.
- [192] H. Asanuma, X. Liang, T. Yoshida, A. Yamazawa, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1316–1318.
- [193] X. Liang, M. Komiyama, H. Asanuma, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 332–350.
- [194] H. Asanuma, T. Takarada, T. Yoshida, D. Tamaru, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2671–2673.
- [195] Y. Kamiya, H. Asanuma, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1663–1672.
- [196] H. Asanuma, H. Kashida, Y. Kamiya, *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 1055–1069.
- [197] H. Kashida, X. L. and H. Asanuma, *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1065–1084.
- [198] H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 203–212.

- [199] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21*, 17870–17876.
- [200] X. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Small* **2009**, *5*, 1761–1768.
- [201] X. Liang, H. Nishioka, T. Mochizuki, H. Asanuma, *J. Mater. Chem.* **2009**, *20*, 575–581.
- [202] H. Nishioka, X. Liang, H. Asanuma, *Chem.– Eur. J.* **2010**, *16*, 2054–2062.
- [203] M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1009–1015.
- [204] X. Liang, R. Wakuda, K. Fujioka, H. Asanuma, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1551–1561.
- [205] Y. Kamiya, T. Takagi, H. Ooi, H. Ito, X. Liang, H. Asanuma, *ACS Synth. Biol.* **2014**, *4*, 365–370.
- [206] D. Matsunaga, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11452–11453.
- [207] X. Liang, K. Fujioka, H. Asanuma, *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 10388–10396.
- [208] M. Zhou, X. Liang, T. Mochizuki, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167–2170.
- [209] X. Liang, M. Zhou, K. Kato, H. Asanuma, *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 194–202.
- [210] W. R. Browne, B. L. Feringa, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 25–35.
- [211] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, S. Steinwand, P. Mondal, M. Biswas, I. Burghardt, J. Wachtveitl, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *21*, 2845–2854.
- [212] Y. Yan, X. Wang, J. I. L. Chen, D. S. Ginger, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8382–8387.
- [213] S. Samai, D. J. Bradley, T. L. Y. Choi, Y. Yan, D. S. Ginger, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 6997–7004.
- [214] B. Kou, J. Zhang, X. Huai, X. Liang, S.-J. Xiao, *RSC Adv.* **2014**, *5*, 5055–5058.
- [215] B. Kou, X. Guo, S.-J. Xiao, X. Liang, *Small* **2013**, *9*, 3939–3943.
- [216] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [217] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526–3527.
- [218] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278–3279.
- [219] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [220] B. S. Sproat, *Methods Mol. Biol.* **2005**, *288*, 17–32.
- [221] R. T. Pon, N. Usman, K. K. Ogilvie, *BioTechniques* **1988**, *6*, 768–775.
- [222] H. Ito, Y. Ike, S. Ikuta, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 1755–1769.
- [223] “DNA Oligonucleotide Synthesis,” <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/dna-oligonucleotide-synthesis.html>, zuletzt abgerufen am 25.03.2018.
- [224] M. K. Smalley, S. K. Silverman, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2001**, *11.11*, 1–12.
- [225] L. Jud, R. Micura, *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23*, 3406–3413.
- [226] B. M. Akiyama, M. D. Stone, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **2009**, pp. 27–46.
- [227] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 15329–15334.
- [228] U. Pradère, F. Halloy, J. Hall, *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23*, 5210–5213.
- [229] A. H. Krotz, P. G. Klopchin, K. L. Walker, G. S. Srivatsa, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3875–3878.
- [230] D. Hannah “Use of Activators,” <http://linktechsupport.zendesk.com/hc/en-us/articles/200142998-Use-of-Activators>, zuletzt aufgerufen am 25.03.2018.
- [231] “Activator ETT BTT,” <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR19-29.html>, zuletzt aufgerufen am 25.03.2018.
- [232] D. C. Capaldi, H. Gaus, A. H. Krotz, J. Arnold, R. L. Carty, M. N. Moore, A. N. Scozzari, K. Lowery, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 832–838.
- [233] J. V. Bonilla, G. S. Srivatsa, *Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products*, CRC Press, **2011**.
- [234] L. Büttner, F. Javadi-Zarnaghi, C. Höbartner, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8131–8137.
- [235] S. Ludmann, A. Marx, *Chim. Int. J. Chem.* **2016**, *70*, 203–206.
- [236] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191–219.
- [237] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16895–16898.
- [238] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18251–18254.
- [239] R. M. Schaaper, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23762–23765.
- [240] I. Hirao, M. Kimoto, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2012**, *88*, 345–367.

- [241] S. C. Johnson, C. B. Sherrill, D. J. Marshall, M. J. Moser, J. R. Prudent, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1937–1941.
- [242] Z. Yang, F. Chen, J. B. Alvarado, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15105–15112.
- [243] E. Crespan, S. Zanolli, A. Khandazhinskaya, I. Shevelev, M. Jasko, L. Alexandrova, M. Kukhanova, G. Blanca, G. Villani, U. Hübscher, et al., *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4117–4127.
- [244] W. A. Beard, S. H. Wilson, *Structure* **2003**, *11*, 489–496.
- [245] M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 10493–10495.
- [246] E. T. Kool, J. C. Morales, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 950.
- [247] E. T. Kool, T. J. Matray, *Nature* **1999**, *399*, 704.
- [248] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191–219.
- [249] A. Hottin, A. Marx, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418–427.
- [250] A. Hottin, K. Betz, K. Diederichs, A. Marx, *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23*, 2109–2118.
- [251] S. Obeid, H. Bußkamp, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8320–8322.
- [252] M. D. McCain, A. S. Meyer, S. S. Schultz, A. Glekas, T. E. Spratt, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5647–5659.
- [253] C. L. Hendrickson, K. G. Devine, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2241–2250.
- [254] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, F. E. Romesberg, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18637–18643.
- [255] A. Marx, D. A. Malyshev, F. E. Romesberg, K. Betz, K. Diederichs, P. Ordoukhanian, T. J. Dwyer, T. Lavergne, W. Welte, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 612.
- [256] D. A. Malyshev, F. E. Romesberg, I. R. Corrêa, J. M. Foster, K. Dhami, N. Dai, T. Lavergne, T. Chen, *Nature* **2014**, *509*, 385.
- [257] A. W. Feldman, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11427–11433.
- [258] Y. J. Seo, D. A. Malyshev, T. Lavergne, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19878–19888.
- [259] M.-L. Winz, E. C. Linder, T. André, J. Becker, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e110–e110.
- [260] S. Gopalakrishna, V. Gusti, S. Nair, S. Sahar, R. Gaur, *RNA* **2004**, *10*, 1820–1830.
- [261] B. Zhu, A. Hernandez, M. Tan, J. Wollenhaupt, S. Tabor, C. C. Richardson, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e94–e94.
- [262] H. Aurup, D. M. Williams, F. Eckstein, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9636–9641.
- [263] T. Someya, A. Ando, M. Kimoto, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 6665–6676.
- [264] N. Morohashi, M. Kimoto, A. Sato, R. Kawai, I. Hirao, *Molecules* **2012**, *17*, 2855–2876.
- [265] R. Kawai, M. Kimoto, S. Ikeda, T. Mitsui, M. Endo, S. Yokoyama, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17286–17295.
- [266] M. Kimoto, T. Mitsui, Y. Harada, A. Sato, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5360–5369.
- [267] G. Martin, W. Keller, *RNA* **1998**, *4*, 226–230.
- [268] V. Rosemeyer, A. Laubrock, R. Seibl, *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 446–449.
- [269] M.-L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e78.
- [270] J. C. Schlatterer, A. Jäschke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344*, 887–892.
- [271] C. Pitulle, R. G. Kleinedam, B. Sproat, G. Krupp, *Gene* **1992**, *112*, 101–105.
- [272] F. Huang, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e8.
- [273] F. Huang, J. He, Y. Guo, Y. Zhang, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1848.
- [274] C. M. Dojahn, M. Hesse, C. Arenz, **2013**, *9*, 3128–3130.
- [275] R. Fiammengo, K. Musílek, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9271–9276.
- [276] F. Huang, G. Wang, T. Coleman, N. Li, *RNA* **2003**, *9*, 1562–1570.
- [277] L. Zhang, L. Sun, Z. Cui, R. L. Gottlieb, B. Zhang, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 939–948.
- [278] G. Sengle, A. Jenne, P. S. Arora, B. Seelig, J. S. Nowick, A. Jäschke, M. Famulok, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1317–1329.
- [279] J. Jemielity, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Czarnecki, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8570–8574.

- [280]R. Contreras, H. Cheroutre, W. Degrave, W. Fiers, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 6353–6362.
- [281]Y. Luo, N. V. Eldho, H. O. Sintim, T. K. Dayie, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8559–8571.
- [282]B. Seelig, A. Jäschke, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7729–7732.
- [283]S. Fusz, S. G. Srivatsan, D. Ackermann, M. Famulok, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5069–5077.
- [284]K. E. Omari, J. Ren, L. E. Bird, M. K. Bona, G. Klarmann, S. F. J. LeGrice, D. K. Stammers, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1573–1579.
- [285]J. Nandakumar, S. Shuman, C. D. Lima, *Cell* **2006**, *127*, 71–84.
- [286]O. C. Uhlenbeck, R. I. Gumport, in *The Enzymes*, Academic Press, **1982**, pp. 31–58.
- [287]Y. Kinoshita, K. Nishigaki, Y. Husimi, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3747–3748.
- [288]J. R. Barrio, M. C. Barrio, N. J. Leonard, T. E. England, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2077–2081.
- [289]T. E. England, O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1978**, *275*, 560–561.
- [290]A. G. Bruce, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 3665–3677.
- [291]Y. Kikuchi, F. Hishinuma, K. Sakaguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 1270–1273.
- [292]R. W. Richardson, R. I. Gumport, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 6167–84.
- [293]M. Kadokura, T. Wada, K. Seio, M. Sekine, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5104–5113.
- [294]J. Wower, S. S. Hixson, L. A. Sylvers, Y. Xing, R. A. Zimmermann, *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 158–161.
- [295]L. W. McLaughlin, E. Romaniuk, P. J. Romaniuk, T. Neilson, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *125*, 639–643.
- [296]R. I. Gumport, O. C. Uhlenbeck, *Gene Amplif Anal* **1981**, *2*, 313–345.
- [297]L. A. Sylvers, J. Wower, S. S. Hixson, R. A. Zimmermann, *FEBS Lett.* **1989**, *245*, 9–13.
- [298]Q.-H. Gu, D. Yu, Z. Hu, X. Liu, Y. Yang, Y. Luo, J. Zhu, Z. Li, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6789.
- [299]S. tom Dieck, L. Kochen, C. Hanus, I. Bartnik, B. Nassim-Assir, K. Merk, T. Mosler, S. Garg, S. Bunse, D. A. Tirrell, et al., *Nat. Methods* **2015**, *12*, 411–414.
- [300]H.-K. Kim, K.-J. J. Park, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1668–1670.
- [301]R. Benhida, M. Devys, J.-L. Fourrey, F. Lecubin, J.-S. Sun, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6167–6170.
- [302]L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 114–125.
- [303]K. A. Lennox, R. Owczarzy, D. M. Thomas, J. A. Walder, M. A. Behlke, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2013**, *2*, e117.
- [304]K. A. Lennox, M. A. Behlke, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 1788–1799.
- [305]H. Jahns, M. Roos, J. Imig, F. Baumann, Y. Wang, R. Gilmour, J. Hall, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6317.
- [306]F. Hövelmann, L. Bethge, O. Seitz, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2072–2081.
- [307]M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415.
- [308]“BBQ-650 Oligo Modifications from Gene Link,” http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=240, zuletzt aufgerufen am 25.03.2018.
- [309]G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 1027–1036.
- [310]A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5168–5174.
- [311]O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380–2382.
- [312]M. González-Pérez, C. Brinco, R. Vieira, T. Rosado, G. Mauran, A. Pereira, A. Candeias, A. T. Caldeira, *Appl. Phys. A* **2017**, *123*, 142.
- [313]“Difference between FITC and 6-FAM labeled oligo,” <http://www.biosyn.com/faq/difference-between-fitc-and-6-fam-labeled-oligo.aspx>, zuletzt aufgerufen am 25.03.2018.
- [314]R. Monroy-Contreras, L. Vaca, *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, DOI 10.4061/2011/741723.
- [315]D. Y. Ryazantsev, M. V. Kvach, D. A. Tsybulsky, I. A. Prokhorenko, I. A. Stepanova, Y. V. Martynenko, S. V. Gontarev, V. V. Shmanai, S. K. Zavriev, V. A. Korshun, *Analyst* **2014**, *139*, 2867–2872.

- [316] B. Groves, Y.-J. Chen, C. Zurla, S. Pochekailov, J. L. Kirschman, P. J. Santangelo, G. Seelig, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 287–294.
- [317] T. E. I. Cheatham, J. L. Miller, T. Fox, T. A. Darden, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4193–4194.
- [318] M. J. Serra, M. H. Lyttle, T. J. Axenson, C. A. Schadt, D. H. Turner, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3845–3849.
- [319] N. Srinivas, T. E. Ouldridge, P. Šulc, J. M. Schaeffer, B. Yurke, A. A. Louis, J. P. K. Doye, E. Winfree, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10641–10658.
- [320] P. Šulc, T. E. Ouldridge, F. Romano, J. P. K. Doye, A. A. Louis, *Biophys. J.* **2015**, *108*, 1238–1247.
- [321] W. Pils, R. Micura, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1859–1863.
- [322] N. Grebenovsky, T. Goldau, M. Bolte, A. Heckel, *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24*, 3425–3428.
- [323] A. K. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e105.
- [324] T. Lan, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6512–6513.
- [325] H. A. Dieck, R. F. Heck, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1133–1136.
- [326] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261.
- [327] M. Teraguchi, T. Masuda, *Macromolecules* **2000**, *33*, 240–242.
- [328] K. W. Wellington, S. A. Benner, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *25*, 1309–1333.
- [329] A. K. Saksena, P. Mangiaracina, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 273–276.
- [330] D. A. Evans, K. T. Chapman, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3560–3578.
- [331] H. C. Zhang, G. D. Daves, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4690–4696.
- [332] H. Ito, X. Liang, H. Nishioka, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5519–5524.
- [333] P. Mondal, M. Biswas, T. Goldau, A. Heckel, I. Burghardt, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 11275–11286.
- [334] Y. Tanaka, S. Fujii, H. Hiroaki, T. Sakata, T. Tanaka, S. Uesugi, K. Tomita, Y. Kyogoku, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 949–955.
- [335] M. C. Wahl, M. Sundaralingam, *Biopolymers* **1997**, *44*, 45–63.
- [336] D. Rastädter, M. Biswas, I. Burghardt, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 8478–8488.
- [337] P. Mondal, M. Biswas, T. Goldau, A. Heckel, I. Burghardt, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 11275–11286.
- [338] X. Liang, T. Mochizuki, T. Fujii, H. Kashida, H. Asanuma, *Nat. Comput.* **2012**, *11*, 231–238.
- [339] P. Mondal, G. Granucci, D. Rastädter, M. Persico, I. Burghardt, *ChemRxiv* **2018**, DOI 10.26434/chemrxiv.5758665.v1.
- [340] M. Biswas, I. Burghardt, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 932–940.
- [341] M. Larhed, A. Hallberg, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9582–9584.
- [342] Jan Štambaský, M. Hocek, Pavel Kočovský, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729–6764.
- [343] G. Rangam, N. Z. Rudinger, H. M. Müller, A. Marx, *Synthesis* **2005**, *2005*, 1467–1472.
- [344] D. H. R. Barton, S. W. McCombie, *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1975**, *0*, 1574–1585.
- [345] M. Unno, K. Kakiage, M. Yamamura, T. Kogure, T. Kyomen, M. Hanaya, *Appl. Organomet. Chem.* **2010**, *24*, 247–250.
- [346] P. F. Holt, B. P. Hughes, *J. Chem. Soc. Resumed* **1954**, *0*, 764.
- [347] N. Kano, F. Komatsu, M. Yamamura, T. Kawashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7097–7109.
- [348] F. Garlich-Zschoche, K. H. Dötz, *Organometallics* **2007**, *26*, 4535–4540.
- [349] C. Peyron, R. Benhida, *Synlett* **2009**, *2009*, 472–476.
- [350] S. Hildbrand, A. Blaser, S. P. Parel, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5499–5511.
- [351] M. Štefko, R. Pohl, B. Klepetářová, M. Hocek, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1689–1704.
- [352] C. Schmöger, A. Stolle, W. Bonrath, B. Ondruschka, T. Keller, K. D. Jandt, *ChemSusChem* **2009**, *2*, 77–82.
- [353] R. Mani, V. Mahadevan, M. Srinivasan, *React. Polym.* **1991**, *14*, 263–268.

- [354] J. Yano, L. S. Kan, P. O. P. Ts'o, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1980**, 629, 178–183.
- [355] R. M. Hyde, A. D. Broom, R. W. Buckheit, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1878–1885.
- [356] P. J. L. M. Quaedflieg, A. P. Van der Heiden, L. H. Koole, A. J. J. M. Coenen, S. Van der Wal, E. M. Meijer, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5846–5859.
- [357] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7305–7309.
- [358] **2010**.
- [359] M. C. R. Buff, Regulation Der Aktivität Eines Anti-Thrombin-Aptamers Und Des GlmS-Ribozyms Mit Licht, Dissertation, Goethe Universität Frankfurt, **2010**.
- [360] C. Djerassi, *Chem. Rev.* **1948**, 43, 271–317.
- [361] M. S. Gibson, R. W. Bradshaw, *Angew. Chem.* **1968**, 80, 986–996.
- [362] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7305–7309.
- [363] W. T. Markiewicz, M. Wiewiórowski, *Nucleic Acids Res.* **1978**, 1, s185–s190.
- [364] S. Neuner, T. Santner, C. Kreutz, R. Micura, *Chem. – Eur. J.* **2015**, 21, 11634–11643.
- [365] S. Pitsch, P. A. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3773–3795.
- [366] K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, K. V. P. P. Kumar, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2551–2651.
- [367] N. Rublack, S. Müller, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, 10, 1906–1913.
- [368] M. Chauleau, S. Shuman, *RNA* **2013**, 19, 1840–1847.
- [369] M. Mandal, R. R. Breaker, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 451.
- [370] A. V. Sherwood, T. M. Henkin, *Annu. Rev. Microbiol.* **2016**, 70, 361–374.
- [371] M. T. Cheah, A. Wachter, N. Sudarsan, R. R. Breaker, *Nature* **2007**, 447, 497.
- [372] T. M. Henkin, *Genes Dev.* **2008**, 22, 3383–3390.
- [373] A. Serganov, E. Nudler, *Cell* **2013**, 152, 17–24.
- [374] R. T. Batey, *Q. Rev. Biophys.* **2012**, 45, 345–381.
- [375] Y.-B. Kim, A. Wacker, K. von Laer, V. V. Rogov, B. Suess, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 5375–5386.
- [376] O. Pikovskaya, A. Polonskaia, D. J. Patel, A. Serganov, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 748–755.
- [377] J. N. Kim, A. Roth, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 16092–16097.
- [378] A. Jordan, P. Reichard, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 71–98.
- [379] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1388–1405.
- [380] G.-H. Lee, H. K. Lim, W. Jung, S. S. Hah, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, 33, 3861–3863.
- [381] D. P. C. McGee, J. C. Martin, *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 1885–1889.
- [382] A. Gupte, J. K. Buolamwini, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7726–7737.
- [383] T. D. Nelson, R. D. Crouch, *Synthesis* **1996**, 1031.
- [384] X.-F. Zhu, H. J. Williams, A. I. Scott, *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2000**, 0, 2305–2306.
- [385] P. Seyfried, Goethe Universität, **2017**.
- [386] U. Pradère, A. Brunschweiler, L. F. R. Gebert, M. Lucic, M. Roos, J. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12028–12032.
- [387] E. Paredes, S. R. Das, *ChemBioChem* **2011**, 12, 125–131.
- [388] S. Kurata, T. Ohtsuki, T. Suzuki, K. Watanabe, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, e145.
- [389] K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2047–2060.
- [390] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 631–635.
- [391] J. Ludwig, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, 16, 131–133.
- [392] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 5065–5068.
- [393] M. Hollenstein, *Molecules* **2012**, 17, 13569–13591.
- [394] J. Caton-Williams, M. Smith, N. Carrasco, Z. Huang, *Org. Lett.* **2011**, 13, 4156–4159.
- [395] M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 7527–7538.
- [396] M. Ortiz, A. M. Debela, M. Svobodova, S. Thorimbert, D. Lesage, R. B. Cole, B. Hasenkopf, C. K. O'Sullivan, *Chem. – Eur. J.* **2017**, 23, 10597–10603.
- [397] M. Hollenstein, F. Wojciechowski, C. J. Leumann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4428–4430.

- [398]G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [399]S. I. Antsyovich, T. S. Oretskaya, G. von Kiedrowski, *Russ. Chem. Bull.* **2005**, *54*, 2671–2681.
- [400]V. Girijavallabhan, A. Arasappan, F. Bennett, K. Chen, Q. Dang, Y. Huang, A. Kerekes, L. Nair, D. Pissarnitski, V. Verma, et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2016**, *35*, 277–294.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABI	<i>Applied Biosystems</i>
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AE-HPLC	<i>anion exchange high performance liquid chromatography</i>
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
anti-miRNA	anti-micro ribonucleic acid
Apt	Aptamer
aq.	<i>aqueous</i>
ArLi	Aryllithium
AMB	1,4-Bis(azidomethyl)benzol
ATP	Adenosintriphosphat
BTT	5-(Benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
Bz	Benzyl
CEO	β -Cyanoethyloxid
COSY	correlation spectroscopy
CH	Cyclohexan
CPG	controlled pore glass
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEA	Diethylamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPPA	Diphenylphosphorylazid
ds	double stranded (doppelsträngig)
Eq.	Äquivalent
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
ETT	5-(Ethylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ges.	gesättigt
GFP	green fluorescent protein
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
iPrPac	<i>para</i> -iso-Propylphenoxyacetyl
konz.	Konzentriert
LED	light emitting diode
LNA	locked nucleic acid
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	Molar

MD	Molekulardynamik
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
miR/miRNA	microRNA
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl
NPE-OH	1-(2-Nitrophenyl)ethanol
NPBY	1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-ol
NPP	2-(<i>o</i> -Nitrophenyl)-propyl
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
<i>o</i> -NB	ortho-Nitrobenzyl
<i>p</i>	<i>para</i>
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
Ph	Phenyl
PNA	Peptid-Nukleinsäure
PSS	photostationärer Zustand
R	beliebiger Rest
R_f	Retentionsfaktor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROESY	Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
RP	Reverse Phase
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNA
ss	single stranded
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TIPSCI	Triisopropylbenzolsulfonylchlorid
T_M	Schmelzpunkt
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Time of flight (Flugzeit)
TOM	[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl
tRNA	transfer-RNA
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
Vis	visible (sichtbar)
z.B.	zum Beispiel