

# **Photo- und redoxaktivierbare Chinonmethide zur Alkylierung von RNA**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Jan-Erik Hornung  
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main

2021

(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Datum der Disputation: 27.09.2021



# Danksagung



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Alkylierung von Nukleobasen .....	2
1.1.1. Photochemische [2+2]-Cycloaddition .....	2
1.1.2. Loste .....	3
1.1.3. <i>cis</i> -Platin.....	4
1.1.4. Durch <sup>1</sup> O <sub>2</sub> aktiviertes Furan .....	5
1.1.5. Photolabil geschütztes 4-Oxo-enal.....	6
1.1.6. 2-Amino-6-vinylpurin .....	7
1.1.7. Chinonmethide.....	8
1.1.8. Chinonmethide als selbstzerlegende <i>Linker</i> .....	12
1.2. Post-transkriptionelle Genregulation durch Argonautenproteine.....	14
1.2.1. miRNA.....	14
1.2.2. Argonautenproteine.....	16
1.2.3. siRNA.....	19
1.2.4. Antagomirs und anti-miRs .....	20
1.2.5. miRNA <i>sponges</i> .....	21
1.3. Photoschutzgruppen.....	21
1.4. Thiole.....	23
1.4.1. Glutathion als Reaktionspartner von Schutzgruppen.....	24
1.4.2. Reaktion von Chinonmethiden mit Thiolen .....	27
1.5. Peptidnukleinsäure (PNA).....	28
1.5.1. PNA-Synthese .....	29
1.5.2. Struktur und Stabilität .....	31
1.5.3. PNA-Triplexstrukturen & PNA-Modifikationen .....	33
1.5.3.1. künstliche Nukleobasen.....	33
1.5.3.2. PNA-Rückgratmodifikationen .....	35
2. Eigene Arbeiten.....	39
2.1. Photolabil geschützte Chinonmethid-Präkursoren.....	41

2.1.1. Synthese des Chinonmethid-Präkursors.....	41
2.1.2. Chinonmethid-Präkursor-Derivate mit unterschiedlicher Länge des <i>Linkers</i> .....	43
2.1.3. Allgemeine Synthese der PNAs .....	44
2.1.4. Allgemeine Synthese der Konjugate.....	45
2.1.5. Selbstalkylierung der Konjugate.....	46
2.1.6. Analyse der RNA-Alkylierung mithilfe des <i>ALFexpress</i> <sup>TM</sup> .....	49
2.1.7. Sequenzselektivität .....	51
2.1.8. Schmelztemperaturen der Duplexe aus Konjugat und RNA .....	54
2.1.9. Alkylierungsexperimente mit unterschiedlicher <i>Linker</i> -Länge.....	56
2.1.10. Vergleich der Selbst- und RNA-Alkylierungskinetiken.....	60
2.1.11. Variation der dPAGE-Temperatur.....	63
2.1.12. Alkylierung nach Bestrahlung in Abwesenheit von RNA.....	69
2.1.13. Versuche der Bestimmung der Alkylierungs-Position.....	70
2.1.14. Masse des Alkylierungsprodukts aus PNA1-32 und RNA1 .....	74
2.1.15. Alkylierung von miRNA-20a.....	77
2.1.15.1. Alkylierung mit 15mer Konjugat.....	77
2.1.15.2. Alkylierung mit 10mer Konjugat.....	79
2.1.15.3. 10mer Konjugat mit internem Chinonmethid-Präkursor.....	80
2.1.15.4. Schmelztemperatur der PNA mit internem Chinonmethid-Präkursor .....	82
2.2. Reduktiv aktivierbare Chinonmethid-Präkursoren.....	84
2.2.1. Synthese.....	85
2.2.1.1. Synthese über einen Methylthiomethylether .....	86
2.2.1.2. Alternative Synthese über Tolythiomethylether .....	90
2.2.1.3. Synthese der Konjugate .....	92
2.2.2. Stabilitätstest der Konjugate in Puffer .....	92
2.2.3. Zerfall der Konjugate bei 0.5 mM GSH .....	92
2.2.4. Zerfall der Konjugate bei 10 mM GSH .....	95
2.2.5. Alkylierung von RNA1.....	97
2.2.5.1. Alkylierungskinetiken bei 0.5 mM GSH.....	98

2.2.5.2. Alkylierungskinetiken bei 10 mM GSH.....	99
2.2.5.3. Analyse der Elektropherogramme .....	100
2.2.5.4. Weitere Aktivatoren.....	102
2.2.6. Beeinträchtigung des photoaktivierbaren Derivats durch GSH und DTT .....	103
2.2.7. Stabilität in Zelllysat .....	105
2.3. Pulldown-Experimente .....	107
2.3.1. Pulldown mit Zelllysat .....	108
2.3.2. Alternativen zum Essigsäureester .....	110
3. Zusammenfassung & Ausblick.....	113
3.1. Zusammenfassung.....	113
3.2. Ausblick .....	118
4. Experimenteller Teil.....	120
4.1. Synthese der Chinonmethid-Präkursoren .....	121
4.1.1. 3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propansäure 39.....	121
4.1.2. 3-(2,2-Dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin-6-yl)- <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)propanamid 40.....	122
4.1.3. <i>N</i> -(2-Azidoethyl)-3-(2,2-dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin-6-yl)propanamid 41 .....	122
4.1.4. <i>N</i> -(2-Azidoethyl)-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamid 38.....	123
4.1.5. <i>N</i> -(2-Azidoethyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)- propanamid 42.....	124
4.1.6. 5-(3-(2-Azidoethylamino)-3-oxopropyl)-2-(2-nitrobenzyloxy)benzylacetat 32 .....	125
4.2. Synthese eines Chinonmethid-Präkursor mit kürzerem <i>Linker</i> .....	125
4.2.1. 3-(2,2-Dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin-6-yl)propansäure 45 .....	125
4.2.2. 3-(2,2-Dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin-6-yl)propan-1-ol 46.....	126
4.2.3. 6-(3-Azidopropyl)-2,2-dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin 47.....	127
4.2.4. 4-(3-Azidopropyl)-2-(hydroxymethyl)phenol 48 .....	127
4.2.5. (5-(3-Azidopropyl)-2-(2-nitrobenzyloxy)phenyl)methanol 49 .....	128
4.2.6. 5-(3-Azidopropyl)-2-(2-nitrobenzyloxy)benzylacetat 44.....	129

4.3. Synthese eines Chinonmethid-Präkursors mit verlängertem <i>Linker</i> .....	129
4.3.1. 3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-hydroxypropyl)propanamid 74 .....	130
4.3.2. 3-(2,2-Dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin-6-yl)- <i>N</i> -(3-hydroxypropyl)propanamid 75.....	130
4.3.3. <i>N</i> -(3-Azidopropyl)-3-(2,2-dimethyl-4 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxin-6-yl)propanamid 76 .....	131
4.3.4. <i>N</i> -(3-Azidopropyl)-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamid 77...132	
4.3.5. <i>N</i> -(3-Azidopropyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)- propanamid 78.....	132
4.3.6. 5-(3-((3-Azidopropyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat 43.....	133
4.4. Synthese des internen PNA-Alkin-Monomers.....	134
4.4.1. 2-((2-(((9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)(prop-2-in-1- yl)amino)essigsäure 53 .....	134
4.5. Synthese der reduktiv-aktivierbaren Chinonmethid-Präkursoren.....	135
4.5.1. Chlormethylmethylsulfid <sup>[201]</sup> .....	135
4.5.2. <i>N</i> -(2-Azidoethyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-((methylthio)methoxy)phenyl)- propanamid 57 .....	135
4.5.3. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((methylthio)methoxy)benzylacetat 58.....	136
4.5.4. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((tert-butylidisulfanyl)methoxy)- benzylacetat 56 .....	136
4.5.5. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((benzylidisulfanyl)methoxy)- benzylacetat 54 .....	137
4.5.6. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((isopropylidisulfanyl)methoxy)- benzylacetat 55 .....	138
4.5.7. 4-Chloromethylthiotoluol <sup>[213]</sup> .....	139
4.5.8. <i>N</i> -(2-Azidoethyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-(( <i>p</i> -tolylthio)methoxy)phenyl)- propanamid 62.....	139
4.5.9. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-(( <i>p</i> -tolylthio)methoxy)benzylacetat 68.....	140

4.5.10. Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Disulfide 54-56 aus dem <i>p</i> -Tolylthiomethylether 68 .....	141
4.6. Synthese des Chinonmethid-Präkursors für die <i>Pulldown</i> -Experimente.....	141
4.6.1. 4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)benzaldehyd 80 .....	141
4.6.2. 5-Formyl-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat 82 .....	142
4.6.3. 5-(Hydroxymethyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat 83.....	143
4.6.4. 5-(Azidomethyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat 69.....	143
4.7. Synthese von Chinonmethid-Präkursoren mit alternativer Abgangsgruppe.....	144
4.7.1. 1-(5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)- <i>N,N</i> -dimethylmethanamin 70.....	144
4.7.2. 1-(5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)- <i>N,N,N</i> -trimethyl- methanaminiumiodid 71.....	145
4.7.3. 5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylpivalat 72 .....	145
4.7.4. 5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzyl benzoat 73.....	146
4.8. Allgemeine Synthese und Reinigung der PNA.....	146
4.9. Allgemeine Synthese der Konjugate und Reinigung .....	148
4.9.1. PNA1-32 .....	148
4.9.2. PNA2-32 .....	148
4.9.3. PNA1-43 .....	148
4.9.4. PNA1-44 .....	149
4.9.5. PNA3-32 .....	149
4.9.6. PNA4-32 .....	149
4.9.7. PNA5-44 .....	149
4.9.8. PNA1-54 .....	150
4.9.9. PNA1-56 .....	150
4.9.10. PNA1-55.....	150
4.9.11. PNA6-69.....	150
4.9.12. PNA1-70.....	151
4.9.13. PNA1-71.....	151
4.9.14. PNA1-72.....	151

4.9.15. PNA1-73.....	152
4.10. Photochemische Entschützung der Chinonmethid-Präkursoren.....	152
4.11. Alkylierungsexperimente.....	153
4.11.1. Bestrahlung der Konjugate und Messung der Selbstalkylierungs-Kinetik.....	153
4.11.2. Handhabung von Proben mit RNA.....	153
4.11.3. Bestrahlung und Inkubation der Konjugate mit RNA.....	153
4.11.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	154
4.12. Messung der Kinetik des Disulfidzerfalls.....	154
4.12.1. Messung der RNA-Alkylierung durch die reduktiv-aktivierbaren Konjugate.....	155
4.12.2. Isolation des Alkylierungsprodukts aus PNA2-32 und RNA2 mittels HPLC.....	155
4.12.3. Isolation des Alkylierungsprodukts aus PNA1-32 und RNA1 mittels dPAGE und <i>in-line Probing</i> .....	155
4.13. Schmelzkurven.....	156
4.14. Beeinträchtigung der Selbstadduktbildung von PNA1-32 durch GSH oder DTT.....	156
4.15. Experimente mit HeLa-Zellysat und <i>Pulldown</i> .....	156
4.15.1. Stabilität in Zellysat.....	157
4.15.2. <i>Pulldown</i> von RNA1 mit PNA6-69.....	157
4.15.3. <i>Pulldown</i> mit Lysat.....	157
5. Anhang.....	159
5.1. Abkürzungsverzeichnis.....	159
5.2. Literaturverzeichnis.....	161
5.3. Lebenslauf.....	170
5.4. Publikationsliste.....	171
5.5. Wissenschaftliche Vorträge.....	171
5.6. Posterbeiträge.....	171
5.7. Eidesstattliche Erklärung.....	172

# 1. Einleitung

Vor über 150 Jahren wurde von Friedrich Miescher die Desoxyribonukleinsäure entdeckt, doch dauerte es noch weitere 83 Jahre, bis ihre Struktur von Watson und Crick entschlüsselt wurde.<sup>[1]</sup> Die Forschung ist immer ein Produkt ihrer Zeit und abhängig von vorangegangenen Erkenntnissen und der vorhandenen Technologie. Dank stetigem Fortschritt ist mittlerweile das Erbgut des Menschen vollständig entschlüsselt, der Ablauf vieler biologischer Prozesse auf molekularer Ebene geklärt und moderne Methoden wie bspw. Röntgenstruktur-Analyse, NMR und Kryoelektronenmikroskopie erlauben eine immer genauere Betrachtung der Struktur von Proteinen.

Proteine in Form von Enzymen und Rezeptoren waren auch lange Zeit der Fokus der Arzneistoffentwicklung, bei der Moleküle gesucht wurden, die gezielt an diese binden und deren Funktion beeinflussen.<sup>[2]</sup> Doch nicht für jedes Protein gibt es eine Bindetasche mit einem passenden Molekül. Ein neuer Ansatz ist daher, einen Schritt früher im zentralen Dogma der Molekularbiologie einzugreifen, denn jedes Protein muss zunächst aus einer RNA transkribiert werden. Doch nicht nur diese Möglichkeit macht RNA zu einem interessanten pharmazeutischen Ziel. Denn RNA kann nicht nur in Proteine umgewandelt werden, sie ist auch maßgeblich an regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt. Die bahnbrechende Entdeckung der RNA-Interferenz<sup>[3]</sup> von Andrew Z. Fire und Craig C. Mello sowie des CRISPR/Cas-Systems<sup>[4]</sup> von Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna wurden daher zurecht mit dem Nobelpreis gewürdigt. Sie zeigen, zu was RNA mithilfe von Proteinen in der Lage ist und bilden die Basis eines neuen Dogmas der Arzneistoffforschung, was Hoffnung auf die Heilung von bisher schwer therapierbaren Krankheiten macht. So erlaubt RNA-Interferenz die gezielte Spaltung einer RNA und verhindert damit die Expression eines Proteins und CRISPR/Cas macht es möglich, fast beliebige Teile eines Genoms zu verändern.<sup>[5]</sup>

Doch um auch nützlich zu sein, müssen sich diese Methoden außerhalb des Labors beweisen. Firmen wie „CRISPR Therapeutics“ versuchen Therapien auf der Basis von CRISPR/Cas zu entwickeln. Dies wird wahrscheinlich noch einige Zeit in Anspruch nehmen, doch durch die COVID-19-Pandemie nimmt die Geschwindigkeit der medizinischen Forschung rapide zu. Durch Erzeugung von Impfstoffen auf RNA Basis war es in kurzer Zeit möglich, ein Mittel gegen den Virus zu entwickeln. Erst jetzt ist es durch technische Fortschritte auch möglich, RNA in den benötigten Mengen zu produzieren, doch die Kosten bleiben sehr hoch, verglichen mit konventionellen Medikamenten. Somit wird diese Therapie zunächst Krankheiten vorbehalten sein, die ansonsten nicht heilbar sind. Auf RNA-Interferenz basierende Arzneimittel sind bereits auf dem Markt zugelassen, zum Beispiel Patisiran, mit Jahrestherapiekosten von bis zu 0.5 Millionen €.

## 1. Einleitung

---

Das für die RNA-Interferenz verantwortliche Argonautenprotein ist wegen seiner Fähigkeit der post-transkriptionellen Genregulation auch selbst ein interessantes Ziel der Forschung. Zusammen mit deregulierter microRNA wird es mit diversen Krankheiten assoziiert, wie z.B. Krebs, Parkinson oder Alzheimer.<sup>[6]</sup>

Dies alles scheint zunächst rein biologisch bzw. biochemisch zu sein, doch ohne Chemie wären diese Entwicklungen nicht möglich gewesen. Die benötigte synthetische RNA wird über Festphasensynthese hergestellt, welche die einzelnen Nukleobasen durch chemische Reaktionen verknüpft und auch die benötigten Monomere müssen zunächst chemisch synthetisiert werden. Außerdem ist RNA fragil, weshalb für Arzneimittel wie Patisiran chemisch modifizierte Nukleinsäuren verwendet werden. Somit liegt es auch an Chemikern, neue Werkzeuge zu entwickeln, die einen Grundstein für moderne Therapeutika legen.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit sich Chinonmethide für die gezielte Alkylierung von RNAs einsetzen lassen, um damit Möglichkeiten zu schaffen, microRNAs und schließlich Argonautenproteine zu hemmen.

### 1.1. Alkylierung von Nukleobasen

Die Alkylierung von Nukleobasen kann ungewollt, z.B. durch Photoschäden, oder gezielt, z.B. in der Chemotherapie, geschehen und sowohl Naturstoffe als auch synthetische Molekül sind dazu in der Lage. Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick der Alkylierung von Nukleobasen durch verschiedene Mechanismen gegeben.

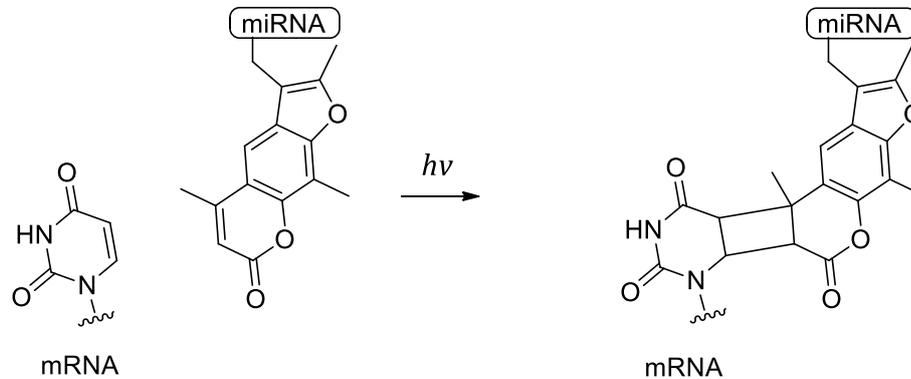
#### 1.1.1. Photochemische [2+2]-Cycloaddition

[2+2]-Cycloadditionen in biologischen Systemen sind in der Regel eine unerwünschte Folge von exzessiver Sonnenstrahlung, wenn der UV-Anteil in Zellen eindringt und dort das Erbgut schädigt. Dabei kann die Nukleobase Thymin angeregt werden und eine [2+2]-Cycloadditionen mit einem benachbarten Thymin vollziehen. Diese Schädigung der DNA führt dazu, dass Hautkrebs entstehen kann, wenn der Schaden nicht repariert wird.<sup>[7]</sup> Gezielt kann die [2+2]-Cycloadditionen auch dafür eingesetzt werden, um hybridisierte Nukleinsäuren kovalent miteinander zu verknüpfen und somit spezifische Präferenzen bei der Strangpaarung zu erforschen. Beispielsweise wurde diese Technik von Imig *et al.* genutzt, um die Interaktion von *RNA-induced silencing complexes* (RISCs) mit verschiedenen mRNAs zu untersuchen (Für eine detailliertere Beschreibung von miRNA, Argonautenproteinen und RISC siehe Kapitel 1.2).<sup>[8]</sup> Hierfür wurde in einer Biotin-markierten pre-miRNA ein verändertes Adenosin eingebaut, welches als 2'-Rest ein

## 1. Einleitung

---

Psoralen trägt. Nach Prozessierung der pre-miRNA, Aufnahme in das Argonautenprotein und Bindung an die Ziel-RNA erfolgte durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 254 bzw. 365 nm die [2+2]-Cycloaddition (Abbildung 1). Anschließend konnte mithilfe von Streptavidin der RNA Duplex isoliert und analysiert werden.



**Abbildung 1:** [2+2]-Cycloadditionen zwischen einem Uracil der mRNA und dem Psoralen der miRNA.

Matsuyama *et al.* untersuchte den Einfluss der [2+2]-Cycloaddition auf die Inhibition des RISCs bei unterschiedlicher Position eines Psoralen-modifizierten Adenosins.<sup>[9]</sup> Hierfür wurde das Monomer entweder im Spaltbereich, in der *Seed*- oder 3'-Region der 2'-O-Methyl-miRNA eingebaut. Nach Bestrahlung führten alle Oligonukleotide zu einer erhöhten Inhibition des RISCs im Vergleich zur unmodifizierten Sequenz. Die im Spaltbereich und der 3'-Region modifizierten Oligonukleotide waren am effektivsten.

### 1.1.2. Lose

Zu den einfachsten Alkylanzien, deren Mechanismus auf nukleophiler Substitution basieren, zählen die „Lose“ (benannt nach den Entdeckern „Wilhelm **L**ommel und Wilhelm **S**teinkopf“). Diese schwefel- oder stickstoffhaltigen Chloralkane sind aufgrund ihrer Struktur besonders reaktiv: Zunächst reagieren sie unter Abspaltung von Chlor zu einem Aziridiniumion, welches dann als sehr reaktives Elektrophil Nucleobasen angreifen kann (Abbildung 2) Die Alkylierung erfolgt somit spontan und unspezifisch. Dennoch finden Lost-Derivate breite Anwendung in der Krebstherapie, beispielsweise in Form von Chlorambucil.<sup>[10]</sup>

## 1. Einleitung

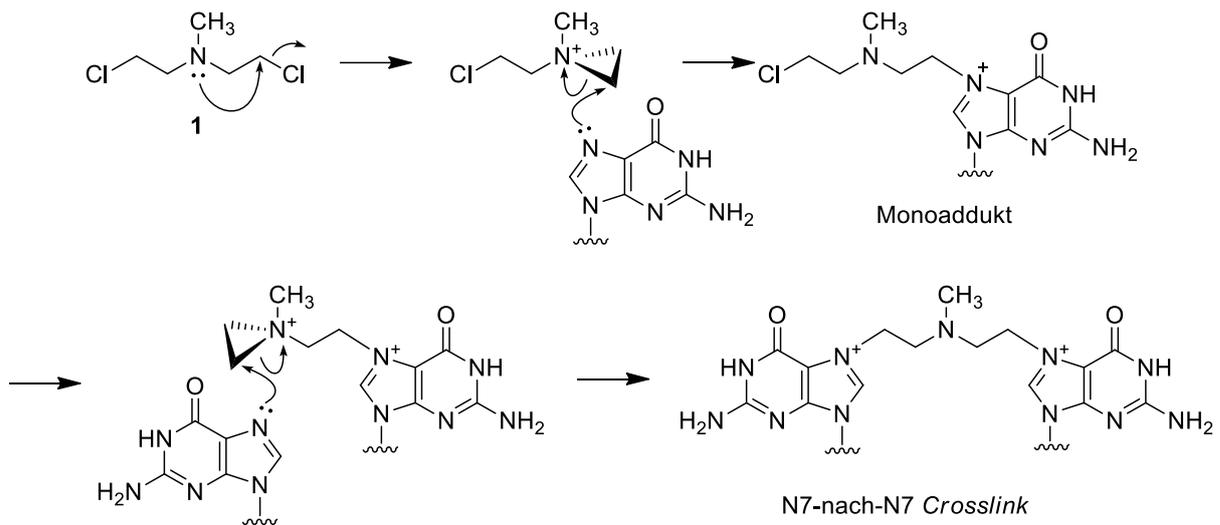


Abbildung 2: Alkylierung von Guanodin an N7-Position durch Mechlorethamin 1.<sup>[11]</sup>

### 1.1.3. *cis*-Platin

Ein weiterer in der Krebstherapie verbreiteter Wirkstoff ist *cis*-Platin 2. Nach Aufnahme in Zellen wird zunächst ein Chloratom mit einem Wassermolekül ersetzt. Erst diese Form 3 reagiert weiter mit den Nucleobasen der DNA (Abbildung 3). Zwar greift *cis*-Platin ebenso RNA und Proteine an, jedoch hat es eine deutlich höhere Affinität zu DNA.<sup>[12]</sup> Die Alkylierung erfolgt vorrangig innerhalb eines Strangs an der N7-Position von benachbarten Guanosinen oder Guanodin-Adenosin-Paaren, während die Verknüpfung zweier gepaarter DNA-Stränge nur zu 2–3 % auftritt.<sup>[13]</sup> Auch das *trans*-Isomer ist in der Lage mit DNA zu reagieren, kann aufgrund der Geometrie jedoch keine Nucleobasen desselben Strangs verknüpfen, weshalb es in der Krebstherapie keine Anwendung findet.

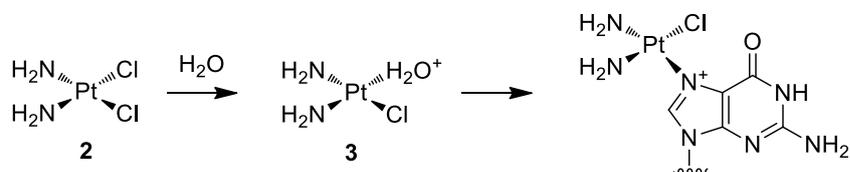


Abbildung 3: Reaktion des *cis*-Platins mit Wasser zum Aquakomplex und Reaktion mit Guanodin.

Durch die Verknüpfung mit *cis*-Platin ändert sich die Struktur des DNA-Duplexes, sodass ein Knick entsteht und es zur Entwindung des Duplexes kommt. Dies führt zur Inhibition der DNA-Replikation, denn der Strang kann an der alkylierten Position meist nicht mehr von der Polymerase abgelesen werden.<sup>[14]</sup> Ebenso verhält es sich mit der Transkription, die ebenfalls an der alkylierten Position abbricht.<sup>[15]</sup> Eine wichtige Rolle für das Wachstum von Krebszellen spielt die Telomerase, welche durch Verlängerung der Telomere die dauerhafte Teilung der Krebszellen

## 1. Einleitung

---

ermöglicht. In Zellexperimenten konnte gezeigt werden, dass auch die Aktivität der Telomerase schon bei niedriger *cis*-Platin Dosierung inhibiert wird.<sup>[16]</sup> Zellen haben jedoch auch die Fähigkeit, die alkylierte DNA durch Nukleotidexzisionsreparatur wiederherzustellen, indem der defekte Basenabschnitt herausgeschnitten und durch einen neu synthetisierten Strang ersetzt wird.<sup>[12]</sup>

### 1.1.4. Durch $^1\text{O}_2$ aktiviertes Furan

Eine neue Methode zur Bildung eines Alkylans wurde in der Gruppe von Annemieke Madder entwickelt. Hierbei wird der Ring eines Furans oxidativ geöffnet, sodass sich das 4-Oxo-enal **4** bildet. Dieser Michael-Akzeptor reagiert aufgrund seiner Struktur mit Adenin und Cytosin (Abbildung 4). Zum Start der Reaktion wurde zunächst *N*-Bromsuccinimid (NBS) als Oxidationsmittel verwendet.<sup>[17]</sup> Mit biologischen Systemen kompatibler sind die in nachfolgenden Experimenten verwendeten Photosensibilisatoren Bengalrosa und Methylenblau, die nach Bestrahlung mit grünem bzw. rotem Licht Singulett-Sauerstoff für die Oxidation generieren.<sup>[18]</sup> Für das *Crosslinking* von zwei DNA-Strängen wurde ein Thymidin-Phosphoramidit synthetisiert, das an 2'-Position über einen *Linker* das Furan enthält, sodass durch automatische Festphasensynthese leicht Furan-modifizierte Oligomere **5** hergestellt werden konnten. Effektives *Crosslinking* nach NBS-Aktivierung erfolgte jedoch nur, wenn im komplementären Strang Cytosin dem Furan gegenüberstand.<sup>[19]</sup> In geringer Ausbeute wurden auch Adenosin Addukte nachgewiesen, die jedoch thermisch nicht stabil waren.

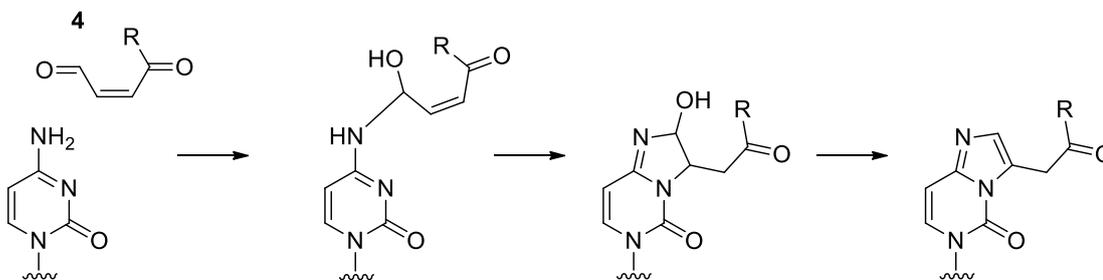
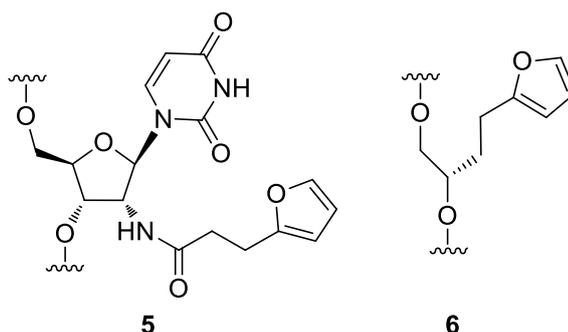


Abbildung 4: Alkylierung von Cytidin durch das aus dem Furan gebildete 4-Oxo-enal **4**.<sup>[19]</sup>

In einer Weiterentwicklung des Furan-Phosphoramidits (Verbindung **6**) wurde vollständig auf Nukleobase und Ribose verzichtet. Die erhöhte Flexibilität führte zu einer deutlich niedrigeren Schmelztemperatur ( $\Delta = -17$  bis  $-37$  °C), aber gleichzeitig auch zu höheren Ausbeuten von bis zu 49 % mit Adenin und 73 % mit Cytosin (Abbildung 5).

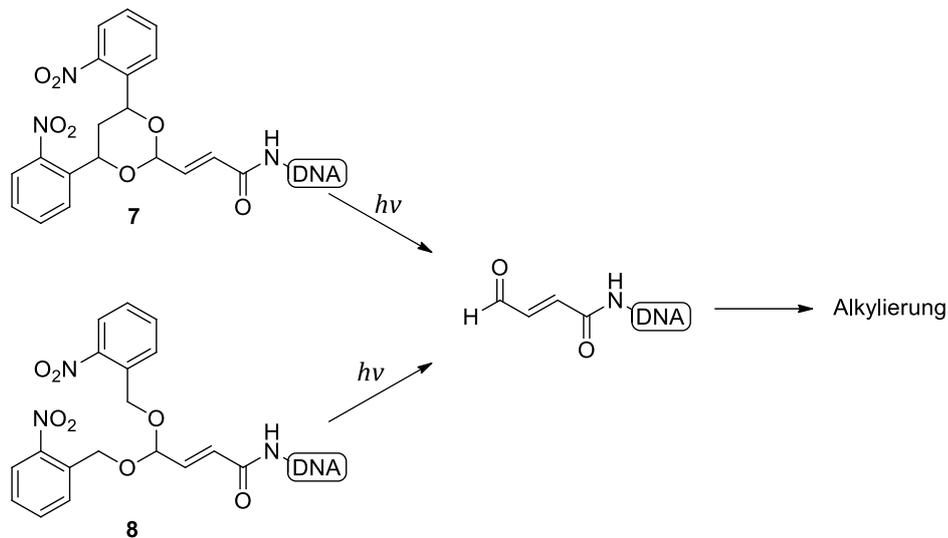


**Abbildung 5:** Mit Furan modifiziertes Uridin **5** und internes Furan **6** ohne Nucleobase.

Neben DNA-Oligomeren ließ sich auch 2'-O-Methyl-RNA mit den Furan-Thymidin-Phosphoramidit herstellen, die mit komplementärer RNA eine ähnliche Erniedrigung der Schmelztemperatur besaß (82 °C für den unmodifizierten Duplex und 51 °C für den Furan-modifizierten). Zudem konnte mit dem RNA-Duplex Ausbeuten von bis 42 % erreicht werden, während beim analogen DNA-Duplex nur 26 % erzielt wurde.<sup>[20]</sup> Zuletzt wurden auch Furan-Monomere für Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) entwickelt. Der Einbau des Furans hatte dabei kaum Einfluss auf den Schmelzpunkt des PNA-DNA Duplexes.<sup>[21]</sup>

### 1.1.5. Photolabil geschütztes 4-Oxo-enal

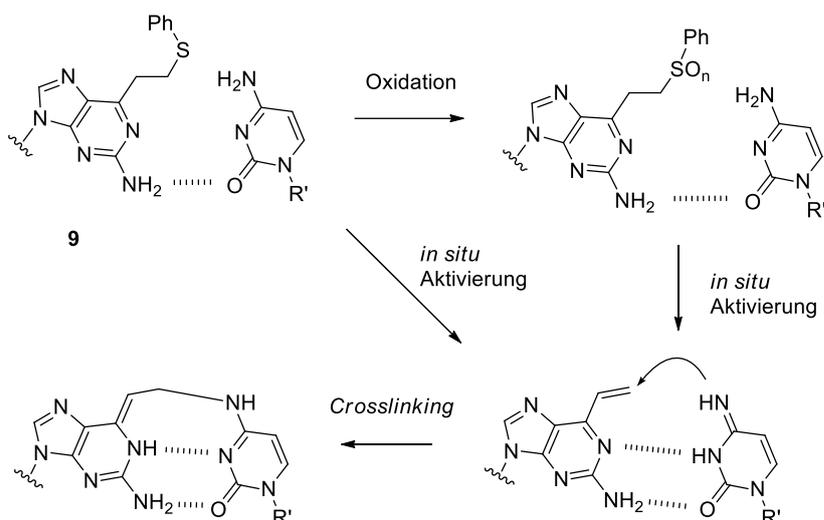
Ähnlich zu Madder wurde auch in der Gruppe von Tang ein 4-Oxo-enal zur Alkylierung von Nucleobasen entwickelt.<sup>[22]</sup> Um unselektive Reaktionen zu verhindern wurde das Aldehyd als Acetal mit *o*-Nitrobenzylgruppen in Form von Verbindung **7** oder **8** geschützt, welche sich durch Bestrahlung mit Licht (365 nm) abspalten lassen (Abbildung 6). Dieser Baustein wurde an das 5'-Ende von DNA platziert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Madder konnte das freigesetzte 4-Oxo-enal alle Nucleobasen alkylieren, hatte jedoch eine deutliche Präferenz zu T und G. Zudem war die Reaktion stark vom pH-Wert abhängig: Während bei pH 9 die höchste Ausbeute und schnellste Kinetik gemessen wurde, kommt es bei pH 5 zu keinem *Crosslinking*. Bei pH 7 konnten nach 72 h *in vitro Crosslinking*-Ausbeuten von bis zu 45 % zwischen zwei DNA-Strängen erreicht werden.



**Abbildung 6:** Photolytische Abspaltung der *o*-Nitrobenzylgruppen den reaktiven Aldehyd frei.<sup>[22]</sup>

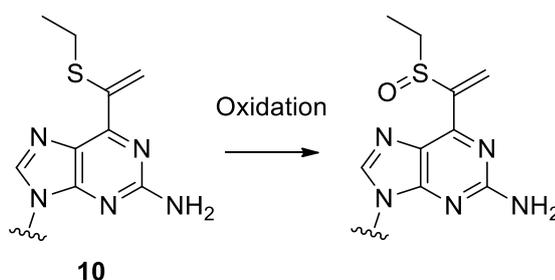
### 1.1.6. 2-Amino-6-vinylpurin

Von Nagatsugi *et al.* wurde eine künstliche Nukleobase **9** entwickelt, die mit Cytidin Basenpaarung eingehen kann und eine Vinylgruppe als Michael-Akzeptor enthält, die mit dem exozyklischen Amin des Cytidins reagieren kann.<sup>[23]</sup> Daneben können aber auch andere Nukleophile wie Cystein oder Anilin alkyliert werden. Damit die Reaktion nicht spontan und unspezifisch verläuft, ist die Vinylfunktion zunächst geschützt.<sup>[24,25]</sup> Hierfür wurden verschiedene Systeme entwickelt. So kann die Schützung durch ein Sulfid erfolgen, welches allein durch Hybridisierung mit Cytidin zum Vinyl-Derivat zerfällt (Abbildung 7)<sup>[25]</sup>, was auch in Zelllysat stattfindet<sup>[24]</sup>. Auch die vorherige Oxidation zum Sulfoxid ist möglich, was die Reaktivität und Ausbeute der Alkylierung deutlich erhöht. So konnten mit allen Nukleobasen *Crosslinks* in folgender Reaktivitätsreihenfolge erhalten werden: C>G>A>>T. Durch Anbringen einer 2'-O-Methyl-Gruppe ändert sich die Selektivität, sodass bevorzugt Thymidin alkyliert wird. Zudem besteht eine pH-Wert-Abhängigkeit: Bei pH 5.0 kann dC noch in hohen Ausbeuten alkyliert werden, bei pH 7.0 kaum mehr.<sup>[26]</sup> Die unterschiedliche Nukleobasen-Selektivität wird auf die Veränderung der Duplexstruktur zurückgeführt. So hat sich bei einem Screening gezeigt, dass die Sequenz „CUG“ am besten zur Alkylierung von Uracil geeignet ist.<sup>[27]</sup> Ein Antisense-Oligonukleotid, das gegen die mRNA von Luciferase gerichtet war, konnte die Translation nach dem *Crosslinking* deutlich unterdrücken, während ohne Alkylans die Proteinexpression selbst bei hohen Konzentrationen nur gering gehemmt wurde.



**Abbildung 7:** Aktivierungs-Mechanismus des geschützten 2-Amino-6-vinylpurins **9** und Alkylierung von Cytidin ( $n = 1$  oder  $2$ ).<sup>[24]</sup>

Neben der Schützung als Sulfid wurde auch ein Cytidin-selektives Ethylsulfanylvinyl-Derivat **10** hergestellt. Dieses zerfällt nicht spontan bei Basenpaarung, sondern bedarf der vorherigen Aktivierung durch Oxidation, was in Zellen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  oder  $\cdot\text{OH}$  aus biologischen Prozessen geschehen kann (Abbildung 8).<sup>[28]</sup> Durch den +I-Effekt des Sulfids ist die Vinylgruppe zunächst unreaktiv. Erst nach der Umwandlung zum Sulfoxid wird durch den -I-Effekt die Reaktivität stark gesteigert. So weit, dass dieses Derivat reaktiver ist, als die Verbindung ohne Sulfoxid und innerhalb von 1 h *in vivo* zu einer Alkylierungsausbeute von 80 % zwischen RNA und 2'-O-Methyl-RNA führte.



**Abbildung 8:** Aktivierung des 2-Amino-6-(1-ethylthiovinyl)purins durch Oxidation.<sup>[28]</sup>

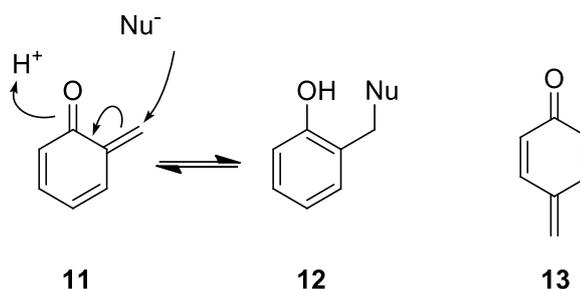
### 1.1.7. Chinonmethide

Chinonmethide (engl. *quinone methides*) sind Michael-Akzeptoren, die nach nukleophilem Angriff zu substituierten Phenolen, wie Verbindung **12**, reagieren (Abbildung 9). Aufgrund der Enon Struktur von *ortho*-Chinonmethiden (Verbindung **11**) ist eine weitere Möglichkeit auch die Reaktion in einer [4+2]-Cycloaddition.<sup>[29]</sup> Ihre hohe Elektrophilie lässt sich mit dem Energiegewinn der Rearomatisierung erklären, die bei anderen Michael-Akzeptoren nicht

## 1. Einleitung

---

vorhanden ist. Jedoch kann die Alkylierung auch reversibel sein, wenn das Nukleophil eine gute Abgangsgruppe bildet, sodass erneut ein Chinonmethid generiert wird.<sup>[30]</sup> Aufgrund der hohen Reaktivität muss das Chinonmethid *in situ* gebildet werden, wenn es zur Alkylierung von Nucleobase verwendet werden soll. Hier sind Oxidation<sup>[31]</sup>, Reduktion<sup>[32]</sup>, sowie photochemische<sup>[33]</sup> und fluoridinduzierte<sup>[34]</sup> Generierung möglich. Zum Beispiel können quartäre Ammoniumsalze verwendet werden, um durch Laser-Photolyse Chinonmethide zu bilden. Des Weiteren sind auch Ester und tertiäre Amine gute Abgangsgruppen für die spontane Bildung von Chinonmethiden. Außer mit Nucleobasen reagieren Chinonmethide auch mit anderen biologisch relevanten Molekülen, wie z.B. Aminosäuren.<sup>[33]</sup>

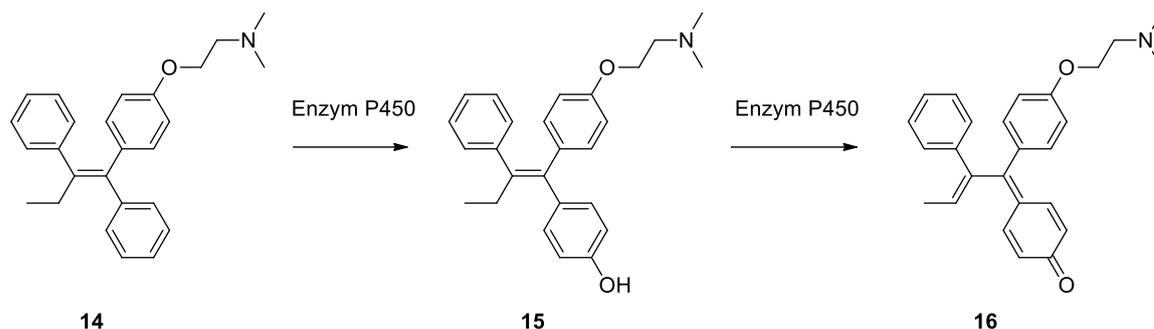


**Abbildung 9:** Reaktion eines *ortho*-Chinonmethids **11** mit einem Nukleophil (Nu<sup>-</sup>) und *para*-Chinonmethid **13**.

Chinonmethide sind in der Regel sehr reaktiv aufgrund ihrer elektronischen Eigenschaften und nicht isolierbar, sie können aber mit sterisch anspruchsvollen Gruppen stabilisiert werden. So kann das Chinonmethid von BHT durch PbO<sub>2</sub> in einer wässrigen Lösung generiert werden, ist bei niedriger Temperatur lagerbar und hat eine Halbwertszeit von 51 min in Phosphatpuffer bei pH 7.4.<sup>[35]</sup> Ebenso kann die Halbwertszeit durch eine Vergrößerung des konjugierten Systems verlängert werden. Trotz ihrer hohen Reaktivität sind auch in Naturstoffen Chinonmethid-Strukturen zu finden, wie bspw. Celastrol, dem eine Wirkung gegen Krebs nachgewiesen wurde.<sup>[36][37]</sup>

In biologischen Systemen können Chinonmethide als Produkt des Stoffwechsels entstehen. So kann Eugenol durch Oxidation ein Chinonmethid bilden, was wahrscheinlich der Grund für seine pro- und antioxidativen Eigenschaften ist.<sup>[38]</sup> Bei verschiedenen Arzneistoffen, wie bspw. Nevirapin, Tamoxifen oder Raloxifen, kann dies nach enzymatischer Umwandlung oder durch Oxidation geschehen.<sup>[38]</sup> Das Chinonmethid **16** des Tamoxifens **14** besitzen mit zwei Phenylringen und einer Vinylgruppe ein großes konjugiertes Elektronensystem, das zu einer vergleichsweise hohen Halbwertszeit von 3 h in Phosphatpuffer führt (Abbildung 10).<sup>[39]</sup>

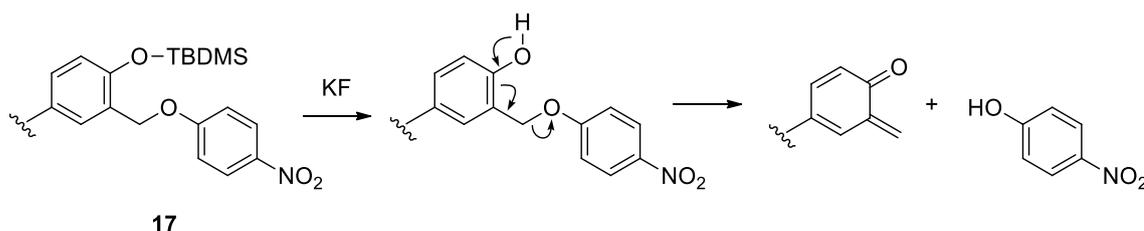
## 1. Einleitung



**Abbildung 10:** Enzymatische Bildung eines *para*-Chinonmethids aus Tamoxifen durch Cytochrom P450.<sup>[38]</sup>

Aufgrund dessen können sie vom Entstehungsort zu anderen Zellen diffundieren und dort DNA Schäden durch Alkylierung erzeugen, welche in Form von Addukten mit Desoxyguanosin nachgewiesen werden konnten.<sup>[40]</sup> Durch andere Nucleophile kann die Reaktivität jedoch begrenzt werden, so sinkt bei Reaktion mit 50 mM Glutathion die Halbwertszeit auf nur noch 3.9 min.<sup>[39]</sup>

Vor allem in der Arbeitsgruppe von Steven Rokita wurde intensiv an der Erforschung der Alkylierung von Nucleobasen durch Chinonmethide gearbeitet. Seine erste Veröffentlichung zu diesem Thema befasste sich mit der Alkylierung von DNA durch einen komplementären DNA-Strang, der am 5'-Ende einen Chinonmethide-Präkursor **17** trug.<sup>[41]</sup> Dessen phenolische Hydroxygruppe war durch eine *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe (TBDMS) geschützt und in Benzylposition fand sich *para*-Nitrophenol als Abgangsgruppe (Abbildung 11). Die Zugabe von Kaliumfluorid (KF) startete die Reaktion, wodurch die TBDMS-Gruppe abgespalten wurde, das Chinonmethid sich spontan bildete und den komplementären Strang alkylierte.

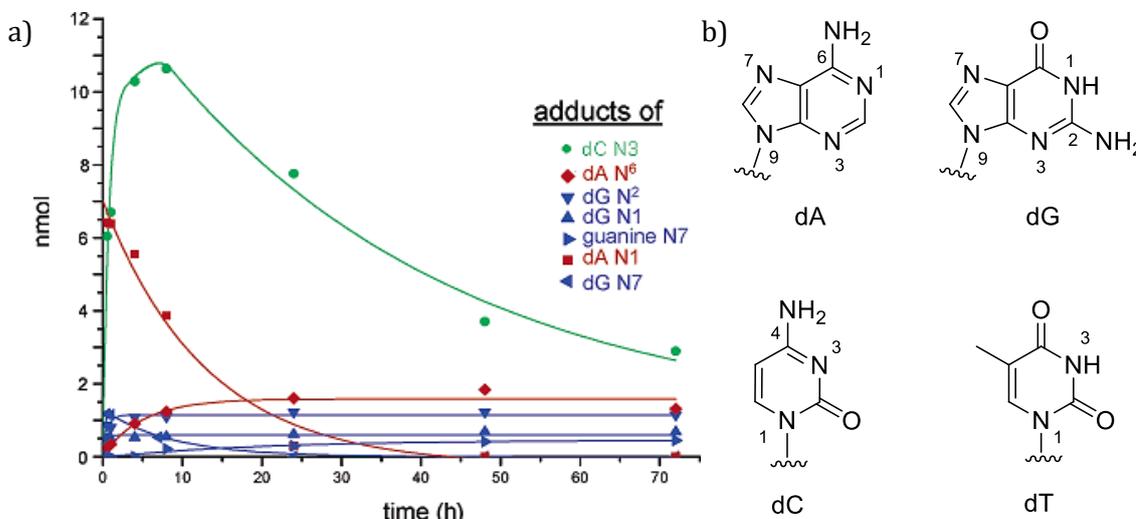


**Abbildung 11:** Bildung des Chinonmethids nach Aktivierung des Präkursors mit KF.<sup>[41]</sup>

Weiterführende Arbeiten untersuchten die Nucleobasenaffinität, Regioselektivität und Reversibilität der Alkylierung. So kam es bei der Reaktion des Chinonmethids mit einer äquimolaren Mischung aus den Desoxybasen dC, dG, T und dA nach 24 h bei 37 °C zu keiner Alkylierung von T.<sup>[42]</sup> Die höchste Affinität wurde zu dC gemessen, danach folgten dG und dA (6200, 520, 210 relative Reaktivität). Der gleiche Trend zeichnete sich bei ssDNA ab, während bei dsDNA dG überwiegt (dC 1.7, dG 19, dA 1.0).<sup>[42]</sup>

## 1. Einleitung

Dies zeigte jedoch nur eine Momentaufnahme der reversiblen Alkylierung, ein exakteres Bild lieferte die zeitabhängige Untersuchung (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** a) Konzentrationen der gebildeten Addukte bei der Alkylierung einer Mischung aller Desoxynucleoside durch ein *ortho*-Chinonmethid in zeitlicher Abhängigkeit. Nachdruck mit Genehmigung. Copyright 2005 American Chemical Society.<sup>[43]</sup> b) Nucleobasen mit Nummerierung der Stickstoffe.

Hier wird deutlich, dass dC N3 eine sehr hohe Reaktivität besitzt, das Addukt aber nicht stabil ist und wieder zerfällt. Neben der Alkylierung an der N3-Position konnte zudem kein weiteres dC Addukt detektiert werden. dA N1 ist zunächst ähnlich reaktiv, das Addukt zerfällt jedoch ebenso schnell. dA besitzt jedoch mit N<sup>6</sup> noch eine weitere Position für Alkylierung, die ein stabiles Addukt bildet. Dieses Addukt nimmt nach einiger Zeit auch den größten Anteil ein, während das dA N1 Addukt wieder vollständig zerfällt.<sup>[43]</sup>

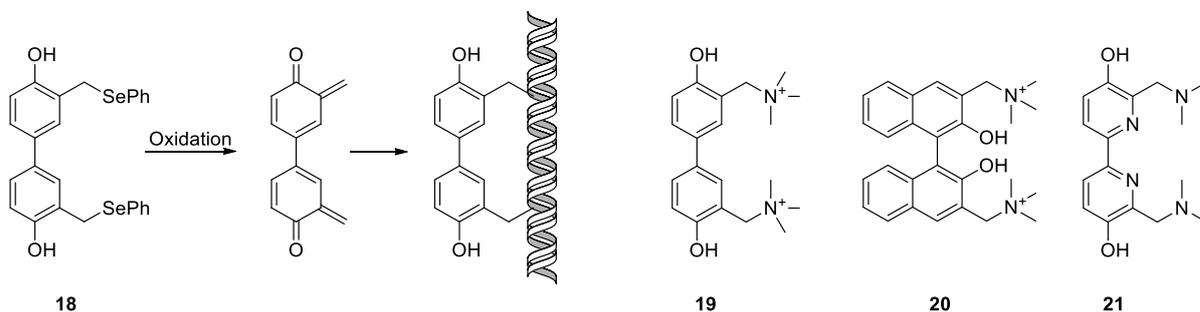
Neben DNA-Konjugaten wurden auch Konjugate aus PNA und Chinonmethid untersucht.<sup>[44]</sup> Gepaart mit DNA konnten hier Alkylierungsausbeuten von 70 % bei 1.1 äq. Konjugat erreicht werden, wenn der TBDMS geschützte Chinonmethid-Präkursor mit KF aktiviert wurde. Aufgrund der Reversibilität wurde auch untersucht, wie effektiv ein Selbstaddukt ist, bei dem das Chinonmethid eine Nucleobase der PNA alkyliert hat. Hierfür wurde das PNA-Konjugat zunächst mit KF aktiviert und das Selbstaddukt mittels RP-HPLC isoliert. Dieses konnte durch die Reversibilität noch eine *Crosslinking*-Ausbeute von 40 % erreichen, mit längerer Lagerzeit sank die Ausbeute jedoch bis auf 20 % nach 168 Stunden. Dies lag an der Bildung von irreversiblen Selbstaddukten, die Reaktion mit Wasser zu Wasseraddukten machten nur einen geringen Teil aus.

Weiter wurde von Rokita gezeigt, wie wichtig die elektronischen Eigenschaften des Benzolrings sind und dass durch unterschiedliche Substituenten die Reaktivität des Chinonmethids und die Reversibilität der Addukte verändert werden kann. Ein elektronenreicher Aromat (Methylgruppe in *meta*-Position zum Phenol) erhöht die Geschwindigkeit der Adduktbildung, jedoch zerfällt das Addukt ebenfalls schneller. Elektronenarme Aromaten (COOEt-Gruppe in *meta*-Position zum

## 1. Einleitung

Phenol) zeigen das gegenteilige Verhalten, die Adduktbildung verläuft langsamer, jedoch ist das Addukt stabiler.<sup>[45]</sup> Bei einer Reaktion von dC mit einer Mischung dieser Chinonmethide dominierte somit zuerst das Addukt mit dem elektronenreichen Derivat, das sich recht schnell in das unsubstituierte Addukt umwandelte und schließlich in das Addukt mit dem elektronenarmen Derivat. Auch an einem DNA-Konjugat konnte gezeigt werden, dass mit einem elektronenreichen Chinonmethid die Bildung des Selbstaddukts um das 12-fache beschleunigt wurde.<sup>[46]</sup>

Neben diesen simplen Chinonmethiden gibt es noch Derivate, die aus mehreren Ringsystemen bestehen und ohne die Verbindung zu einem Oligonukleotid unselektiv Nucleobasen alkylieren oder zum *Crosslinking* von Duplexe führen.



**Abbildung 13:** Bildung eines Chinonmethids aus einem Phenylselenid-Derivat und weitere auf mehreren (Hetero)-Aromaten basierende Chinonmethid-Präkursoren.

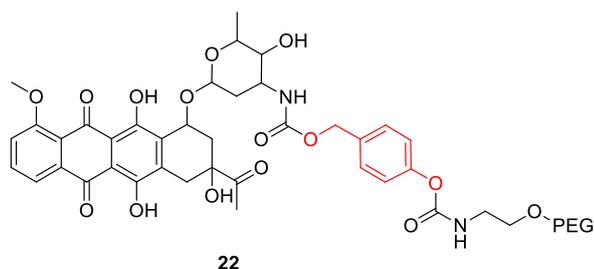
Ein mit Phenylselenid in Benzylposition versehener Chinonmethid-Präkursor **18** kann durch Oxidation mit  $\text{NaIO}_4$  oder Bestrahlung aktiviert werden und dabei Alkylierungs-Ausbeuten von bis 80 % zu erreichen.<sup>[47]</sup> Sehr effektiv sind auch das ähnliche quartäre Ammonium Derivat **19**<sup>[48]</sup>, das BINOL Derivat **20**<sup>[49]</sup> oder Heteroaromaten wie Bipyridin **21** (Abbildung 13).<sup>[50]</sup>

### 1.1.8. Chinonmethide als selbstzerlegende *Linker*

Eine weitere Anwendung von Chinonmethiden ist der Einsatz als selbstzerlegende *Linker* (*self-immolative linker*). Dafür wird die Abgangsgruppe in Benzyl-Position durch ein Molekül ersetzt, das freigesetzt werden soll. Auf welche Art die Freisetzung ausgelöst wird, wird über eine Schutzgruppe am Phenol bestimmt. Der *Linker* sitzt somit zwischen freizusetzendem Molekül und der eigentlichen Schutzgruppe, was mehr Kontrolle über die Freisetzung ermöglicht. Wenn das Molekül oder die Schutzgruppe beispielsweise sterisch sehr anspruchsvoll sind, kann der *Linker* den Abstand vergrößern, um die Freisetzungskinetik zu verbessern.<sup>[51]</sup> Eine interessante Anwendung ist daher die Modifikation von Arzneimitteln zur Verbesserung des Wirkstoffprofils und der zeitlichen Freisetzung (Abbildung 14).

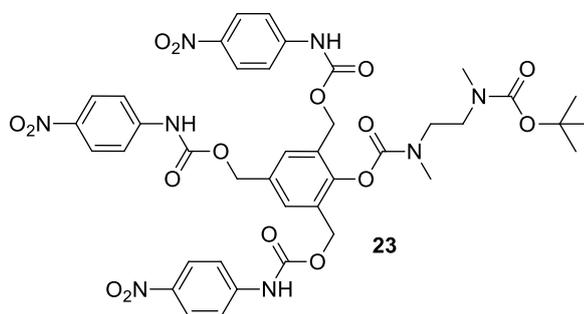
## 1. Einleitung

---



**Abbildung 14:** Daunorubicin *Prodrug* **22**, dessen Freisetzung enzymatisch in Ratten-Plasma erfolgt.<sup>[52]</sup>

Anstelle des Phenols können auch die entsprechenden Anilinderivate genutzt werden, wobei das gebildete Iminochinonmethid nicht zelltoxisch wirkt.<sup>[53]</sup> Wie auch bei der Alkylierung steuern Variationen der Ring-Substituenten die Halbwertszeit der Freisetzung.<sup>[54]</sup> Es ist auch möglich mehrere *Linker* zu kombinieren: So lässt sich durch Veränderung der Kettenlänge von linearen Polymeren die Freisetzungskinetik modulieren<sup>[55]</sup> oder mit einer dendritischen Struktur durch eine Schutzgruppe gleichzeitig auch mehrere Moleküle freisetzen. Handelt es sich hierbei um Reportermoleküle, wie bspw. Fluorophore führt dies so zu einer Signalverstärkung. Dabei können die *Linker* neben der verzweigten Struktur auch in Reihe aufgebaut werden. De Groot *et al.* beschrieben als erste ein solches System, dass nach Reduktion eines Nitrobenzols zum Anilin ein Iminochinonmethid bildet und vier Moleküle Paclitaxel freisetzt.<sup>[56]</sup> In Reihe angeordnete *Linker* ermöglichten außerdem die Freisetzung einer hohen lokalen Konzentrationen von Iminochinonmethiden, die mit den Aminosäuren eines Proteins reagieren können und somit dieses mit einem fluoreszierenden Anilin markieren.<sup>[57]</sup> An Dendrimeren basierend auf Phenol konnte von Haba *et al.* gezeigt werden, dass mit einer Schutzgruppe drei, über *para*- und *ortho*-Benzylgruppen verbundene, Moleküle freigesetzt werden können (Abbildung 15).<sup>[58]</sup> Dies geschieht schrittweise, wobei sich zuerst das *para*-Chinonmethid bildet, mit Wasser abreagiert und anschließend die beiden *ortho*-Positionen.



**Abbildung 15:** Das Dendrimer **23** ermöglicht die Freisetzung von drei *p*-Nitroanilinen nach Zugabe von HCl. <sup>[58]</sup>

Als „selbsterlegende Chemosensoren“ wurden *Linker* entwickelt, die durch unterschiedliche Schutzgruppen mit ausgewählten Molekülen reagieren und Reportermoleküle freisetzen können. Die auch von Rokita verwendete TBDMS-Schutzgruppe reagiert mit Fluorid und eignet sich daher für dessen Nachweis. Dies verwendete Kim *et al.* um ein Fluorophor freizusetzen, sodass

## 1. Einleitung

Fluoridkonzentrationen im mikromolaren Bereich detektiert werden konnten.<sup>[59]</sup> Ein weiteres Beispiel ist die Phenylboronatgruppe, welche in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{ONOO}^-$  zu Phenol oxidiert wird und so die Detektion dieser Spezies in Zellen ermöglicht.<sup>[60]</sup> Durch einen Phosphatester am Phenol kann die Entschützung enzymatisch durch die alkalische Phosphatase ablaufen.<sup>[61]</sup> Bei 10 mM Substrat und 1.0 U/mL alkalischer Phosphatase war die Reaktion nach 20 min vollständig. Auf eine andere Art funktioniert die Detektion von Tyrosinase: 3-Hydroxybenzyl kann in Zellen von Tyrosinase zu 3,4-Dihydroxybenzyl umgesetzt werden, welches wiederum ein Chinonmethid bildet.<sup>[62]</sup> Die Entschützung erfolgt damit erst nach enzymatischer Umsetzung, da der phenolische Sauerstoff erst enzymatisch eingeführt werden muss.

## 1.2. Post-transkriptionelle Genregulation durch Argonautenproteine

### 1.2.1. miRNA

Dass RNA in Form von mRNA die Biosynthese von Aminosäure steuert, ist hinreichend bekannt. Aber erst durch präzisere analytische Methoden konnten RNAs entdeckt und erforscht werden, die aus kurzen Sequenzen bestehen und keine Rolle in der Translation spielen. MicroRNA (miRNA) und *small interfering RNA* (siRNA) gehören zu den *small non-coding RNAs*, welche wichtige Rollen bei der post-transkriptionellen Regulation spielen. MiRNAs haben eine Länge von 21–25 Nukleotiden und sind das Produkt mehrerer Prozessierungsschritte. Zunächst erfolgt im Zellkern die Transkription des für die miRNA codierenden Gens zur „pri-miRNA“, welche eine Haarnadelstruktur aufweist (Abbildung 16). Nach der Spaltung durch die Endonuklease Drosha zur „pre-miRNA“ gelangt diese durch das Protein Exportin-5 in das Cytoplasma. Dort wird im letzten Schritt durch die Endonuklease Dicer die Schleife gespalten und es entsteht ein miRNA-Duplex. Einer der Stränge wird anschließend in den „miRNA-induced silencing complexe“ (miRISC bzw. RISC) geladen, der aus miRNA und Argonautenprotein besteht. Welcher der Einzelstränge verwendet wird, ist unter anderem sequenzspezifisch.<sup>[63]</sup>

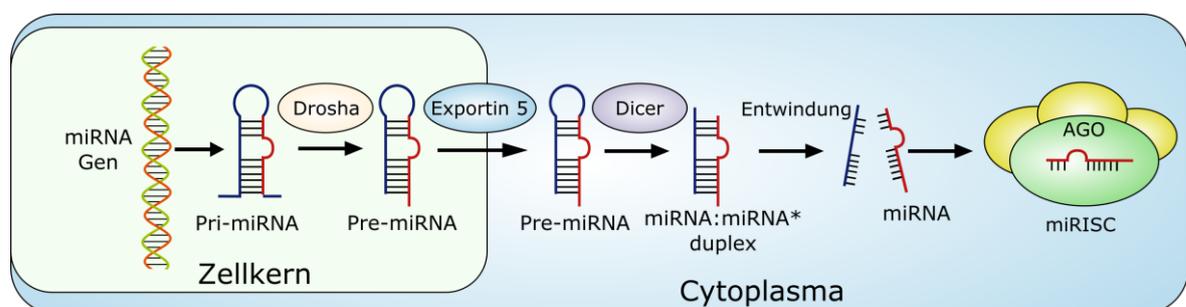
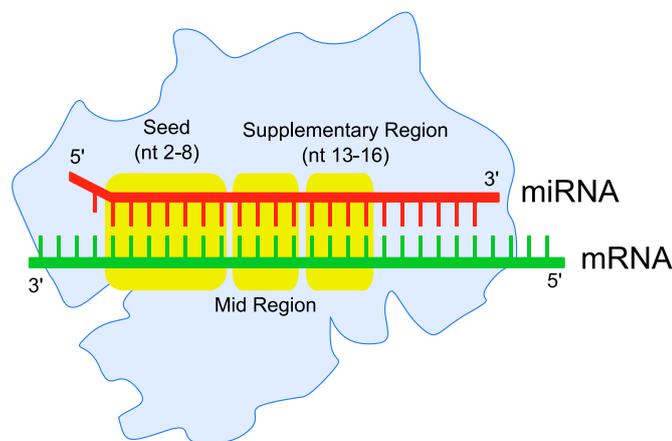


Abbildung 16: Bildung des miRNA-RISCs.<sup>[64]</sup>

## 1. Einleitung

---

Die Aufgabe der miRNA im RISC ist die Erkennung der Ziel-mRNA, während das Argonautenprotein die Repression vermittelt. Die Nukleobasen 2–8 der miRNA sind besonders wichtig für die mRNA-Erkennung und werden *Seed-Region* genannt (Abbildung 17). Nur bei vollständig komplementärer *Seed-Region* wird die entsprechende mRNA als Ziel akzeptiert. Leichte Variationen beim Prozessieren der miRNA durch Drosha oder Dicer lassen „Isomirs“ entstehen, bei denen Nukleotide am 5'- oder 3'-Ende fehlen oder zusätzlich sind.<sup>[65]</sup> Tritt die Veränderung am 5'-Ende auf, verschiebt sich auch die *Seed-Region* und andere mRNAs werden erkannt. Veränderungen am 3'-Ende beeinflussen die Basenpaarung in der *Supplementary-Region* und können Einfluss auf die Aktivität haben.

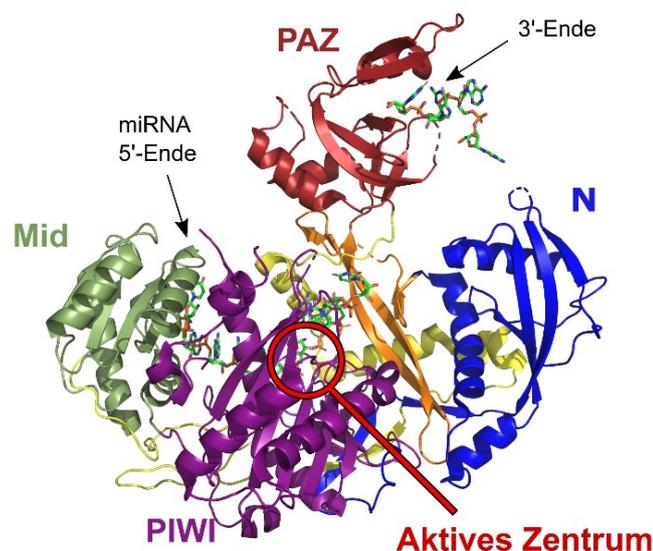


**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des RISC mit Einteilung der miRNA-Abschnitte in *Seed*, *Mid* und *supplementary Region* <sup>[66]</sup>

Das Auftreten von Isoformen ist von der miRNA abhängig. Während einige miRNA keine Isoform haben, treten sie bei anderen Sequenzen zahlreich auf.<sup>[67]</sup> Die Veränderung der *Seed-Region* kann auch durch *RNA-Editing* geschehen, bei dem bspw. Adenosin in Inosin oder Cytidin in Uridin umgewandelt wird und somit zu anderer Basenpaarung führt.<sup>[68]</sup> Des Weiteren kann miRNA auch aus den Introns entstehen, die während der mRNA-Prozessierung herausgespleißt werden und wird dann als *mirtron* bezeichnet.<sup>[69]</sup> Neben den intrazellulären miRNAs verlassen auch einige die Ausgangszelle und werden von anderen Zellen wieder aufgenommen, um dort die Genexpression zu regulieren. Sie können damit die Aufgabe von interzelluläre Signalmolekülen übernehmen.<sup>[70]</sup> MiRNAs haben eine Stabilität im Bereich von Minuten bis Tagen, abhängig unter anderem von der miRNA-Sequenz, ihrer Familie und dem Gewebe, in dem sie vorkommen.<sup>[71]</sup> Trotz des Vorhandenseins von RNAsen ist miRNA im Blut stabil. Mehrere Erklärungen sind hier für möglich: So könnte die miRNA in Exosomen oder in Komplexen mit Proteinen eingeschlossen sein, um den Abbau zu verhindern.<sup>[72]</sup>

### 1.2.2. Argonautenproteine

Die Argonautenproteine wurden erstmals 1998 bei Erforschung der Pflanze *Arabidopsis thaliana* entdeckt.<sup>[73]</sup> Bei einer Mutation der das Protein Argonaut 1 (AGO1) codierenden Sequenz wurde eine Veränderung der Blätterform beobachtet, die Bohmert *et al.* an die Form der Argonauten Tintenfische erinnerte. Durch Abgleich der Aminosäuresequenz wurde festgestellt, dass diese Proteine nicht nur in Pflanzen vorkommen, sondern von vielen Lebewesen mit Ausnahme von Hefe und Bakterien exprimiert werden und einen wichtigen Teil der post-transkriptionellen Genregulation übernehmen.<sup>[74]</sup> So gibt es bei Säugetieren vier Proteine der Argonautfamilie (AGO1 bis AGO4), die für mRNA-Repression verantwortlich sind, was je nach Protein durch translationale Repression oder Deadenylierung geschieht. Bei AGO2 ist zudem mRNA-Spaltung durch eine RNase-H-ähnliche Domäne (PIWI) möglich. Die Struktur der Proteine lässt sich einteilen in Amino-terminale- (N), PAZ- (PIWI-Argonaut-Zwille), MID- (middle) und PIWI-Domäne, wobei vor allem die PAZ und PIWI Domänen hoch konserviert sind. Die PAZ-Domäne erkennt das 3'-Ende der miRNA durch Interaktion des 3'-Nukleotids mit einem Phenylalanin-Rest und fixiert es in einer speziellen Bindetasche (Abbildung 18).<sup>[75]</sup> Die Phosphatgruppe am 5'-Ende wird in einer tiefen Bindetasche zwischen MID- und PIWI-Domäne gehalten. Daher sind nur die Basenpaare 2–8 für die mRNA Erkennung zuständig, die erste Base wird im Protein von Aminosäureresten abgeschirmt. Die Basenpräferenz kann sich innerhalb der Proteinfamilie unterscheiden, in *Arabidopsis thaliana* bindet AGO1 vor allem RNAs mit Uridin am 5'-Ende, während AGO2 Adenosin bevorzugt.<sup>[76]</sup> Weitere Aminosäurereste im RISC erfüllen den Zweck, die miRNA bereits in eine helikale Form zu bringen, um schnelle Basenpaarung zu ermöglichen.<sup>[77]</sup>



**Abbildung 18:** Kristallstruktur des hAgo2-Proteins im Komplex mit miRNA-20a.<sup>[78]</sup>

## 1. Einleitung

---

Die Bindung der mRNA erfolgt in mehreren Stufen: von außen sind zunächst nur die Basen 2–6 zugänglich. Bei erfolgreicher Hybridisierung kommt es zur Konformationsänderung der Proteinstruktur: Amino-terminale- and PAZ-Domäne entfernen sich weiter von der MID- und PIWI-Domäne und erlauben so weitere Basenpaarung im zentralen Bereich. Nach der Bindung der mRNA erfolgt die Repression.<sup>[77]</sup> Für die Spaltung durch AGO2 ist vollständige Komplementarität an der Schnittstelle nötig.

Neben der Spaltung der mRNA gibt es noch andere Wege, durch die die Expression unterdrückt wird: Cotranslationaler Abbau von Proteinen, Inhibierung der Elongation, vorzeitige Beendigung der Translation durch Abfallen des Ribosoms und Inhibierung der Initiation der Translation.<sup>[79]</sup> Von Petersen *et al.* wurde untersucht, wie trotz aktiver Translation keine vollständigen Proteine detektiert werden konnten, wenn sich auf einer mRNA eine Bindestelle für miRNAs befand.<sup>[80]</sup> Während die mRNA-Konzentration nur im geringen Maße sank, konnte von Proteinen nur kurze, kurzlebige Peptidketten beobachtet werden. Somit muss die Repression noch vor der vollständigen Translation geschehen, indem das Ribosom von der mRNA abfällt. Im Gegensatz dazu beobachtete Pillai *et al.*, dass in Gegenwart von miRNAs deren Ziel-mRNAs nicht an das Polysom binden, solange die Translation von der Cap-Struktur abhängig ist.<sup>[81]</sup> Des Weiteren kann AGO2 durch eine eIF4E-ähnliche Domäne die Cap-Struktur binden, sodass der eigentlich eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E) kompetitiv gehemmt ist und somit die Translation inhibiert wird. Ebenso kann durch den RISC eine Dissoziation des eIF4A von der mRNA erfolgen, sodass eIF4F nicht mehr bindet.<sup>[82]</sup>

Nicht nur durch den eigentlichen RISC wird Repression ausgeübt, es können noch weitere Proteine rekrutiert werden, die über andere Mechanismen die Translation verhindern. Von Chendrimada *et al.* wurde die Bedeutung des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 6 (eIF6) untersucht, der die Bildung des 80S Ribosoms aus den 60S und 40S Untereinheiten hemmt. Fehlt dieser, verringert sich die Repression durch miRNA.<sup>[83]</sup> Somit scheint es, dass eIF6 von AGO rekrutiert wird, um die Assemblierung des Ribosoms und damit die Translation zu unterdrücken. Neben der RNase-H-ähnlichen Domäne des AGO-Proteins kann der mRNA Abbau auch durch zusätzliche Proteine geschehen.<sup>[84]</sup> Sowohl hAgo1, als auch hAgo2 besitzen eine Bindetasche für das Protein GW182, dessen Bindung vor allem durch zwei Tryptophan-Reste des GW182 vermittelt wird.<sup>[85]</sup> GW182 rekrutiert weitere Proteine: Deadenylase, das Decapping-Enzym DCP2, und diverse Decapping-Aktivatoren, die den mRNA-Abbau auslösen.

Welcher dieser Mechanismen schließlich zur Repression führt, hängt von der Struktur des miRNA-mRNA Duplexes ab.<sup>[86]</sup> So kann dieselbe miRNA die Translation unterdrücken oder mRNA Abbau auslösen, je nach mRNA-Sequenz, in Abhängigkeit der Anzahl, Abstände und Position der Bindungsstellen auf der 3'-UTR.

## 1. Einleitung

Auch Viren haben sich weiterentwickelt, um den miRISC auszunutzen, indem bspw. RNA-Viren eine Bindestelle für miRNA enthalten. Durch die Rekrutierung des miRISC schützt sich das Virus vor Exonukleasen und antiviralen Reaktionen der Zelle.<sup>[87]</sup> Zum Beispiel sorgt das Hepatitis-C-Virus durch die Bindung an miR-122 nicht nur für seinen Schutz, sondern löst damit auch die Derepression von mRNA mit miR-122-Bindestellen aus. Die Tumorsuppressor miRNA wird somit abgefangen und es kommt zu einem erhöhten Krebsrisikos.<sup>[88]</sup>

Zwar ist seit der Entdeckung der Argonautenproteine und Entschlüsselung ihres Wirkmechanismus schon einiges an Zeit vergangen, dennoch werden stetig neue Details und Vorgänge entdeckt. So konnte durch *Crosslinking*-Experimente herausgefunden werden, dass mRNA auch erkannt wird, wenn nur die Hälfte der *seed*-Sequenz bindet, dafür aber in der *supplementary*-Region volle Basenpaarung vorhanden ist.<sup>[65]</sup>

Die *supplementary*-Region spielt auch eine entscheidende Rolle bei der „target RNA-directed miRNA degradation“ (TDMD), bei der mRNAs zum Abbau von miRNA führen (Abbildung 19).<sup>[89]</sup> Durch die Basenpaarung in der *supplementary region* und darüber hinaus kann es zum Freisetzen des 3'-Endes der miRNA vom Protein kommen, wodurch sich N-/PAZ- und MID-/PIWI-Domänen voneinander entfernen. Hierdurch wird der ansonsten abgeschirmte Teil zwischen *seed*- und *supplementary region* freigelegt, unabhängig davon, ob miRNA und mRNA in diesem Bereich hybridisieren. Auch das Entladen der miRNA ist dann möglich. Bei Basenpaarung in der *mid region* ist jedoch die Spaltung der mRNA durch AGO2 wahrscheinlicher. Das freie 3'-Ende der miRNA kann nun enzymatisch verkürzt oder verlängert werden bzw. die miRNA vollständig abgebaut werden. Das freigelegte Argonautenprotein kann dann erneut beladen werden.<sup>[90]</sup>

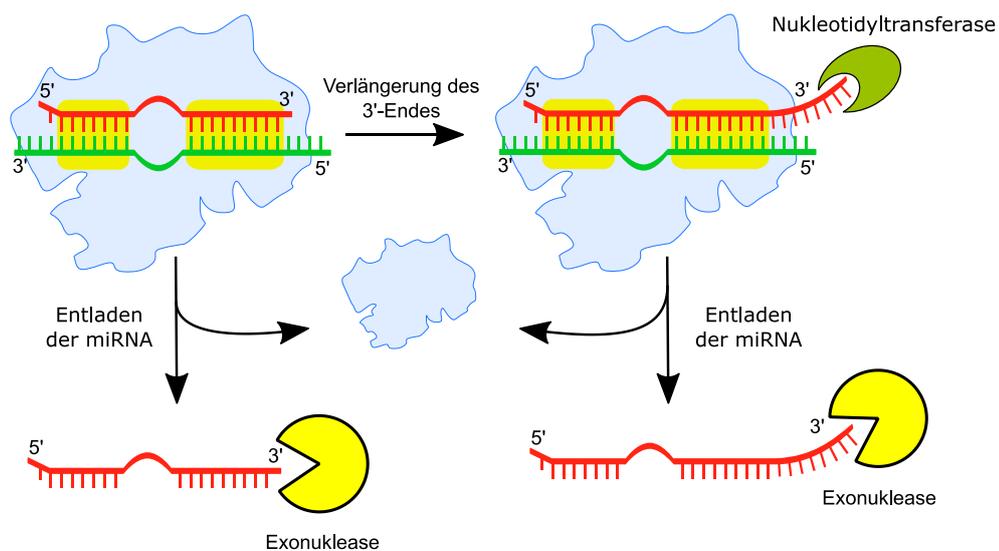


Abbildung 19: Mechanismen der „target-directed miRNA degradation“.<sup>[90]</sup>

### 1.2.3. siRNA

Neben miRNA kann auch die bereits 1998 entdeckte siRNA<sup>[3]</sup> die Genexpression steuern, hier spricht man von RNA-Interferenz (RNAi). Beide RNAs haben eine ähnliche Struktur, siRNA ist ebenfalls eine ca. 21 Nukleobasen lange ssRNA und kann zusammen mit Argonautenproteinen einen siRISC bilden, der post-transkriptionelle Genregulation bewirken, siRNA besitzt jedoch meist einen anderen Ursprung. Anfänglich wurde nur entdeckt, dass siRNA nicht von den Wirtsgenen codiert wird, sondern von viraler Infektion oder anderer äußerer Quelle als ursprünglich längerer RNA-Duplex in die Zelle tritt. Weitere Forschungen zeigten, dass siRNA aber auch endogenen Ursprungs sein kann.<sup>[91]</sup> Die zunächst lange, doppelsträngige und komplementäre RNA wird nach Einbringen in die Zelle durch das Protein Dicer geschnitten. Der kürzere siRNA Duplex wird dann mithilfe des *RISC-loading complex* in das Argonautenprotein geladen. Dort wird der *passenger strand* durch die PIWI-Domäne gespalten und nur der *guide strand* verbleibt im RISC.<sup>[92]</sup> Die mRNA Erkennung erfolgt dann genau wie bei miRNA und bei perfekt komplementären Sequenzen kommt es zur Spaltung durch AGO2. Aufgrund des möglichen exogenen Ursprungs der siRNA kann RNAi als Werkzeug genutzt werden um durch eingebrachte siRNA gezielt mRNA zu spalten und somit einen *Knock-Down* zu bewirken. Besonders Interesse liegt dabei auf der Unterdrückung von Proteinen, die ansonsten keine Bindestelle für Moleküle besitzen und somit nicht durch kompetitive Hemmung zu blockieren sind. Für die Zellpenetration gibt es mehrere Möglichkeiten: So können Polymere wie Chitosan oder Cyclodextrin benutzt werden, um die RNA vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen, indem sie Micellen um die RNA bilden.<sup>[93]</sup> Durch Einbau verschiedener Monomere, wie z.B. Sacharide, kann die Zellaufnahme verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit sind zellpenetrierende Peptide, die mit siRNA und Lipofectamin durch elektrostatische Wechselwirkung einen Komplex bilden, um eine deutlich verbesserte Aufnahme zu erreichen.<sup>[94]</sup> Auch mithilfe von Lipiden lassen sich Micellen oder Liposome bilden, um siRNA einzuschließen<sup>[95]</sup> Kombinationen aus mehreren Methoden sind ebenfalls möglich.

Die Aufnahme in Zellen bedeutet jedoch noch nicht, dass die gewünschte RNA auch effizient herunterreguliert wird.<sup>[96]</sup> Die Bildung von Sekundärstrukturen kann dazu führen, dass manche Sequenzabschnitte nicht zugänglich sind. Zur Optimierung der Sequenz von siRNAs wurden mehrere Computerprogramme entwickelt, die solche Probleme minimieren sollen.<sup>[97]</sup> Ein weiteres Problem ist, dass auch andere, ähnliche Sequenzen durch RNAi gespalten werden können und so *off-target* Effekte auftreten können. Um dem entgegenzuwirken, kann die siRNA 2'-O-Methyl-modifiziert werden, wobei vor allem die Modifikation der zweiten Nukleobase zu einer deutlichen Minderung der Off-Target Effekte führt.<sup>[98]</sup> 2'-O-Methyl-Modifikationen sind zudem nützlich, um das Oligomer vor RNAsen zu schützen. Nachteilig bei *in vivo* Experimenten ist auch die geringe Wirkdauer einer siRNA-Dosis, die in der Regel nur Tage bis Wochen anhält.<sup>[99]</sup>

## 1. Einleitung

---

Zur Verbesserung wurden von Alterman *et al.* zwei gleiche siRNAs am 3'-Ende durch einen *Linker* verbunden.<sup>[100]</sup> Die so erhaltene „divalente siRNA“ konnte in Mäuse- und Primatenexperimenten die Synthese des Huntingtin-Proteins für mindestens 6 Monate nach Injektion ins Gehirn unterdrücken.

Das erste auf RNAi basierendes Medikament, *Patisiran*, wurde 2018 von der FDA und der EMA zugelassen. Es handelt sich um eine in Lipid-Nanopartikeln eingeschlossene dsRNA, die an den jeweiligen 3'-Enden um zwei Desoxythymidine verlängert wurde und mehrere 2'-O-Methyl-Modifikationen aufweist.<sup>[101]</sup>

### 1.2.4. Antagomirs und anti-miRs

Zur Inhibierung des RISC wurden sogenannte Antagomirs entwickelt. Dies sind kurze künstliche Oligomere, die kompetitiv an die miRNA im RISC binden. Hierfür eignen sich besonders chemisch modifizierte Nucleoside, die stabiler als RNA sind und vor Abbau geschützt sind. Möglich ist z.B. 2'-O-Methyl-RNA, *locked nucleic acid* (LNA), bei der durch eine 2'-O,4'-C-Methylenbrücke das Zucker-Phosphat-Rückgrat in einer C3'-endo-Konformation gehalten wird oder Peptidnucleinsäure (*peptide nucleic acid*, PNA), bei der das Phosphat-Rückgrat durch Peptidbindungen ersetzt wurde. Depression ist aufgrund der hohen Affinität bereits mit einer kurzen 8mer LNA möglich.<sup>[102]</sup> Im Vergleich zu LNA ist 2'-O-Me-RNA deutlich schwächer aktiv, erst bei höheren Konzentrationen ist sie ähnlich wirksam.<sup>[103]</sup> PNA war in der gleichen Studie ebenfalls effizienter als ein Antagomir bestehend aus 2'-O-Me-RNA, findet jedoch seltener Anwendung als Antagomir. Oft wird eine hohe Konzentration eingesetzt und zudem muss das Oligomer mit einem zellpenetrierenden Peptid versehen werden.<sup>[104]</sup> Jedoch können auch schon kurze PNA-Sequenzen effektive Inhibitoren sein. Eine 4mer PNA zeigte an rekombinantem miRISC einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1 µM bei der Spaltung von mRNA. Durch Konjugation an ein kleines Molekül konnte der IC<sub>50</sub>-Wert auf 100 nM gesenkt werden.<sup>[105]</sup> Eine 10mer PNA wurde eingesetzt, um an pre-miRNA-210 zu binden. Bei einer PNA-Konzentration von 1–2 µM wurde Dicer inhibiert, sodass die miRNA-210-Konzentration sank. Auch durch Einführen eines PEG-Rests im Rückgrat der PNA kann die RNA Affinität erhöht werden.<sup>[106]</sup> Ein darauf basierendes Oligomer konnte die Expression von miR-210 in HeLa Krebs-Modellzellen verringern und so einen Krebs inhibierenden Effekt ausüben. Auch cyclische Peptide eignen sich, um die Zellaufnahme von PNA verbessern. Trotz ihrer Größe üben sie eine Repression von miRNA aus.<sup>[107]</sup>

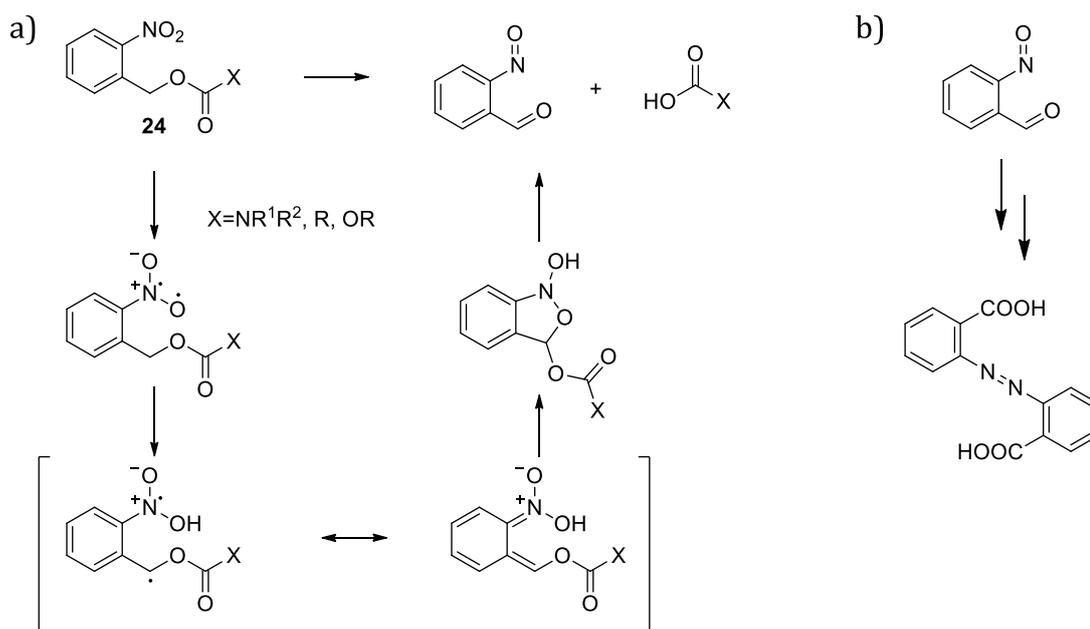
## 1. Einleitung

### 1.2.5. miRNA sponges

Ein weiterer als „miRNA sponge“ bezeichneter Ansatz zur Hochregulation einer bestimmten mRNA ist die Expression von vielen kurzen RNAs, die zur miRNA komplementär sind. Hierfür wird ein Plasmid so modifiziert, dass es mehrere miRNA Bindestellen mit *bulge* enthält. Der *bulge* ist nötig, da die Sequenzen nicht vollständig komplementär sein dürfen, andernfalls käme es zur Spaltung der RNA durch AGO2. Das Plasmid wird in die Zelle eingebracht und durch die anschließende Bindung werde die AGO-Proteine kompetitiv gehemmt, sodass die eigentliche Ziel-mRNA nicht mehr gebunden werden kann.<sup>[108]</sup>

### 1.3. Photoschutzgruppen

Schutzgruppen sind nötig, um funktionelle Gruppen eines Moleküls vor unerwünschten Reaktionen zu schützen. Sie ermöglichen es, Reaktionen erst zu einem gewünschten Zeitpunkt zu erlauben. Photoschutzgruppen sind in dem Sinne besonders, dass sie sich allein durch die Bestrahlung mit Licht abspalten lassen und keine weiteren Chemikalien notwendig sind. Dies macht sie ideal für die Verwendung in Systemen, in denen ein weiterer Eingriff nicht einfach oder unerwünscht ist. Zudem ermöglichen sie eine örtlich lokalisierte Entschützung. Damit eignen sich Photoschutzgruppen besonders für die Untersuchung von biologischen Systemen. Gezielt wurden sie erstmals 1966 von Barltrop *et al.*<sup>[109]</sup> verwendet, um Carbonsäuren mit der recht simplen *ortho*-Nitrobenzylgruppe zu schützen, die sich mit Licht der Wellenlänge 365 nm abspalten lässt (Abbildung 20 a).



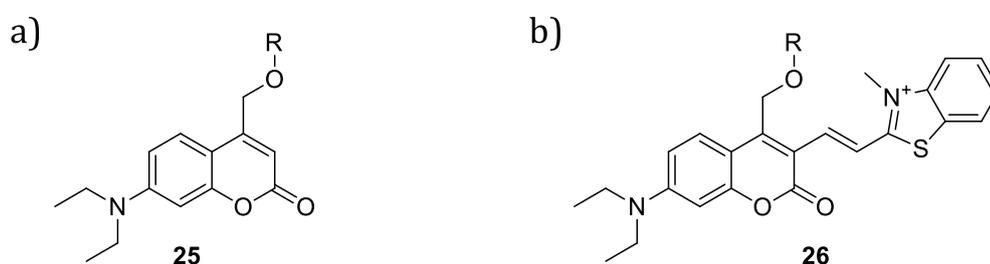
**Abbildung 20:** a) Mechanismus der photolytischen Abspaltung der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe **24**.<sup>[110]</sup> b) Absorbierendes Nebenprodukt der Entschützung.

## 1. Einleitung

---

Diese Wellenlänge ist für biologische Systeme noch nicht schädlich im Gegensatz zu kurzwelligerer UV-Strahlung.<sup>[111]</sup> Ein Problem bei dieser simplen Schutzgruppe ist die Dimerisierung von Nitrosobenzyldehyd zu Azobenzol-2,2'-dicarbonsäure (Abbildung 20 b) bei der Entschützung. Diese können als Lichtfilter wirken und die weitere Entschützung verhindern. Dies kann durch Einführen einer Methylgruppe an der Benzyl-Position verhindert werden, sodass keine Dimerisierung mehr stattfindet.

Eine weitere populäre Schutzgruppe **25** basiert auf Cumarin (Abbildung 21 c) und lässt sich bei 405 nm abspalten.<sup>[112]</sup> Durch Vergrößerung des  $\pi$ -Elektronensystems lassen sich Cumarin-Derivate auch mit höherer, energieärmerer Wellenlänge abspalten, was die Biokompatibilität erhöht. Beispielsweise wird durch Konjugation mit einem Benzothiazol das Absorptionsmaximum von Verbindung **26** auf 538 nm verschoben.<sup>[113]</sup>



**Abbildung 21:** a) Auf Cumarin basierende Schutzgruppe **25**, bei 405 nm entschützbare. b) Durch Konjugation mit Benzothiazol ist Verbindung **26** aufgrund des bathochromen Effekts schon bei 538 nm entschützbare. <sup>[113]</sup>

Erstmals wurde 1976 von Engels und Schlaeger die Verwendung einer Photoschutzgruppe in einem biologischen System demonstriert.<sup>[114]</sup> Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde mit einer Nitrobenzylgruppe am Phosphatester geschützt. Nach Photolyse reagierte die Proteinkinase auf das freigesetzte cAMP fast im gleichen Maße wie auf ungeschütztes cAMP. Darauf folgten weitere geschützte, biologisch aktive Verbindungen, die die Aufklärung von Prozessen in der Zelle ermöglichten. So kann geschütztes Glutamat benutzt werden, um die Eigenschaften von Neurotransmittern zu untersuchen.<sup>[115]</sup> Es ermöglicht unmittelbar eine große Stoffmenge freizusetzen und die Reaktion von Glutamatrezeptoren darauf zu verfolgen. Auch anorganische Stoffe lassen sich freisetzen, so können geschützte  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatbildner nach Entschützung gezielt  $\text{Ca}^{2+}$  in einer Zelle freisetzen.<sup>[116]</sup> Wichtig sind auch geschützte Nukleinsäuren: Photoschutzgruppen können die Translation oder Transkription von Nukleinsäuren blockieren. So konnte geschützte mRNA ohne Zersetzung in Zebrafisch Embryos gebracht werden, wo nach Entschützung das von der mRNA codierte GFP exprimiert wurde, jedoch mit schwächerer Fluoreszenz als bei direkter Injektion ungeschützter mRNA.<sup>[117]</sup> Gezielte Steuerung der Genregulation kann durch geschützte siRNA ermöglicht werden: Eine gegen die Sequenz von GFP gerichtete siRNA unterdrückte mithilfe des RISC zwar schon in geschütztem Zustand zu einem Teil die Fluoreszenz, nach Entschützung jedoch deutlich stärker.<sup>[118]</sup> Der

## 1. Einleitung

---

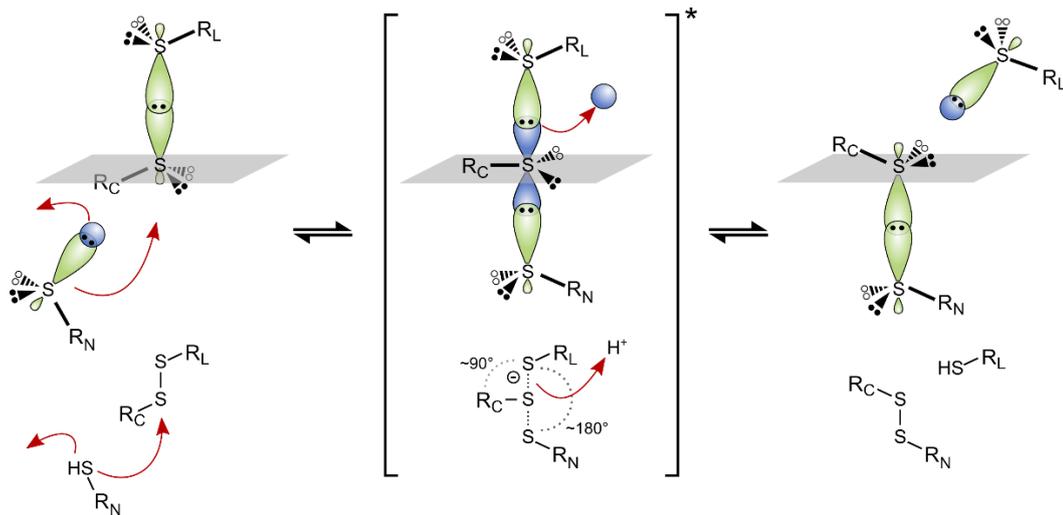
gegenteilige Effekt wird durch geschützte antimicroRNAs erreicht: Hierfür wurden einige Nucleobasen von antimicroRNA-92a mit Nitrobenzylderivaten geschützt und in Mäuse injiziert. Nach Bestrahlung der Haut wurde die microRNA-92a Expression lokal herunterreguliert, während andere Organe nicht betroffen waren.<sup>[119]</sup>

Bei der Synthese künstlicher RNA Oligomere kann die *o*-Nitrobenzyloxymethyl-Schutzgruppe (NBOM) für die Schützung der 2'-OH-Gruppe der Monomere eingesetzt werden.<sup>[120]</sup> Im Vergleich zu der normalerweise verwendeten TBDMS-Schützung konnte die Kupplungszeit deutlich verringert werden (2 min statt 10 min). Vorteil ist die Entschützung mittels Lichts, statt durch Fluorid, wie im Fall von TBDMS.

### 1.4. Thiole

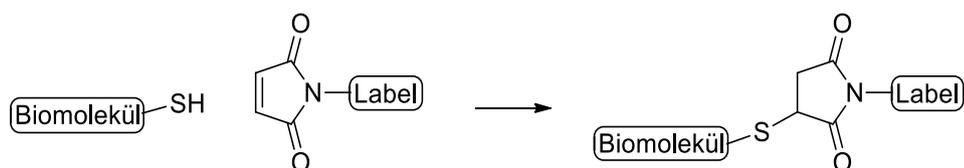
Thiole sind wichtige funktionelle Gruppen für die biochemischen Prozesse in lebenden Organismen. So erlaubt Cystein bei Proteinen und Peptiden die kovalente Verknüpfung von Aminosäuren durch Disulfidbrücken, was wesentlich zur Stabilität und Faltung eines Proteins beiträgt. Dennoch sind Disulfide nicht unreaktiv und können weitere Reaktionen eingehen. Sie können mit anderen Thiolen austauschen oder wieder zum Thiol reduziert werden. Beispielsweise wird Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel eingesetzt, um Disulfidbrücken zu spalten und somit Proteine zu denaturieren. Die Reaktivität beruht darauf, dass DTT ein intramolekulares Disulfid bilden kann, was energetisch begünstigt ist.<sup>[121]</sup> Auch in kürzeren Peptiden, wie dem Tripeptid Glutathion (GSH), kommt Cystein vor. So wirkt GSH, bestehend aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin als Reduktionsmittel in Zellen, indem es zu Glutathiondisulfid (GSSG) dimerisiert. Außerdem wirkt es als Signalvermittler bei Redoxprozessen.<sup>[122]</sup> Bei zu hoher Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen kommt es zu oxidativem Stress, welcher Biomoleküle schädigt, was durch GSH verhindert werden soll. In Zellen bewirkt die Glutathion-Reduktase die Elektronenübertragung von NADP<sup>+</sup>/NADPH auf GSSG um GSH zu bilden.

## 1. Einleitung



**Abbildung 22:**  $S_N2$ -Mechanismus des Thiol-Disulfid-Austauschs mit Abbildung der beteiligten Orbitale. Nachdruck mit Genehmigung. Copyright 2013 Elsevier.<sup>[122]</sup>

Mechanistisch verläuft der Thiol-Disulfid-Austausch über eine  $S_N2$  Reaktion (Abbildung 22). Im ersten Schritt wird das angreifende Thiol deprotoniert und es kommt zu einem negativ geladenen Übergangszustand mit einer trigonal-bipyramidalen Anordnung. Dann spaltet sich ein Thiolat ab und wird protoniert. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt vom pH-Wert ab: Je höher dieser ist, desto schneller verläuft der Austausch. Einfluss hat auch die sterische Hinderung des Thiols und Disulfids.<sup>[123]</sup> Eine praktische Anwendung findet der Thiol-Disulfid-Austausch in der Biochemie, wo er genutzt wird, um Proteine, wie z.B. Antikörper, zu markieren.<sup>[124]</sup> Ebenso wird auch Maleimid verwendet, das mit Thiolen reagiert (Abbildung 23).<sup>[125]</sup>

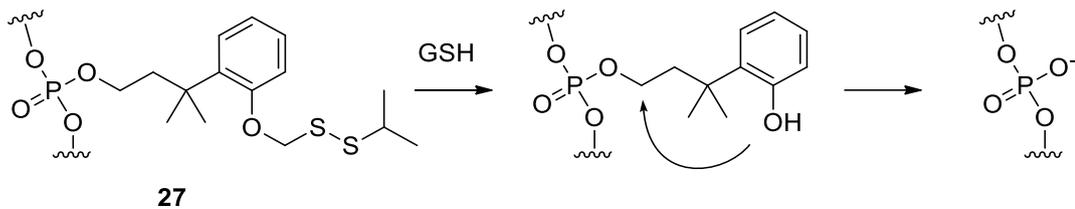


**Abbildung 23:** Markierung eines Biomoleküls durch Reaktion eines Thiols (z.B. von Cystein) mit Maleimid.<sup>[125]</sup>

### 1.4.1. Glutathion als Reaktionspartner von Schutzgruppen

Die GSH-Konzentration ist intra- und extrazellulär deutlich verschieden: Während in Zellen von Säugetieren bis 10 mM GSH typisch sind, finden sich extrazellulär nur um den Faktor 10–100 geringere Konzentrationen.<sup>[126]</sup> Dieser Gradient lässt sich nutzen, um geschützte Wirkstoffe herzustellen, die erst in Zellen, nach Reaktion mit GSH, aktiv werden. Hierfür gibt es Ansätze, die auf der beschriebenen Reaktion von GSH mit Disulfiden basieren oder auch mit anderen funktionellen Gruppen, die mit Thiolen reagieren. In der Gruppe von Ono wurden GSH-empfindliche Gruppen genutzt, um das Phosphat-Rückgrat von Oligonukleotiden zu schützen (Abbildung 24).<sup>[127]</sup>

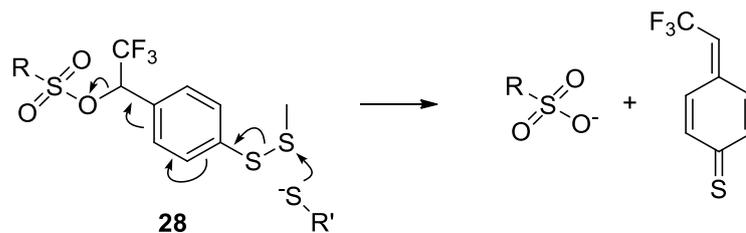
## 1. Einleitung



**Abbildung 24:** Entschützung des Phosphat-Rückgrats **27** nach Eintritt in die Zellen und Reaktion mit GSH.<sup>[127]</sup>

Durch die fehlende negative Ladung wurden diese besser in Zellen aufgenommen. Die Entschützung erfolgt zunächst über die Spaltung des Disulfids und den anschließenden Zerfall des O,S-Acetals. Das entschützte Phenol kann nun intramolekular reagieren und sich vom Phosphorsäureester abspalten. Bei 10 mM GSH, 100  $\mu$ M Oligomer, 37 °C und pH 7.0 erfolgte dies vollständig in 4 h, während bei 10  $\mu$ M GSH die Verbindung stabil blieb.

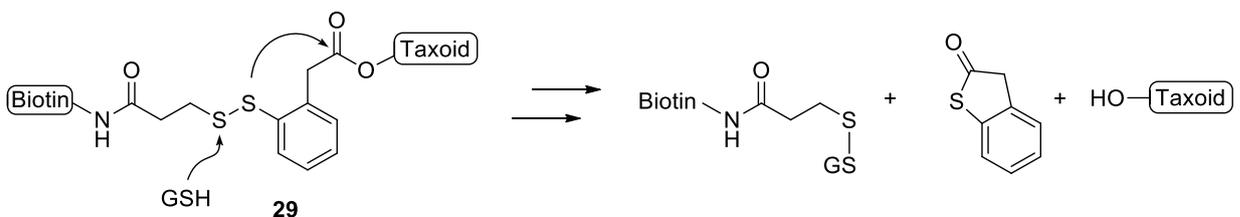
Von Miller und Choi stammt ein ähnlicher Ansatz basierend auf dem Disulfid **28** aus Methanthiol und Thiophenol, das nach Disulfid-Spaltung zu einem Thiochinonmethid unter Abspaltung der geschützten Gruppen reagiert (Abbildung 25).<sup>[128]</sup>



**Abbildung 25:** Vorgeschlagener Mechanismus für die Spaltung des Disulfids von Verbindung X.<sup>[128]</sup>

Mit 5 mM Glutathion erfolgte fast vollständige Entschützung innerhalb von 2–3 min, während in reinem PBS Puffer (pH 7.4) keine Reaktion stattfand. So geschützte Fluorophore waren zellgängig und zeigten in der Zelle ihre typische Fluoreszenz als Nachweis für die Entschützung.

Auf einem gemischten Disulfid **29** mit Thiophenol basiert auch der *Linker* von Ojima.<sup>[129]</sup> Er ist so aufgebaut, dass es nach der Disulfidspaltung intramolekular zu einer Esterspaltung kommt, die in diesem Fall Taxoid, ein Krebsmedikament, freisetzt (Abbildung 26).



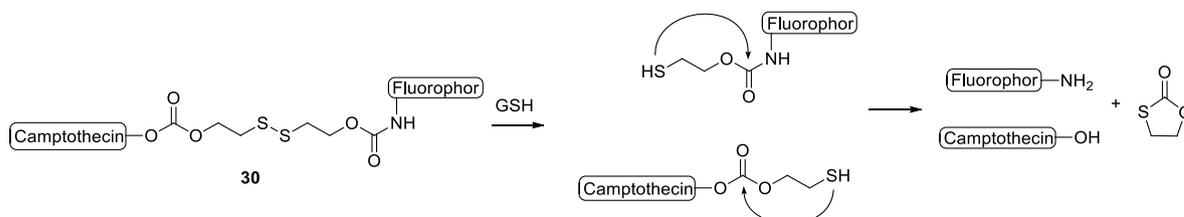
**Abbildung 26:** Mechanismus für die Spaltung des Disulfid **29** durch GSH und Freisetzung von Taxoid.<sup>[129]</sup>

Da Forschungen gezeigt haben, dass Biotin-Rezeptoren in Krebszellen überexprimiert werden, wurde Taxoid über den Disulfid-*Linker* mit Biotin zur Tumor-Erkennung verbunden. Vorteilhaft

## 1. Einleitung

ist auch, dass die GSH-Konzentration in Krebszellen das 1000-fache der im Blut beträgt. In Leukemiezellen zerfiel der Linker *in vitro* wie gewünscht nach Zugabe von Glutathionester.

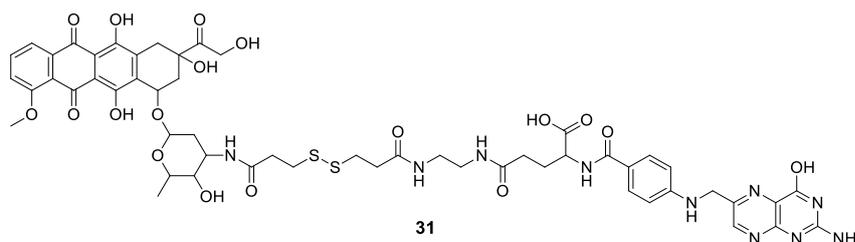
Der Ansatz von Lee *et al.* verwendet ein Carbamat und einen Kohlensäureester anstelle eines Carbonsäureesters, die über ein 2,2'-Dithiodiethanol mit einem Fluorophor und dem Tumorwirkstoff Camptothecin verbunden wurden (Verbindung **30**, Abbildung 27).<sup>[130]</sup>



**Abbildung 27:** Vorgeschlagener Mechanismus für die Spaltung des Disulfid und Freisetzung von Camptothecin und des Fluorophors.<sup>[130]</sup>

Nach der Disulfid-Spaltung können die Thiole intramolekular zu 1,3-Oxathiolan-2-on zyklisieren. Bei 0.1 mM Substrat und 0.1 mM GSH, 37 °C und pH 7.4 war nach 90 Minuten die Entschützung vollständig. Durch Anfügen eines zyklischen Peptides wurde die Verbindung zellgängig für Krebszellen gemacht. Nach Internalisierung konnte Fluoreszenz, sowie die erwartete Zelltoxizität beobachtet werden.

Santra *et al.* haben über das Disulfid von 3-Mercaptopropionsäure und Amidbindungen Folsäure, zur Zielerkennung, und Doxorubicin, als Zytostatikum verbunden (Verbindung **31**, Abbildung 28).<sup>[131]</sup>



**Abbildung 28:** Verknüpfung von Doxorubicin und Folsäure durch ein Disulfid.<sup>[131]</sup>

Bei 5 mM GSH und 5 mM GSH Substrat, 37 °C und pH 7.4 war die Spaltung nach 3 Stunden vollständig. Auch dieses Substrat zeigte sich als zellgängig und cytotoxisch. Im Vergleich dazu zeigte ein Substrat mit C-C anstelle der S-S Bindung nur sehr geringe Zelltoxizität. Die Wirkung ist somit von der zerfallenden S-S Bindungen abhängig.

### 1.4.2. Reaktion von Chinonmethiden mit Thiolen

Aufgrund der Nukleophilie von Thiolen könnte man annehmen, dass sie bei der Reaktion von Chinonmethiden mit Nucleobasen konkurrieren würden. Rokita bemerkte bei der Reaktion von 1  $\mu\text{M}$  DNA mit 1.1  $\mu\text{M}$  DNA-Chinonmethid-Konjugat selbst bei Anwesenheit 450  $\mu\text{M}$  ( $\cong$  450 äq.) Mercaptoethanol keinen nennenswerten Einfluss auf die Alkylierungs-Rate.<sup>[132]</sup> Modica *et al.* untersuchten die Reaktion von Chinonmethiden, die photochemisch oder thermisch generiert wurden, mit verschiedenen Aminosäuren, Aminen und Glutathion.<sup>[133]</sup> Bei thermisch generierten Chinonmethiden wurden nach 3.5 h, 80 °C und pH 7.0 95 % Ausbeute bei der Reaktion mit Ethanthiol (2 äq.) erhalten. Bei gleichen Bedingungen wurden mit Glutathion nach 0.5 h 84 % Ausbeute erhalten. In keinem Fall wurde ein Salicylalkohol detektiert. Bei photochemischer Generierung wurde nach 2 h ebenfalls 86 % Glutathion-Addukt gemessen und 12 % Salicylalkohol. Auf der Basis von Kinetikmessungen wurde die folgende Nukleophilie Ordnung aufgestellt:  $\text{RS}^- \gg \text{R}_3\text{N} > \text{PhO}^- > \text{RSH} \approx \text{RNH}_2 > \text{HO}^- \gg \text{H}_2\text{O} \geq \text{Cl}^-, \text{AcO}^-, \text{ROH}$ . Laut Peter sind Cystein-SH-Gruppen die stärksten Nucleophile in wässriger intrazellulärer Umgebung.<sup>[133]</sup>

Auch Byrne *et al.* stellten bei der Alkylierung von Nucleosomen fest, dass Bis-Chinonmethide ein *Crosslink* zwischen DNA und den Histonen herstellen können.<sup>[134]</sup> Der alkylierte Aminosäurerest konnte dabei nicht bestimmt werden. Die Cysteine von Histonen sind jedoch unzugänglich, daher ist ein Angriff an Lysin oder Arginin wahrscheinlicher. Loa *et al.* konnten zeigen, dass Thiole durchaus die Alkylierung von Proteinen durch Chinonmethide hemmen.<sup>[135]</sup> In ihren Experimenten alkylierten sie die Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) mit einem Chinonmethid, das eine Phosphatgruppe zur Proteinerkennung trägt. Bei Zugabe von 1 mM Cystein kommt es zur Verhinderung der Proteinalkylierung. Durch Tandem-Massenspektrometrie (MS) wurde nachgewiesen, dass die Alkylierung nur an den Cystein-Resten erfolgt. Jiang *et al.* kamen zu einem ähnlichen Ergebnis: Durch Proteinverdau und MS konnte gezeigt werden, dass die abgeschirmten Cysteine von PTP1B nicht alkyliert wurden, sondern nur die *N*-terminalen.<sup>[136]</sup> Auch bei der Glutathion Transferase reagierten Cystein, sowie Alanin, Lysin, Histidin, Tyrosin, Trypsin mit einem Chinonmethid.<sup>[137]</sup>

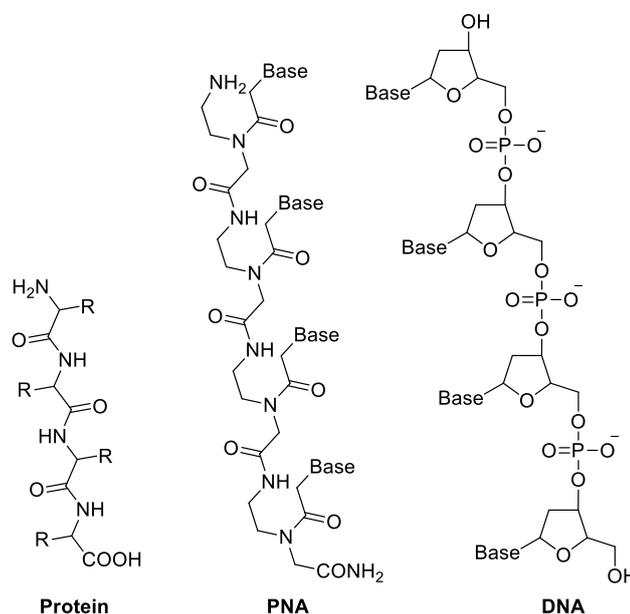
Arumugam *et al.* zeigten nicht nur die Alkylierung von Cystein, sondern auch die Reversibilität der Reaktion.<sup>[138]</sup> (Hydroxymethyl)-2-naphthol reagiert bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 350 nm zu einem Naphthochinonmethid, welches wiederum mit dem Cystein eines Peptides reagierte. Hierfür war ein Überschuss von Chinonmethid nötig (4 äq.). Das isolierte alkylierte Peptid konnte durch Bestrahlung erneut das Chinonmethid bilden, welches zum (Hydroxymethyl)-2-naphthol reagierte und somit das Cystein freisetzte. Die photochemische Hin- und Rückreaktion stehen im Gleichgewicht. Um die vollständige Rückreaktion zu ermöglichen

## 1. Einleitung

kann Vinylether hinzugegeben werden, Dieser fängt das Chinonmethid in einer [4+2]-Cycloaddition ab und verhindert so die erneute Reaktion zum Cystein-Addukt.

### 1.5. Peptidnukleinsäure (PNA)

Bei Peptidnukleinsäure (engl. *peptide nucleic acid*, PNA) handelt es sich um ein Nukleinsäure-Analogon der dritten Generation<sup>[139]</sup>, bei dem das Phosphat-Zucker-Rückgrat durch ein Pseudo-Peptidrückgrat ersetzt wurde. Dieses besteht aus *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheiten, die über Amidbindungen verknüpft sind. Die Nukleobasen sind über ein Acetamid mit dem sekundären Amin des Rückgrats verbunden.



**Abbildung 29:** Vergleich der chemischen Struktur eines Protein- (R = Aminosäureseitenkette), eines PNA- und eines DNA-Strangs.<sup>[140]</sup>

Konzipiert wurde sie 1991 von Nielsen, da es keine Möglichkeit gab, künstliche Peptide für die sequenzspezifische Bindung von DNA zu entwerfen.<sup>[140]</sup> Außerdem sollte durch vereinfachte Struktur und Darstellung die Synthese von Oligonukleotiden in großem Maßstab (Millimole bis Mol) ermöglicht werden. Zunächst war sie jedoch zur Bildung von Triplexstrukturen mit DNA-Doppelsträngen entwickelt worden. Es zeigte sich, dass ein 10mer Duplex aus dA<sub>10</sub> ssDNA und T<sub>10</sub> PNA die sehr hohen Schmelztemperatur von 73 °C besaß im Vergleich zum reinen dsDNA-Duplex mit nur 23 °C. Diese resultiert aus dem neutralen Rückgrat der PNA, welches bei DNA aufgrund der negativen Ladungen zur Repulsion der Stränge führt. Der gleiche Effekt wurde auch bei anderen künstlichen Oligomeren beobachtet, die auf einen Phosphorsäureester im Rückgrat verzichten.<sup>[141]</sup> Des Weiteren kann PNA sowohl antiparallel als auch parallel hybridisieren, wobei der Schmelzpunkt bei paralleler Bindung deutlich niedriger liegt.<sup>[142]</sup> Fehlpaarungen werden an

## 1. Einleitung

---

5'- und 3'-Ende toleriert und haben kaum Einfluss auf den Schmelzpunkt (0.2–1.3 °C). Innerhalb einer Sequenz führen Fehlpaarungen jedoch zu deutlicher niedrigerer Schmelztemperatur in Abhängigkeit der Nukleobase (5.9–13.4 °C).<sup>[143]</sup>

Die Struktur ähnelt bei Bindung mit DNA mehr der B-Form, während sich bei RNA eine A-ähnliche Helix bildet. Im Gegensatz zur Ribonukleinsäure bindet PNA sowohl bei niedriger, als auch hoher Salzkonzentrationen.<sup>[144]</sup> Aufgrund des höheren Schmelzpunktes der PNAs besteht bei purinreichen DNA-Duplexen die Möglichkeit der Stranginvasion, sodass sich ein D-Loop bildet.<sup>[145]</sup> Diese D-Loops bilden sich unabhängig von der Richtung und sind über mehrere Stunden stabil.

Durch die Peptidverknüpfungen hat PNA sowohl eine hohe chemische als auch biochemische Stabilität. Nukleasen, die ansonsten das Zucker-Phosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren spalten, zeigen hier keine Wirkung. Proteasen sind eine andere Klasse von Enzymen, die für den Abbau von Aminosäuren zuständig sind und damit prinzipiell PNA angreifen könnten. Demidov *et al.* untersuchten die Stabilität von PNA in verschiedenen Zellextrakten und Humanserum.<sup>[146]</sup> In Humanserum war nach 24 h höchstens 20 % abgebaut, in eukaryotischem Zytoplasmaextrakt war dies bereits nach 2 h der Fall. Im Vergleich dazu wurde das Polypeptid Adrenocorticotropin unter diesen Bedingungen jedoch schon mit einer Halbwertszeit von 5 Min abgebaut.

### 1.5.1. PNA-Synthese

Da PNA genau wie Peptide aus der Verknüpfung von Carbonsäuren und Aminen zu Amidien entsteht, kann auf die Synthesestrategien dieser zurückgegriffen werden. Die Festphasensynthese ist somit das Standardverfahren der PNA-Synthese, bei dem der PNA-Strang während des Kettenwachstums mit dem ersten Monomer auf einem Harz immobilisiert ist. Die meistverwendeten Schutzgruppenstrategien sind dabei *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) oder Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) basierend. Nielsen verwendete zunächst die Boc-Strategie, bei welcher der *N*-Terminus Boc-geschützt ist.<sup>[147]</sup> Die Entschützung erfolgt im sauren Milieu mit TFA. Zur Unterdrückung von Nebenreaktionen sind die restlichen Amine der Nukleobasen orthogonal mit Benzyloxycarbonyl (Cbz) geschützt. Als Trägermaterial kann z.B. mit 4-Methylbenzhydrylamin modifiziertes Polystyrol-Harz zum Einsatz kommen. Zunächst wurde die Boc-Strategie eingesetzt, da nach dem Entschützen das freie primäre Amin als Nebenreaktion im neutralen oder basischen Milieu einen *N*-Acytransfer durchführen kann (Abbildung 30). Zur anschließenden Kupplung können etablierte Peptidkupplungs-Reagenzien, wie z.B. HOBt mit DIC eingesetzt werden, vor allem HBTU lieferte gute Ergebnisse.

## 1. Einleitung

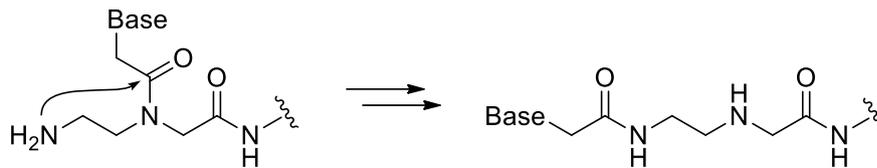


Abbildung 30: Unerwünschte *N*-Acyltransfer-Reaktion im neutralen und basischen Milieu.

Noch freie, ungekuppelte Aminogruppen können durch Essigsäureanhydrid acetyliert (Capping) werden, um Sequenzen mit fehlenden Nucleobasen zu vermeiden. In manchen Fällen kann das jedoch auch zum Scheitern der Synthese führen.<sup>[148]</sup> Die Abspaltung vom Träger erfolgt schließlich mit Trifluormethansulfonsäure.

Von Thomson *et al.* wurden Monomere eingeführt, deren primäre Aminogruppe mit Fmoc geschützt ist, während die restlichen Aminogruppen mit Cbz geschützt sind.<sup>[149]</sup> Diese Änderungen haben den Vorteil, dass mildere Entschützungsbedingungen möglich sind (20%iges Piperidin ggü. 95%iger TFA) und die Monomere eine bessere Löslichkeit besitzen. Seit 2006 sind Fmoc geschützte PNA-Monomere auch kommerziell erhältlich. Als Festphase kann *Rink-Amid*-Harz verwendet werden, bei dem die Abspaltung mit TFA erfolgt. Die Cbz-Entschützung erfolgt jedoch mit starken Säuren, wie Trifluormethansulfonsäure oder wasserfreiem Fluorwasserstoff, daher wurde die Cbz-Gruppe später durch Benzhydryloxycarbonyl (Bhoc) ersetzt, sodass die Entschützung simultan zur Abspaltung von der Festphase erfolgt.

Ein typischer Syntheseyklus bei Verwendung der Fmoc-Strategie beginnt mit dem Entschützen des terminalen Amins durch 20%iges Piperidin (Deblock, Abbildung 31). Nach einem Waschschrift wird anschließend das aktivierte Monomer hinzugegeben. Noch verbliebene, freie Aminogruppen werden im letzten Schritt durch Essigsäureanhydrid acetyliert, woraufhin der nächste Zyklus beginnen kann. Nach vollendet Synthese kann die Abspaltung erfolgen, die je nach Verbindung zum Harz unterschiedlich ausfallen kann.

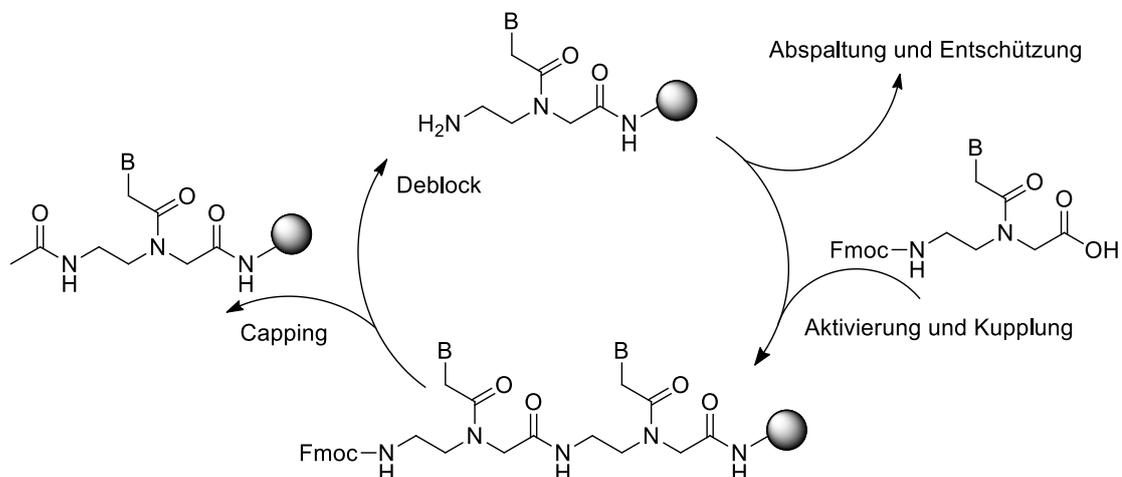
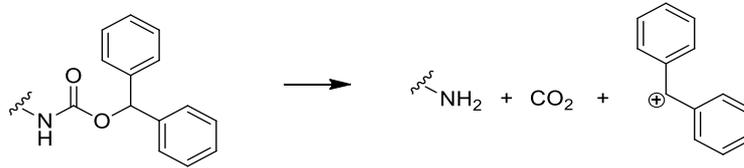


Abbildung 31: Festphasen-Syntheseyklus zum Aufbau eines PNA-Oligomers (B = Nucleobase).

## 1. Einleitung

---

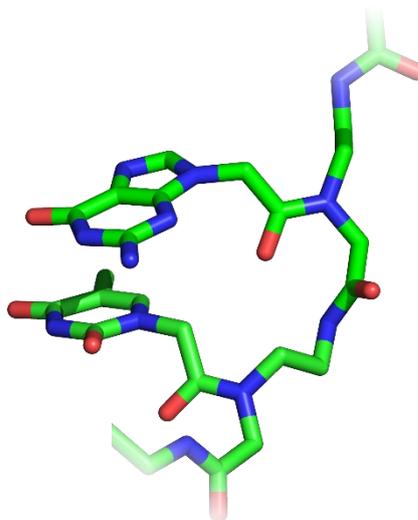
So erfolgt bei Verwendung von *Rink-Amid*-MBHA-Harz die Abspaltung durch eine Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % Triisopropylsilan (TIPS) und 2.5 % Wasser. TIPS und Wasser wirken als *Scavenger*, da bei der Entschützung der Boc-Gruppen reaktive Carbokationen entstehen (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Abspaltung der Boc-Schutzgruppe führt zum Entstehen eines reaktive Benzhydryl-Carbokations.

### 1.5.2. Struktur und Stabilität

Von Eriksson und Nielsen wurden früh Bemühungen zur Strukturaufklärung von Duplexen aus PNA und Nucleinsäuren unternommen. Hierfür wurden sowohl die Kristallstrukturanalyse durch Röntgenstrahlung als auch NMR-Spektroskopie genutzt. Bei der NMR-Messung eines PNA-DNA Duplexes zeigte sich, dass dieser als rechtsgängige Doppelhelix vorliegt und sowohl Eigenschaften der A- und B-Form besitzt. Die Länge einer Windung ist 42 Å, der Durchmesser 23 Å und die helikale Windung pro Basenpaar durchschnittlich 28°. Je nach Sequenz ist sowohl interstrang als auch intrastrang Basenstapelung möglich, ein Merkmal der A-Form, welches zu höherer Schmelztemperatur von RNA führt. Alle primären Amidbindungen sind in der *trans*-Konformation, während die Carbonylgruppen der sekundären Amide in Richtung des *C*-Terminus zeigen (Abbildung 33). Im gepaarten DNA-Strang sind die Nucleotide in einer B-Form ähnlichen Konformation angeordnet, mit C2'-endo Konformation der Ribose.<sup>[150]</sup>



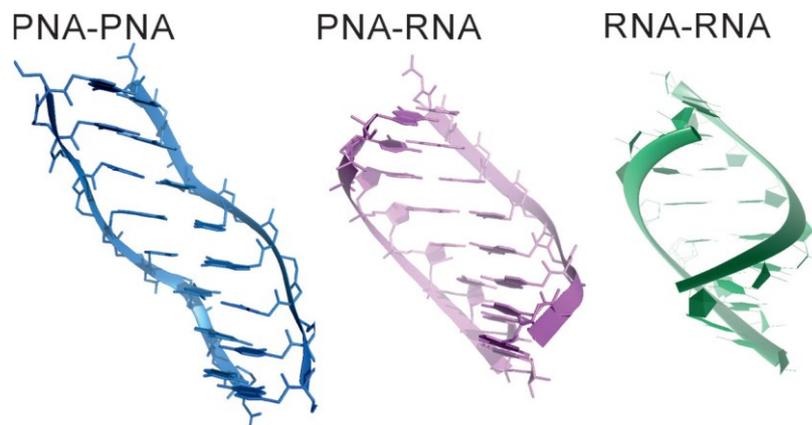
**Abbildung 33:** NMR-Struktur eines Duplexes aus PNA und DNA. Der Ausschnitt zeigt zwei Nucleobasen der PNA (G14 & T15).<sup>[150]</sup>

## 1. Einleitung

---

Der Duplex aus RNA und PNA ähnelt indessen der bei RNA üblichen A-Form, wobei der RNA-Strang bei NMR-Messungen fast die helikale Formation der A-Form erreichte.<sup>[151]</sup> An den verbreiterten Resonanzsignalen des PNA-Rückgrats kann man eine hohe konformationelle Flexibilität erkennen. Auch hier zeigt die Carbonylgruppe der sekundären Amidbindung in Richtung des C-Terminus, während die Carbonylgruppen der primären nach Außen gerichtet sind, um Wasserstoffbrücken zu bilden. In der Kristallstruktur zeigt sich im Vergleich zum RNA Duplex in A-Form eine geringere helikale Windung von  $26^\circ$  (vgl.  $33^\circ$ ) und ein niedrigerer Anstieg pro Base von  $2.4 \text{ \AA}$  (vgl.  $2.6\text{--}3.3 \text{ \AA}$ ) (Abbildung 34).<sup>[152]</sup>

Auch die Bildung von PNA-PNA Duplexen ist möglich, die Nukleobasen stapeln hier ähnlich der A-Form. Aufgrund der Achiralität des Rückgrats können sich sowohl rechts-, als auch linksgängige Helices bilden, mit einem Durchmesser von  $28 \text{ \AA}$  und 18 Basenpaaren bzw.  $58 \text{ \AA}$  je Windung. Hieraus resultiert eine weite, tiefe große Furche und eine enge, flache kleine Furche, was sich deutlich von A- und B-Form unterscheidet und daher als „P-Form“ bezeichnet wurde.<sup>[153]</sup> PNA-Duplexe zeichnen sich zudem durch eine deutlich höhere Schmelztemperatur als DNA-Duplexe aus.<sup>[154]</sup>



**Abbildung 34:** Vergleich der Kristallstrukturen eines PNA-PNA-, PNA-RNA- und RNA-RNA-Duplexes. Nachdruck mit Genehmigung. Copyright 2015 Oxford University Press. <sup>[152]</sup>

Eine Besonderheit der PNA ist die hohe Stabilität von Duplexen in organischen Lösungsmitteln, aufgrund der geringeren Polarität. Von Sen und Nielsen wurde die Schmelztemperatur von dsPNA, eines PNA-DNA-Duplexes und dsDNA in Abhängig von steigender DMF- oder Dioxan-Konzentration untersucht.<sup>[155]</sup> Bei dsDNA kam es zu einem deutlich steileren Abfallen der Schmelztemperatur: Bei 30 % DMF war diese von  $35.8 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $18.2 \text{ }^\circ\text{C}$  gefallen, während bei dsPNA mit gleicher Sequenz nur ein Abnahme von  $70.2 \text{ }^\circ\text{C}$  auf  $64.3 \text{ }^\circ\text{C}$  verzeichnet wurde.

### 1.5.3. PNA-Triplexstrukturen & PNA-Modifikationen

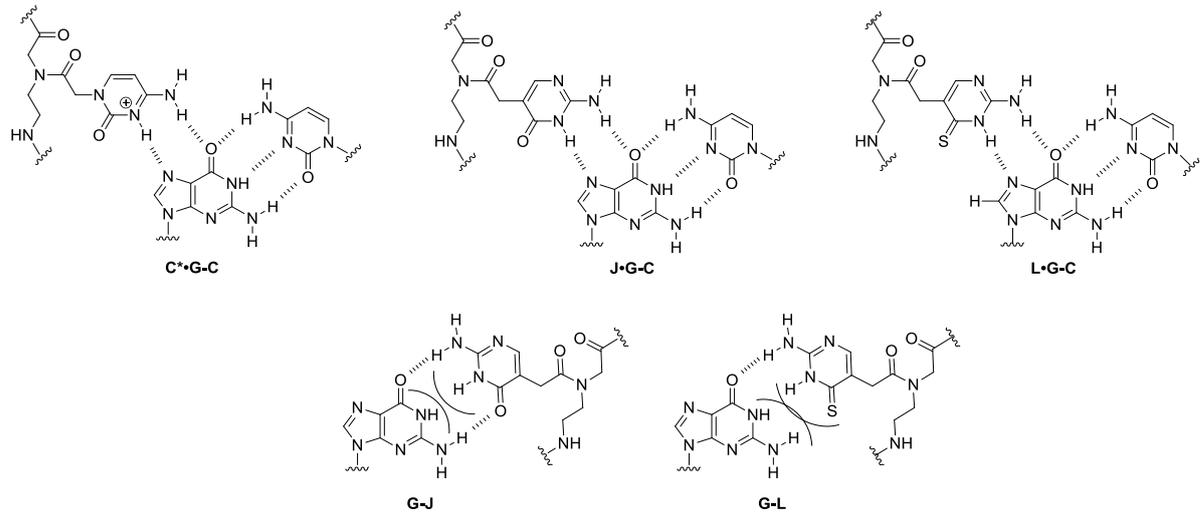
PNA kann mit DNA und RNA Triplex-Strukturen bilden, abhängig von Konzentration, Inkubationszeit und Salzkonzentration. In der Regel entsteht zuerst der Triplex, der anschließend zu einer Stranginvasion umlagert.<sup>[156]</sup> Thymin-reiche PNAs können sowohl über Watson-Crick- als auch Hoogsteen-Basenpaarung binden und einen Triplex aus zwei PNAs und einem DNA-Strang bilden. Auch dieser nimmt eine P-Form ein, mit einer breiten Furche entlang der Helixachse.

Die spezifische Erkennung und Bindung von dsRNA ist ein hilfreiches Werkzeug, da Basenpaarung auch bei einzelsträngiger RNA in den Sekundärstrukturen Haarnadel und Pseudoknoten auftritt. Biologisch wichtige Vertreter sind die in Haarnadel-Struktur vorliegenden Vorläufer-Oligomere von siRNA und miRNA, sowie ribosomale RNA. Die Verwendung von gewöhnlichen Oligonukleotiden ist aufgrund der hohen Schmelztemperatur der dsRNA nicht möglich. Die Bindung über die freie Hoogsteen-Seite ist somit eine elegante Lösung, um dieses Problem zu umgehen. Ein Nachteil ist jedoch, dass sich nicht jede beliebige Sequenz eignet, so muss ein ausreichend langer Polypurin-Abschnitt vorhanden sein, um Triplexbildung zu ermöglichen.

#### 1.5.3.1. künstliche Nukleobasen

Für eine Hoogsteen-Basenpaarung mit Guanin müsste Cytosin protoniert vorliegen, was bei physiologischen Bedingungen jedoch nicht gegeben ist. Um dies dennoch zu ermöglichen, wurde die künstliche Nukleobase Pseudoisocytosin (J) entwickelt, die im Hoogsteen-Strang verwendet werden kann (Abbildung 35).<sup>[157]</sup> Der simple Aufbau des PNA-Rückgrats erlaubt die schnelle Synthese von Monomeren mit künstlichen Basen durch die Peptidverknüpfung. Der Einbau von weiteren künstlichen Nukleobasen ermöglicht gezielte Veränderung des Bindungsverhaltens. So kann 2,6-Diaminopurin, anstelle von Adenin, mit Thymin drei Wasserstoffbrücken eingehen und erhöht dadurch die Schmelztemperatur.<sup>[158]</sup> Basierend auf Pseudoisocytosin wurde mit Thiopseudoisocytosin (L) eine Nukleobase für verbesserte Bindung an dsDNA und dsRNA entwickelt. Beiden ist gemein, dass sie durch den Stickstoff des Heteroaromaten Triplexbildung unabhängig vom pH-Wert ermöglichen.<sup>[157]</sup>

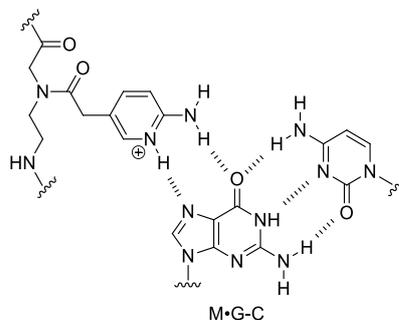
## 1. Einleitung



**Abbildung 35:** Hoogsteen-Basenpaarung von protoniertem Cytosin (C<sup>+</sup>), Pseudoisocytosin (J) und Thiopseudoisocytosin (L), sowie Repulsion bei Watson-Crick-Basenpaarung.<sup>[159]</sup>

Die Substitution des Sauerstoffatoms durch Schwefel verhindert die Watson-Crick-Basenpaarung durch sterische Hinderung, während die Hoogsteen-Basenpaarung ungehindert bleibt. Dies macht die Duplexbildung aus RNA und PNA ungünstiger, sodass die Triplexbildung bevorzugt wird. Somit wird auf diese Art auch die Stranginvasion unterbunden.

Eine weitere künstliche Nukleobase zur dsRNA Erkennung ist 1-Aminopyridin (M).<sup>[160]</sup> Im protonierten Zustand kann sie die gleiche Basenpaarung wie Pseudoisocytidin bzw. C<sup>+</sup> eingehen (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Hoogsteen-Basenpaarung von 1-Aminopyridin (M).<sup>[160]</sup>

Der Vorteil liegt darin, dass 1-Aminopyridin im Vergleich zu Cytosin durch die höhere Basizität ( $pK_a = 6.7$ ) schon in niedrigerem pH-Bereich protoniert vorliegt. Durch die Ladung ist auch eine höhere Bindungsaffinität als bei Pseudoisocytidin gegeben. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Bindung zu einer RNA-Haarnadelschleife 100-mal stärker ist als zur gleichen DNA-Haarnadelschleife. In Zellexperimenten wurde auch die *in vivo* Wirksamkeit bestätigt: Eine 9mer PNA mit 1-Aminopyridin konnte gezielt an eine mRNA-Haarnadelschleife binden, wodurch die Proteinexpression um 80 % sank.<sup>[161]</sup> Des Weiteren kann 1-Aminopyridin verwendet werden, um

## 1. Einleitung

die Desaminierung von Adenosin zu Inosin zu erkennen. Inosin bindet durch seine Isosterie zu Guanosin deutlich besser an 1-Aminopyridin, sodass die Unterscheidung möglich wird.<sup>[162]</sup>

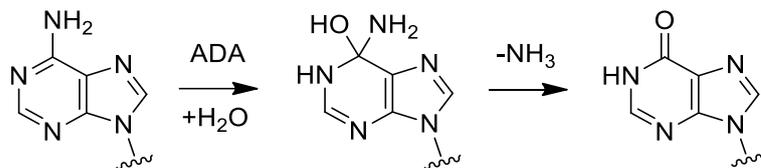


Abbildung 37: Umwandlung von Adenosin zu Inosin durch Adenosin-Desaminase (ADA).

Aufgrund der fehlenden Wechselwirkung von Pyrimidin-Basen über die Hoogsteen-Seite wird die Triplex-Bildung von PNAs mit beliebigen Nukleinsäure-Sequenzen eingeschränkt. Mit 2-Pyrimidinon (P) als künstlicher Nukleobase ist es jedoch möglich, Cytidin über eine einzelne Wasserstoffbrücke zu binden (Abbildung 38).<sup>[163]</sup> Die Affinität ist daher niedriger als bei der Basenpaarung anderer Nukleobasen, jedoch besteht eine Selektivität zu Cytidin. Dies reicht aus, um mit einer 9mer PNA, die ein 2-Pyrimidinon enthält, eine Schmelztemperatur von 43 °C zu erreichen und somit über der physiologischen Grenze von 37 °C zu liegen.

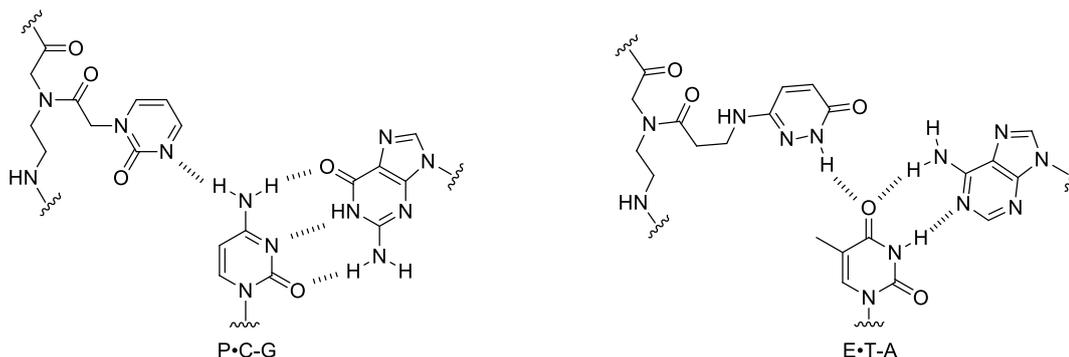


Abbildung 38: Hoogsteen-Basenpaarung von 2-Pyrimidinon (P) und 3-Oxo-2,3-dihydro-pyridazin (E).

3-Oxo-2,3-dihydro-pyridazin (E) wurde bereits 1997 in der Gruppe von Nielsen entwickelt, um Thymin in Triplex-Strukturen zu binden.<sup>[164]</sup> Durch einen längeren *Linker* zum Rückgrat und das Fehlen eines Wasserstoffs an N-1 Position wurde die sterische Hinderung mit der Methylgruppe des Thymins vermieden. Der zweite Stickstoff vermittelt die Wasserstoffbrücke zur 4-Oxo-Gruppe des Thymins und die 4-Oxo-Gruppe von E kann zudem noch mit den Wasserstoffatomen des Watson-Crick-gepaarten Adenins wechselwirken.

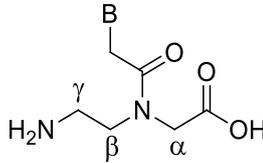
### 1.5.3.2. PNA-Rückgratmodifikationen

Neben dem normalen *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-Rückgrat, wurden noch einige PNA-Rückgratmodifikationen entwickelt, um die Hybridisierung zu verbessern und negative Eigenschaften zu kompensieren. Hierfür können funktionelle Gruppen in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Position

## 1. Einleitung

---

eingeführt werden, was jedoch zur Folge hat, dass im vormals achiralen Rückgrat ein Stereozentrum erzeugt wird (Abbildung 39).



**Abbildung 39:**  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Position des PNA-Rückgrats.

### Ionische Modifikationen

Das Einbringen einer negativen Ladung kann durch einen Carbonsäure-Rest erfolgen, dessen  $pK_s$  unterhalb des pH-Werts in Zellen liegt und somit größtenteils deprotoniert vorliegt. Von Kirillova *et al.* wurden die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Derivate solcher carbonsäure-modifizierten Monomere hergestellt, genannt „Polyanionic Carboxyethyl Peptide Nucleic Acids“ (*ce*-PNAs).<sup>[165]</sup> Die Eigenschaften von T<sub>10</sub>-Oligomeren wurden auf der Basis der *S*-Enantiomere getestet. Ein Duplex aus reiner  $\alpha$ -PNA und dA<sub>10</sub> DNA konnte nicht eindeutig beobachtet werden, wenn überhaupt war er sehr instabil. Im Gegensatz dazu hat die  $\gamma$ -PNA eine sehr hohe Schmelztemperatur von über 80 °C. Alternativ zur Carbonsäure kann auch eine Sulfatgruppe eingesetzt werden, wie es bei „ $\gamma$ -sulphate PNA“ (PNA S) der Fall ist.<sup>[166]</sup> Durch das Ersetzen von 3 T mit den entsprechenden Sulfatderivaten sank der Schmelzpunkt des Triplexes aus zwei 9mer PNAs und ssDNA jedoch um fast 6 °C. Ursache dessen ist die Repulsion der negativen Ladungen zwischen DNA und PNA. Der Vorteil von PNA S liegt jedoch darin, dass eine deutlich bessere Transfektion mit Lipofectamin möglich ist. So konnte PNA S erfolgreich die Geneexpression von „ErbB2“ inhibieren, während normale PNA durch fehlende Aufnahme in Zellen keinen Effekt hatte.

Analog dazu kann durch Aminogruppen eine positive Ladung eingebracht werden, die in Zellen protoniert vorliegen. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\gamma$ -substituiertes Rückgrat führen zu einer höheren Schmelztemperatur mit komplementärer DNA, wobei diese bei  $\gamma$ -S-Modifikation am höchsten ist, gefolgt von  $\alpha$ -R und zuletzt  $\alpha$ -S.<sup>[167]</sup> Durch die Aminogruppen wurde auch die Aufnahme in Zellen verbessert. Die beste Aufnahme erfolgt bei  $\gamma$ -S-PNA, gefolgt von  $\alpha$ -R und  $\alpha$ -S.<sup>[167]</sup>

## 1. Einleitung

---

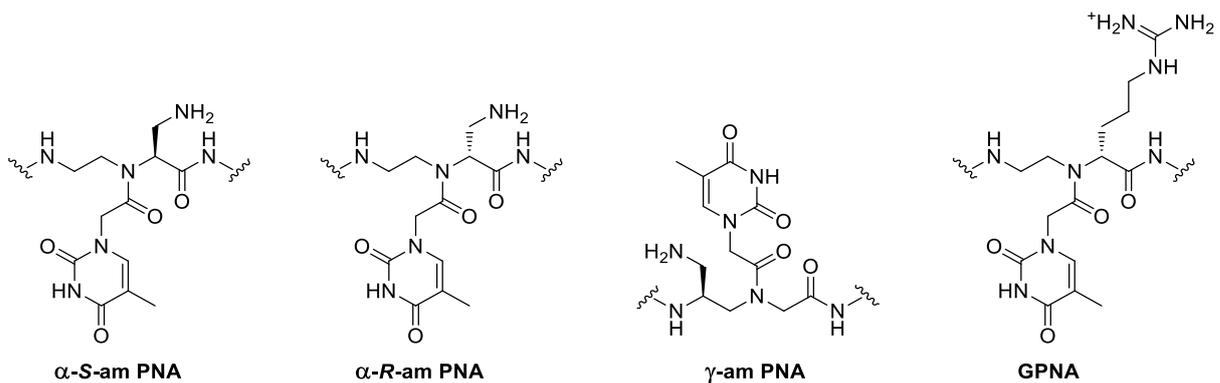


Abbildung 40:  $\alpha$ -Aminomethylen-, $\gamma$ -Aminomethylene-PNA und GPNA.<sup>[167]</sup>

Ebenso wurde mit „GPNA“ eine Rückgratmodifikation basierend auf einem Arginin entwickelt.<sup>[168]</sup> Das *L*-Stereoisomer führt jedoch zu einer Destabilisierung von  $-8\text{ °C}$  pro eingebauter Nukleobase bei Bindung mit RNA, das *D*-Stereoisomer nur um etwa  $-3\text{ °C}$ . Vorteil ist jedoch auch hier. Dass Oligomere mit 4 und 6 modifizierten Basen von HeLa Zellen aufgenommen wurden, während dies mit (Arginin)<sub>4</sub> verknüpfter PNA nicht geschah.

### Neutrale Modifikationen

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von neutralen Resten untersucht. Von Sugiyama *et al.* wurde in  $\beta$ -Position ein Methyl-Rest eingeführt. Während sich  $\beta$ -S-Me-PNA genau wie unmodifizierte PNA verhielt und eine ähnliche Schmelztemperatur aufwies, konnte  $\beta$ -R-Me-PNA anscheinend nicht binden. CD-Spektren der PNAs lassen darauf schließen, dass  $\beta$ -S-PNA eine rechtsgängige Helix annimmt, während  $\beta$ -R-Me-PNA linksgängig ist.<sup>[169]</sup>

Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurde von Sahu *et al.* PEG-modifizierte PNA entwickelt.<sup>[170]</sup> Hierfür wurde in  $\gamma$ -Position ein Diethylenglykol-Rest („miniPEG“) angefügt. Durch die zusätzlichen Wasserstoffbrücken konnte durch Ersetzen von 5 Monomeren eines 15mers die Löslichkeit auf fast das 9-fache erhöht werden. Als weiterer Vorteil hat sich gezeigt, dass die Schmelztemperatur im Duplex mit DNA um  $2.3\text{--}4\text{ °C}$  pro Einheit und im Duplex mit RNA um  $1.2\text{--}2.3\text{ °C}$  steigt, außerdem neigt die modifizierte PNA weit weniger zur Selbstaggregation. Auch *in vivo* konnte die Wirksamkeit dieser Oligomere als anti-miRs gezeigt werden.<sup>[106]</sup> Hierfür wurde eine vollständig miniPEG- $\gamma$ -modifizierte, gegen miR-210 gerichtete 22-mer PNA verwendet, welche zur Zellpenetration in Nanopartikel eingeschlossen wurde. Die Nanopartikel wurden direkt in das Tumorgewebe von Mäusen injiziert, woraufhin sich die miR-210-Konzentration halbierte und sich das Tumorstadium deutlich verlangsamte. Der erreichte Effekt war bei modifizierter PNA deutlich größer als bei unmodifizierter.

### Konjugate mit zellpenetrierenden Peptiden

Entgegen der Erwartung, dass ein ungeladenes Oligonukleotid besser die Zellmembran passieren kann, werden reine PNAs kaum in Zellen internalisiert.<sup>[171]</sup> Wie bereits beschrieben, gibt es einige Rückgratmodifikationen, die darauf abzielen, dieses Problem zu beheben, indem sie wieder polare Reste einführen. Alternativ dazu kann die PNA als Konjugat mit einem zellpenetrierenden Peptid (*cell-penetrating peptide* / CPP) verknüpft werden, um die Zellgängigkeit zu erhöhen. Die erreichte Wirkung liegt nicht nur am Peptid, sondern auch andere Faktoren, wie die Art der Zellen und die PNA-Sequenz sind entscheidend. Von Oh *et al.* wurde die Effizienz verschiedener CPP erforscht.<sup>[172]</sup> Hierfür wurden literaturbekannte Peptide mit PNA konjugiert und die Wirkung als anti-miR in MCD, Hela und A549 Zellen getestet. Vor allem etablierte Peptide, wie Penetratin und Tat zeigten eine hohe Wirkung, während das kurze, von Fabani *et al.*<sup>[103]</sup> verwendete KKKK-Peptide nur eine moderate Repression zeigte. Eine Modifikation ist somit in jedem Fall nötig, um eine hohe *in vivo* Wirkung zu erreichen, entweder als Konjugat mit CPPs oder in Form der bereits erwähnten Rückgratmodifikationen.

## 2. Eigene Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Systeme entwickelt und charakterisiert, die basierend auf der Reaktivität von Chinonmethiden in der Lage sind, sowohl örtlich als auch zeitlich ausgelöste Alkylierung von RNA zu ermöglichen. Der Nutzen soll darin liegen, in biologischen Systemen RNAs gezielt ausschalten zu können. Vor allem miRNA und siRNA sind dabei ein interessantes Angriffsziel, da sie, wie bereits erwähnt, mithilfe der Argonautenproteinen für einen wichtigen Teil der post-transkriptionellen Genregulation zuständig sind und deregulierte miRNAs eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs spielen.<sup>[173]</sup>

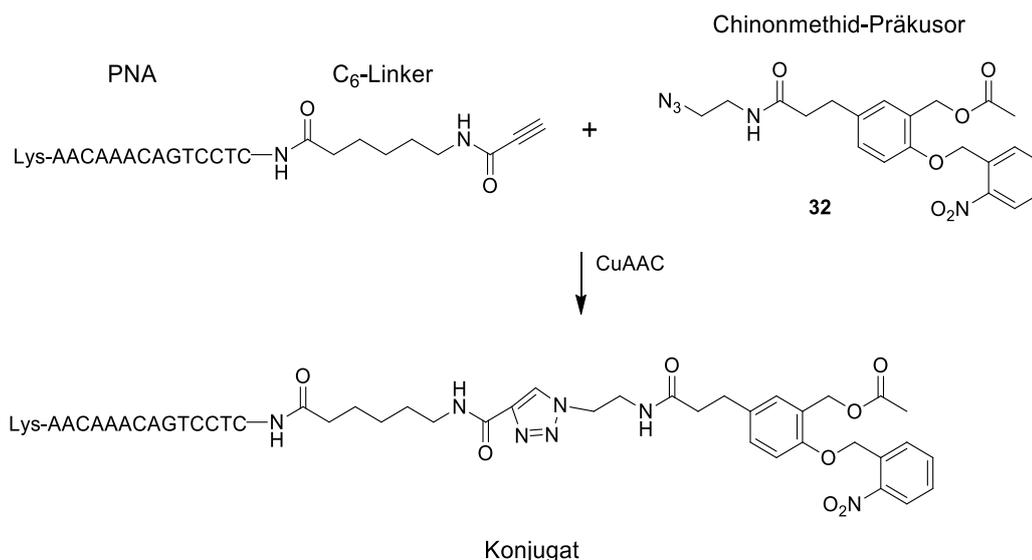
Während mRNAs eine kurze Halbwertszeit besitzen, sind miRNAs durch den Einbau im RISC vor dem Abbau durch RNAsen geschützt, aber können dennoch alkyliert werden. Da ungeschützte Alkylanzien spontan und meist unspezifisch reagieren, müssen diese durch Schutzgruppen so modifiziert werden, dass sie zunächst unreaktiv sind und mit einem (Makro-)Molekül, wie bspw. einem Oligomer verbunden werden, das für die Sequenzspezifität zuständig ist. Da ein weiterer Eingriff in biologische Systeme nach der Applikation des Alkylans schwierig sein kann, bieten sich vor allem Photoschutzgruppen an, die allein durch Licht einer bestimmten Wellenlänge entfernt werden können. Dies umgeht das Problem, dass weitere Chemikalien zur Entschützung hinzugegeben werden müssten und erlaubt zudem die Steuerung der lokalen Freisetzung, allein durch Bestrahlung von außen. So könnte bspw. gezielt ein Organ oder Tumor belichtet werden, um die ortsspezifische Alkylierung nur an dieser Stelle zu erzielen, während an anderen Körperregionen keine Effekte auftreten.

Eine ungewollte Schädigung sollte unbedingt vermieden werden, da durch Alkylierung ausgelöste Gendefekte erneut zur Entstehung von Mutationen und folglich zu Krebs führen könnten. Ohne die Konjugation mit einem zielerkennenden Molekül wäre die Freisetzung des Alkylans zwar örtlich beschränkt, aber dennoch unspezifisch. Zur sequenzspezifischen Erkennung von Nucleinsäuren bieten sich vor allem künstliche Oligomere an, die für bessere Biokompatibilität, Stabilität und Sequenzspezifität optimiert wurden. Neben der auf Nucleosiden basierenden LNA und 2'-OMe-RNA eignet sich auch PNA hierfür. Die Vorteile sind die simple Synthese mittels SPPS, die auch in größerem Maßstab möglich ist und die hohe Sequenzaffinität.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen basieren auf den Ergebnissen einer vorausgegangenen Masterarbeit im Arbeitskreis Göbel.<sup>[174]</sup> Dort entstand die Idee, ein photolabil geschütztes Chinonmethid als Alkylans für RNA zu verwenden. Es wurde ein TBDMS- und ein *o*-Nitrobenzyl-geschützter Chinonmethid-Baustein synthetisiert, der sich über eine Azid-Gruppe mittels CuAAC mit einer Alkin-modifizierten PNA verknüpfen ließ. Die Verwendung der CuAAC war nötig, da das geschützte TBDMS-geschützte Chinonmethid nicht mit den Abspalt-Bedingungen der PNA-Festphasensynthese kompatibel war. Hier erfolgt im letzten Schritt die

## 2. Eigene Arbeiten

Abspaltung von der Festphase durch 95%ige TFA, was auch den Verlust der TBDMS-Gruppe zur Folge hatte und somit das freie Phenol keine kontrollierte Entschützung mehr ermöglichte. Stattdessen wurde das Selbstaddukt erhalten, d.h. das freigesetzte Chinonmethid hatte bereits die Nucleobasen der PNA alkyliert. Über das Azidderivat konnte schließlich das gewünschte Konjugat erhalten werden. Da die Konjugation somit nach der Festphasensynthese erfolgt, ermöglicht dies einen modularen Aufbau, da eine einmalig synthetisierte PNA mit Alkin-Linker auf simple Art und Weise mit mehreren Chinonmethid-Derivaten kombiniert werden kann (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Aufbau der Konjugate aus PNA und Chinonmethid-Präkursor.

Auch die sonst notwendige HPLC-Reinigung der PNA nach der Festphasensynthese fällt in den meisten Fällen dadurch weg, da die anschließende Konjugation mit dem hydrophoben Chinonmethid-Baustein zu einer starken Verschiebung der Retentionszeit führt. Eine einzige statt zwei HPLC-Trennungen auf Stufe des Konjugats reicht daher aus. Das Alkin befindet sich am *N*-Terminus und somit nur an den Vollängen-Produkten. Daher lässt sich das Konjugat leicht als einzelnes Signal, abseits der Syntheseabbrüche und nicht reaktierten Nebenprodukte isolieren. Schlussendlich wurden die erhaltenen Konjugate mit komplementärer, Cy5-markierter RNA in Pufferlösung inkubiert und die Schutzgruppen auf die entsprechende Weise entfernt, um das Chinonmethid zu bilden und die Alkylierung zu initiieren. Bei der Analyse durch denaturierende Gelelektrophorese zeigte sich, dass das TBDMS- und das *o*-Nitrobenzyl-geschützte System vergleichbare Ergebnisse lieferten.

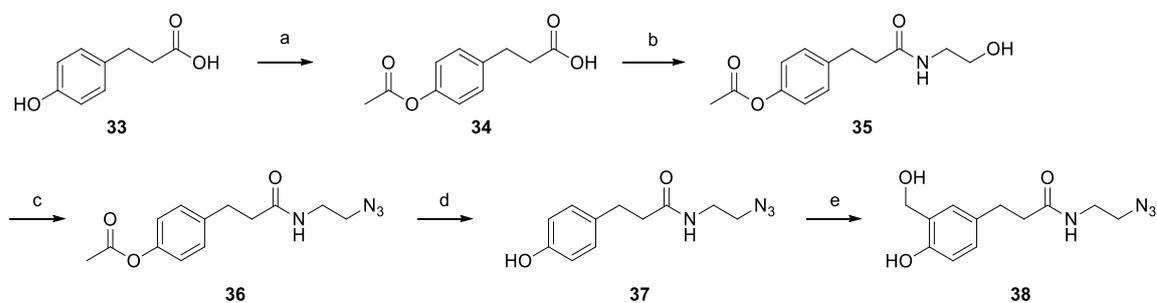
In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich unterschiedliche RNA-Sequenzen auf die Ausbeute und Kinetik der Alkylierung auswirken und wie die Konjugate verbessert werden können. Ein weiteres geschütztes Chinonmethid wurde synthetisiert, das reaktiv mit Glutathion aktiviert wird und es wurden erste Experimente in Zelllysate durchgeführt.

### 2.1. Photolabil geschützte Chinonmethid-Präkursoren

Dieses Kapitel handelt von der Synthese und Reaktivität *o*-Nitrobenzyl-geschützter Chinonmethid-Präkursoren. Es wurde untersucht, wie daraus mit PNA hergestellte Konjugate zunächst ohne komplementäre RNA reagieren. Zudem wurde der Einfluss der PNA-Sequenz und Position des Chinonmethid-Präkursoren auf die Kinetik der RNA-Alkylierung untersucht, um ein möglichst optimales Konjugat herzustellen. Aufgrund der Reversibilität wurde auch der Einfluss der Gelelektrophorese-Temperatur auf die gemessene Kinetik bestimmt.

#### 2.1.1. Synthese des Chinonmethid-Präkursors

Zunächst wurde die Syntheseroute des Azids **38** optimiert, um eine höhere Gesamtausbeute zu erreichen. Zur einfacheren Derivatisierung wurde bisher eine Syntheseroute verwendet, bei der die Einführung der Azidfunktion vor der Schützung des Phenols erfolgte (Abbildung 42). Die Umsetzung zum Salicylalkohol **38** ließ sich in diesem Fall nur mit einer Ausbeute von 58 % durchführen. Der Grund ist in diesem Schritt wahrscheinlich die Zugabe von Ethanol zur vollständigen Solvatisierung des hydrophoben Edukts **37**. Bereits in der Veröffentlichung der Methode von Li *et al.*<sup>[175]</sup> wird angemerkt, dass dies zur Minderung der Ausbeute führt, die ansonsten bei Umsetzung von 3-(4-Hydroxyphenyl)propansäure **33** mit NaBO<sub>2</sub> über 80 % beträgt.

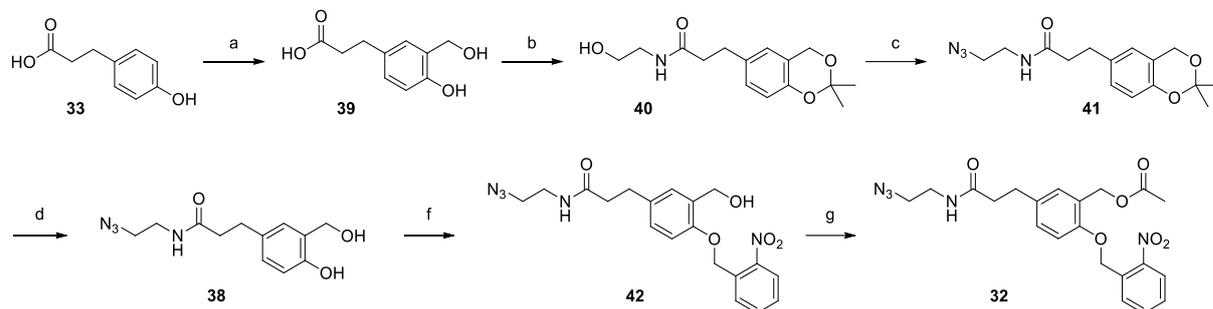


**Abbildung 42:** Bisher verwendete Syntheseroute von Verbindung **8**. a) AcOH, Pyridin, AcCl, RT, 15 h, 93 %. b) 1. Et<sub>3</sub>N, Ethylchlorformiat, MeCN, 0 °C, 20 min. 2. H<sub>2</sub>O, 2-Aminoethanol, RT, 16 h, 81 %. c) 1. Et<sub>3</sub>N, MsCl, DMF, RT, 35 min. 2. NaN<sub>3</sub>, 60 °C, 2,5 h, 67 %. d) 1 M HCl, THF, RT, 3 h, 80 %. e) CH<sub>2</sub>O, NaBO<sub>2</sub>, EtOH, H<sub>2</sub>O, 70 °C, 18 h, 58 %.

Daher erfolgte die Umsetzung von 3-(4-Hydroxyphenyl)propansäure **33** zum Salicylalkohol **39** nun als erster Schritt (Abbildung 43). Die phenolische und benzyliche Hydroxygruppe des Salicylalkohols **39** konnten daraufhin säurekatalysierte mit 2,2-Dimethoxypropan als Acetonid geschützt werden, was die selektive Reaktion und Aktivierung der Carbonsäure mit Triethylamin und Ethylchlorformiat ermöglichte und anschließend die Amidverknüpfung mit 2-Aminoethanol zu Verbindung **40**. Beide Reaktionen konnten mit hoher Ausbeute durchgeführt werden, wenn bei der Acetonidbildung auf die genaue Stöchiometrie des 2,2-Dimethoxypropan geachtet wurde. Bei

## 2. Eigene Arbeiten

zu großem Überschuss wurde als Rohprodukt nur ein braunes Öl isoliert, das nach säulenchromatographischer Reinigung nur eine geringe Produktausbeute lieferte.



**Abbildung 43:** neue Syntheseroute: a)  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{NaBO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $55^\circ\text{C}$ , 13 h, 84 %. b) 1. 2,2-Dimethoxypropan, *p*-TsOH, MeCN,  $0^\circ\text{C}$ , 45 min. 2.  $\text{Et}_3\text{N}$ , Ethylchloroformiat,  $0^\circ\text{C}$ , 25 min, dann Zugabe von 2-Aminoethanol, 18 h, RT, 67 %. c) 1. MsCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeCN,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 15 min; 2.  $\text{NaN}_3$ , *n*- $\text{Bu}_4\text{NI}$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 4 h, 86 %. d) 1 M HCl,  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ , RT, 3 h, 84 %. e) 2-Nitrobenzylbromid, *n*- $\text{Bu}_4\text{NI}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Aceton, Reflux, 5 h, 81 %. f)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, RT, 18 h, 89 %.

Ein weiterer Vorteil dieser Syntheseroute ist die Stabilität des Acetonids gegenüber Basen, sodass die Acetonidschätzung mit anschließender Amidverknüpfung als Eintopfreaktion ohne Aufarbeitung durchgeführt werden kann. Nicht umgesetzte Reste der Carbonsäure wurden durch Zugabe von Triethylamin in das entsprechende Salz umgewandelt und bleiben bei der nachfolgenden Chromatographie auf der Säule zurück, wie auch der ungeschützte Salicylalkohol, der deutlich später eluiert. Zudem umgeht dies das Problem, dass bei der Säulenchromatographie nach der Acetonidschätzung eine geringe Menge Essigsäure im Eluenten nötig wäre, damit die Carbonsäure 45 (Abbildung 46) reproduzierbar chromatographiert werden kann. Die sauren Bedingungen können jedoch auch zur Hydrolyse führen. In der Eintopfreaktion wurde eine mit der zweistufigen Synthese vergleichbaren Ausbeute erhalten.

Daraufhin folgte die Umsetzung zum Azid 41, die Entschätzung des Acetonids zu Verbindung 38 und schließlich die erneute Schätzung des Phenols als *o*-Nitrobenzylether 42. Alle diese Schritte konnten in reproduzierbar hohen Ausbeuten durchgeführt werden. Die Bildung des Azids verlief nach einer vorherigen *in situ* Umwandlung des Alkohols 40 zum Mesylat laut DC-Analyse annähernd quantitativ. Auch die Hydrolyse des Acetonids 41 erfolgte quantitativ in einer Mischung aus THF und 1 M HCl, sodass neben einer Extraktion keine weitere Reinigung nötig war. Daraufhin wurde das Phenols 38 mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  und *o*-Nitrobenzylbromid zum *o*-Nitrobenzylether 42 umgesetzt, was aufgrund der Acidität selektiv am phenolischen Sauerstoff geschah.

Abschließend wurde durch die Veresterung das Zielmolekül 32 erhalten. Dieser Schritt wurde zunächst aus der von Zhou *et al.*<sup>[132]</sup> publizierten Synthesevorschrift übernommen und erfolgte mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von  $\text{FeCl}_3$  als Katalysator und Ethanol als Lösungsmittel. Bei Zugabe von  $\text{FeCl}_3$  war jedoch oft eine spontane Reaktion, in Form von Rauch und Hitzeentwicklung zu beobachten. Daher wurde bei späteren Synthesen auf Pyridin als Katalysator und auch als Lösungsmittel zurückgegriffen, was ebenso zu hohen Ausbeuten führte.

### 2.1.2. Chinonmethid-Präkursor-Derivate mit unterschiedlicher Länge des *Linkers*

Neben den elektronischen Effekten beeinflussen auch sterische Einflüsse die Effektivität des Alkylans. So entscheidet die Länge des *Linkers* zwischen PNA und Chinonmethid über dessen Reichweite und damit den räumlichen Bereich potenzieller Reaktionspartner. Um einen Abstand zwischen den PNA-Basen und dem Chinonmethid zu schaffen, wurden die PNAs am *N*-Terminus mit einem *C*<sub>6</sub>-*Linker* und anschließend Propiolsäure versehen. Im bisher verwendeten vollständigen Konjugat aus PNA und Verbindung **32** folgen auf die letzte Base somit der hydrophobe *C*<sub>6</sub>-*Linker*, das polare Triazol, eine *C*<sub>2</sub>-Kette, ein Amid und erneut eine *C*<sub>3</sub>-Kette, an der das Chinonmethid angebunden ist (Abbildung 44).

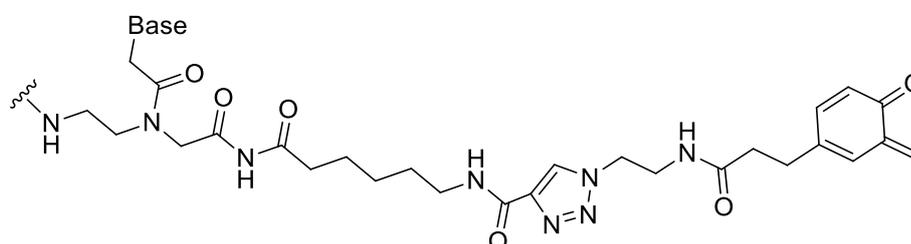


Abbildung 44: Linkerstruktur zwischen PNA und dem Chinonmethid.

Der gesamte *Linker* besteht somit sowohl aus hydrophoben als auch hydrophilen Abschnitten, welche die räumliche Anordnung im polaren Medium Wasser schwer vorhersagbar machen. Zu lange unpolare Ketten könnten kollabieren, um sich von Wasser abzuschildern und polare Gruppen könnten untereinander oder mit Nukleobasen des Konjugats oder des gepaarten Strangs wechselwirken. Dies würde, trotz der langen Linkerstruktur, die effektive Reichweite des Chinonmethids einschränken.

Daher wurde der Einfluss der Linkerlänge und -struktur auf die Alkylierung der RNA untersucht. Hierfür wurden zwei Derivate synthetisiert, Verbindung **43** mit einer zusätzlichen *CH*<sub>2</sub>-Gruppe und Verbindung **44** mit kürzerem *Linker* ohne Amid (Abbildung 45). Die Synthese von Verbindung **43** erfolgte analog der beschriebenen (vgl. Abbildung 43), außer dass 2-Aminoethanol durch 3-Aminopropanol ersetzt wurde.

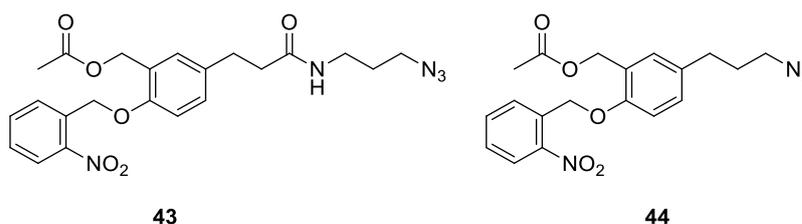
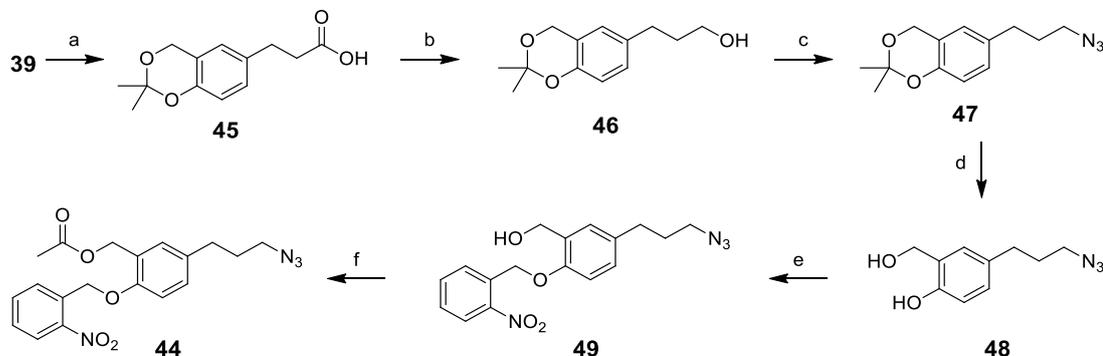


Abbildung 45: Chinonmethid-Präkursoren mit unterschiedlicher Länge des *Linkers*.

## 2. Eigene Arbeiten

Für die Synthese des Chinonmethid-Präkursors **44** wurde Verbindung **39** als Acetonid geschützt und mit  $\text{LiAlH}_4$  zum Alkohol **46** reduziert (Abbildung 46). Dann erfolgte die Umsetzung zum Azid **47** sowie die folgenden Schritte der Synthese analog zu den bereits beschriebenen (vgl. Abbildung 43).



**Abbildung 46:** Synthese von Verbindung **3**. a) 2,2-Dimethoxypropan, *p*-TsOH, DMF, RT, 2 h, 80 %. b)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, RT, 2.5 h, 85 %. c) 1.  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeCN,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 15 min; 2.  $\text{NaN}_3$ , *n*- $\text{Bu}_4\text{NI}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 2.5 h, 87 %. d) 1 M  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ , RT, 2 h, 87 %. e) 2-Nitrobenzylbromid, *n*- $\text{Bu}_4\text{NI}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Aceton, Reflux, 1.5 h, 94 %. f)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DMAP, RT, 1 h, 73 %.

### 2.1.3. Allgemeine Synthese der PNAs

Die für die selektive Erkennung der RNA-Sequenz nötigen PNAs wurden mittels Festphasensynthese auf *Rink*-Amid-MBHA-Harz hergestellt. Hierfür wurde die Fmoc-Synthesestrategie mit kommerziell erhältlichen PNA-Monomeren verwendet. Für die bessere Vergleichbarkeit wurde in den folgenden Experimenten zunächst die gleiche 10mer PNA (**PNA1**) verwendet, wie in den vorherigen RNA-Alkylierungs-Experimenten im Arbeitskreis. Diese Sequenz wurde gewählt, da sie bereits erfolgreich in RNA-spaltenden Konjugaten Verwendung fand. Sie basiert auf den Forschungen von Matsumura *et al.*<sup>[176]</sup> und ist komplementär zu einer Cy5-markierten 29mer RNA (**RNA1**, Tabelle 1). Die RNA ist zudem am 3'-Ende mit vier dT und am 5'-Ende mit 10 dT verlängert, um die Auflösung der späteren Gelelektrophorese zu erhöhen.

**Tabelle 1:** Verwendete PNA- und RNA-Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz
<b>PNA1</b>	Lys-AACAGTCCTC-NH-( $\text{C}_6$ )-(Alkin)
<b>RNA1</b>	5' Cy5-T10-AUACCUUGUCAGGAGAAGAGAGGCCGUUA-T4 3'

Die Synthese erfolgte manuell in 2 mL Kunststoff-Spritzen, die mit einer Fritte versehen waren. Um die Wasserlöslichkeit der ansonsten unpolaren PNA zu erhöhen, wurde vor den Nukleobasen zunächst die Aminosäure Lysin gekuppelt. Die gewählte Fmoc-Strategie erforderte dann die

## 2. Eigene Arbeiten

---

Entschützung mit 20%igem Piperidin in DMF für 7 min und erneut 5 min für eine vollständige Freisetzung der Aminogruppe. Die anschließende Kupplung der Nucleobasen wurde mit 5 Äquivalenten des Monomers, HOBt und DIC durchgeführt. Auf eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid wurde verzichtet. Stattdessen wurde die Kupplung für 2–3 h durchgeführt und die vollständige Umsetzung mittels des „Kaiser-Tests“ überprüft.

Beim Kaiser-Test handelt es sich um einen empfindlichen Nachweis von freien Aminogruppen, weshalb er bei der Festphasensynthese von Aminosäuren oder PNAs zum Einsatz kommt. Hierfür werden einige Kunststoffkügelchen der Festphase entnommen und mit den drei Kaiser-Test-Lösungen, Kaliumcyanid in wässrigem Pyridin, Ninhydrin in *n*-Butanol und Phenol in *n*-Butanol versetzt. Beim Erwärmen auf 100 °C färben sich die Kügelchen aufgrund der Reaktion mit Ninhydrin blau, wenn noch freie Aminogruppen vorhanden sind, ansonsten bleiben sie farblos. Im Fall einer unvollständigen Kupplung wurde diese wiederholt, was häufig bei den Guanin-Monomeren auftrat.

Wie bereits erwähnt, erfolgte dann die Kupplung des *C*<sub>6</sub>-Linkers und des Alkyls in Form von Propiolsäure (Abbildung 47). Nach vollständiger Synthese wurden die Oligomere durch eine Lösung aus 95 % TFA, 2.5 % TIPS und 2.5 % Wasser von der Festphase abgespalten, was dreimal für je 1 h geschah. Das Lösungsmittel wurde anschließend mittels eines Luftstroms entfernt und der Rückstand in Reinstwasser gelöst. Die Reinheit der erhaltenen Rohprodukte reichte, um die folgende CuAAC durchzuführen.

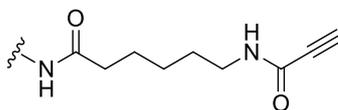


Abbildung 47: N-Terminus der PNA nach vollständiger Synthese.

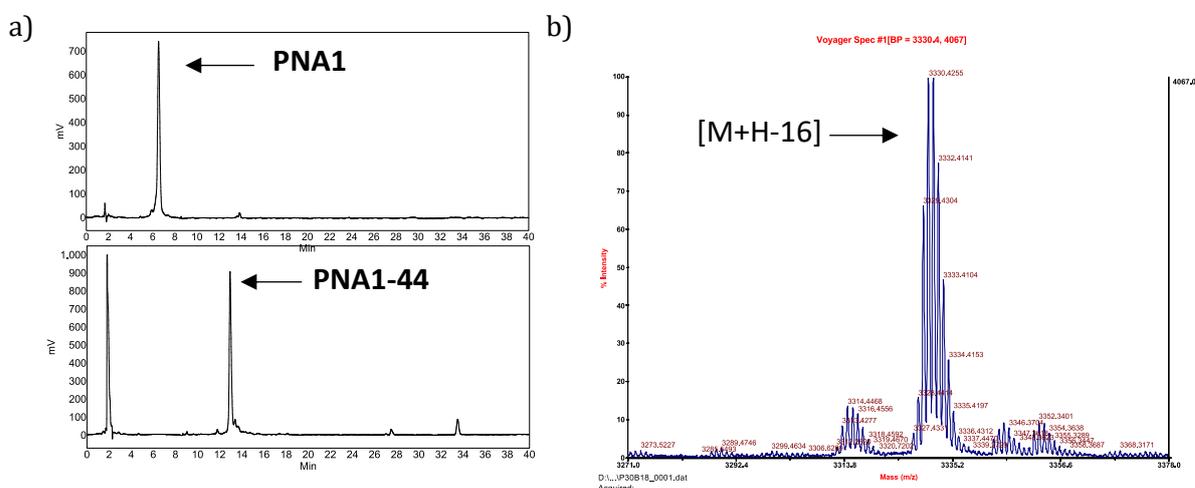
### 2.1.4. Allgemeine Synthese der Konjugate

Zur Herstellung der Konjugate aus den geschützten Chinonmethiden und der PNA wurde die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) eingesetzt. Hierfür wurde die PNA mit 5 Äquivalenten des Chinonmethid-Präkursors in einer 1:1 Lösung aus DMSO und Wasser bestehend aus 500 µM CuSO<sub>4</sub>/TBTA Komplex 1:1 und 5000 µM frischem Natriumascorbat bei 37 °C inkubiert. Typischerweise betrug das Gesamtvolumen etwa 1000 µL bei einer PNA-Konzentration von 40–100 µM. Für möglichst vollständige Umsetzung wurde die Reaktion für länger als 16 h durchgeführt, woraufhin das Produkt mittels RP-HPLC auf einer 250 x 10.0 mm Säule präparativ getrennt werden konnte. Für PNA hat sich die Verwendung von 0.1 % TFA in

## 2. Eigene Arbeiten

Wasser und Acetonitril als Eluenten etabliert<sup>[177]</sup>. In Abbildung 48 a) ist zu sehen, dass die CuAAC quantitativ verlaufen kann, wenn die PNA vorher gereinigt wurde.

Der Eluent wurde schließlich in einem *SpeedVac*<sup>™</sup> Vakuumkonzentrator entfernt, um das Konjugat als TFA-Salz zu erhalten. Das Konjugat wurde daraufhin in DEPC-Wasser gelöst, die Konzentration bestimmt und die Identität mittels MALDI-Massenspektrometrie bestätigt. Das Massenspektrum enthält nur selten Signale des vollständigen Konjugats, da die Laser-Bestrahlung der MALDI-Matrix während der Messung zum Zerfall der *o*-Nitrobenzyl-Photoschutzgruppe führt. So zeigen sich im Massenspektrum vor allem die Abspaltung von Sauerstoff [M+H-16], die vollständige Abspaltung der *o*-Nitrobenzylgruppe [M+H-136] und die Bildung des Chinonmethids, bzw. Selbstaddukts [M+H-195] (Abbildung 48 b).



**Abbildung 48:** a) HPLC-Chromatogramm vor und nach der Reaktion von **PNA1** mit Azid **44** b) MALDI-Massenspektrum des Konjugats **PNA1-44**. Erwartete Masse: 3348.40 Da, Hauptsignal: 3330.43 m/z [M+H-16].

Die Bezeichnung der Konjugate setzt sich zusammen aus der verwendeten PNA und dem Chinonmethid-Präkursor. (Bspw. **PNA1-32** wurde synthetisiert aus **PNA1** und Verbindung **32**)

### 2.1.5. Selbstalkylierung der Konjugate

Das Ziel der Konjugate sollte die selektive Alkylierung der komplementären RNA sein. Ist diese nicht in räumlicher Nähe, muss das gebildete Chinonmethid mit anderen Nukleophilen ein Addukt bilden. So kann das Chinonmethid intramolekular mit einer ungepaarten PNA-Nukleobase reagieren, sodass sich ein Selbstaddukt bildet. Ebenso sind Addukte mit Wasser und dem Puffer (MES) denkbar, jedoch wurden Wasseraddukte in der Gruppe von Rokita nur bei reinen Poly-T-Strängen beobachtet, die keine Möglichkeit der Selbstalkylierung bieten.<sup>[132]</sup>

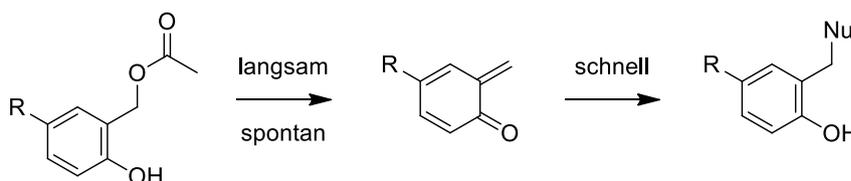
Um ein besseres Verständnis der Reaktivität und Kinetik der Konjugate zu erhalten, wurde zunächst das Verhalten eines Konjugats ohne die komplementäre RNA untersucht. Da die

## 2. Eigene Arbeiten

---

verwendeten PNA-Konjugate nicht fluoreszenzmarkiert sind und zudem nicht bei einer konventionellen Gelelektrophorese trennbar sind, wurde für die Messung der Selbstalkylierungskinetik die RP-HPLC eingesetzt. Die Sensitivität ist bei der verwendeten UV/Vis-Detektion deutlich geringer als bei einer Fluoreszenzdetektion, sodass auch eine höhere PNA-Menge als bei den Alkylierungsexperimenten mit RNA nötig ist. Dafür sind alle absorbierenden Moleküle sichtbar, nicht nur fluoreszenzmarkierte.

Die Reaktion des Konjugats wird nach Entschützung des Phenols durch die spontane Abspaltung des Acetats und damit verbundene Chinonmethid-Bildung gestartet (Abbildung 49). Für die Untersuchung des verwendeten Chinonmethids ist die RP-HPLC jedoch ungeeignet, da dieses sehr viel schneller weiterreagiert, als ein RP-HPLC-Lauf dauert und somit nur die Folgeprodukte beobachtet werden können. Ähnlich einer  $S_N1$  Reaktion dominiert die langsame Acetatabspaltung die Gesamtkinetik der Alkylierung, sodass die hohe Reaktionsgeschwindigkeit des Chinonmethids vernachlässigbar wird (Abbildung 49) und die Reaktion einer Kinetik 1. Ordnung folgen sollte.

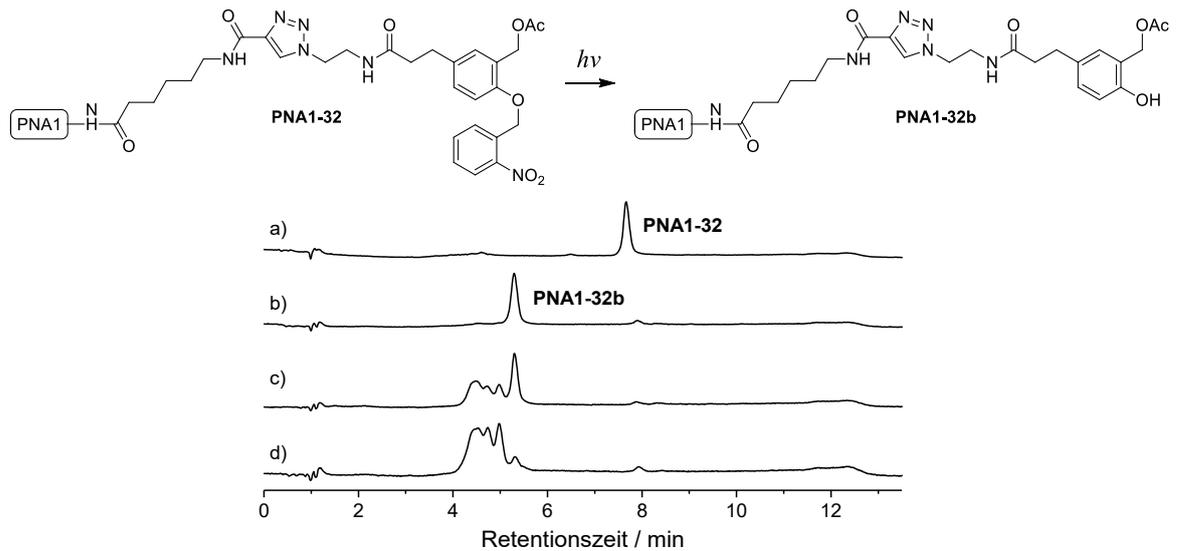


**Abbildung 49:** Bildung des Chinonmethids und Reaktion mit einem Nucleophil, z.B. einer Nucleobase.

Für die Messung wurden dieselbe Puffer- und Salzkonzentration (130 mM MES pH 7.0, 130 mM NaCl) wie bei vorheriger Inkubation mit RNA verwendet, die PNA-Konzentration wurde jedoch auf 30  $\mu$ M statt 6  $\mu$ M bei einem Volumen von 140  $\mu$ L erhöht. Bei solch hohen Konzentrationen hat PNA eine Tendenz zur Aggregation aufgrund ihres vorwiegend unpolaren, hydrophoben Charakters<sup>[178]</sup>, was bei der Alkylierung von RNA problematisch sein könnte. Die Kinetik der spontanen Abspaltung des Acetats sollte jedoch unabhängig von der Aggregation sein.

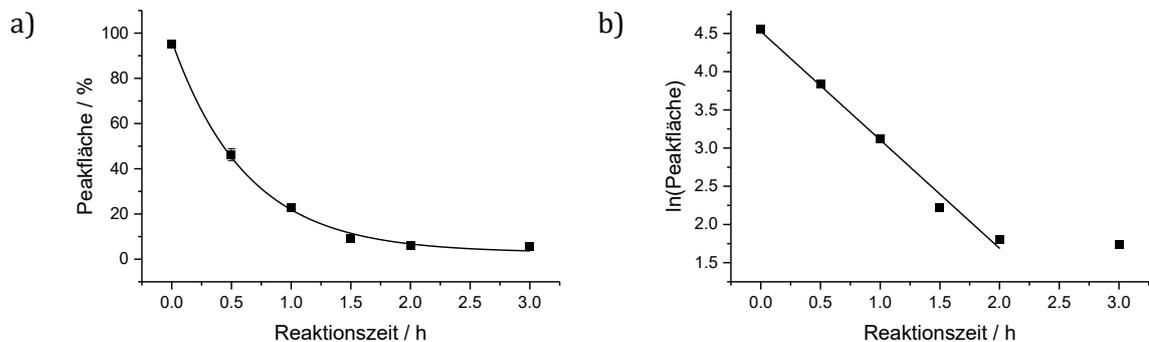
Die Kinetik wurde durch Bestrahlung (2 min, 365 nm) der Lösung initiiert und eine 20  $\mu$ L Probe direkt mittels RP-HPLC analysiert. Die verbleibende Lösung wurde bei 37 °C inkubiert. Direkt nach der Bestrahlung entsteht ein neues Signal, während **PNA1-32** kaum mehr detektiert wird (Abbildung 50 a & b).

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 50:** HPLC-Chromatogramme der Photolyse von **PNA1-32**. a) PNA vor der Bestrahlung, b) PNA nach 2-minütiger Bestrahlung bei 365 nm. Dieselbe Probe nach c) 30 min und d) 90 min. Bedingungen: 30  $\mu$ M **PNA1-32**, 130 mM NaCl, 130 mM MES Puffer, pH 7,0, 37 °C.

Das neue Signal bei 5.3 min konnte mittels MALDI-Massenspektrometrie dem freien Phenol zugeordnet werden. Dieses Signal verschwindet ebenfalls im Laufe der Zeit, da sich spontan das Acetat abspaltet, das Chinonmethid bildet und sofort weiterreagiert. Nach 90 min ist das Signal des Phenols fast vollständig verschwunden (Abbildung 50 d). Die Kinetik der Selbstalkylierung ohne RNA wurde bestimmt, indem die Signale integriert und der Anteil des Phenol-Signals am Gesamtintegral bestimmt wurden (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** a) Kinetik der Selbstalkylierung von **PNA1-32** nach Bestrahlung mit Kurvenanpassung einer Reaktion 1. Ordnung. b) Auftragung des natürlichen Logarithmus der Messwerte gegen die Zeit.

Beim Auftragen des Logarithmus der Messwerte gegen die Zeit zeigen alle Messpunkte (bis auf den letzten) einen linearen Verlauf, was dafürspricht, dass es sich wie erwartet um eine Reaktion 1. Ordnung handelt. Die Kurvenanpassung mit einer Exponentialfunktion ergab eine Halbwertszeit von 0.43 h.

Mit dem System von Rokita ist dies nur bedingt vergleichbar, da die von ihm publizierten Experimente zur Selbstalkylierung bei Raumtemperatur durchgeführt wurden und auch die Fluoridaktivierung die Kinetik beeinflusst.<sup>[46]</sup> So ist bei einem ähnlich aufgebauten Präkursor nach

## 2. Eigene Arbeiten

40 min noch TBDMS-geschütztes Phenol vorhanden und es hat sich erst 20–30 % Selbstaddukt gebildet.<sup>[46]</sup> In einem anderen Experiment mit dem gleichen Präkursor, war die Selbstaddukt-Bildung erst nach mehr als 12 h vollständig.<sup>[44]</sup>

Die Produkte der Selbstalkylierung wurden auch durch MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Hier findet man die Molmasse des Selbstaddukts ( $[M+H^+]$  3211 m/z &  $[M+Na^+]$  3232 m/z), jedoch nicht die des Wasseraddukts oder des MES-Addukts (Abbildung 52).

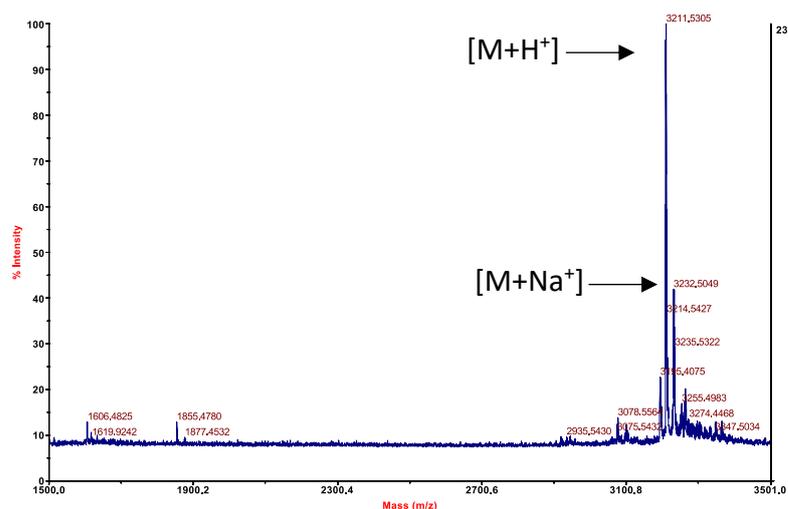
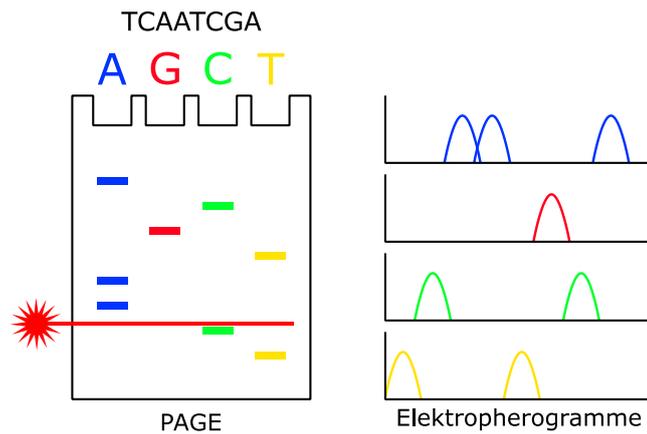


Abbildung 52: MALDI-Massenspektrum des Selbstaddukts von PNA1-32.

### 2.1.6. Analyse der RNA-Alkylierung mithilfe des *ALFexpress*<sup>TM</sup>

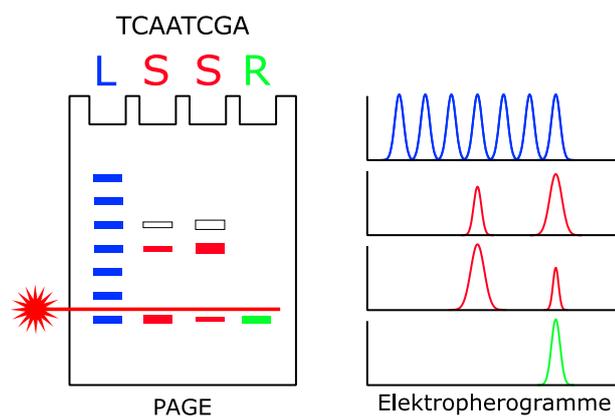
Die Analyse der RNA-Alkylierung durch die synthetisierten Konjugate erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE) auf einem *ALFexpress*<sup>TM</sup> DNA Sequenziersystem. Der *ALFexpress*<sup>TM</sup> besteht aus einer Gelelektrophorese-Kammer, an der am unten Ende der Glasplatte ein 632.8 nm HeNe-Laser angebracht ist, der orthogonal zu den Gelspuren einstrahlt. Wenn fluoreszenzmarkierte Fragmente den Laser passieren, beginnen sie zu emittieren, was von den Fluoreszenzdetektoren, die hinter jeder Spur angebracht sind, erkannt wird (Abbildung 53). Hierdurch ist eine sehr empfindliche Detektion selbst geringer Stoffmengen möglich, die nach Angaben des Herstellers im Bereich 50 amol bis 45 fmol liegt. Außerdem ist in den Gelplatten ein Wasserkreislauf integriert, der mittels eines Thermostaten eine konstante Geltemperatur ermöglicht.

Das System wurde für die DNA-Sequenzierung entwickelt, bei der fluoreszenzmarkierte Terminatoren in PCR-Reaktionen eingesetzt werden, um so markierte DNA-Oligomere der Abbruchsequenzen zu erhalten (Abbildung 53).



**Abbildung 53:** Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung mittels des ALFexpress™.

Die erhaltenen Elektropherogramme lassen sich mit der mitgelieferten Software quantitativ auswerten, indem beliebige Signal-Bereiche integriert werden. Im Arbeitskreis Göbel ist die RNA-Fragmentanalyse mittels ALFexpress™ eine etablierte Methode, um die Spaltstelle und -rate von metallfreien, künstlichen Ribonukleasen zu ermitteln.<sup>[179][180]</sup> Hierfür werden in bestimmten Zeitintervallen Proben aus der Inkubation der künstlichen Ribonuklease mit der entsprechenden RNA entnommen und mittels des ALFexpress™ analysiert. Die RNA ist hierbei am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert, sodass durch die Spaltung ein kürzeres Fragment mit Fluorophor entsteht und ein Fragment ohne Fluorophor, das auf dem ALFexpress nicht detektiert wird. Mit einer zusätzlich aufgetragenen Hydrolyseleiter der RNA besteht die Möglichkeit die Spaltstelle genau zuzuordnen (Abbildung 54).



**Abbildung 54:** Schematische Darstellung der Analyse der RNA-Spaltung durch eine künstlichen Ribonuklease. (L = Hydrolyseleiter, S = Probe der Spaltung, R = ungespaltene RNA)

Diese Analysemethode eignet sich auch zur Untersuchung der Alkylierung von Nucleinsäuren. Da PNA ein ungeladenes Rückgrat hat und ansonsten nur eine positive Ladung am Lysin, ist davon auszugehen, dass sie sich während der Gelelektrophorese in Richtung der Kathode bewegt. Nucleinsäuren bewegen sich aufgrund des negativ geladenen Rückgrats entgegengesetzt in Richtung der Anode. Aufgrund der hohe Affinität von PNA ist für eine vollständige Trennung der

Duplexe jedoch die Verwendung von harnstoffhaltigem Ladepuffer und Gel (denaturierende PAGE<sup>[181]</sup>) nötig. Native Gele können für Bindungsexperimente und *Bandshift-Assays* benutzt werden, hier bleibt die Hybridisierung trotz der positiven Ladung der PNA bestehen.<sup>[182]</sup>

Nach der Alkylierung der RNA durch ein PNA-Chinonmethid-Konjugat sind die Oligomere kovalent verbunden. In einem nativen Gel würde demnach kein Unterschied im Laufverhalten sichtbar werden. Erst nach Denaturierung besitzt die alkylierte RNA ein deutlich langsames Laufverhalten als die unveränderte RNA. Für eine erfolgreich Denaturierung wurde neben der Verwendung von Harnstoff auch die Gelelektrophorese bei einer erhöhten Temperatur von 57 °C durchgeführt, wie es bei der etablierten Analyseverfahren für künstliche Ribonukleasen der Fall war.

### 2.1.7. Sequenzselektivität

Neben der Voraussetzung, dass ein Alkylans hohe Ausbeuten erreicht, ist auch wichtig, dass es spezifisch reagiert. Besonders bei einer späteren *in vivo* Anwendung in Zellen sollte sichergestellt werden, dass nur die gewünschte Sequenz alkyliert wird und keine *off-target*-Effekte auftreten. Für die Erkennung der Ziel-Sequenz wurde eine 10mer PNA eingesetzt, die im Arbeitskreis bereits für RNA-Spaltung verwendet wurde. Diese PNA-Länge wurde auch in Arbeiten der Rokita-Gruppe<sup>[44]</sup> verwendet und bietet theoretisch eine Spezifität von 1 zu  $4^{10}$  (= 1.048.576). Um zu bestätigen, dass die Alkylierung auf Sequenzerkennung basiert, wurde die Bindungssequenz von PNA und RNA verändert. Um möglichst identische Bedingungen für die neue Sequenz zu erhalten, wurden einige Voraussetzungen festgelegt: 1. Die Nucleobasen außerhalb der Bindungsstelle wurden nicht geändert, sodass die gleichen ungepaarten Nucleobasen alkyliert werden können. 2. Die neue Bindungssequenz besteht aus den gleichen Nucleobasen, es wurde nur eine Permutation von 6 Nucleobasen durchgeführt. 3. Die letzten beiden Nucleobasen des *N*-terminus (AG) wurden lediglich getauscht (GA), damit die gepaarten Nucleobasen in Reichweite des Chinonmethids nicht geändert werden. 4. Auch an drittletzter Position sollte kein Uridin stehen, damit in der komplementären PNA kein Adenosin an dieser Stelle steht, was evtl. zur Bildung von mehr Selbstaddukten führen könnte (vgl. Nucleobasenpräferenz des Chinonmethids Kapitel 1.1.7).

Mit diesen Anforderungen wurden mithilfe eines *Python-Scripts* die Schmelztemperaturen aller möglichen Sequenzen berechnet. Dafür wurde „itertools“ für die Generierung der Permutationen und das „Biopython“-Paket<sup>[183]</sup> mit „nearest neighbour thermodynamics“ und den Tabellen von Allawi & SantaLucia<sup>[184]</sup> für die Schmelztemperaturberechnung verwendet. Da es „Biopython“ nicht möglich ist, PNA-Schmelztemperaturen zu berechnen, wurde ein DNA-DNA-Duplex angenommen. Zwar wurde von Nielsen eine Methode für die Schmelztemperaturberechnung von PNA veröffentlicht<sup>[185]</sup>, jedoch hat diese als Parameter die DNA-Schmelztemperatur, den

## 2. Eigene Arbeiten

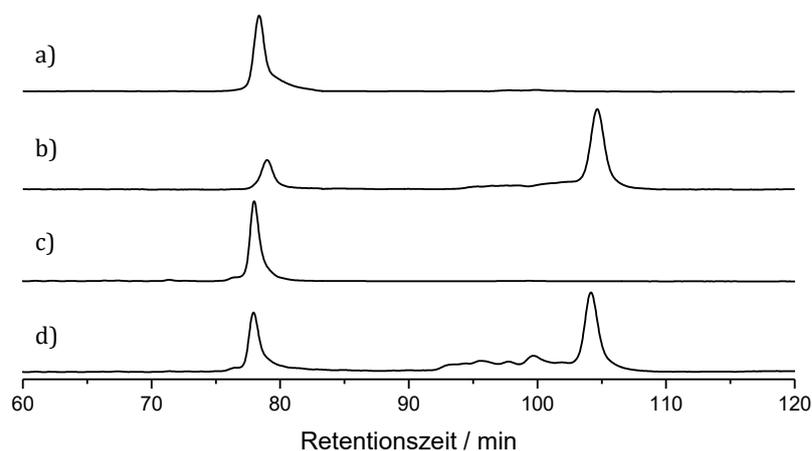
Pyrimidin-Anteil und die Sequenzlänge. Da die letzten beiden Werte für alle Sequenzen identisch sind, ergibt sich lediglich ein linearer Zusammenhang zwischen DNA- und PNA-Schmelztemperatur, der für einen relativen Vergleich zwischen den Werten nicht nötig ist.

Auf diese Weise wurde die DNA „3'-AACACGCTCT-5'“ als Sequenz mit der höchsten theoretischen Schmelztemperatur von 38.9 °C ermittelt, während für die vorherige Sequenz 33.7 °C berechnet wurden (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Für die Überprüfung der Sequenzselektivität verwendete Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz
<b>PNA1</b>	Lys-AACAGTCCTC-NH-(C <sub>6</sub> )-(Alkin)
<b>RNA1</b>	5' Cy5-T10-AUACCUUGUCAGGAGAAGAGAGGCCGUUA-T4 3'
<b>RNA2</b>	5' Cy5-T10-AUACCUUGUGCGAGAAGAGAGGCCGUUA-T4 3'
<b>PNA2</b>	Lys-AACACGCTCT-NH-(C <sub>6</sub> )-(Alkin)

Mit der neuen **RNA2** konnte nun überprüft werden, ob 6 Basenfehlpaarungen zur Inhibierung der Alkylierung führen bzw. die gezielte Alkylierung durch die Basenpaarung vermittelt wird. Außerdem wurde mit einem zur neuen Bindungsstelle von **RNA2** komplementären PNA-Konjugat **PNA2-32** der Einfluss auf die Alkylierungskinetik untersucht. Unter denselben Bedingungen (3 µM RNA, 6 µM Konjugat, 130 mM NaCl, 130 mM MES pH 7.0) wie in vorherigen Experimenten wurde nun **RNA1** mit Konjugat **PNA2-32** und **RNA2** mit Konjugat **PNA1-32** bestrahlt und für 64 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels des *ALFexpress*<sup>™</sup> analysiert (Abbildung 55).

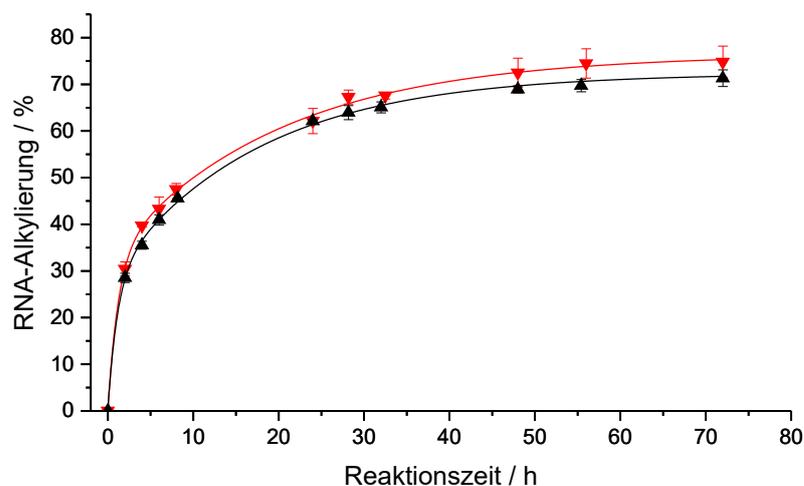


**Abbildung 55:** Elektropherogramme der untersuchten Konjugat- und RNA-Kombinationen. a) **RNA1** mit **PNA2-32**, b) **RNA1** mit **PNA1-32**, c) **RNA2** mit **PNA1-32**, d) **RNA2** mit **PNA2-32**. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6 µM Konjugat, 3 µM RNA, 130 mM NaCl und 130 µM MES-Puffer (pH 7.0), 64 h nach Bestrahlung)

Die sehr geringe Alkylierungsausbeute (< 5 %), wenn nicht komplementäre Stränge zusammen inkubiert werden, bestätigt die Vermittlung der Alkylierung durch die Hybridisierung des Konjugats.

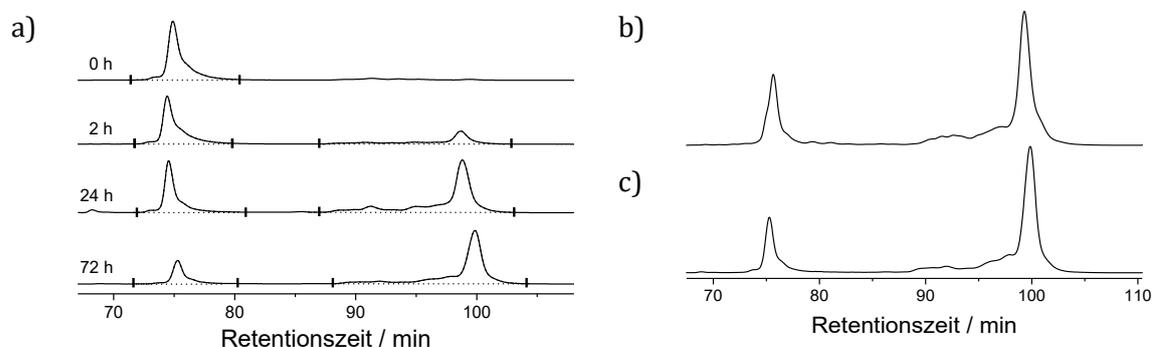
### Alkylierung von RNA2 durch PNA2-32

Mit der neuen RNA2 und dem Konjugat PNA2-32 war es nun auch möglich zu untersuchen, inwiefern die Reaktionsrate und Ausbeute von der Sequenz abhängig sind, denn theoretisch hat die neue Bindungssequenz auch einen höheren Schmelzpunkt. Unter denselben Bedingungen wie für PNA1-32 und RNA1 (6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM MES pH 7.0, 130 mM NaCl) wurde nun RNA2 und PNA2-32 zusammen bestrahlt, bei 37 °C inkubiert und nach bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen, die mittels des *ALFexpress*<sup>TM</sup> analysiert wurden. Aus den erhaltenen Elektropherogrammen ließ sich die Alkylierungsausbeute bestimmen (Abbildung 56).



**Abbildung 56:** Kinetik der Alkylierung von RNA1 durch PNA1-32 (schwarze Dreiecke) und RNA2 durch PNA2-32 (rote Dreiecke). Kurvenanpassung dient der besseren Visualisierung. (Vorläufiges Ergebnis, siehe Kapitel 2.1.11)

Die Reaktionskinetiken und Ausbeuten (76 % mit PNA1-32 vs. 73 % mit PNA2-32) sind nahezu identisch, Abweichungen können hier durch systematische Fehler, wie z.B. Pipettierfehler entstanden sein. Da nur die Bindungssequenz geändert wurde, die aufgrund der Basenpaarung nicht für Alkylierung zugänglich sein sollte, waren identische Kinetiken auch zu erwarten.



**Abbildung 57:** a) Elektropherogramme der Alkylierung von RNA2 durch PNA2-32 0–72 h nach Bestrahlung (Integrationsgrenzen sind durch Striche markiert). Elektropherogramm der Alkylierung von b) RNA1 durch PNA1-32, c) RNA2 durch PNA2-32 nach 72 h. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0))

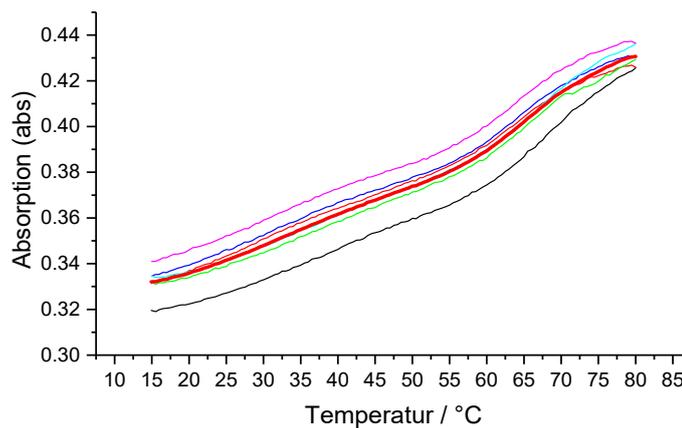
## 2. Eigene Arbeiten

---

Auch das Signalmuster der entstandenen Alkylierungsprodukte ist nahezu identisch, geringe Unterschiede könnten auf den Tausch der Basen am *N*-Terminus der PNA zurückzuführen sein. Das letzte bindende Basenpaar ist bei **PNA2-32** das schwächere A-T mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen anstelle von G-C mit drei Wasserstoffbrückenbindungen, sodass möglicherweise auch das Adenosin zur Alkylierung zur Verfügung steht.

### 2.1.8. Schmelztemperaturen der Duplexe aus Konjugat und RNA

Da die Sequenzänderungen für den Duplex aus **RNA2** und **PNA2-32** laut dem Vorhersage-Algorithmus<sup>[183]</sup> (siehe Kapitel 2.1.7) zu einem höheren Schmelzpunkt führen sollte, überprüfte man diesen experimentell. Hierfür wurden die gleichen Pufferbedingungen wie bei der Inkubation verwendet und die Absorptionsänderung bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur bei einer RNA- und PNA-Konzentration von jeweils 1  $\mu$ M gemessen. Die erhaltenen Rohdaten entsprachen zunächst nicht den Erwartungen (Abbildung 58).



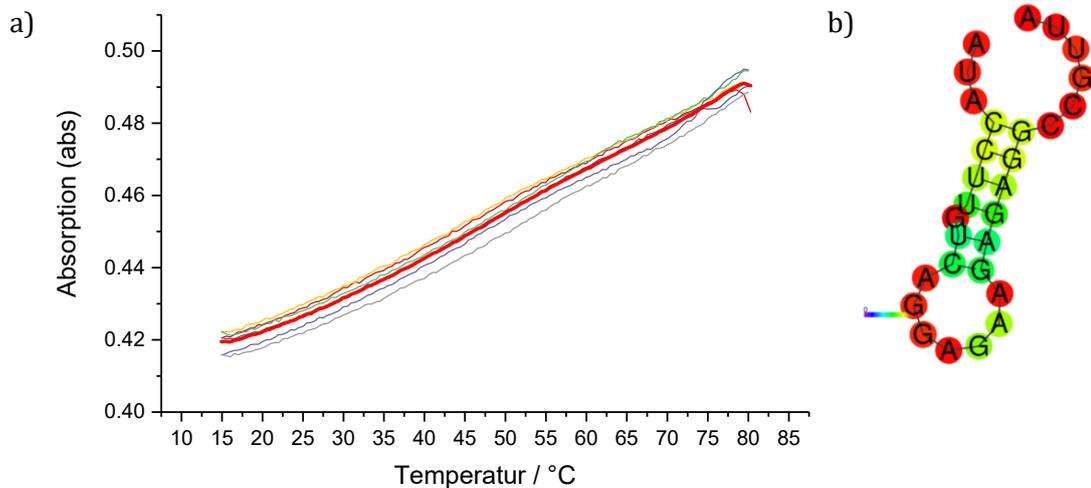
**Abbildung 58:** Gemessene Schmelzkurven des Duplexes aus **RNA1** und **PNA1-32** bei 260 nm.

Die gemessenen Schmelzkurven sind fast linear und weist nicht den typischen sigmoidalen Verlauf einer Schmelzkurve mit klar erkennbarem Wendepunkt auf, der die Schmelztemperatur angibt. Daher war fraglich, ob sich der Schmelzpunkt im Messbereich (15–80 °C) befindet. Zwar können PNAs zusammen mit RNAs sehr hohe Schmelztemperaturen erreichen, doch ein Wert über 85 °C erschien bei einem 10mer als eher unwahrscheinlich. Zur Überprüfung der Methode wurden Messungen ausschließlich mit **RNA1** ohne **PNA1-32** durchgeführt. Hier zeigte sich ein deutlich linearer Verlauf (Abbildung 59), wie er für ungepaarte ssRNA zu erwarten ist.<sup>[186]</sup> Es wäre auch denkbar gewesen, dass die RNA teilweise selbstkomplementär ist und eine Haarnadelstruktur ausbildet, was zu einem zusätzlichen Schmelzpunkt geführt hätte.

Mithilfe des „*RNAfold* Webserver“ der Uni Wien wurde die Sekundärstruktur der RNA vorhergesagt.<sup>[187]</sup> Die berechnete Haarnadelstruktur enthält jedoch Wobble-Basenpaarung (G-U)

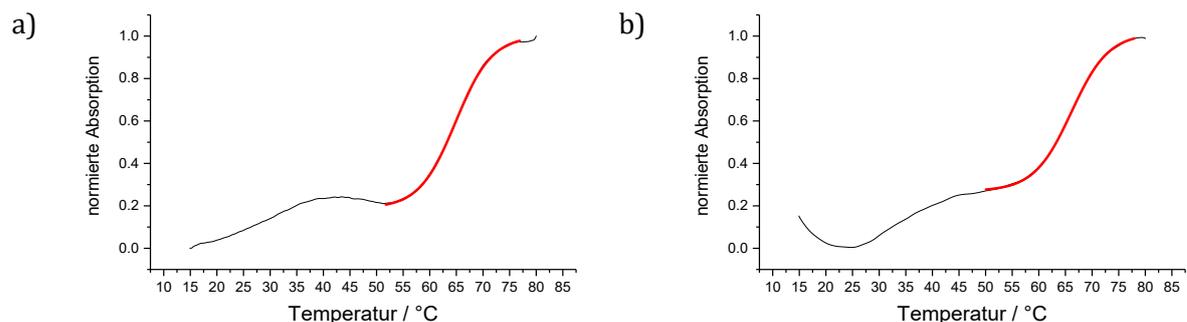
## 2. Eigene Arbeiten

und einen *bulge*, was sie energetisch ungünstig macht. Dies spiegelt sich auch im Farbcode wider, der nur eine mittelmäßige Basenpaarungs-Wahrscheinlichkeit zeigt (Abbildung 59 b).



**Abbildung 59:** a) Temperaturabhängige Absorptionsänderung von **RNA1** („Schmelzkurven“ **RNA1**) b) Mithilfe des „*RNAfold* Webserver“ vorhergesagt schwache Sekundärstruktur von **RNA1**.

Für die Auswertung wurde daher die Absorptionsänderung der ssRNA als Grundlinie angenommen und von den Werten des RNA-PNA-Duplexes subtrahiert. So konnte eine Schmelzpunktcurve erhalten werden, wie sie zu erwarten wäre. Zur Bestimmung des Wendepunkts, welcher der Schmelztemperatur entspricht, wurde eine Kurvenanpassung unter Verwendung einer Sigmoidfunktion (Boltzmann) durchgeführt. So wurde eine Schmelztemperatur von 64.8 °C erhalten. Für **PNA2-32** und **RNA2** wurde ein Schmelzpunkt von 66.1 °C ermittelt, der somit leicht höher ist, wie es auch die Berechnung vorhergesagt hat.



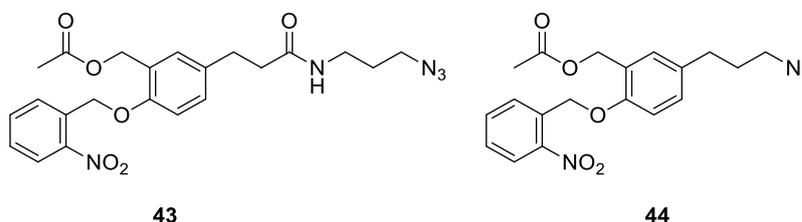
**Abbildung 60:** Schmelzkurven der Duplexe aus a) **RNA1** und **PNA1-32** sowie b) **RNA2** und **PNA2-32** nach Subtraktion einer linearen Funktion und Kurvenanpassung mit einer Sigmoidfunktion (rote Kurve).

Die geringe Änderung der Absorption könnte daraus resultieren, dass hier eine 43mer RNA (einschließlich DNA-Teil) mit einer 10mer PNA hybridisiert und die lineare Steigerung der Absorption aufgrund der hohen Anzahl an ungepaarten Nucleobasen überwiegt. Tedeschi *et al.* beispielsweise haben bei der Messung der Schmelztemperatur eines Duplexes aus einer 18mer DNA und einer 10mer PNA eine ähnlich geringe Absorptionsänderung festgestellt.<sup>[188]</sup> Ein weiterer Grund für die geringe Änderung ist die geringe Oligomer-Konzentration von 1 µM. Da für

die Messung jedoch ein Volumen von 1000  $\mu\text{L}$  nötig waren, wurde die Konzentration nicht weiter erhöht.

### 2.1.9. Alkylierungsexperimente mit unterschiedlicher *Linker*-Länge

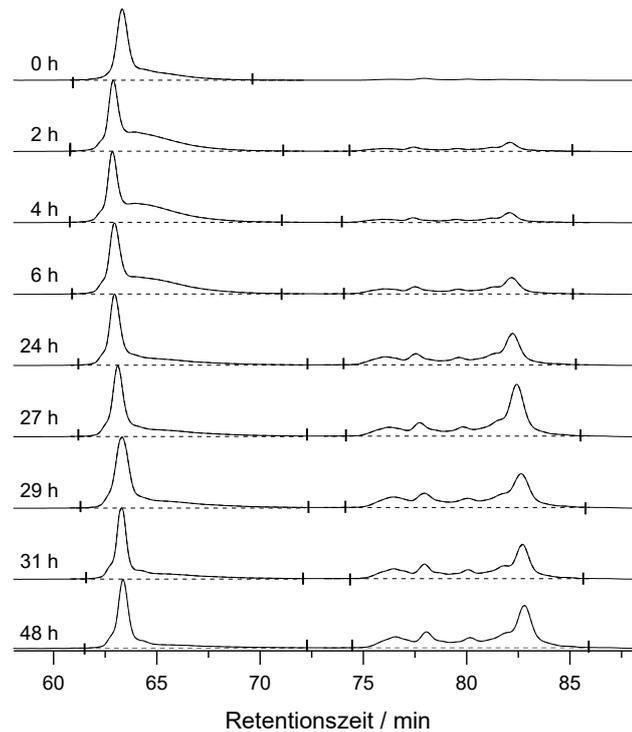
Zusammen mit **PNA1** wurden aus den Verbindungen **43** und **44** Konjugate hergestellt, die wie in Kapitel 2.1.2 besprochen unterschiedlich lange *Linker* zwischen PNA und Chinonmethid-Präkursor tragen (Abbildung 61). Für die Messung der Alkylierungsgeschwindigkeit und -ausbeute mit **RNA1** wurden die üblichen Bedingungen (6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0)) verwendet. Nach zweiminütiger Bestrahlung der Proben, wurden sie bei 37 °C inkubiert und nach bestimmten Zeitintervallen 1  $\mu\text{L}$  Proben entnommen, die bei -20 °C bis zur Analyse gelagert wurden. Die Proben wurden schließlich durch PAGE mithilfe des *ALFexpress*<sup>™</sup> DNA Sequenzierers analysiert.



**Abbildung 61:** Chinonmethid-Präkursoren mit unterschiedlicher Länge des *Linkers*.

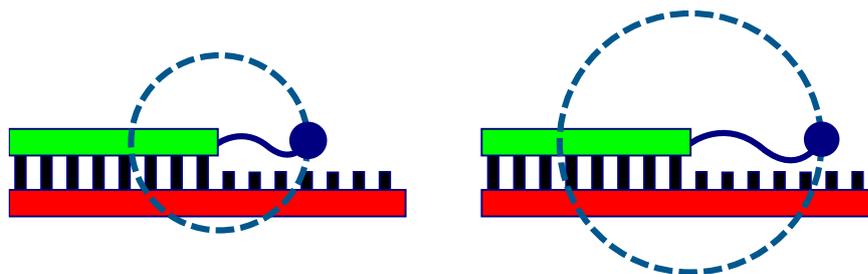
Für den Vergleich mit Konjugat **PNA1-32** wurde von Konjugat **PNA1-44** mit kürzerem *Linker* eine Inkubation angesetzt, von der über 48 h Proben genommen wurden, die mittels des *ALFexpress*<sup>™</sup> analysiert wurden.

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 62:** Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch Konjugat **PNA1-44**. (Integrationsgrenzen sind durch Striche markiert. Vorläufiges Ergebnis, siehe Kapitel 2.1.11. Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

In Abbildung 62 ist ein Ausschnitt der Elektropherogramme zu sehen, die den zeitlichen Verlauf der Alkylierung abbilden. Bei einer Retentionszeit von 63 min ist die **RNA1** zu sehen, während die Alkylierungsprodukte retardiert werden und im Bereich 74–85 min auftreten. Erkennbar ist auch, dass es sich hier nicht um ein einheitliches Produkt handelt, sondern mehrere überlappende Signale entstehen, mit einem Hauptprodukt bei 83 min. Die Ursachen hierfür könnte das Entstehen verschiedener Konstitutionsisomere sein. Das Chinonmethid hat zwar eine Präferenz für bestimmte Nucleobasen, aber durch die Anbindung an die PNA kommt noch ein räumlicher Faktor hinzu: Aufgrund des kürzeren *Linkers* hat **PNA1-44** weniger Freiheiten und eine geringere Reichweite. Daher könnten sich Alkylierungsprodukte bilden, die aus elektronischen Gründen ungünstiger wären und nur durch sterische Effekte aufgrund der räumlichen Einschränkung entstehen (Abbildung 63).

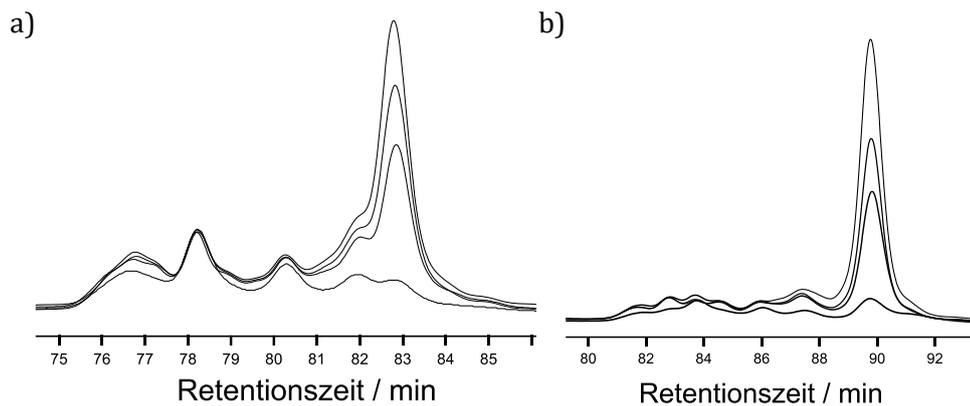


**Abbildung 63:** Vereinfachte Darstellung der Reichweite eines Konjugats mit kurzem und langem *Linker*.

## 2. Eigene Arbeiten

---

Die Konstitutionsisomeren könnten andere Sekundärstrukturen bilden, die wiederum die Migration des Oligomers beeinträchtigen. Zwar wurden den Proben und dem Gel Harnstoff zugesetzt, doch durch die Alkylierung könnte dennoch Hybridisierung möglich sein. Die kovalente Bindung führt dazu, dass sich die Nukleobasen des PNA- und RNA-Strangs weiterhin räumlich nah sind. Vor allem bei Überlagerung der Elektropherogramme wird die zeitliche Entwicklung der Alkylierungsprodukte sichtbar (Abbildung 64 a). Anfangs dominieren die Signale im Bereich von 74–82 min und erst nach einigen Stunden entsteht das Signal bei 83 min.



**Abbildung 64:** Überlagerung der Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch a) Konjugat **PNA1-44** b) Konjugat **PNA1-32**. (0–48 h nach Bestrahlung, Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

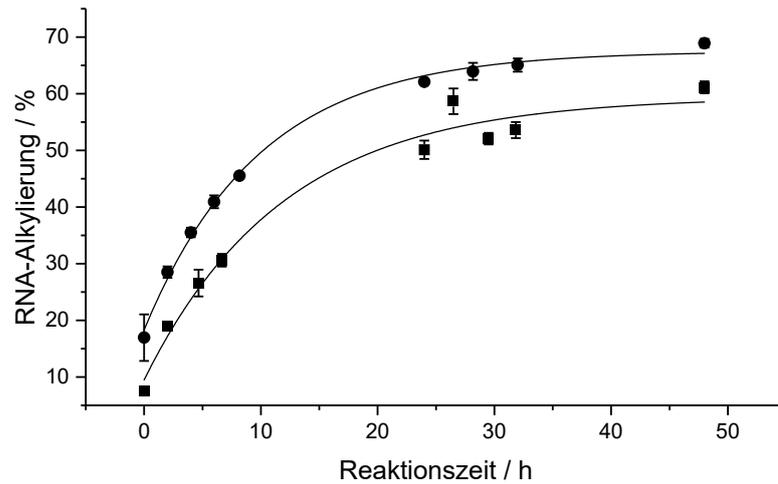
Im Vergleich dazu entstehen bei der Alkylierung von **RNA1** mit Konjugat **PNA1-32** ebenso zuerst Produkte im Bereich 80–88 min und anschließend das Hauptprodukt bei 90 min (Abbildung 64 b). Die Nebenprodukte machen hier jedoch nicht so einen großen Anteil aus.

Direkt neben dem *N*-Terminus der PNA befindet sich die ungepaarte RNA-Sequenz „AAGA“, bei der die Adenosine präferierte Alkylierungsziele sind, sodass die Linkerlänge entscheidend für die Selektivität sein könnte und durch den längeren *Linker* mehr Adenosine erreichbar sind. Alternativ könnte es durch den langen *Linker* auch ungünstig sein, die erste ungepaarte Nukleobase zu alkylieren. Die real vorliegende räumlichen Struktur ist hier schwer abzuschätzen.

Für die Auswertung der Ausbeute und der Kinetik wurden die entsprechenden Signale im Elektropherogramm integriert und der Anteil des Alkylierungsprodukts am Gesamtintegral bestimmt. Die Messwerte wurden dann in *OriginPro™* importiert, grafisch aufgetragen und zur Visualisierung eine Exponentialfunktion an die Daten angepasst.

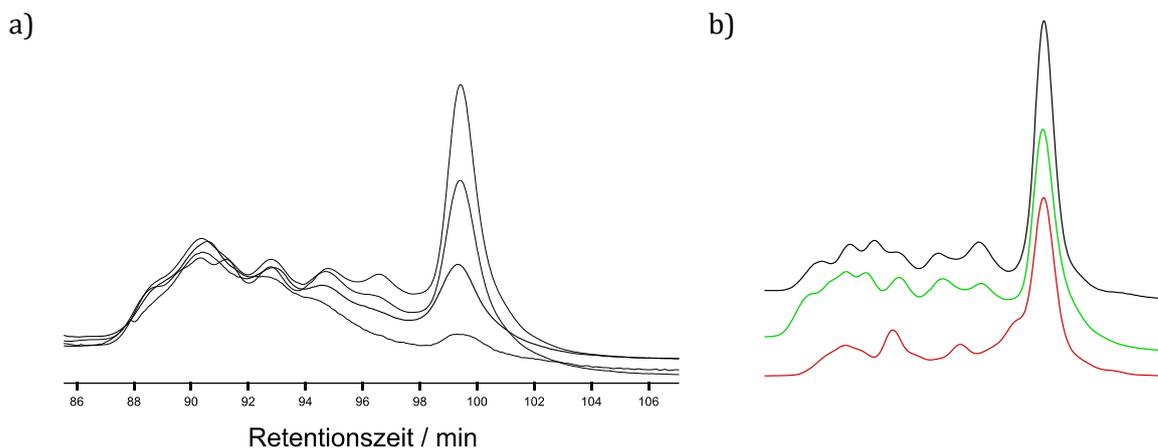
Bei zugrundelegen einer Reaktion 1. Ordnung wird für das Konjugat **PNA1-44** mit kürzerem *Linker* zum Chinonmethid eine ähnliche Halbwertszeit von 8.3 h erhalten, bei Konjugat **PNA1-32** betrug sie 7.7 h. Deutlich zu sehen ist jedoch die um fast 10 % geringere Ausbeute (Abbildung 65).

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 65:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32** (Kreise) und **PNA1-44** (Quadrate). (6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0))

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anschließend das Konjugat **PNA1-43** mit einer zusätzlichen Methylengruppe in der *Linker*-Struktur untersucht. Dieses zeigte ebenfalls ein ausgeprägtes Muster an Nebenprodukten, aber führt zu einer geringeren Ausbeute als Konjugat **PNA1-32**. Das Muster der Alkylierungsprodukte ist zwischen Konjugat **PNA1-43** und Konjugat **PNA1-32** sehr ähnlich, was vermuten lässt, dass die um eine Methylengruppe längere Kette kaum Einfluss auf die Struktur der Produkte hat (Abbildung 66 a). Im Gegensatz dazu scheint Konjugat **PNA1-44** durch die fehlende Amidgruppe und den kürzeren *Linker* ein Produktmuster mit anderer Verteilung der Nebenprodukte zu bilden (Abbildung 66 b).

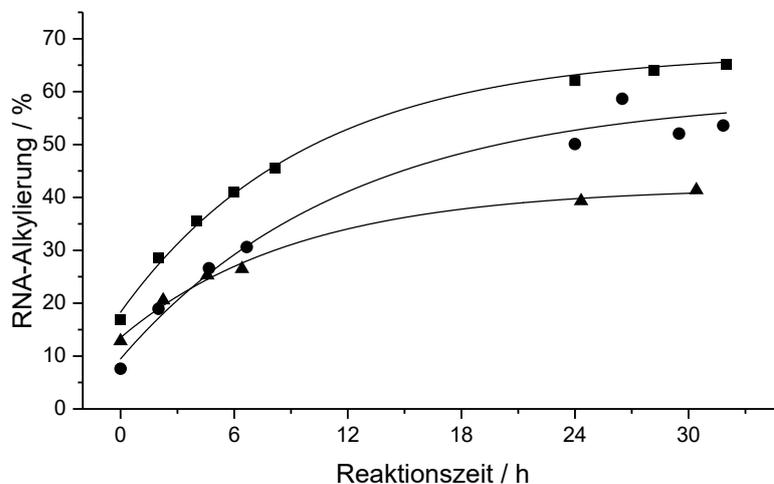


**Abbildung 66:** a) Überlagerung der Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-43**, 0–48 h nach Bestrahlung. b) Alkylierungsprodukt der Konjugate **PNA1-32** (Oben, schwarz), **PNA1-43** (Mitte, grün) und **PNA1-44** (Unten, rot) nach 48 h. (Gelelektrophorese bei 57  $^{\circ}\text{C}$ , 6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0)).

Vergleicht man nur die Kinetik, hat das längere Konjugat eine Halbwertszeit von 6.5 h, was ähnlich den anderen Konjugaten ist. Die erreichte Ausbeute liegt mit 40 % nach 30 h aber deutlich unter den Werten der anderen Konjugate, die 55 % bzw. 65 % erreichten (Abbildung 67). Grund dafür könnten hydrophobe Wechselwirkungen der *Linker* sein. Aufgrund der ähnlichen

## 2. Eigene Arbeiten

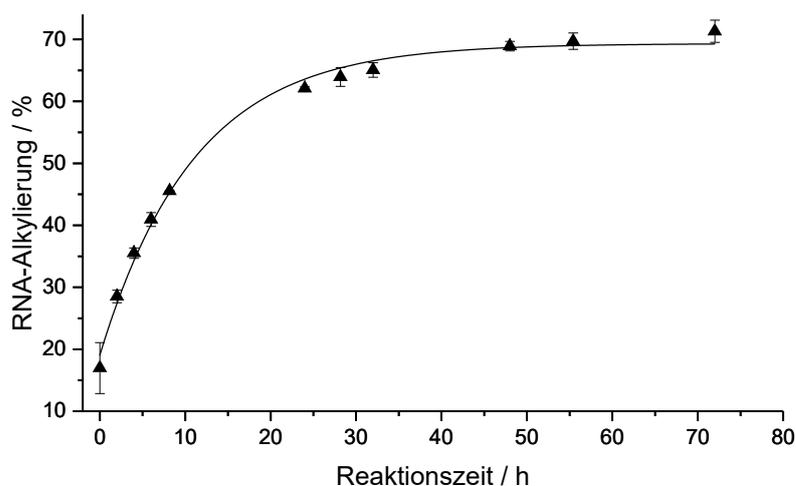
Halbwertszeiten ist davon auszugehen, dass die Alkylierungsgeschwindigkeit vor allem von den elektronischen Eigenschaften des Chinonmethids bestimmt wird, die bei allen Konjugaten gleich sind.



**Abbildung 67:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32** (Quadrate), **PNA1-44** (Kreise) und **PNA1-43** (Dreiecke). (6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0))

### 2.1.10. Vergleich der Selbst- und RNA-Alkylierungskinetiken

In Kapitel 2.1.5 wurde für die Selbstalkylierung des Konjugats **PNA1-32** eine Halbwertszeit von 0.43 h bestimmt. Die Selbstalkylierung geschieht damit deutlich schneller als die RNA-Alkylierung, bei der mit **RNA1** und **PNA1-32** unter Annahme einer Reaktion 1. Ordnung eine Halbwertszeit von 7.7 h ermittelt wurde (Abbildung 68, vgl. auch Kapitel 2.1.7).



**Abbildung 68:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32** mit Kurvenanpassung einer Reaktion 1. Ordnung. (6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0))

## 2. Eigene Arbeiten

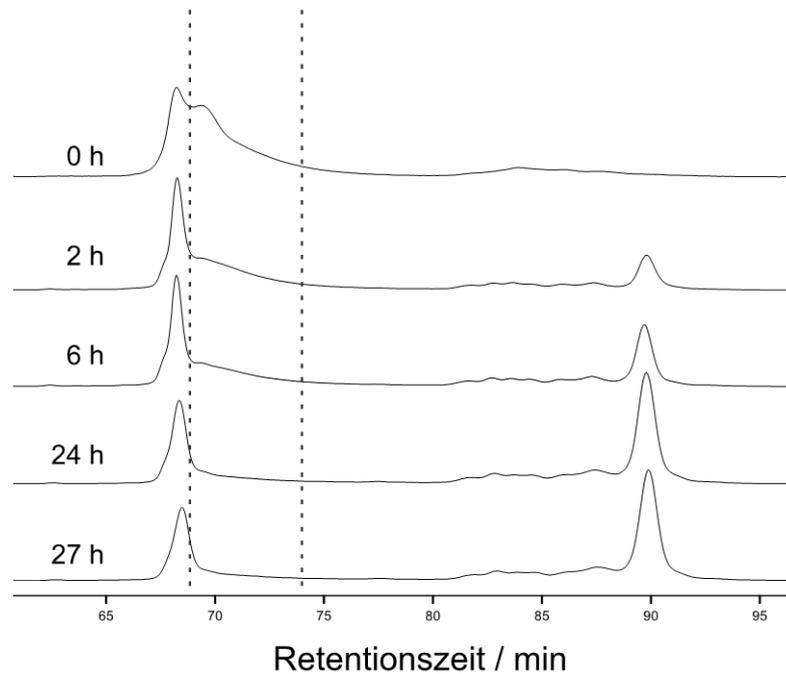
---

Unterschiede könnten durch die unterschiedlichen Analysemethoden für die Ermittlungen der Kinetiken kommen. So ist es bei dPAGE nicht möglich zu bestimmen, wie viele Konjugate noch als Ester vorliegen und noch kein Acetat abgespalten haben. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion sollte aber unabhängig von der Präsenz der RNA sein. Anders als bei der Selbstalkylierung ist aber, dass durch die Zugabe der RNA das Chinonmethid als Reaktionspartner nun sowohl PNA- als auch RNA-Nukleobasen zur Verfügung hat. Der große Unterschied in den Kinetiken muss demnach bedeuten, dass die Chinonmethide nicht direkt zu den RNA-Alkylierungsprodukten reagieren, die am Ende mittels des *ALFexpress*<sup>™</sup> detektiert werden. Auf dem Gel können nur alkylierte RNAs detektiert werden, die während des Gellaufs bei 57 °C stabil sind. Damit sind die Selbstalkylierung der Konjugate und reversible, labile RNA-Alkylierungsprodukte nicht messbar.

Durch die ausgiebigen Untersuchungen der Reaktion von Chinonmethiden mit Nucleinsäuren, vor allem durch die Arbeitsgruppe von Rokita, ist bekannt, dass die Alkylierung reversibel ist, abhängig davon welche Nucleobase und Position alkyliert wird. Auf die Analyse mittels RP-HPLC hat dies jedoch kaum einen Einfluss: Die RP-HPLC-Trennung basiert auf der Wechselwirkung der unpolaren, stationären Phase (C<sub>18</sub>-Ketten auf Kieselgel), den Molekülen und dem Laufmittel, das sich mit einem Gradienten von polar zu unpolar ändert. Die Retention hängt somit von der Polarität der Moleküle ab. Je nach alkylierter Nucleobase wird sich das Laufverhalten somit kaum ändern, da sich auch die Polarität kaum ändert. Eine Umlagerung während der Trennung könnte somit lediglich zu breiteren Signalen führen.

Bei der Analyse der RNA-Alkylierung mittels dPAGE hat die Reversibilität jedoch einen großen Einfluss. Die Retention wird hier durch die Masse der Oligomere bestimmt. Durch die Alkylierung wird die Masse deutlich größer und die mit ungeladener PNA alkylierte RNA migriert somit deutlich langsamer. Geschieht ein Bindungsbruch zwischen RNA und Konjugat während der Gelelektrophorese, wäre dieser sehr wahrscheinlich irreversibel. Da reine PNA nicht oder entgegengesetzt in Richtung Kathode wandert, während die freie RNA nun deutlich schneller migriert, ist nicht mehr sichtbar, ob die RNA zwischenzeitlich alkyliert wurde. Der Verbleib der PNA ist auf dem Gel nicht sichtbar, da sie nicht Cy5-markiert ist.

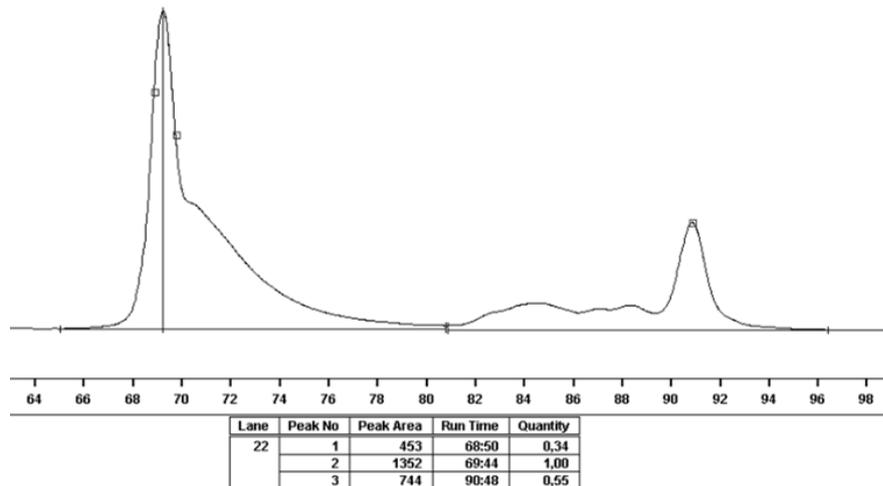
Bei Betrachtung der Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** mit **PNA1-32** zeigt sich jedoch ein Hinweis, dass labile Alkylierungsprodukte entstanden sein könnten, die sich während der Gelelektrophorese wieder getrennt haben.



**Abbildung 69:** Elektropherogramm der Alkylierung von **RNA1** mit **PNA1-32**. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

Vor allem in den Elektropherogrammen, die die RNA kurz nach der Bestrahlung zeigen, ist das RNA-Edukt-Signal sehr verbreitert, was von reversiblen Alkylierungsprodukten kommen könnte (Abbildung 69). Dafür spricht, dass das Signal sehr breit ist, da die Bindung früh bricht und es mit fortschreitender Inkubationszeit abnimmt, da immer mehr reversible Alkylierungsprodukte in irreversible umgewandelt werden, die vor allem im Signal bei 90 min zu sehen sind (vgl. zeitlicher Verlauf der Alkylierung von Desoxynukleotiden, Kapitel 1.1.7). Diese Signalverbreiterung ähnelt dem aus der HPLC bekannten „Peak Tailing“, dessen Ursache eine Reaktion während des Laufs sein kann, bspw. eine uneinheitliche Protonierung durch einen falsch gewählten pH-Wert des Eluenten.

Um den Anteil des verbreiterten Signals zu bestimmen, wurde eine Spur exemplarisch so ausgewertet, als wäre das RNA-Edukt-Signal symmetrisch (Abbildung 70). Bis zum Maximum entspricht das Signal auch der zu erwartenden Form einer Gaußfunktion, daher wurde das Integral der linken Hälfte (453) verdoppelt und vom gesamten Integral des verbreiterten Signals subtrahiert ( $1352 - 453 = 899$ ). Somit könnte die Alkylierungsausbeute nach 2 h tatsächlich bereits 65 % statt 29 % betragen.



**Abbildung 70:** Alternative Auswertung der Integrale des Elektropherogramms.

### 2.1.11. Variation der dPAGE-Temperatur

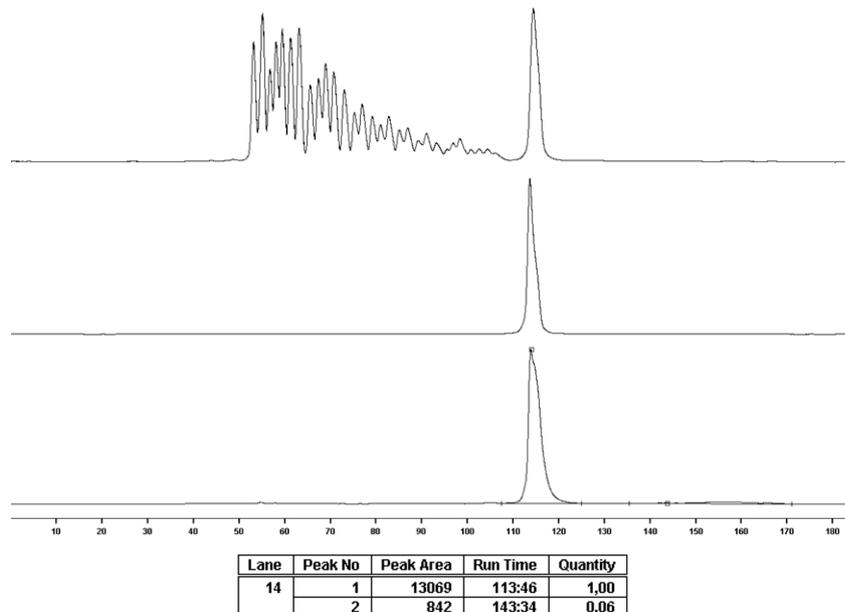
Das „Peak Tailing“ bedeutet, dass die Bindung zwischen RNA und Konjugat erst während der Gelelektrophorese gebrochen wird, was sehr wahrscheinlich durch die hohe Geltemperatur ausgelöst wird. Aufgrund der Erfahrungen des Arbeitskreises mit PNA-Konjugaten künstlicher Ribonukleasen wurde stets eine Geltemperatur von 57 °C gewählt<sup>[179,180]</sup>, um eine vollständige Trennung von RNA und PNA zu erreichen. Im Rahmen der Alkylierung von RNA sollte dies jedoch neu bewertet werden, da ein vorzeitiger Bruch der Bindung aufgrund der hohen Temperatur ein falsches Bild davon vermittelt, welche Produkte bei 37 °C während der Inkubation vorliegen.

Wird die Hybridisierung nicht aufgehoben, würde es zu einer Erhöhung der Retentionszeiten kommen, was einem „Band Shift Assay“ ohne Harnstoff entsprechen würde und es wäre nicht mehr ersichtlich, ob die Retentionszeitverschiebung aus der kovalenten Bindung resultiert oder nur aus der Hybridisierung. In Kapitel 2.1.8 wurde für den Duplex aus **PNA1-32** und **RNA1** eine Schmelztemperatur von 64.8 °C bestimmt, sodass ohne Harnstoff bei 25 °C keine Trennung auftreten sollte.

Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob bei 25 °C eine Denaturierung mit Harnstoff möglich ist: Konjugat **PNA1-32** und **RNA1** wurden ohne Bestrahlung für 72 h inkubiert und anschließend versucht, bei einer Elektrophorese-Temperatur von 25 °C die Stränge mittels dPAGE zu trennen. Das gemessene Elektropherogramm zeigt die vollständige Denaturierung und beweist, dass die hohe Harnstoff (7 M) Konzentration bei dieser 10mer PNA ausreicht (Abbildung 71).

## 2. Eigene Arbeiten

---



**Abbildung 71:** Elektropherogramme a) des Hydrolysemusters von **RNA1**, b) **RNA1** ohne PNA, c) **RNA1** und **PNA1-32** nach 72 h Inkubation ohne Bestrahlung. (Gelelektrophorese bei 25 °C, 6 µM Konjugat, 3 µM RNA, 130 mM NaCl und 130 µM MES-Puffer (pH 7.0)).

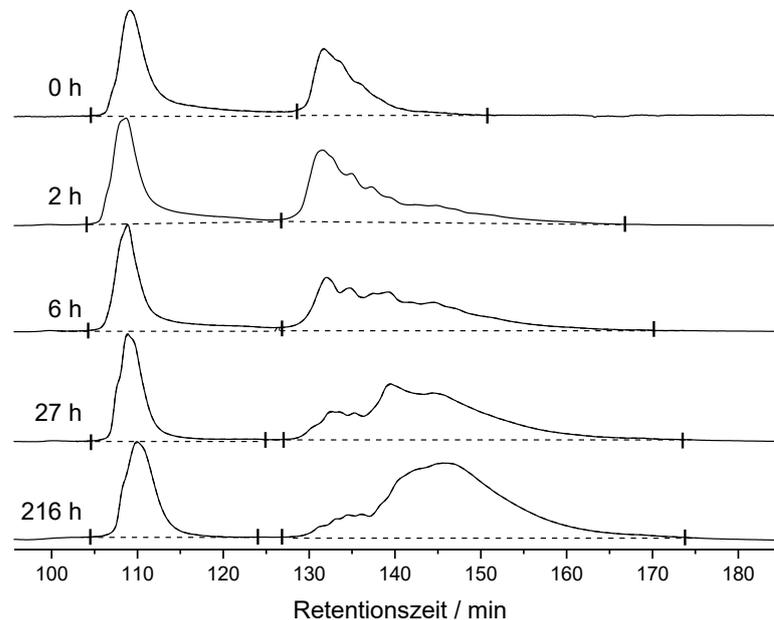
Zwar ist ein weiteres Signal im Bereich 140–170 min zu sehen, dass ca. 6 % ausmacht, jedoch kann dieses durch Alkylierung entstanden sein, nachdem ein kleiner Teil der *o*-Nitrobenzylgruppen durch Tageslicht abgespalten wurde. Bei niedriger Temperatur ist zudem zu beobachten, dass sich die Retentionszeit der **RNA1** von 69 min auf 115 min und die Signalbreite erhöht. Dies liegt an der Erhöhung von Viskosität und elektrischem Widerstand des Gel-Puffer-Systems, wodurch die Oligomere langsamer migrieren.<sup>[189]</sup> Im Vergleich zur reinen **RNA1** bleibt die Retentionszeit zusammen mit **PNA1-32** jedoch identisch und es ist kaum „Peak Tailing“ sichtbar, sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass schon beim Start der Elektrophorese auch bei 25 °C kaum mehr Hybridisierung vorlag.

### Alkylierung bei 25 °C Geltemperatur

Da die Trennung der Oligomere auch bei niedriger Temperatur gewährleistet war, wurde unter diesen Bedingungen erneut die Alkylierung von **RNA1** mit Konjugat **PNA1-32** analysiert. Aufgrund der veränderten Analysebedingungen bilden die Alkylierungsprodukten ein anderes Signalmuster. Bereits bei der Probe, die direkt nach der Bestrahlung entnommen wurde, ist eine deutlich erhöhte Produktbildung zu sehen (47 % statt 17 %). Die Differenz von 30 % entspricht vermutlich dem Anteil der reversiblen Bindungen, die bei 25 °C stabil bleiben. Nach 2 h beträgt die Ausbeute 61 %, ähnlich den postulierten 65 % (vgl. 2.1.10). Sichtbar wird auch, dass sich das Signalmuster der Produkte im Laufe der Alkylierung ändert: Zunächst überwiegen die schneller migrierenden Produkte im Bereich 130–140 min, später bilden langsamer migrierende Produkte

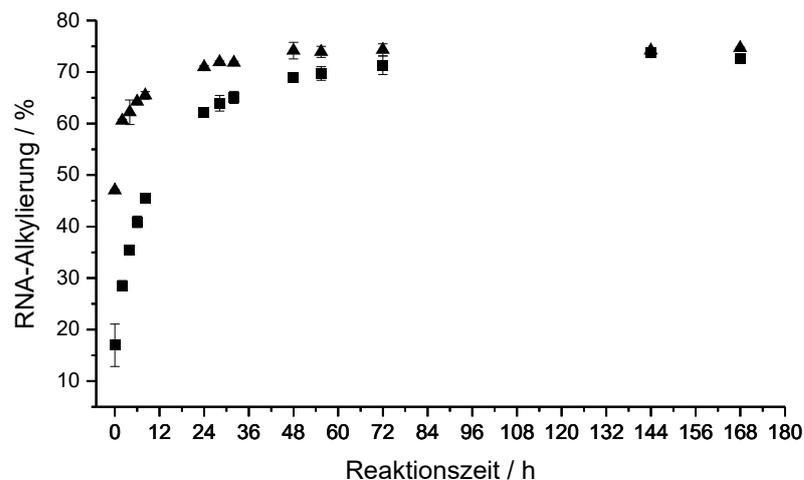
## 2. Eigene Arbeiten

(140–165 min) die Mehrheit (Abbildung 72). Außerdem bildet sich kein eindeutiges Hauptsignal, was auch an der starken Signalverbreiterung durch die niedrigere Temperatur liegen kann, die Signale überlappen nun stark miteinander.



**Abbildung 72:** Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32** nach 0–216 h. (Integrationsgrenzen sind durch Striche markiert. Gelelektrophorese bei 25 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

Nach 24 h ist die Alkylierung mit 71 % fast abgeschlossen, verglichen mit der Endausbeute von 74 %. Die Integrale ändern sich kaum mehr, nur die Produktverteilung verschiebt sich zu den langsam migrierenden Alkylierungsprodukten. Erst nach 72 h sind die bei niedriger und hoher Gel-Temperatur gemessenen Ausbeuten annähernd identisch (Abbildung 73).

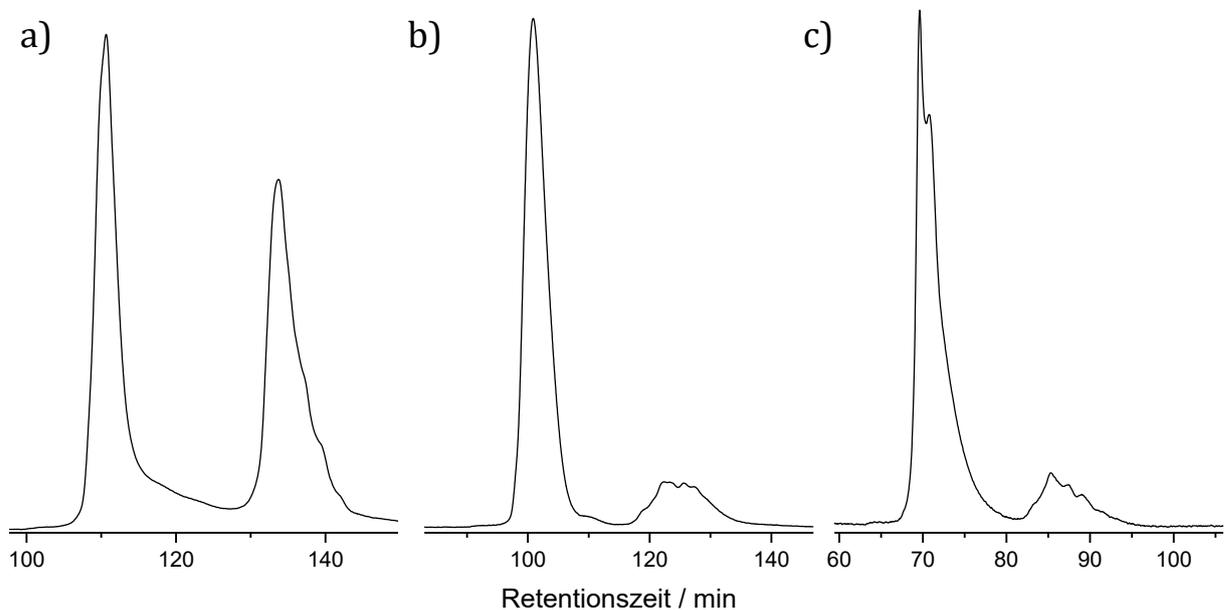


**Abbildung 73:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32**: Analyse der Probe bei einer Geltemperatur von 25 °C (Dreiecke) und 57 °C (Quadrate). (6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

## 2. Eigene Arbeiten

---

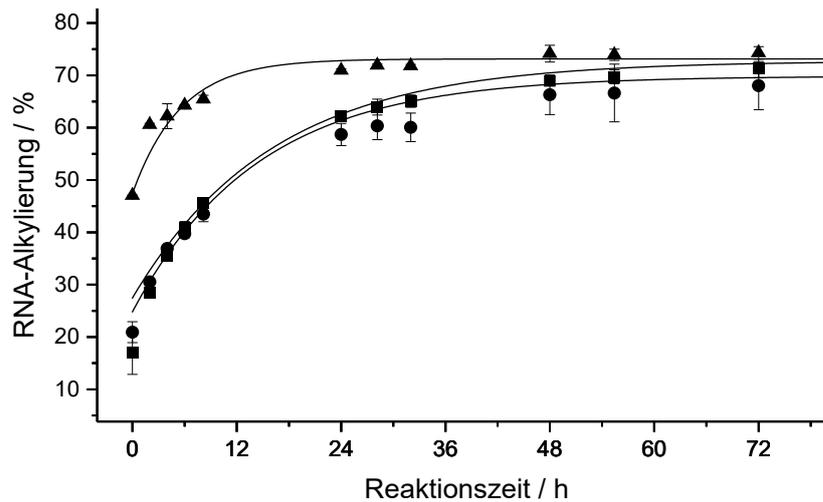
Um die These, dass es sich bei den bei niedriger Temperatur beobachteten schnell migrierenden Produktsignalen um labile Produkte handelt, zu überprüfen, wurden die Proben mit Ladepuffer für 2 h auf 60 °C erwärmt. Dies sollte die Bedingungen der Gelelektrophorese bei hoher Temperatur simulieren. Wenn die labilen Bindungen unter diesen Bedingungen brechen, führt der Harnstoff dazu, dass keine erneute Hybridisierung und Alkylierung stattfinden kann. Die stabilen, irreversiblen Bindungen, die auch bei hoher Geltemperatur detektiert werden, müssten weiterhin bestehen und daher als einzige bei niedriger Geltemperatur sichtbar bleiben. Die anschließende Gelanalyse mittels des *ALFexpress™* zeigte genau das erwartete Bild (Abbildung 74).



**Abbildung 74:** Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32** direkt nach der Bestrahlung. Analyse der Probe direkt nach der Bestrahlung bei einer Geltemperatur von a) 25 °C, b) nach Erhitzen der Probe für 2 h auf 60 °C im Ladepuffer und Analyse bei einer Geltemperatur von 25 °C, c) direkte Analyse bei 57 °C.

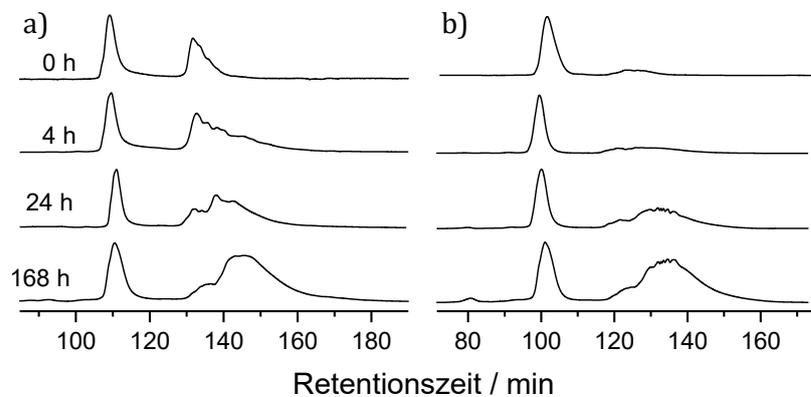
Nach Erhitzen der Probe ist auch bei niedriger Geltemperatur deutlich weniger Alkylierung zu messen, die Produktsignale ähneln sehr der Analyse bei hoher Temperatur. Beim Auftragen der erhaltenen Ausbeuten gegen die Zeit wird sichtbar, dass die Analyse bei hoher Temperatur und niedriger Temperatur mit vorherigem Erhitzen fast identisch sind (Abbildung 75). Die niedrigere Ausbeute kann daher kommen, dass es durch den Harnstoff und das EDTA partiell zur Hydrolyse der RNA kam.

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 75:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32**: Analyse der Probe bei einer Geltemperatur von 25 °C (Dreiecke), 57 °C (Quadrate) und nach Erhitzen der Proben für 2 h im Ladepuffer und Analyse bei einer Geltemperatur von 25 °C (Kreise). Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

Beim direkten Vergleich mehrerer Spuren wird deutlich, dass der Großteil der schneller migrierenden Produkte verschwunden ist, was dafürspricht, dass es sich hierbei um die labilen Bindungen gehandelt hat. Nach 216 h der Alkylierung ist das Muster annähernd identisch, sodass es sich hier um ausschließlich irreversible Bindungen handelt (Abbildung 76).



**Abbildung 76:** Vergleich der Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32**: a) direkte Analyse bei einer Geltemperatur von 25 °C, b) nach Erhitzen der Proben für 2 h im Ladepuffer auf 60 °C und Analyse bei einer Geltemperatur von 25 °C.

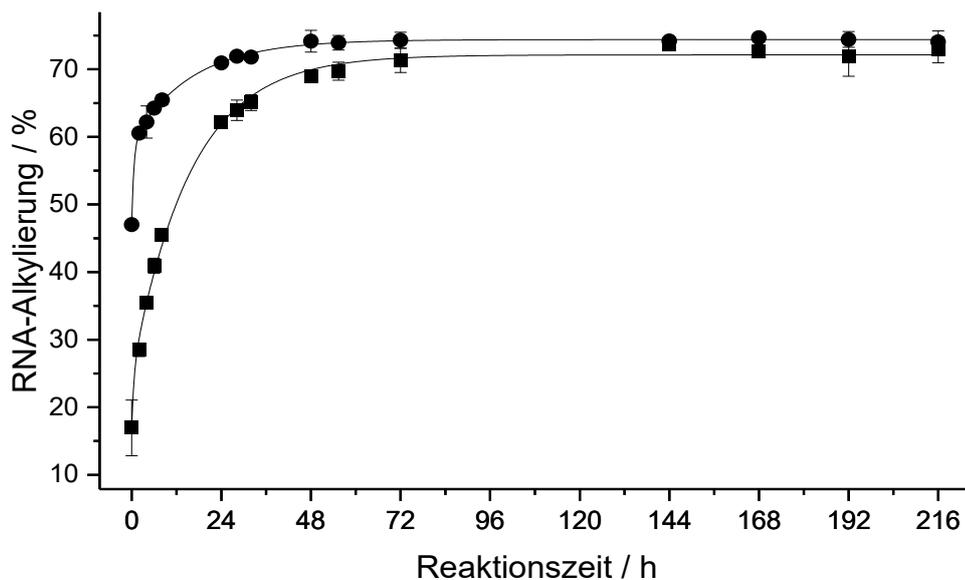
Zur Bestimmung der Reaktionskinetik wurde auch mit den neuen Daten eine Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung durchgeführt. Die Halbwertszeit wurde so auf 3.9 h bestimmt und damit erheblich weniger, als bei 57 °C Geltemperatur gemessen wurden (7.7 h). Diese aus der Kurvenanpassung erhaltene Halbwertszeit ist jedoch unter Vorbehalten zu betrachten, da die Messwerte eigentlich nicht einer Reaktion 1. Ordnung folgen. Bei Auftragen der Messwerte in Form von  $1/X$  gegen die Zeit entsteht auch keine eindeutige lineare Abhängigkeit, wie es für eine Reaktion 2. Ordnung zu erwarten wäre.

## 2. Eigene Arbeiten

---

Bei der Alkylierung der RNA durch Chinonmethide kann nicht einfach angenommen werden, dass die RNA auf direktem Wege alkyliert wird und somit eine Reaktion 1. Ordnung stattfindet. Stattdessen kann auch ein Teil der PNA reversibel alkyliert werden und dann zur RNA umlagern. Zudem machen weitere Parameter wie unterschiedliche Nukleobasen und Alkylierungspositionen die Kinetik komplexer. Wenn dieser Umlagerungsprozess von PNA- zu RNA-Nukleobasen langsam verläuft, könnte dies erklären, warum bereits kurz nach der Bestrahlung eine hohe Alkylierungsausbeute vorliegt, die daraufhin nur noch langsam zunimmt. Es sind somit mehrere Reaktionen 1. Ordnung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, die schließlich zu den detektierten Alkylierungsprodukten führen.

In der Software „OriginPro“ ist für Kurvenanpassung die Funktion „two-phase decay“ vorhanden. Diese besteht aus der gewichteten Summe zweier Exponentialfunktionen, sodass die Summe aus einer langsamen und einer schnellen Kinetik abgebildet werden kann. Die so errechneten Kurven erreichen eine sehr viel höhere Anpassungsgüte als eine einzelne Exponentialfunktion (Abbildung 77).



**Abbildung 77:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32**: Analyse der Probe bei einer Geltemperatur von 25 °C (Kreise) und 57 °C (Quadrate) mit Kurvenanpassung mit der Funktion „two-phase decay“.

Dafür ist die Interpretation der Kurvenanpassung nun komplexer, da Halbwertszeiten für zwei Reaktionen erhalten werden. Die schnelle Reaktion hat eine Halbwertszeit von 0,42 h und die langsame 11 h bei einer Geltemperatur von 25 °C. Damit ähnelt die Halbwertszeit der schnellen Reaktion den 0,43 h, die für die Selbstalkylierung der **PNA1-32** bestimmt wurden (Kapitel 2.1.5). Wird mit den Daten der Gelelektrophorese bei 57 °C dieselbe Kurvenanpassung durchgeführt und die Halbwertszeit der schnellen Reaktion ebenfalls mit 0,43 h als fixiert vorgegeben, erhält man auch hier für die langsame Reaktion eine Halbwertszeit von 11 h. Der Anteil der schnellen

Reaktion ist aber niedriger, so beträgt er nur noch 14 % anstelle von 44 %, da die schnelle Reaktion vor allem zu labilen Bindungen führt, die bei hoher Geltemperatur nicht sichtbar sind.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Rokita bei der Untersuchung der Alkylierung einzelner Nucleobasen und deren Mischung durch Chinonmethide (vgl. Abbildung 12 und Kapitel 1.1.7).<sup>[43]</sup> Anfangs überwiegen die sofort entstehenden Produkte mit dC N3 und dA N1, die aber beide nicht stabil sind. In Reichweite des Chinonmethids von **PNA1-32** befinden sich im RNA-Strang vor allem Adenin und Guanin, wenn man die Sekundärstruktur außer Acht lässt. Nur im PNA-Strang befindet sich Cytosin in Reichweite, was aufgrund der Basenpaarung aber nicht zugänglich sein sollte. Diese günstige Konstellation erklärt wahrscheinlich das anfängliche Überwiegen der labilen Bindungen, sowie die hohe Ausbeute der Alkylierung, da die später gebildeten Addukte mit dA N6 und Guanin N1 und N<sup>2</sup> stabilere Bindungen eingehen.

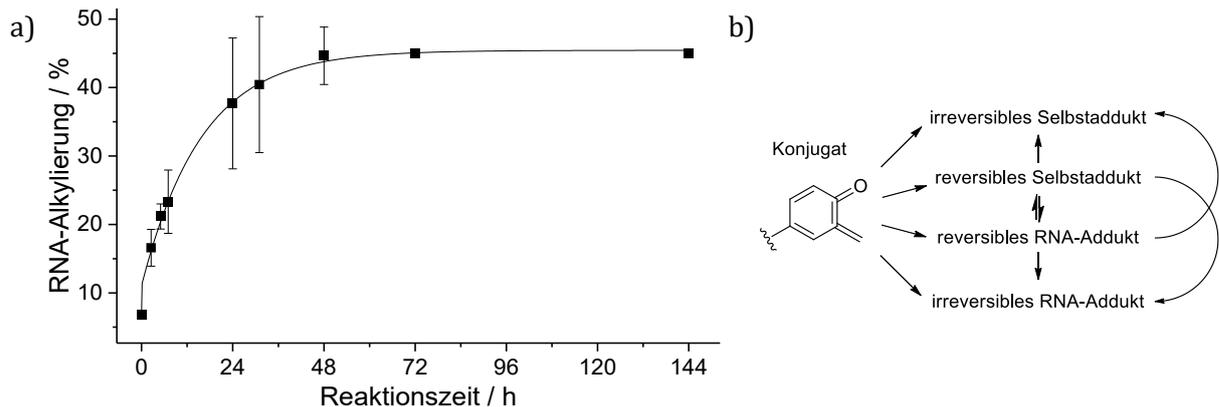
### 2.1.12. Alkylierung nach Bestrahlung in Abwesenheit von RNA

Da die langsame Kinetik anscheinend die Umlagerungsreaktion der bereits alkylierten Nucleobasen abbildet, wurde nun untersucht, wie sich die Reaktion verhält, wenn **PNA1-32** bereits vor der Zugabe von **RNA1** bestrahlt wird. So sollten zunächst vor allem Selbstaddukte entstehen, sodass die anschließend detektierten RNA-Addukt durch Umlagern entstanden sein müssten. Möglich ist auch, dass die Basenpaarung durch die Selbstalkylierung des Konjugats blockiert oder eingeschränkt wird, was die Reaktion verlangsamen würde. Ein ähnliches Experiment wurde auch in der Gruppe von Rokita durchgeführt: Das Chinonmethid-PNA-Konjugat wurde mit KF aktiviert und erst anschließend mit RNA inkubiert. Hier reduzierte sich die Ausbeute deutlich, von 70 % auf 44 % nach < 0.2 h und bis auf 22 %, wenn 168 h zwischen der Zugabe von KF und RNA vergingen.<sup>[44]</sup>

Für diese Reaktionskinetik wurde erst 5 Minuten nach der Bestrahlung die **RNA1** hinzugegeben und die Lösung wie bereits zuvor bei 37 °C inkubiert. Die Alkylierung wurde bei einer Geltemperatur von 57 °C mit dem *ALFexpress* analysiert, damit nur stabile Alkylierungsprodukte detektiert werden. Genau wie bei Rokita führte dies zu einer geringeren Alkylierungsausbeute von 45 % statt 74 % (Abbildung 78 a). Der Grund dafür ist die ständige Umwandlung der reversiblen Produkte zu stabilen, irreversiblen Selbstaddukten oder Wasseraddukten. Je mehr Zeit vergeht, desto weniger reversible Selbstaddukte sind vorhanden, die somit die maximale Ausbeute limitieren. Wird hier dieselbe Kurvenanpassung wie vorher durchgeführt, erhält man eine schnelle Kinetik mit einer Halbwertszeit von < 0.5 Minuten und eine langsame Kinetik von 11 h. Der Anteil der schnellen Kinetik wäre mit 11 % gering. Allerdings beruht diese Zahl lediglich auf zwei und zudem unsicheren Messpunkten, weshalb sie mit großer Vorsicht zu betrachten ist.

## 2. Eigene Arbeiten

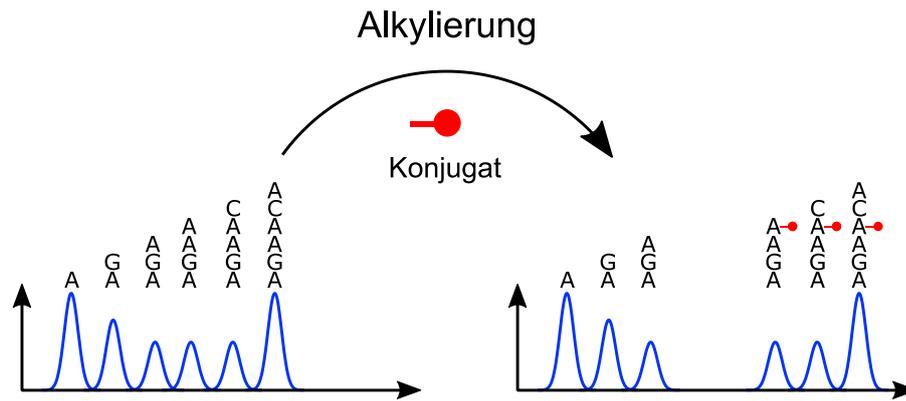
Durch die verzögerte RNA-Zugabe und die hohe Geltemperatur sind hier kaum mehr Alkylierungsprodukte der schnellen Kinetik sichtbar. Bei Ausschluss des ersten Datenpunkts errechnet sich aus der Kurvenanpassung mit einer einfachen Reaktion 1. Ordnung eine Halbwertszeit von 11 h, was vergleichbar mit den bereits erhaltenen Werten ist. Zudem wird eine hohe Anpassungsgüte erreicht, was bestätigen sollte, dass die langsame Kinetik aus der Umlagerung von reversiblen Addukten entsteht und die schnelle Kinetik aus direkter Alkylierung der RNA.



**Abbildung 78:** a) Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32**. **RNA1** wurde erst 5 min nach der Bestrahlung hinzugegeben. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)). b) Reaktionsprodukte des Chinonmethids und Folgeprodukte.

### 2.1.13. Versuche der Bestimmung der Alkylierungs-Position

Zur Bestimmung der Alkylierungs-Position wurde die Isolierung des Alkylierungsprodukts aus **PNA1-32** und **RNA1** mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese versucht. Ein Vorteil von PAGE ist, dass alle Konjugate, die nicht mit der RNA reagiert haben, direkt abgetrennt werden, weil das Konjugat aufgrund der positiven Ladung in der Tasche des Gels verbleibt. Bei ausreichender Auflösung sollte auch eine gute Trennung zwischen RNA und Alkylierungs-Produkt möglich sein. Mit dem isolierten Alkylierungs-Produkt wäre dann *in-line probing* durchführbar. Hierbei wird die RNA gezielt hydrolysiert, sodass bei der Gelelektrophorese ein Signal-Muster entsteht, dessen Intensität Aufschluss über die Hybridisierung der RNA gibt. Bei der Basenpaarung mit PNA oder durch Ausbildung von Sekundärstrukturen sind die gebundenen Nukleotide weniger anfällig für Hydrolyse, sodass diese Spaltprodukte nur noch schwach, bis gar nicht zu sehen sind. Des Weiteren sollte so auch sichtbar werden, an welcher Nukleobase die RNA alkyliert wurde. Bei Spaltung vor und nach der Alkylierungsposition sollte sich eine deutliche Lücke zwischen den Banden auf dem Gel zeigen, da nicht nur eine Nukleobase abgespalten wird, sondern mit dieser das gesamte PNA-Konjugat (Abbildung 79).

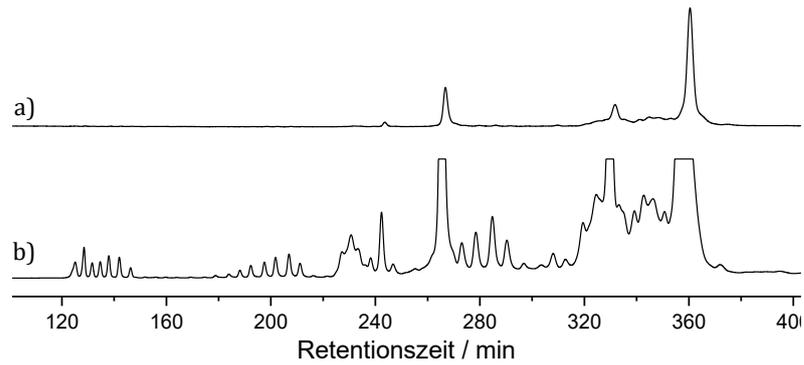


**Abbildung 79:** Erwartetes Elektropherogramm bei Hydrolyse des Alkylierungsprodukts (Konjugat ist als roter Punkt dargestellt).

Für die Geltrennung wurde eine Probe mit **PNA1-32** und **RNA1** wie bereits zuvor beschrieben bestrahlt, für 72 Stunden inkubiert und durch präparative Gelelektrophorese getrennt. Die Bande des Alkylierungsprodukts wurde mittels UV-Licht bestimmt, aus dem Gel geschnitten und in Puffer inkubiert. Nach Fällung der Alkylierungsprodukte mit Ethanol wurde die Probe für das *in-line probing* mit  $MgCl_2$  genutzt und das Ergebnis mittels des *ALFExpress™* analysiert (Abbildung 80).

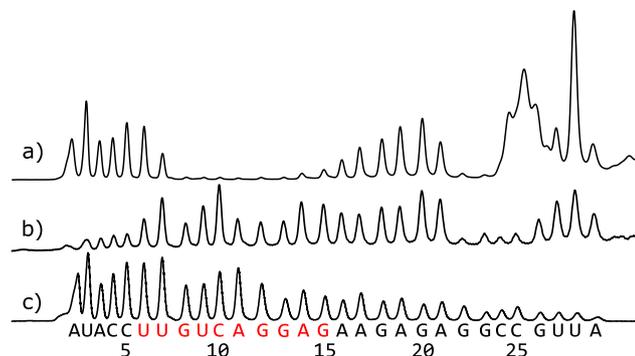
Im Elektropherogramm des isolierten Oligomers ist zu sehen, dass immer noch Reste der nicht alkylierten RNA (267 min) vorhanden sind. Außerdem wurden die vier Desoxythymidine sowie A29 am 3'-Ende partiell abgespalten, sowohl bei der RNA (244 min), als auch beim Alkylierungsprodukts (331 min). Diese Verunreinigungen erschweren die Auswertung des *in-line probing*. Gut erkennbar ist das Hydrolysemuster der RNA (120–245 min), die Signalintensität im mittleren Bereich sinkt aufgrund der Hybridisierung mit der PNA. Eine starke Basenpaarung beginnt erst ab U7 der RNA und auch bei den letzten zwei gebundenen Nukleobasen ist leichte Spaltung zu sehen. Das *in-line probing* zeigt, dass das Konjugat an die RNA gebunden hat, aber da sich keine Retentionszeitverschiebung im Hydrolysemuster zeigt, stammen die Signale bei 120–220 min von einem Abschnitt der RNA, der nicht alkyliert wurde.

## 2. Eigene Arbeiten



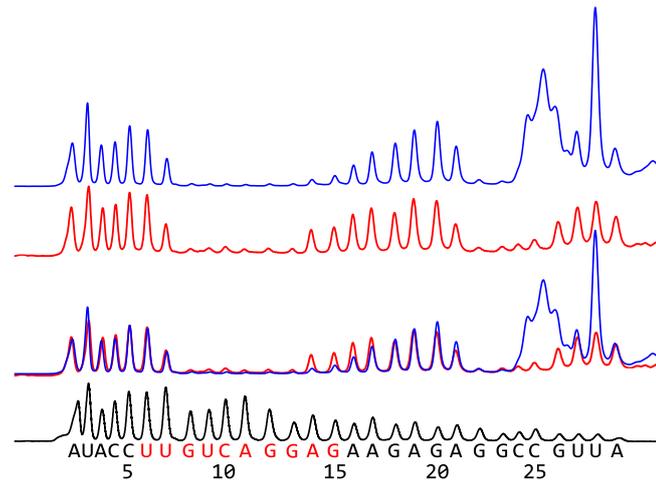
**Abbildung 80:** Elektropherogramme der a) isolierten Alkylierungsprodukte b) *in-line probing* der isolierten Alkylierungsprodukte.

Ab G22 zeigt sich eine deutlich geringere Signalintensität, was scheinbar der erwarteten Lücke im Hydrolysemusters entspricht (vgl. Abbildung 79). Jedoch finden sich auch beim *in-line probing* der reinen **RNA1** an dieser Stelle schwächere Signale (Abbildung 81 b), sodass dieses Muster unabhängig von der Alkylierung ist. Der Grund dürfte sein, dass die Sequenz GGCC intermolekulare Sekundärstrukturen bildet und so der *Footprint* entsteht. Die Signale zwischen C24 und U27 (Abbildung 81 a) konnten nicht eindeutig mit Hilfe der Hydrolyseleiter zugeordnet werden, sodass sie wahrscheinlich hydrolysierten Alkylierungsprodukten entsprechen.



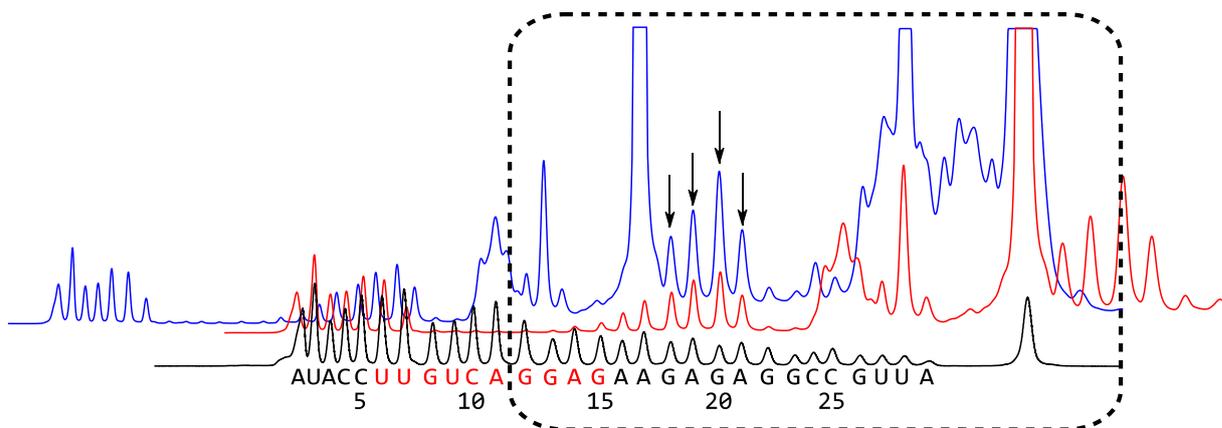
**Abbildung 81:** Vergleich des a) *in-line probings* des Alkylierungsprodukts von **RNA1** und **PNA1-32** mit b) dem *in-line probing* von **RNA1**. c) Hydrolyseleiter der **RNA1**.

Als nächstes wurde das *in-line probing* des Alkylierungsprodukts verglichen mit dem *in-line probing* von **RNA1** und **PNA1-32** ohne Bestrahlung (Abbildung 82). Am 5'-Ende von A1 bis U7 gleichen sich beide Hydrolysemuster, was sich damit deckt, dass in diesem Bereich auch keine Alkylierung zu erwarten wäre. Unterschiedliche Intensitäten finden sich am Ende der Bindungsstelle von A14 bis A17, was besonders bei Überlagerung der Spuren deutlich wird. Die niedrigere Intensität dieser Signale beim Alkylierungsprodukt (blau) könnte man als Zeichen der Alkylierung in diesem Bereich deuten. Jedoch sollten in diesem Fall auch alle nachfolgenden Signale (A18–A21) schwächer sein. Es könnte auch nur auf eine stärkere Bindung zwischen **RNA1** und **PNA1-32** durch die kovalente Verknüpfung hinweisen, da A14 innerhalb der Bindungssequenz liegt und somit eigentlich nicht für die Alkylierung zur Verfügung stehen sollte.



**Abbildung 82:** Vergleich des *in-line probings* des Alkylierungsprodukts (blau) sowie **RNA1** und **PNA1-32** ohne Bestrahlung (rot). Unterste Spur ist die Hydrolyseleiter von **RNA1**.

Bei allen Fragmenten, die eine höhere Retentionszeit als **RNA1** haben (244 min, vgl. Abbildung 80), muss es sich um hydrolysierte Alkylierungsprodukte handeln. Direkt nach dem Signal von **RNA1** finden sich vier klar definierte Signale (blau, mit Pfeil markiert, Abbildung 83), die aufgrund ihrer Position von der Hydrolyse des Hauptprodukts stammen sollten.



**Abbildung 83:** Überlagerung des *in-line probings* des Alkylierungsprodukts (blau) mit derselben Spur in gespreizter und verschobener Form (rot). Verschobene und gespreizte Hydrolyseleiter von **RNA1** zum Vergleich (schwarz).

Spreizt und überlagert man das Elektropherogramm des *in-line probings* mit einer Kopie desselben so, dass das Signal von Alkylierungsprodukt und **RNA1** sowie von deren Hydrolyseprodukten bei U28 dieselbe Retentionszeit besitzen (rote Spur), scheinen sich auch die weiteren Hydrolysesignale des Alkylierungsprodukts mit den Hydrolyseprodukten von **RNA1** zu decken. Unter dieser Annahme ließen sich die markierten Signale den Positionen G18 bis A21 zuordnen. Sichtbar ist auch die niedrigere Intensität der folgenden Signale, da sie von der Position her dem *Footprint* der „GCC“-Sequenz entsprechen würden. Die Existenz der Hydrolyseprodukte von G18 bis A21 würde bedeuten, dass die Alkylierung spätestens an G18 geschehen sollte.

## 2. Eigene Arbeiten

---

Mögliche Hydrolyseprodukte von A16 und A17 wären vom Signal von **RNA1** verdeckt. Gemäß dieser Interpretation müsste die Alkylierung an A16, A17 oder G18 erfolgt sein.

Bemerkenswert ist, dass sich demnach auch das Signal bei 230 min dem Alkylierungsprodukt mit A11 zuordnen ließe, obwohl diese Nukleobase eigentlich gepaart in der Mitte der Bindungssequenz vorliegt und damit unzugänglich ist. Man hätte eher eine Alkylierung an A14 erwartet, da dieses am Ende der Bindungssequenz liegt. Dieses Produkt ist aber nicht eindeutig nachweisbar, im erwarteten Bereich sind nur Signale geringer Intensität sichtbar. Es ist denkbar, dass die Alkylierung während der Hydrolyse geschieht, möglicherweise durch Umlagerung, da eine Alkylierung während der Basenpaarung aufgrund der sterischen Hinderung sehr unwahrscheinlich ist

Insgesamt betrachtet wären somit A16 bis G18 die Nukleobasen, die am wahrscheinlichsten alkyliert werden (Abbildung 84). Dies wäre auch schlüssig mit den Ergebnissen des Rokita-Arbeitskreises, dass Adenin bevorzugt alkyliert wird sowie Adenin und Guanin irreversible Addukte bildet und diese Nukleobasen in direkter Reichweite des Chinonmethids ungepaart vorliegen.



**Abbildung 84:** Hydrolyseprodukte, von denen retardierte Fragmente gefunden wurden (rot) oder keine nachgewiesen wurden (grün). (Rote Buchstaben zeigen die Bindungssequenz der PNA.)

### 2.1.14. Masse des Alkylierungsprodukts aus PNA1-32 und RNA1

Zur Bestätigung, dass es sich bei den neu entstehenden Signalen um Alkylierungsprodukte handelt, wurden sie massenspektrometrisch untersucht. Die direkte Messung der Inkubationslösung ist jedoch aufgrund der hohen Salz- und Pufferkonzentration mittels MALDI nicht möglich. Für die Ionisierung ist es notwendig die Probe mit einer Matrix aus geeigneten Molekülen zu kristallisieren, was von Salzrückständen verhindert wird. Zudem eignen sich für Peptide und Nukleinsäuren unterschiedliche Matrizen und da PNA einem Peptid ähnelt, könnte dies die Kristallisierung erschweren. Für den Erfolg der Messung sollte das Produkt somit in einer hohen Reinheit vorliegen, frei von Salzen und Puffern und auch in ausreichender Menge vorhanden sein.

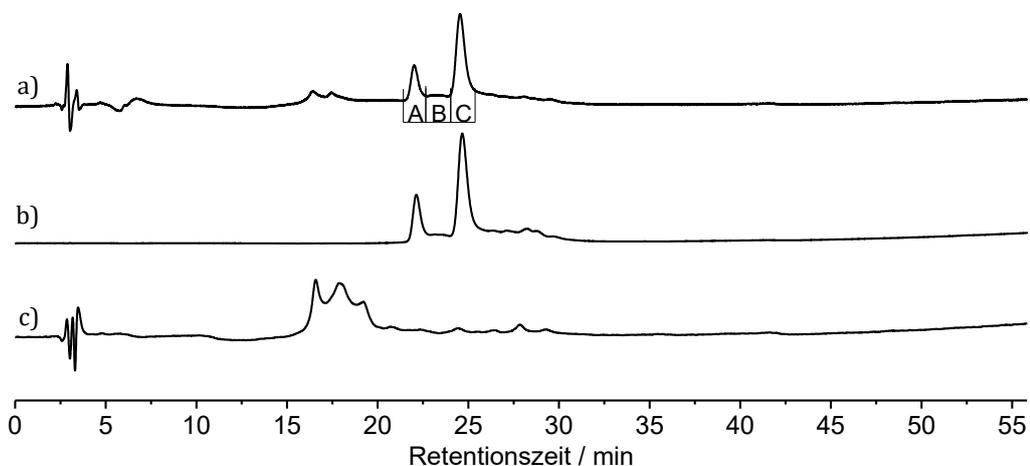
Für eine schnelle und einfache Entfernung von Salzen und Puffern eignen sich „NAP-Säulen“, die ein Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer enthalten und durch Gelpermeationschromatographie kleine Moleküle zurückhalten, sodass sich die reine Nukleinsäure eluieren lässt. So wurde

## 2. Eigene Arbeiten

---

zunächst mit dieser Reinigungsmethode versucht, eine qualitativ hochwertige Probe der Alkylierung von **RNA2** durch **PNA2-32** zu erhalten. Die erwünschte Wirkung wurde jedoch nicht erzielt: Wahrscheinlich durch die hydrophoben Eigenschaften der PNA wurde auch das Alkylierungsprodukt zurückgehalten und eluierte erst zusammen mit den unerwünschten Salz- und Pufferresten.

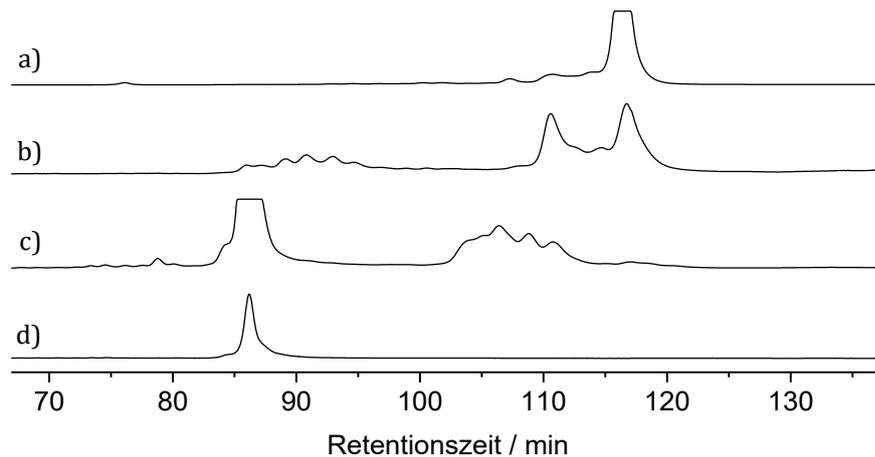
Für eine effektivere Reinigung wurde RP-HPLC verwendet, die präzisere Ergebnisse ermöglicht, jedoch auch zeitintensiv ist. Wie bei der Untersuchung der Selbstalkylierung wurde ein Gradient mit TEAA Puffer (pH 7.0) und Acetonitril als Eluenten verwendet. Hiermit ließ sich erfolgreich **PNA2-32**, **RNA2** und das Alkylierungsprodukt voneinander trennen (Abbildung 85).



**Abbildung 85:** RP-HPLC-Chromatogramme der Alkylierung von **PNA2-32** durch **RNA2**: a) Detektion bei 260 nm (A, B und C sind die isolierten Fraktionen), b) Fluoreszenzdetektion (Ex.: 600 nm / Det.: 650 nm), c) Nur **PNA2-32**, 40 min nach Bestrahlung und Inkubation bei 37 °C.

Vorteilhaft erwies sich dabei auch die Verwendung eines Fluoreszenzdetektors, mit dem sich die Cy5-markierte RNA leicht im Chromatogramm identifizieren ließ (Abbildung 85 b). Die übrigen Signale konnten durch den Vergleich mit bestrahltem Konjugat als Selbstaddukte der **PNA2-32** identifiziert werden (Abbildung 85 c). Zur zusätzlichen Verifizierung der isolierten Fraktionen wurden diese mittels des *ALFexpress*<sup>™</sup> analysiert (Abbildung 86). Deutlich sichtbar ist, dass in Fraktion A fast ausschließlich das Alkylierungs-Hauptprodukt zu finden war. In Fraktion B befindet sich eine Mischung aus dem Hauptprodukt, Nebenprodukten und wahrscheinlich auch hydrolysierten Bestandteilen (85–95 min). In Fraktion C überwiegend **RNA2** mit einem geringen Anteil der Nebenprodukte der Alkylierung.

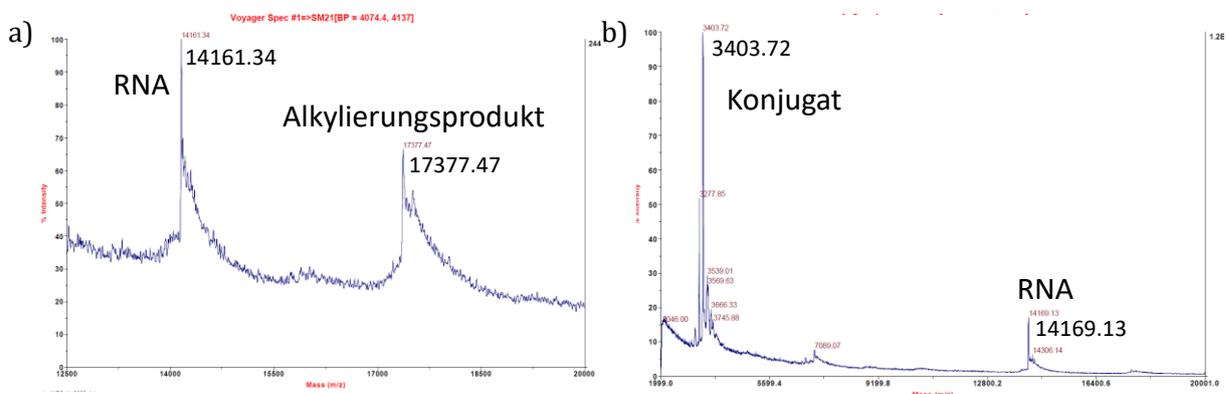
## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 86:** Elektropherogramme der RP-HPLC Fraktionen a) A: Hauptprodukt der Alkylierung b) B: verschiedene Alkylierungsprodukte c) C: überwiegend **RNA2** und einige Alkylierungsprodukte d) **RNA2** als Referenz; Gel Temperatur: 57 °C

Trotz der erfolgreichen Isolation war es nicht möglich, ein Massenspektrum zu messen. Der im Eluenten verwendete TEAA-Puffer wird allgemein hin als flüchtiger Puffer angesehen<sup>[190]</sup>, der beim Trocknen im Vakuum entfernt werden sollte. Scheinbar geschah dies aber nicht vollständig, sodass Rückstände die Messung verhinderten, da keine Kristallisation mit der MALDI-Matrix erfolgte.

Um die Puffer-Rückstände vollständig zu entfernen, wurde die Probe erneut mittels RP-HPLC gereinigt, diesmal mit reinem Wasser, ohne Pufferzusätze und Acetonitril. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass der Lauf zunächst mit 100 % Wasser startet und für 4 min bei diesen Bedingungen die Salze und Pufferrückstände von der Säule eluiert. Anschließend wird durch einen steilen Gradienten auf 80 % Acetonitril die verbliebenen Alkylierungsprodukte in einem möglichst geringen Zeitraum eluiert. Die erhaltene Fraktion wurde eingefroren und lyophilisiert, damit der Eluent schonend entfernt wurde. Durch die zweifache RP-HPLC-Reinigung kam es zu hohen Ausbeuteverlusten, sodass eine Quantifizierung nicht mehr möglich war. Für eine MALDI-Messung reichte die Substanzmenge jedoch (Abbildung 87).



**Abbildung 87:** MALDI-Massenspektren von a) Fraktion A nach zweifacher RP-HPLC-Reinigung b) unbestrahltes Konjugat **PNA2-32** inkubiert mit **RNA2**.

Das gemessene Signal von 17377.47 m/z (Abbildung 87 a) entspricht der berechneten Masse des Alkylierungsprodukts von **RNA2** und **PNA1-32** von 17375.17 g/mol (Durchschnittliche Molmasse). Neben der Masse des Produkts ist auch das Massensignal von **RNA2** sichtbar (14161.34 m/z), was wahrscheinlich durch die Reversion der Alkylierung während der Ionisierung geschieht. Der bei der Messung verwendete Laser hat bereits zuvor zur Abspaltung der Photoschutzgruppe des PNA-Konjugats geführt (Kapitel 2.1.4) und die Möglichkeit der photoinduzierten Bildung von Chinonmethiden durch UV-Bestrahlung ist bekannt<sup>[191]</sup>.

Zum Vergleich wurde ein Massenspektrum einer unbestrahlten Probe bestehend aus **PNA2-32** und **RNA2** gemessen (Abbildung 87 b). Auch hier ist ein schwaches Signal bei ca. 17000 m/z zu sehen, welches wahrscheinlich Alkylierungsprodukte sind, die während der Laser-Bestrahlung entstanden sind. Abgesehen davon ist **RNA2** und das übliche MALDI-Signalmuster eines Konjugats zu sehen (vgl. Abbildung 48).

### 2.1.15. Alkylierung von miRNA-20a

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den bisher verwendeten RNAs um Sequenzen, die auf den Arbeiten im Arbeitskreis bzw. von Komiyama<sup>[176]</sup> basieren. Als nächstes wurde die Alkylierung von miRNA-20a untersucht, die im RISC zusammen mit einem Argonautenprotein, wie in Kapitel 1.2 erwähnt, für post-transkriptionelle Genregulation zuständig ist. MiRNA-20a ist Teil der miR-17-92 Familie, die insgesamt 15 miRNAs mit gleicher Seed-Sequenz umfasst und zählt zur Gruppe der „Oncomirs“, welche microRNAs bezeichnet, die mit Krebs in Verbindung gebracht werden. Sie spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und dem Krebswachstum u.a. bei Magen- und Prostatakrebs.<sup>[192]</sup> Es existiert jedoch eine Gewebespezifität, während sie bei den genannten Krebsarten hochreguliert ist, findet man bei Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs eine Herabregulation. Zu den durch miRNA-20a regulierten Proteinen gehört unter anderem E2F<sup>[193]</sup>, p21<sup>CIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup> <sup>[194]</sup>, Proteine, die für den Zellzyklus und Tumorsuppression zuständig sind, und TGFBR2<sup>[195]</sup>, welches ebenfalls ein Tumorsuppressor ist. Daher bietet sich diese miRNA als attraktives Ziel an, weshalb im Arbeitskreis auch schon mit Erfolg eine künstliche Ribonuklease zur Spaltung von miRNA-20a entwickelt wurde.<sup>[179]</sup>

#### 2.1.15.1. Alkylierung mit 15mer Konjugat

Da von Plamena Dogandzhyski für diese Experimente bereits eine gegen miRNA-20a gerichtete 15mer PNA synthetisiert wurde, konnte diese als Ausgangspunkt für die Alkylierungsexperimente genutzt werden. Aufgrund der Länge von 15 Nucleobasen besitzt sie zwei Lysin-Reste am C-Terminus, um die Hydrophilie zu erhöhen. Da das Chinonmethid am N-Terminus angefügt wird,

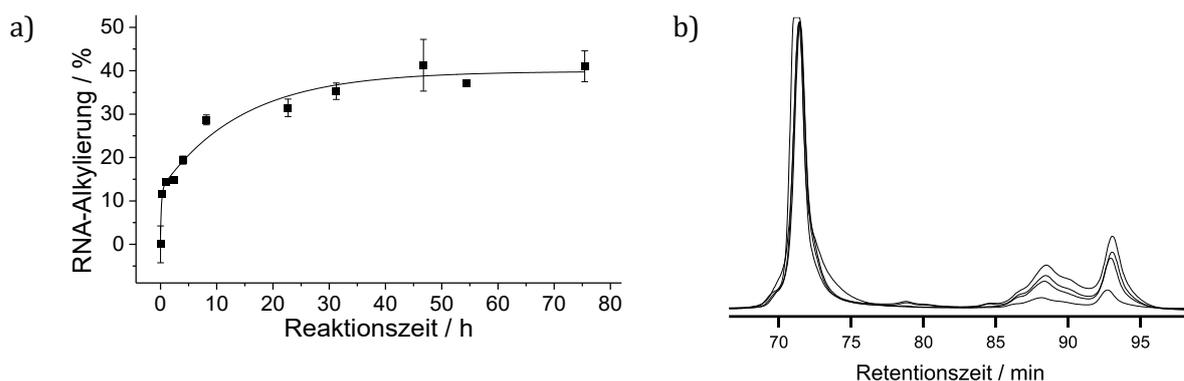
## 2. Eigene Arbeiten

sollte dies keinen Einfluss auf die Alkylierung haben. Wie bereits zuvor beschrieben wurde durch CuAAC ein Konjugat mit Verbindung **32** hergestellt und mit der komplementären **RNA3** inkubiert, die wie vorherige Sequenzen mit 14 T und Cy5 modifizierte miRNA-20a ist (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Verwendete miRNA-20a Sequenz (**RNA3**) und komplementäre **PNA3**.

Bezeichnung	Sequenz
<b>RNA3</b>	5' Cy5-T10- <u>UAAAGUGCUUAUAGUCAGGUAG</u> -T4 3'
<b>PNA3</b>	LysLys-ATTTACGAATATCA-NH-(C <sub>6</sub> )-(Alkin)

Im Vergleich zur Alkylierung der vorherigen Sequenzen zeigte sich eine geringe Ausbeute von 41 % nach 75 h. Wie bei vorherigen Experimenten scheinen auch hier zwei Prozesse parallel abzulaufen, was im schnellen Anstieg der Ausbeute in den ersten 8 Stunde sichtbar ist (Abbildung 88). Anschließend wird die Ausbeute durch eine langsamere Kinetik mit einer Halbwertszeit von 10 h bestimmt.



**Abbildung 88:** a) Kinetik der Alkylierung von **RNA3** durch Konjugat **PNA3-32** mit Kurvenanpassung mit der Funktion „two-phase decay“. b) Überlappung der Elektropherogramme der Proben 0–72 h nach Bestrahlung. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

Das Signalmuster zeigt auch wie zuvor einen Bereich von Nebenprodukten (85–92 min) und ein langsamer migrierendes Signal des Hauptprodukts (93 min). Im Gegensatz zu den vorherigen Sequenzen steigt der Anteil der Nebenprodukte jedoch ungefähr im gleichen Verhältnis, wie das Hauptprodukt. Der Grund dafür liegt wohl darin, dass nun andere Nukleobasen in Reichweite des Chinonmethids sind: Neben der Bindungsstelle befindet sich ein Adenin, ein Cytosin und mehrere Guanine im RNA-Strang. Bei einer Mischung von Nukleobasen sind nach Rokita zunächst die reversiblen Positionen an Adenin und Cytosin die bevorzugten Ziele, während Guanin eine untergeordnete Rolle spielt.<sup>[43]</sup> Aufgrund der gewählten Bindungsstelle, die bei der *seed*-Sequenz der miRNA-20a beginnt, endet die PNA am N-Terminus mit den Basen Cytosin und Adenosin. Daher ist auch denkbar, dass sich ein nicht unerheblicher Anteil der Konjugate selbst alkyliert, da das „A-T“-Basenpaar, wie zuvor beschrieben, schwächer bindet. Dies würde zum einen die Kinetik der RNA-Alkylierung verlangsamen und zum anderen die geringere Ausbeute erklären, da ein Teil

## 2. Eigene Arbeiten

der Konjugate sich irreversibel selbst alkyliert, bzw. zu irreversiblen Wasseraddukten umlagern könnte. Da diese Selbstaddukte nicht kovalent mit der RNA verbunden sind, wäre es theoretisch möglich, dass ein reversibles Selbstaddukt mit einem irreversiblen austauscht und es somit schließlich zur RNA-Alkylierung kommt, weil stets 2 Äquivalente des Konjugats verwendet wurden. Bei einer 15mer PNA ist jedoch davon auszugehen, dass aufgrund der hohen Schmelztemperatur keine Strangverdrängung stattfindet.

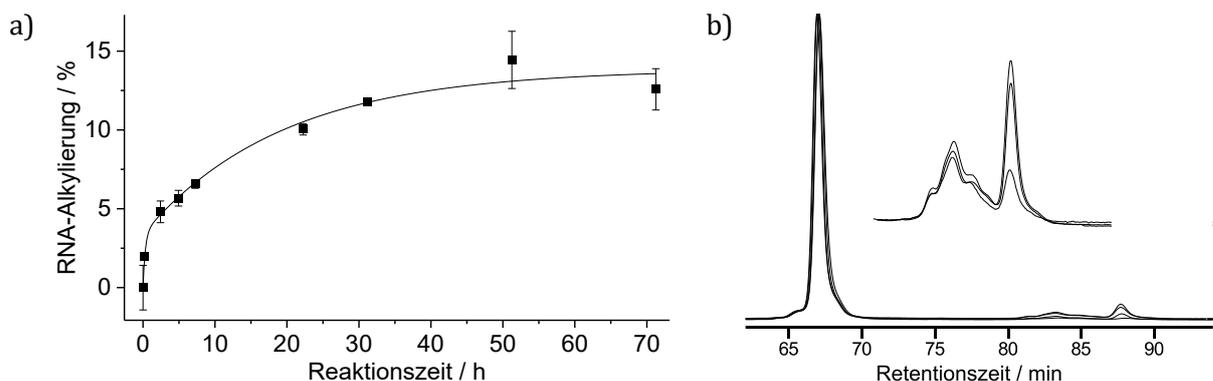
### 2.1.15.2. Alkylierung mit 10mer Konjugat

Zur besseren Vergleichbarkeit mit den vorherigen Konjugaten wurde ebenfalls ein kürzeres 10mer Konjugat für die Alkylierung synthetisiert, das die letzten 5 Basen am *N*-Terminus nicht enthält und nur einen Lysin-Rest trägt (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Verwendete miRNA-20a Sequenz (**RNA3**) und komplementäre 10mer **PNA4**.

Bezeichnung	Sequenz
<b>RNA3</b>	5' Cy5-T10- <u>UAAAGUGCUU</u> AUAGUGCAGGUAG-T4 3'
<b>PNA4</b>	Lys-ATTTACGAA-NH-(C <sub>6</sub> )-(Alkin)

Die Alkylierungsausbeute dieses Konjugats war mit 13 % nach 72 h noch geringer als mit dem 15mer (Abbildung 89).



**Abbildung 89:** a) Kinetik der Alkylierung von **RNA3** durch Konjugat **PNA4-32** mit Kurvenanpassung mit der Funktion „two-phase decay“. b) Überlappung der Elektropherogramme der Proben 0–72 h nach Bestrahlung, Bereich 78–92 min vergrößert. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

Auch hier scheint die schnelle Kinetik nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, nach 2 h wird die Reaktion hauptsächlich von der langsamen Kinetik bestimmt. Diese ist mit einer Halbwertszeit von 13 h ähnlich schnell wie die vorherige. Auch das schwach ausgeprägten Signalmuster des Produkts ist ähnlich der Alkylierung durch **PNA3-32**. Bei der Betrachtung der Bindestelle findet man zwei ungepaarte Adenosine im RNA-Strang in Reichweite des Chinonmethides. Dies wäre

eigentlich eine gute Voraussetzung für die Alkylierung, jedoch befinden sich ebenso im PNA-Strang zwei Adenosine am *N*-Terminus. Somit ist auch hier die Möglichkeit der Selbstalkylierung gegeben, was wahrscheinlich der Grund für die geringe Alkylierungsausbeute ist.

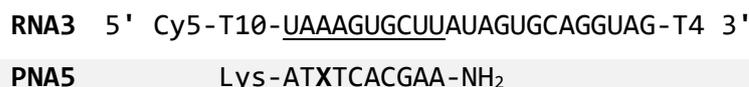
### 2.1.15.3. 10mer Konjugat mit internem Chinonmethid-Präkursor

Die bisherigen Alkylierungsversuche mit miRNA-20a hatten deutlich geringere Ausbeuten als bei der Alkylierung von **RNA1** erreicht. Da miRNA-20a dennoch ein attraktives, biologisch relevantes Ziel darstellt, wurden Möglichkeiten der Verbesserung des Konjugats evaluiert. Aus den vorangegangenen Experimenten wurde geschlossen, dass die PNA-Sequenz in Reichweite des Chinonmethids kein Adenosin tragen sollte, da sich dieses wahrscheinlich durch vermehrte Selbstalkylierung negativ auf die Alkylierungsausbeute mit der RNA auswirkt. Die Verschiebung der Bindungssequenz wäre im Hinblick auf die biologische Anwendung jedoch wenig nützlich. Da die miRNA-20a im Argonautenprotein gebunden ist, steht zunächst nur die *seed*-Sequenz für die Hybridisierung zur Verfügung, die restlichen Basen sind abgeschirmt. Daher könnte eine 10mer PNA, die nicht mehr die *seed*-Sequenz enthält, wahrscheinlich auch nicht an die miRNA im RISC binden. Eine Verlängerung der Sequenz auf ein 22mer würde das Chinonmethid in eine Position bringen, in der ein ungepaartes Adenosin liegt. Doch auch hier ist fraglich, ob die Bindung in der *supplementary* Region überhaupt zustande kommt oder ob ein 22mer schon von sich aus einen solch hohen Schmelzpunkt hat, dass die Alkylierung keinen Unterschied bringen würde.

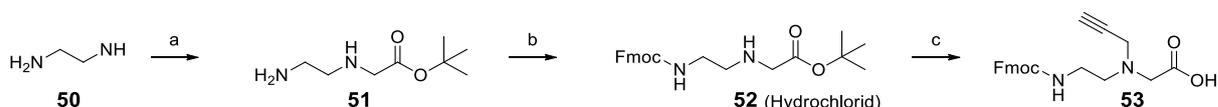
Bisher wurde das Chinonmethid stets über einen *C<sub>6</sub>-Linker* am *N*-Terminus einer PNA angebracht, was den Vorteil hatte, dass die PNA in größerem Maßstab hergestellt werden konnte, um die Derivatisierung mit *Linker* und Alkin anschließend nur mit einem Teil der Festphase durchzuführen. So bleibt die Möglichkeit bspw. andere Linkerlängen und Modifikationen zu verwenden. Für die Alkylierung der miRNA-20a wäre es am besten, wenn sich das Chinonmethid in dem zur *seed*-Sequenz komplementären Bereich befinden würde. Am 5'-Ende der miRNA befindet sich ein Abschnitt von drei Adenosinen, die sich wahrscheinlich ideal für eine Alkylierung anbieten würden. Um dies zu ermöglichen, wurde das mittlere Thymin der PNA-Sequenz durch einen internen Alkin-Baustein ersetzt, sodass die PNA-Sequenz nur modifiziert wurde. Damit steht das Chinonmethid direkt den Adenosinen gegenüber und wird im PNA-Strang von zwei Thyminen umgeben, die sich nicht zur Alkylierung eignen.

## 2. Eigene Arbeiten

**Tabelle 5:** modifizierte PNA mit internem *Linker* (PNA5); **X** = Verbindung **53** (Abb. 48).



Damit der interne Alkin-Baustein möglichst ähnlich den anderen Nukleobasen-Monomeren ist und dieser nicht basenpaarende Teil möglichst geringen Einfluss auf die restliche Hybridisierung hat, wurde als Basis das Rückgrat der PNA genommen. Anstelle der Verbindung der Base über ein sekundäres Amid wurde eine Propargylgruppe über ein tertiäres Amin angebunden. Die Synthese dieses Bausteins basiert auf der publizierten PNA-Rückgrat Synthese von Thomson *et al.*<sup>[149]</sup> Hier wird Ethylendiamin **50** mit Bromessigsäure-*tert*-butylester umgesetzt, sodass nur eine Monoalkylierung stattfindet (Abbildung 90). Das Produkt **51** wird dann mit Fmoc-Succinimid am verbleibenden, primären Amin geschützt und kann nach Waschen mit 1 M Salzsäure als HCl-Salz **52** isoliert werden. Für die Einführung der Propargylgruppe wurde zunächst mit DIPEA die freie Base gebildet und diese anschließend mit Propargylbromid alkyliert. Durch abschließende Zugabe von TFA konnte der *tert*-Butylester in die freie Carbonsäure **53** überführt werden.

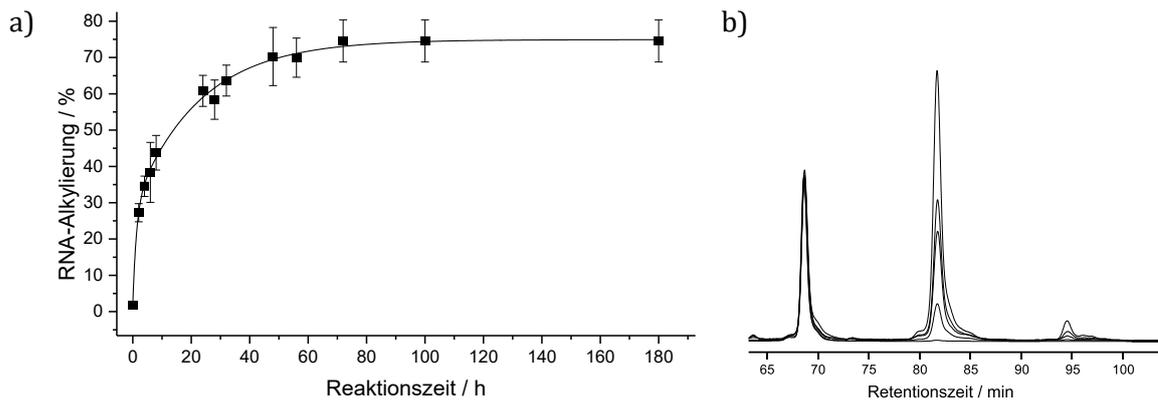


**Abbildung 90:** Synthese des internen Alkin Monomers. a) *t*-Butylbromacetat, DCM. b) Fmoc-OSu, DIPEA. c) 1. Propargylbromid, DIPEA, DCM, RT, 18 h; 2. TFA, DCM, RT, 1 h, 54 %.

Die Bedingungen der Festphasensynthese entsprachen denen der vorherigen PNAs und erlaubten die problemlose Synthese des Oligomers. Für die CuAAC wurde das Chinonmethid mit verkürztem *Linker* gewählt (Verbindung **44**), um einen möglichst geringe Distanz zwischen Chinonmethid und den Adenosinen zu erreichen.

Wie zuvor wurde das Konjugat **PNA5-44** mit **RNA3** inkubiert, um den Einfluss des internen Chinonmethid-Präkursors zu überprüfen. Durch das neu platzierte Chinonmethid konnte wieder eine hohe Ausbeute von 75 % nach 72 h erreicht werden. Nicht nur von der Ausbeute, sondern auch von der Kinetik her ist die Reaktion mit der Alkylierung von **RNA1** vergleichbar. Die Halbwertszeiten wurden durch eine Kurvenanpassung auf 0.86 h und 15.5 h bestimmt.

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 91:** a) Kinetik der Alkylierung von **RNA3** durch Konjugat **PNA5-44** mit Kurvenanpassung mit der Funktion „two-phase decay“. b) Überlappung der Elektropherogramme der Proben 0–72 h nach Bestrahlung. (Gelelektrophorese bei 57 °C, 6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M RNA, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

Bei der Alkylierung von **RNA3** mit **PNA5-44** ist im Elektropherogramm auch ein völlig anderes Signalmuster sichtbar. Das Produktsignal ist dem Eduktsignal sehr ähnlich, was nahelegt, dass nur ein Produkt entsteht, weil vor allem das ungepaarte Adenosin in Reichweite des Chinonmethids für die Alkylierung zur Verfügung steht. Als Nebenprodukt gibt es nur ein weiteres Signal, das langsamer migriert. Da der zeitliche Abstand zwischen den drei Signalen etwa gleich ist, könnte es sich hier um eine zweifach alkylierte RNA handeln. Jedoch ist fraglich, wie diese entstehen könnte. PNA kann zwar Triplexformationen eingehen oder parallel anstatt antiparallel binden, für diese beiden Bindungsarten eignet sich die verwendete RNA-Sequenz jedoch nicht.

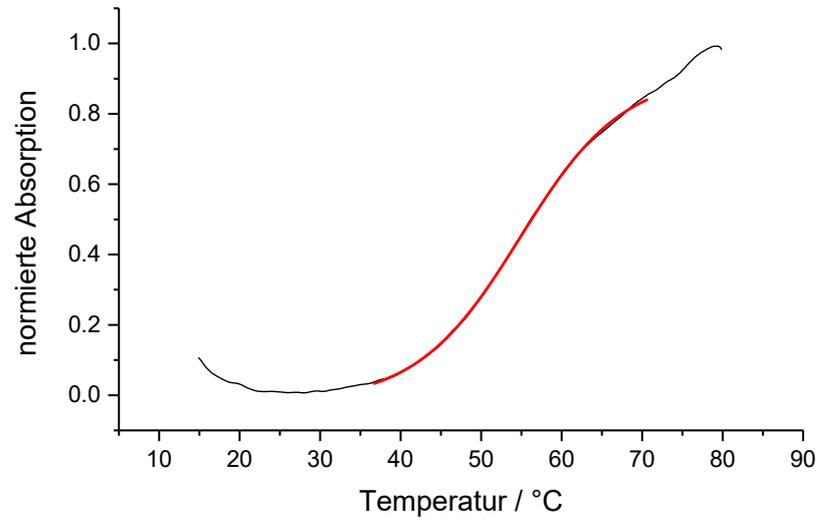
### 2.1.15.4. Schmelztemperatur der PNA mit internem Chinonmethid-Präkursor

Da das Konjugat **PNA5-44** nur noch aus 9 Nukleobasen besteht, mit einer Unterbrechung durch den Alkin-Linker und Verbindung **44** in der Mitte, wurde untersucht, wie sich dies auf die Schmelztemperatur des Duplex auswirkt. Genau wie bei den vorherigen Schmelztemperaturmessungen ist die Änderung der Absorption durch das Schmelzen des Duplexes sehr gering und wird von der Absorptionsänderung der ungepaarten Nukleobasen überdeckt. Ein weiterer Grund ist wohl auch, dass nur noch 9 statt 10 Nukleobasen hybridisieren, sodass die Absorptionsänderung noch geringer ausfällt. Auch hier wurde eine lineare steigende Absorption als Grundlinie subtrahiert, sodass der Wendepunkt im Schmelzpunktdiagramm besser ersichtlicher wurde. Die Kurvenanpassung mit einer Boltzmann-Funktion ergab eine Schmelztemperatur von 54.8 °C, welche somit ca. 10 °C niedriger liegt als die, der vorher gemessenen Konjugate **PNA1-32** und **PNA2-32** (siehe Abbildung 60). Der Austausch einer internen Nukleobase durch das Chinonmethid sorgt somit zu einer deutlichen Erniedrigung der

## 2. Eigene Arbeiten

---

Schmelztemperatur. Mit 54.8 °C liegt dieser jedoch weiterhin über dem biologisch relevanten Wert von 37 °C.



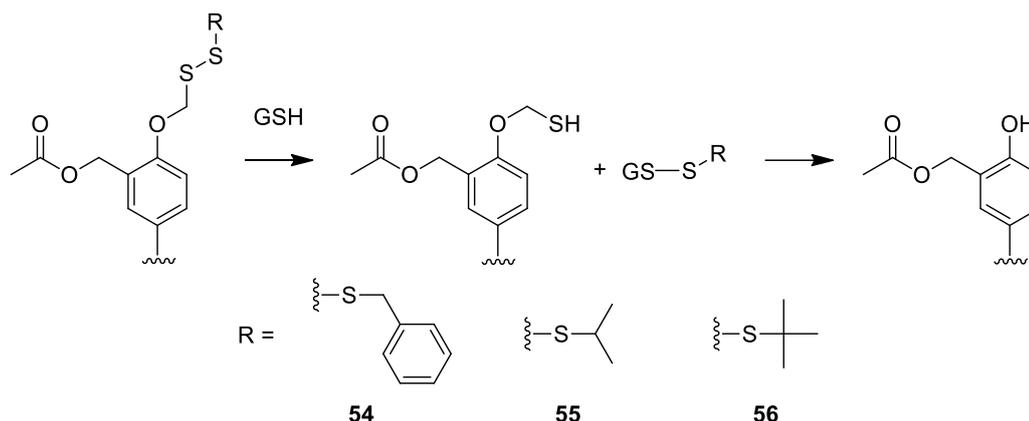
**Abbildung 92:** Schmelzkurve des Duplexes aus **RNA3** und **PNA5-44** nach Subtraktion einer linearen Funktion und Kurvenanpassung mit einer Sigmoidfunktion (rote Kurve).

Auch an der Schmelzkurve ist zu sehen, dass erst bei Temperaturen über 35 °C das Schmelzen des Duplexes beginnt, weshalb in dieser Hinsicht die biologische Anwendung von **PNA5-44** möglich sein sollte.

### 2.2. Reduktiv aktivierbare Chinonmethid-Präkursoren

Die Steuerung der Alkylierung durch Licht ist ein attraktives System, das eine lokale Freisetzung ermöglicht. Diese Methode ist für vor allem für *in vitro* Anwendungen interessant, bei *in vivo* Experimenten prinzipiell auch, aber die praktische Durchführung ist nicht trivial, schließlich muss bei der Bestrahlung von Organismen eine entsprechende Eindringtiefe des Lichts möglich sein. Vor allem kurzwelliges Licht wird stark von Haut bzw. Gewebe absorbiert und stärkere Lichtquellen würden zu unerwünschter Erwärmung des Gewebes und eventuell zu photochemischen Nebenreaktionen führen. Möglich wäre hier die Verwendung von Zwei-Photonen-Absorption, die durch langwelligere Strahlung ein tieferes Eindringen ermöglicht. Alternativ lässt sich mittels Kanülen mit Lichtwellenleitern eine sehr präzise lokale Bestrahlung in Gewebe realisieren, was jedoch wieder einen invasiven Eingriff nötig macht.<sup>[196]</sup> Des Weiteren kann mithilfe des bathochromen Effekts auch die Absorptionswellenlänge der Photoschutzgruppe verändert werden, damit langwelligeres Licht zur Aktivierung ausreicht. Nachteilig wäre jedoch hier, dass damit je nach Applikationsform die Stabilität gegenüber Umgebungslicht sinkt und die Aktivierung nicht mehr so lokal begrenzt wie gewünscht wäre.

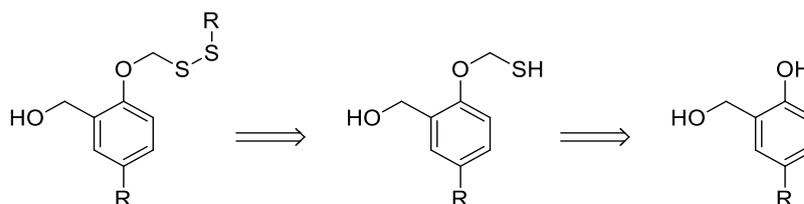
Als Alternative zur Lichtaktivierung wäre auch ein System nützlich, das nach Zell-Penetration des Konjugats durch die dort vorherrschenden Bedingungen aktiviert wird. Somit ist kein externes Signal mehr nötig, aber die Möglichkeit der zeitlich gesteuerten Freisetzung ist nicht mehr gegeben. Die Spezifität des Konjugats sollte dennoch erhalten bleiben, sodass keine *off-target*-Effekte zu erwarten wäre. Als Signalmolekül bietet sich Glutathion an, da dieses Tripeptid in Zellen in einer weitaus höheren Konzentration vorliegt als extrazellulär.<sup>[197]</sup> Biologisch spielt es mit Glutathiondisulfid bei Redoxvorgänge in Zellen eine wichtige Rolle, bspw. als Antioxidationsmittel. Aufgrund des Cysteins ist Glutathion in der Lage, mit Disulfiden auszutauschen oder sie zu Thiolen zu reduzieren und damit zu spalten. Daher war der Ansatz für die neue Schutzgruppe, ein Disulfid zu verwendet, das von GSH zum Thiol reduziert wird und anschließend das Phenol freisetzt (Abbildung 93).



**Abbildung 93:** Entschützung des Phenols durch Spaltung des Disulfids mit GSH und die geplanten Thiolreste.

### 2.2.1. Synthese

Ausgehend von der etablierten Synthese der Chinonmethid-Präkursoren wurden drei verschiedene Disulfid-Derivate synthetisiert, um den Einfluss unterschiedlicher Reste auf die Kinetik der Disulfidspaltung bzw. Entschützung messen zu können. Hierfür wurden Benzylmercaptan, 2-Propanthiol und 2-Methyl-2-propanthiol als primäres, sekundäres und tertiäres Thiol eingesetzt. Für die Synthese des Disulfids sind mehrere Methoden denkbar: Aus zwei Thiolen ließe sich durch Oxidation, z.B. mit Iod, ein Disulfid herstellen, wobei diese Methode vor allem für symmetrische Disulfide geeignet ist. Für gemischte Disulfide müsste ein Thiol in großem Überschuss vorliegen.<sup>[198]</sup> Zudem wäre das benötigte Thiol des Salicylalkohols ein Thiohalbacetal und damit potenziell instabil, es könnte schon während der Reinigungsschritte zerfallen (Abbildung 94).



**Abbildung 94:** mögliche Retrosynthese zur Einführung der Disulfid-Schutzgruppe.

Eine Synthesemethode, die darauf abzielt, O,S-Acetale mit Disulfiden herzustellen wurde von Semenyuk *et al.* für die Schützung von RNA-Phosphoramiditen<sup>[199]</sup> während der Festphasensynthese entwickelt (Abbildung 94). Die *tert*-Butyldithiomethyl (DTM) Schutzgruppe bleibt bei der für RNA-Oligomer-Synthesen typischen Inkubation mit Ammoniak stabil und kann anschließend reduktiv mit TCEP oder DTT im neutralen pH-Bereich abgespalten werden (Abbildung 95).

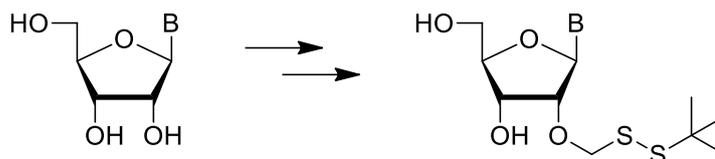


Abbildung 95: Schützung des 2'-OH der Ribose durch DTM nach Semenyuk *et al.* (B= Nukleobase).<sup>[199]</sup>

### 2.2.1.1. Synthese über einen Methylthiomethylether

Zur Planung der Syntheseroute wurde das Zielmolekül retrosynthetisch analysiert. Die Disulfide können über die erwähnte Methode der DTM-Schützung erhalten werden. Hierbei wird der Methylthiomethylether (MTM-Ether) **58** mit Sulfurylchlorid zum Chloromethylether und anschließend Thiotosylat umgesetzt, welches schließlich mit dem gewünschten Thiol zum Disulfid reagiert. Der Ester **58** kann einfach aus dem entsprechenden Benzylalkohol **57** erhalten werden. Zuletzt kann die benötigte Schützung der phenolische Hydroxygruppe von Verbindung **38** mit einer MTM-Gruppe durch eine Pummerer-Umlagerung erhalten werden. (Abbildung 96).

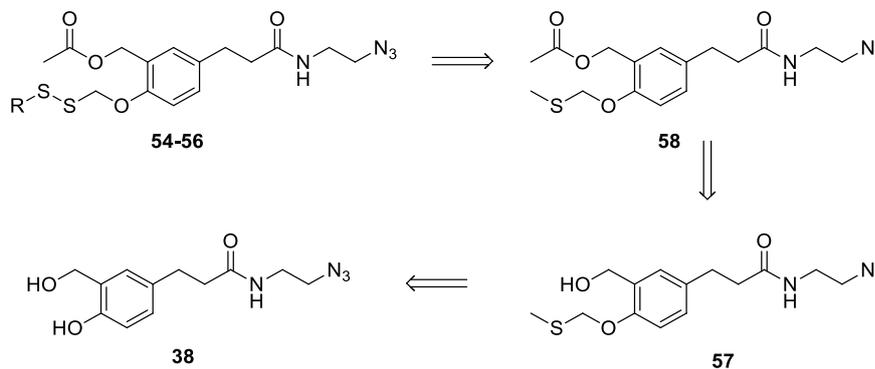


Abbildung 96: Retrosynthese der Disulfid-Derivate.

Die Pummerer-Umlagerung ist verwandt mit Oxidationen, die über ein Sulfonium-Ion ablaufen. Zum Beispiel kann sie während der Swern-Oxidation als Nebenreaktion bei höheren Reaktionstemperaturen als den üblicherweise verwendeten  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  auftreten. Entscheidend für den Reaktionsverlauf ist, ob der Alkohol direkt mit dem Schwefel des Dimethylchlorsulfonium-Ions oder nach Abspaltung des Chlors mit dem Kohlenstoff des kationischen Schwefel-Intermediats reagiert (Abbildung 97).

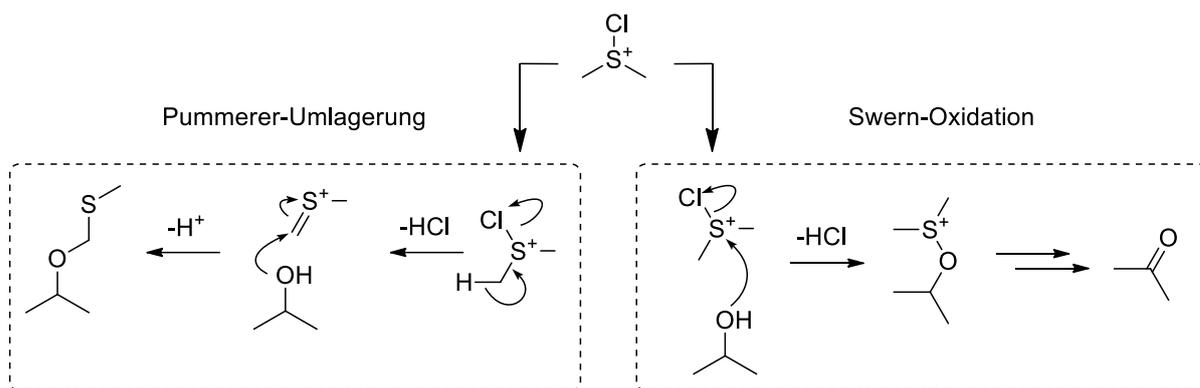


Abbildung 97: Mechanismus der Pummerer-Umlagerung und Swern-Oxidation.

Für die Einführung der MTM-Schutzgruppe über die Pummerer-Umlagerung wurde in der Methode von Semenyuk *et al.* eine Mischung aus DMSO,  $\text{Ac}_2\text{O}$  und Essigsäure verwendet. Diese Bedingungen bringen Schwierigkeiten bei der Selektivität zwischen Oxidation und Umlagerung mit sich. So verwendet die Albright-Goldman-Oxidation ebenfalls DMSO und  $\text{Ac}_2\text{O}$  und verläuft über die Bildung eines Sulfoniumions, bei der sich ein MTM-Ether nur als Nebenprodukt bildet.<sup>[200]</sup>

Bei dem verwendeten Salicylalkohol **38** würde es wahrscheinlich zur Oxidation, Acetylierung oder MTM-Schätzung des Benzylalkohols kommen, weil der Phenolalkohol unter den gewählten Bedingungen nicht selektiv reagieren würde (großer Überschuss an DMSO,  $\text{Ac}_2\text{O}$  und  $\text{AcOH}$ ). Eine selektive Schätzung des Benzylalkhols als Ester wäre ebenfalls aufgrund der höheren Reaktivität der phenolischen Hydroxygruppen nur über mehrere Stufen realisierbar.

Dennoch wurde die Reaktion mit einem Testansatz durchgeführt. Während nach einigen Stunden kaum Reaktion zu beobachten war, hatte sich nach einem Tag laut DC-Analyse eine Mischung von zahlreichen Produkten gebildet. Dasselbe geschah bei Erwärmung der Reaktion auf  $50\text{ }^\circ\text{C}$  und kürzerer Reaktionsdauer. Die Probe wurde aufgrund der komplexen Mischung nicht weiter analysiert.

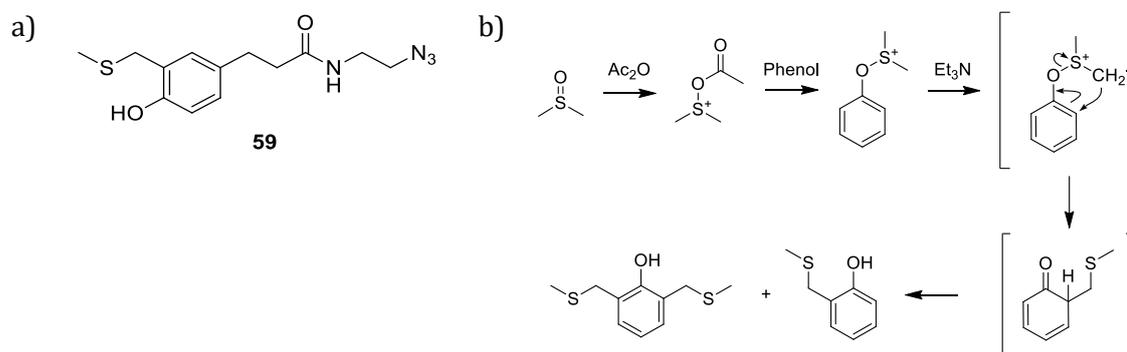
Eine neue Synthesestrategie bestand darin, die MTM-Gruppe durch eine Williamson-Ethersynthese herzustellen, die als Halogenid Chloromethylmethylsulfid verwenden würde. Chloromethylmethylsulfid kann sehr einfach durch Zugabe von Thionylchlorid zu DMSO in DCM und anschließender Destillation des Produkts erhalten werden.<sup>[201]</sup>

Zunächst wurde versucht, die Ethersynthese unter den gleichen Bedingungen wie bei der Einführung der *o*-Nitrobenzylschutzgruppe in Aceton mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  unter Sieden durchzuführen. Mit dieser Base sollte die Deprotonierung und Alkylierung des Benzylalkohols vermieden werden. Im Gegensatz zum *o*-Nitrobenzylbromid tolerierte Chloromethylmethylsulfid diese Bedingungen jedoch nicht und zersetzte sich, was zu einer Gelbfärbung der Lösung führte. Laut DC-Analyse ließ

## 2. Eigene Arbeiten

sich keine Produktbildung feststellen. Um die Zersetzung zu verhindern, wurde nun wasserfreies THF verwendet. Mit  $K_2CO_3$  und auch NaH konnte durch DC-Analyse ebenfalls keine Umsetzung erkannt werden. Erfolg brachte schließlich die Verwendung von Kalium-*tert*-butanolat und einfaches Rühren in trockenem DMF bei Raumtemperatur. Hilfreich war dabei, das Kalium-*tert*-butanolat als Lösung in THF einzusetzen, um eine genauere Dosierung bei kleineren Ansätzen zu erreichen. Unter diesen Bedingungen war die Ausbeute des MTM-Ethers **57** mit 35 % dennoch nicht sehr hoch. Weitere Variationen der Temperatur, Stoffmengen und Zeitabstände zwischen der Zugabe der Reagenzien ließen keinen klaren Einfluss auf die Ausbeute erkennen. Diese war bei gleicher Durchführung der Reaktion variabel, sodass bei manchen Ansätzen kein Produkt isoliert werden konnte. Im Vergleich dazu wurden bei der Umsetzung von Phenolen mit Chloromethylmethylsulfid von anderen Forschungsgruppen Ausbeuten bis 100 %<sup>[202]</sup> beschrieben, die meisten Publikationen geben 60–80 %<sup>[203]</sup> an.

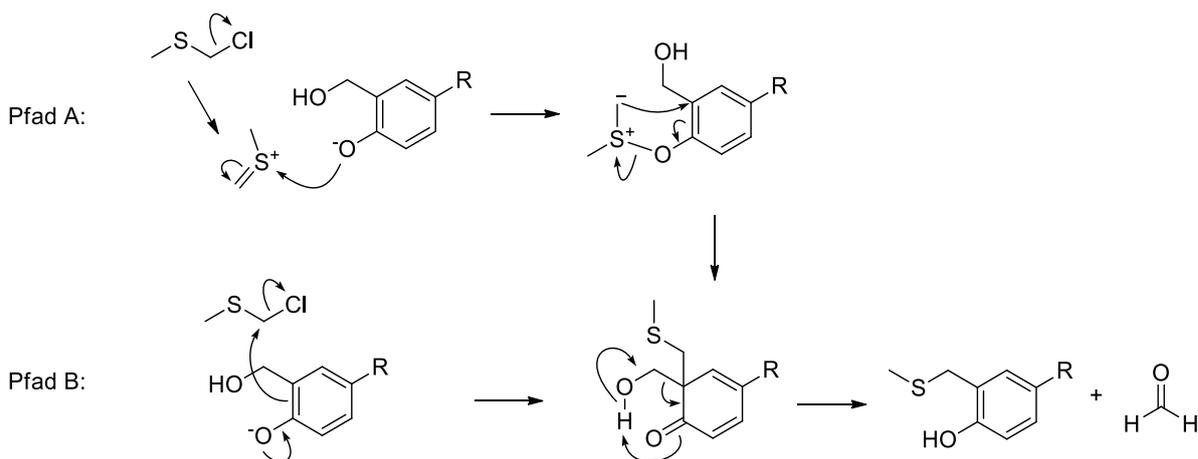
Ein Nebenprodukt, das bei der Umsetzung des Salicylalkohols **38** stets entstand, konnte durch NMR und MS als das Methylthiomethylierungs-Produkt **59** des Phenols identifiziert werden (Abbildung 98 a).



**Abbildung 98:** a) Nebenprodukt des MTM-Schützungs b) Mechanismus der Methylthiomethylierung in *ortho*-Position des Phenols.<sup>[204]</sup>

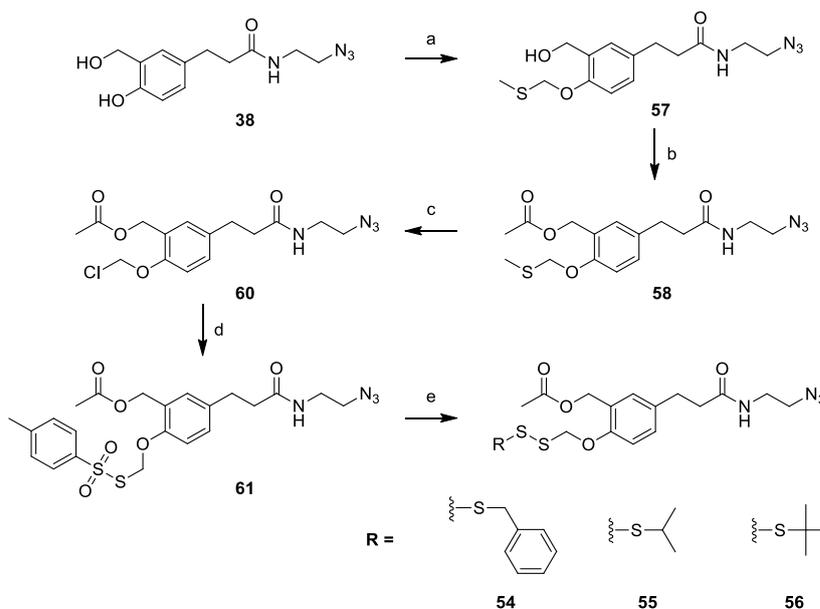
Bei Oxidationen, die über ein Sulfonium-Ion verlaufen, wie der Pfitzner-Moffatt-Oxidation, tritt ebenfalls die Methylthiomethylierung von Phenolen auf.<sup>[204]</sup> Jedoch ist bei Verbindung **38** der Benzylalkohol substituiert worden. In den Arbeiten von *Claus* wird eine solche Abspaltung der *o*-Hydroxymethylgruppe bei der Umsetzung von 6-Hydroxymethylkreosol mit DMSO und  $Ac_2O$  beschrieben.<sup>[205]</sup> Die Reaktion könnte über eine [2,3]-Sigmatrope-Umlagerung verlaufen, nachdem der phenolische Sauerstoff mit dem Schwefel reagiert (Pfad A)<sup>[204]</sup> oder über einen  $S_N2$ -Mechanismus (Pfad B, Abbildung 99).

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 99:** Mögliche Mechanismen der Methylthiomethylierung mit Hydroxymethylabspaltung, die zur Bildung des Nebenprodukts führen.

Für die Einführung des Disulfids in Verbindung **57** muss die MTM-Gruppe in einen reaktiven Chloromethylether<sup>[206]</sup> umgewandelt werden, um mit Kaliumthiosylat zu reagieren. Zur Verhinderung eventueller Reaktionen des Benzylalkohols, wurde dieser zunächst mit Pyridin und Ac<sub>2</sub>O in guter Ausbeute (80 %) zu Verbindung **58** verestert. Darauf folgte die Umwandlung in das Disulfid nach der Vorschrift von Semenyuk *et al.*<sup>[199]</sup>. In einer Eintopfreaktion wurde die MTM-Gruppe mit Sulfurylchlorid chloriert und durch Zugabe von Kaliumthiosylat die erste Hälfte des Disulfids aufgebaut. Durch Zugabe des entsprechenden Thiols wurden unter Abspaltung des Sulfinats schließlich die Zielverbindungen gebildet (Ausbeute Verbindung **54**: 73 %, Verbindung **55**: 83 %, Verbindung **56**: 33 %) (Abbildung 100).



**Abbildung 100:** Synthese der Disulfid-Derivate, die letzten 3 Schritte wurden als Eintopfreaktion durchgeführt. a) NaI, *t*-BuOK, Chloromethylmethylsulfid, DMF, RT, 18 h, 35 %. b) Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, RT, 18 h, 80 %. c) SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DCM, RT, 10 min. d) Kaliumthiosylat, RT, 3 h. e) *tert*-Butylmercaptan, Benzylmercaptan oder Isopropylmercaptan, 16–23 h, 33–83 % über 3 Schritte.

### 2.2.1.2. Alternative Synthese über Tolythiomethylether

Da die MTM-Schützung des Phenols nicht immer zuverlässig verlief, wurde nach Alternativen zur Herstellung des Disulfids gesucht. Die Umwandlung des Sulfids zum Chlorid funktioniert prinzipiell auch mit anderen Resten als der Methylgruppe. *Benneche* und *Undheim* bspw. verwendeten 4-Chlorphenylsulfid und Phenylsulfid<sup>[207]</sup> um daraus  $\alpha$ -Haloalkylarylether zu bilden. Die Wahl fiel daher auf die Verwendung von 4-Chloromethylthiotoluol (Abbildung 101) als leicht zugängliche Alternative zu Chloromethylmethylsulfid.

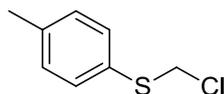


Abbildung 101: 4-Chloromethylthiotoluol.

Publiziert ist die Synthese aus *p*-Methylthiotoluol und *N*-Chlorsuccinimid in  $\text{CCl}_4$  bzw. bei anderen Thioanisol-Derivaten auch in DCM<sup>[208]</sup>. Der Versuch der Synthese geschah in DCM, jedoch konnte nach dieser Vorschrift kein reines Produkt isoliert werden (Abbildung 102). Die Synthese gelang schließlich durch die Umsetzung von *p*-Toluolthiol mit Paraformaldehyd und konz. Salzsäure in Toluol, womit auch die vorher nötige Methylierung von *p*-Toluolthiol entfällt. Nach destillativer Reinigung konnte 4-Chloromethylthiotoluol erfolgreich mit Verbindung **38** umgesetzt werden, was gut mittels DC-Analyse zu verfolgen war.

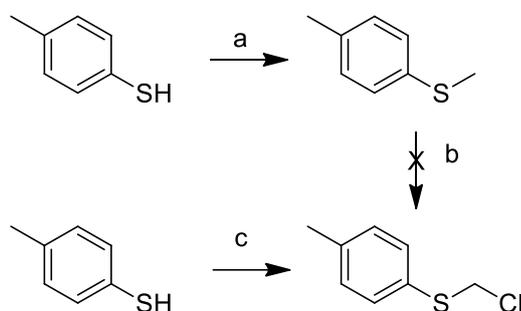
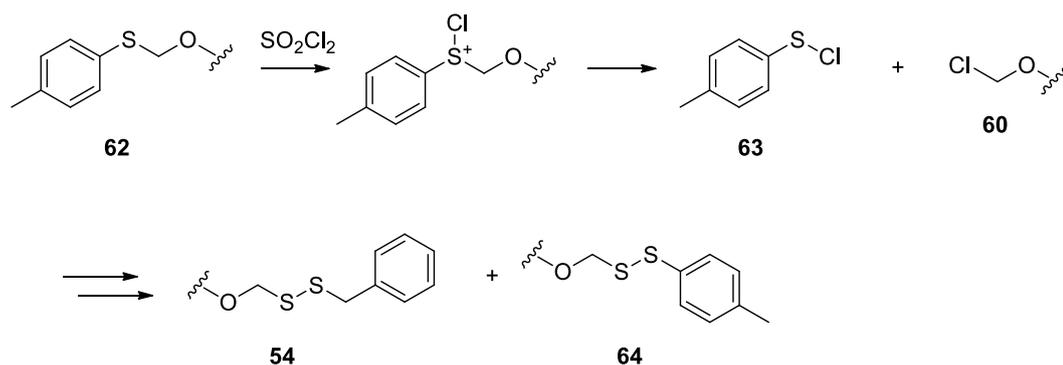


Abbildung 102: Synthese von 4-Chloromethylthiotoluol. a) MeI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Aceton. b) *N*-Chlorsuccinimid, DCM. c) Paraformaldehyd, konz. HCl, Toluol, 50 °C, 1.5 h, 35 %.

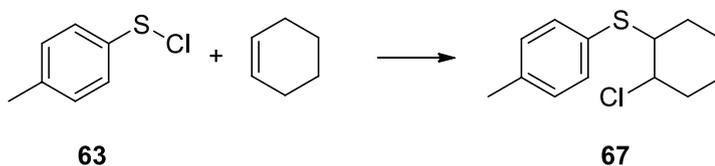
Unter den gleichen Bedingungen wie beim MTM-Ether **57** konnte das erhaltene Tolythiomethyl-Derivat **62** zunächst nicht sauber zu den Disulfiden umgesetzt werden, da das entstehende *p*-Toluolsulfonylchlorid **63** wahrscheinlich zu Nebenreaktionen führte. Im NMR-Spektrum von Verbindung **54** waren zusätzliche Signale im Aryl-Bereich zu sehen, sowie ein Signal im Alkyl-Bereich, dass der  $\text{CH}_3$ -Gruppe eines Toloyl-Rests entsprechen könnte. Durch Säulenchromatographie konnte diese Verunreinigung nicht abgetrennt werden, bei der es sich um Verbindung **64** handeln könnte. Bei der Umsetzung des Sulfids mit  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  entsteht neben dem Chloromethylether auch ein reaktives Sulfonylchlorid **63**, das für dieses Nebenprodukt verantwortlich sein könnte (Abbildung 103).

## 2. Eigene Arbeiten



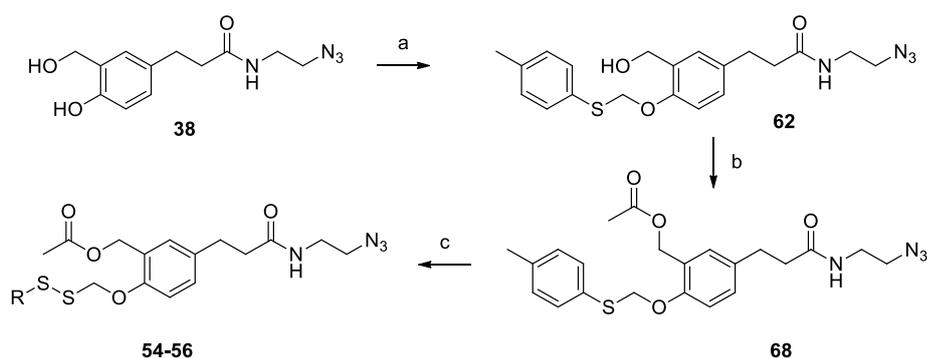
**Abbildung 103:** Nebenreaktion des entstehenden *p*-Toluolsulfonylchlorid führt möglicherweise zum unerwünschten Disulfid **66**.

Um die Nebenreaktionen zu unterbinden, wurde das Sulfonylchlorid **63** durch Zugabe von Cyclohexen abgefangen (Abbildung 104).



**Abbildung 104:** Cyclohexen überführt das reaktive *p*-Toluolsulfonylchlorid in das unreaktive Cyclohexan-Derivat **67**.

Während der Durchführung war deutlich zu sehen, wie die gelbe Farbe der Lösung direkt nach Zugabe des Cyclohexens verschwand. Um die vollständige Umsetzung zu gewährleisten, wurde die Reaktion noch für weitere 20 Minuten gerührt, bevor das Kaliumthiosylat hinzugegeben wurde. Um schließlich nach Zugabe des Thiols die Disulfide zu erhalten (Ausbeute Verbindung **54**: 23 %, Verbindung **55**: 70 %, Verbindung **56**: 78 %, Abbildung 105).



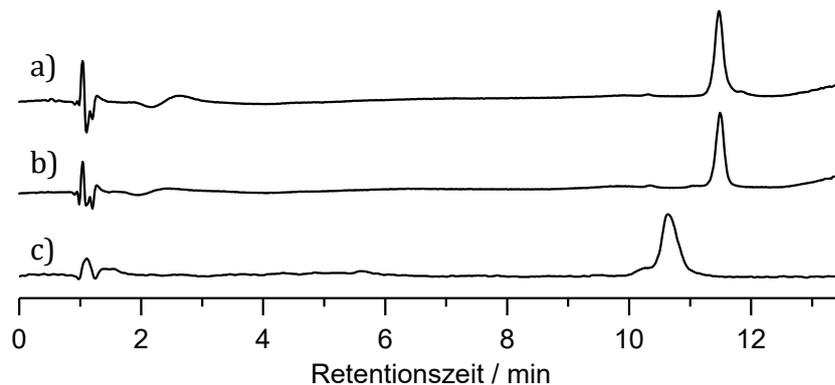
**Abbildung 105:** Verbesserte Synthese der Disulfide durch 4-Chloromethylthiotoluol. a) *t*-BuOK, 4-Chloromethylthiotoluol, MeCN, DMF, RT, 16 h, 79 %. b)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, RT, 16 h, 68 %. c) 1.  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ , DCM, RT, 30 min; 2. Cyclohexen, RT, 20 min d) Kaliumthiosylat, RT, 25 min. e) *tert*-Butylmercaptan, Benzylmercaptan oder Isopropylmercaptan, 16 h, 23–78 % über 3 Schritte.

### 2.2.1.3. Synthese der Konjugate

Wie zuvor waren auch die Disulfide so aufgebaut, dass sie mittels CuAAC mit der PNA verknüpft werden können. Das für die Reaktion benötigte Cu<sup>I</sup> wäre als Reduktionsmittel möglicherweise in der Lage, Disulfid zu spalten und die Konjugate damit unbrauchbar zu machen.<sup>[209]</sup> Bei der Synthese der Konjugate mit **PNA1** mittels CuAAC stellte sich jedoch heraus, dass die Bedingungen kein Problem darstellten, ebenso war auch die Reinigung mittels RP-HPLC mit 0.1 % TFA als Eluent mit dem Konjugat kompatibel.

### 2.2.2. Stabilitätstest der Konjugate in Puffer

Um die Stabilität der Konjugate ohne GSH zu überprüfen, wurden diese für 72 Stunden bei 37 °C in Pufferlösung (130 mM MES pH 7.0, 130 mM NaCl) inkubiert. Die Analyse mittels RP-HPLC zeigte anschließend, dass bei keinem der Konjugate eine Reaktion stattfand (Abbildung 106). Somit sollte die Stabilität gewährleistet sein, solange kein GSH bzw. reduktives Milieu vorhanden ist. Auffällig ist, dass das Isopropylderivat **PNA1-55** eine andere Retentionszeit hat und ein breiteres Signal. Es wurde jedoch mehrfach mit dem gleichen Ergebnis synthetisiert und die Identität durch MALDI-Massenspektroskopie bestätigt.



**Abbildung 106:** RP-HPLC-Chromatogramm der Konjugate **PNA1-56** (*tert*-Butyl), **PNA1-54** (Benzyl) und **PNA1-55** (Isopropyl) nach 72 h Inkubation bei 37 °C in Pufferlösung (130 mM MES pH 7.0, 130 mM NaCl).

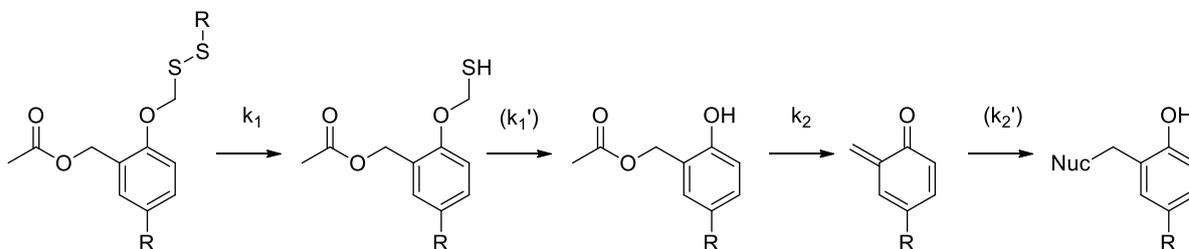
Da nun diese Grundvoraussetzung gegeben war, wurde im nächsten Schritt die Aktivierung bzw. der Zerfall des Disulfids bei verschiedenen GSH-Konzentrationen untersucht.

### 2.2.3. Zerfall der Konjugate bei 0.5 mM GSH

Wie vorher beschrieben, sollte das ideale Konjugat bei niedrigen extrazellulären GSH-Konzentrationen nur in geringem Maße reagieren und erst in der Zelle bei höheren Konzentrationen aktiviert werden. Hierfür wurden 0.5 mM und 10 mM als GSH-Konzentration verwendet, da dies in etwa den extra- bzw. intrazellulären Bedingungen entspricht.<sup>[126]</sup> Wie bereits bei den photolabil geschützten Konjugaten wurde die Entschützung mittels RP-HPLC verfolgt. Während der Inkubation finden mehrere Reaktionen nacheinander statt: Zunächst die

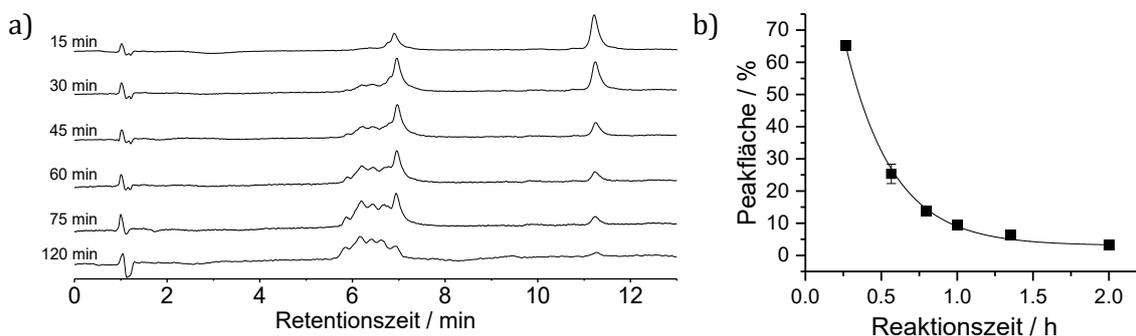
## 2. Eigene Arbeiten

Spaltung des Disulfids mit Zerfall des Thiohalbacetals und anschließend die Bildung des Chinonmethids welches mit einer Nukleobase zum Selbstaddukt reagiert. Das Thiohalbacetal und das Chinonmethid werden wie zuvor möglicherweise nicht sichtbar sein, da deren Zerfall bzw. Reaktion wahrscheinlich schneller als ein HPLC-Lauf ist.



**Abbildung 107:** Schritte, die zur Freisetzung des Phenols führen, welches das Chinonmethid bildet und schließlich mit einem Nukleophil reagiert mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für jeden Schritt.

Zunächst wurden die Derivate mit 0.5 mM GSH (sowie 130 mM MES pH 7.0, 130 mM NaCl) inkubiert. Am schnellsten erfolgt hier die Umsetzung des Benzyl-Derivat **PNA1-54**, gefolgt von Isopropyl- **PNA1-55** und *tert*-Butyl-Derivat **PNA1-56**. Wie zu erwarten, korreliert die Kinetik mit der sterischen Hinderung des Disulfids. Im HPLC-Chromatogramm des Benzyl-Derivates lässt sich die Entstehung unterschiedlicher Produkte gut verfolgen (Abbildung 108).



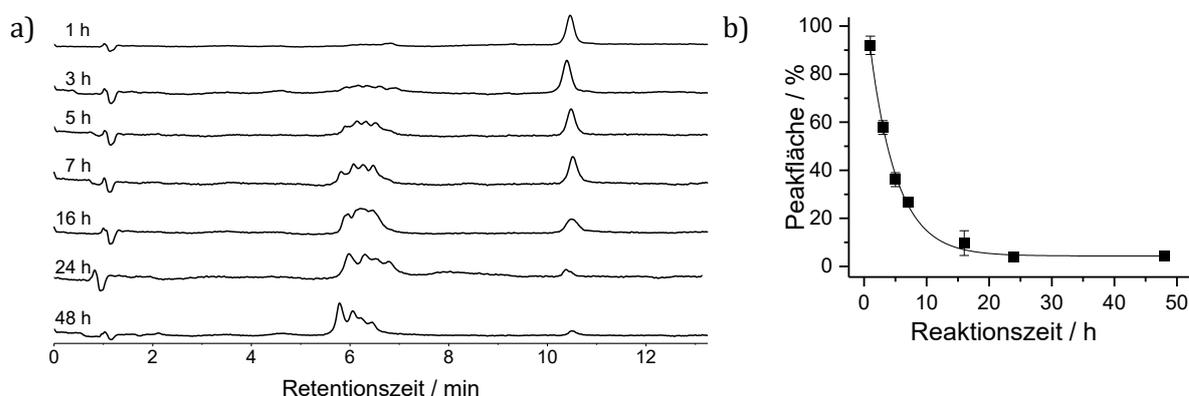
**Abbildung 108:** a) RP-HPLC-Chromatogramme der Reaktion des Benzylderivates **PNA1-54** mit 0.5 mM GSH. b) Kinetik der Disulfidspaltung mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (20  $\mu$ M Konjugat, 0.5 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

Man sieht deutlich, wie sich nach 15 Minuten neben dem Eduktsignal (11.3 min) ein zweites Signal bildet (6.9 min), was dem Chromatogramm des Konjugats **PNA1-32** nach der Bestrahlung ähnelt (vgl. Abbildung 50). Anschließend ist auch der weitere Reaktionsverlauf analog dem photolabil geschützten Derivat **PNA1-32**: das neue Produkt wandelt sich in mehrere Folgeprodukte um, die mittels MALDI-MS als Selbstaddukte identifiziert wurden. Da mit diesem Experiment einzig die Zerfallskinetik des Disulfids bestimmt werden sollte, wurden die Integrale aller entstehenden Produkte summiert, sodass unter Annahme einer Reaktion 1. Ordnung eine Halbwertszeit von 0.22 h erhalten wurde und  $k_1 > k_2$  gilt ( $k_2$  bezeichnet die Bildung und Reaktion des Chinonmethids). Da nach der Abspaltung der Schutzgruppe am Phenol das Acetat chemisch identisch mit dem Produkt der Photoaktivierung ist, sollte auch hier für  $k_2$  eine Halbwertszeit von

## 2. Eigene Arbeiten

0.43 Stunden gelten (vgl. Kapitel 2.1.5). Beim Isopropyl- und *tert*-Butyl-Derivat wurde auf die gleiche Art vorgegangen und Halbwertszeiten von 3.0 Stunden bzw. 28 Stunden erhalten. Mit einer Halbwertszeit von 0.22 Stunden bei 0.5 mM GSH würde das Benzylderivat somit möglicherweise schon vor Eintritt in die Zelle aktiviert werden. Daher würde es sich für *in vivo* Anwendungen schlechter eignen.

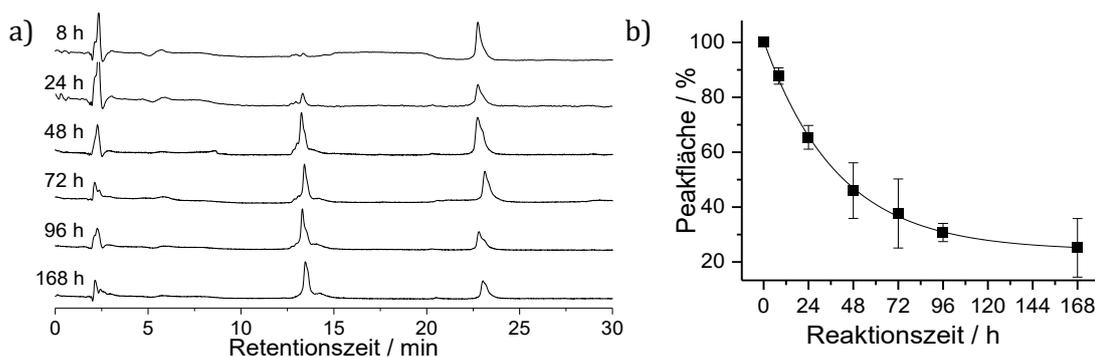
Bei Betrachtung der HPLC-Chromatogramme des Isopropylderivats ist ebenfalls deutlich zu erkennen, wie das Eduktsignal abnimmt, jedoch ist hier kein einzelnes Signal des Folgeprodukts sichtbar. Stattdessen sind nur die Signale der Selbstalkylierungsprodukte sichtbar, da das Acetat schneller zum Chinonmethid zerfällt, als es gebildet wird ( $k_1 < k_2$ , Abbildung 109).



**Abbildung 109:** a) HPLC-Chromatogramme der Reaktion des Isopropylderivats **PNA1-55** mit 0.5 mM GSH. b) Kinetik der Disulfidspaltung mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (20  $\mu$ M Konjugat, 0.5 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

Die RP-HPLC-Messung des *tert*-Butyl-Derivats gestaltete sich zunächst schwierig, da unter den RP-HPLC-Bedingungen der vorherigen Messungen (Gradient aus 0.1 M TEAA Puffer pH 7.0 & MeCN) kein Produktsignal zu sehen war. Die Ursache scheint die, im Vergleich mit den anderen Konjugaten, sehr langsame Reaktionsgeschwindigkeit bzw. hohe Stabilität zu sein, sodass das Acetat nur in geringer Konzentration entsteht. Das deutlich schneller entstehende Chinonmethid bzw. die Folgeprodukte liefern unter den RP-HPLC-Bedingungen möglicherweise nur ein breites Signal des Produktgemischs, das im Chromatogramm nicht ersichtlich ist. Deshalb wurde im Fall dieses Derivats für die HPLC-Analyse ein Eluent mit 0.1 % TFA verwendet, wie es auch für die Reinigung der Konjugate üblich war. Im Chromatogramm ist unter diesen Bedingungen jedoch nur ein Produktsignal mit Schultern zu beobachten, sodass nicht die unterschiedlichen entstehenden Signale verfolgt werden können. Da nur der Zerfall des Disulfids von Interesse war, ist die Kenntnis über die genau Produktzusammensetzung nicht nötig, solange sich bei den Reaktionsprodukten der Extinktionskoeffizient nicht erheblich ändert. Wie beim Isopropylderivat ist hier  $k_2$  deutlich größer als  $k_1$  und somit das Acetat wahrscheinlich nicht zu beobachten.

## 2. Eigene Arbeiten

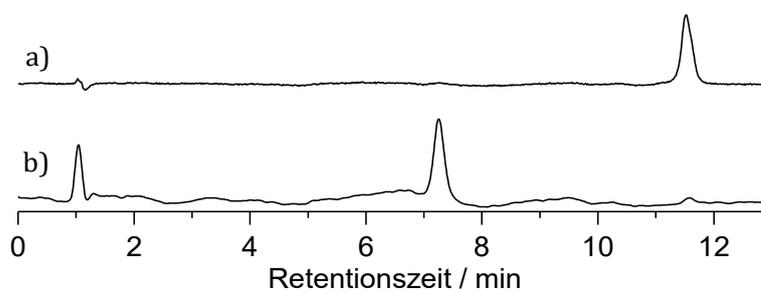


**Abbildung 110:** a) HPLC-Chromatogramme der Reaktion des *tert*-Butylderivats **PNA1-56** mit 0.5 mM GSH. b) Kinetik der Disulfidspaltung mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (20  $\mu$ M Konjugat, 0.5 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

### 2.2.4. Zerfall der Konjugate bei 10 mM GSH

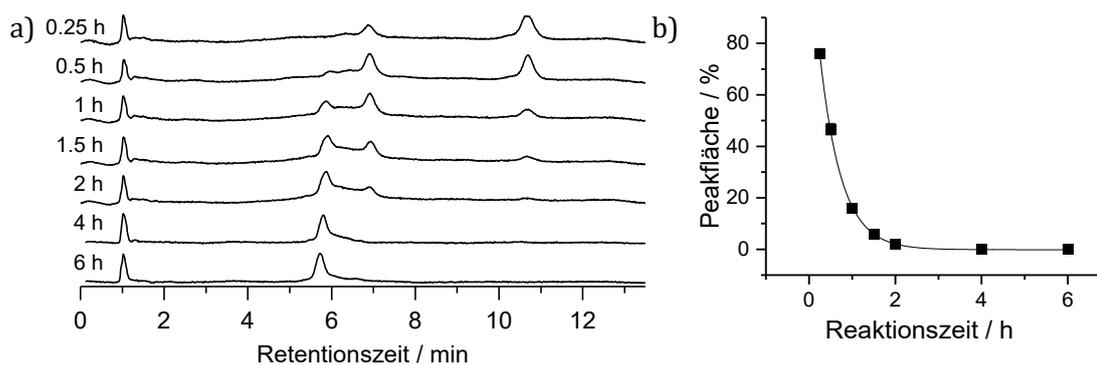
Die Inkubationen der Derivate wurden nun erneut mit 10 mM GSH wiederholt, was den Bedingungen in der Zelle gleichen soll. Wie zu erwarten, zeigt sich hier eine deutlich schnellere Entschützung des Phenols bei allen Derivaten, wobei die Reihenfolge der Reaktivität erhalten blieb.

Beim Benzylderivat **PNA1-54** erfolgte die Reaktion nun so schnell, dass dieses bereits nach 5 Minuten Inkubation nicht mehr detektiert wurde und somit die Halbwertszeit nur auf unter 5 min geschätzt werden konnte.



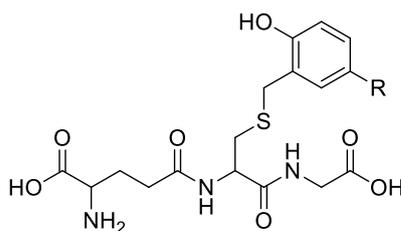
**Abbildung 111:** HPLC-Chromatogramme der Reaktion des Benzylderivates **PNA1-54** mit 10 mM GSH. a) Ohne GSH b) 5 min nach Zugabe von 10 mM GSH.

Das Isopropylderivat **PNA1-55** erreicht eine Halbwertszeit von 0.34 Stunden und ist damit fast so schnell wie das Benzylderivat bei 0.5 mM GSH. Außerdem veränderte sich das Chromatogramm: es entsteht ein Hauptprodukt mit einer Retentionszeit von 5.7 Minuten und das vorher aufgetretene Muster der Selbstalkylierungsprodukte (6–7 min) ist geringer ausgeprägt (Abbildung 112).



**Abbildung 112:** a) RP-HPLC-Chromatogramme der Reaktion des Isopropylderivats **PNA1-55** mit 10 mM GSH. b) Kinetik der Disulfidspaltung mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (20  $\mu$ M Konjugat, 10 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

Dieses Hauptprodukt entsteht ebenfalls bei der Reaktion von **PNA1-56** mit 10 mM GSH, wo es isoliert und mittels MALDI-Massenspektrometrie als GSH-Addukt identifiziert wurde (Abbildung 113).

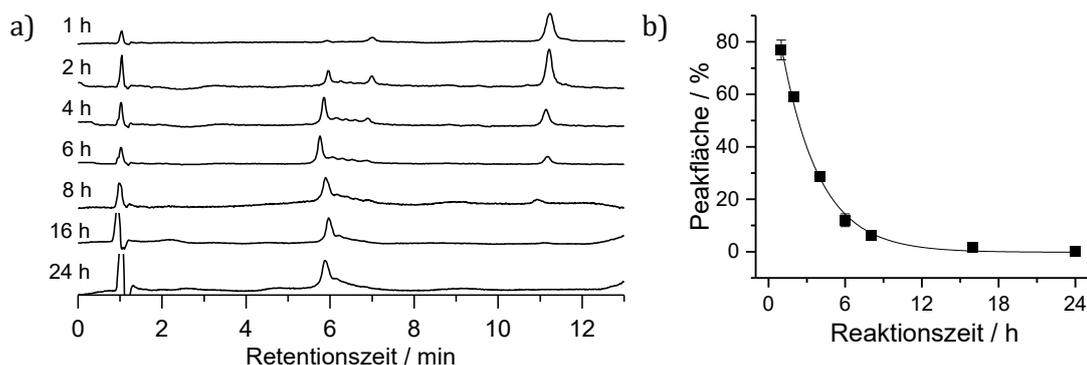


**Abbildung 113:** GSH-Addukt, entstanden aus der Reaktion des Chinonmethids mit GSH.

Bereits im Chromatogramm des Isopropylderivats **PNA1-55** bei 0,5 mM GSH (Abbildung 109) ist dieses Produkt nach 24 Stunden deutlich sichtbar. Bei niedrigen GSH-Konzentrationen scheint es also, als würde das Selbstaddukt präferiert entstehen und anschließend teilweise zum GSH-Addukt umlagern. Bei hohen GSH-Konzentrationen entsteht direkt und deutlich mehr GSH-Addukt, sodass es schon nach 1 Stunde deutlich zu sehen ist.

Am deutlichsten wird dies beim *tert*-Butyl-Derivat, da es mit einer Halbwertszeit von 2,1 Stunden am langsamsten reagiert (Abbildung 114). So entsteht wahrscheinlich schon während der Abspaltung des Disulfids auch die Umwandlung eventuell entstandener reversibler Selbstaddukte in das GSH-Addukt, weshalb die Signale der Selbstaddukte nur schwach ausfallen und auch das vermeintliche Acetat nur anfangs schwach sichtbar ist.

## 2. Eigene Arbeiten



**Abbildung 114:** a) HPLC-Chromatogramme der Reaktion des *tert*-Butylderivats **PNA1-56** mit 10 mM GSH. b) Kinetik der Disulfidspaltung mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (20  $\mu$ M Konjugat, 10 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

In Hinblick auf die Aktivierung nach dem Eintritt in Zellen würden sich alle Derivate eignen, da selbst 2.1 h eine akzeptable Halbwertszeit für biologische Anwendungen sein sollte. Das Benzylderivat würde jedoch wahrscheinlich größtenteils außerhalb der Zellen aktiviert werden, je nachdem wie schnell die Zellinternalisierung geschieht. Nach Zellinternalisierung sollte das Derivat genug Zeit zur Aktivierung haben, bevor Exocytose geschieht. Am ausgewogensten ist das Isopropylderivat **PNA1-55**, mit Halbwertszeiten von 3 Stunden (0.5 mM GSH) und 0.34 Stunden (10 mM GSH).

**Tabelle 6:** Halbwertszeiten der Disulfidspaltung.

		0.5 mM GSH	10 mM GSH
<b>PNA1-54</b>	Benzylrest	$t_{1/2} = 0.22$ h	$t_{1/2} < 5$ min
<b>PNA1-55</b>	Isopropylrest	$t_{1/2} = 3.0$ h	$t_{1/2} = 0.34$ h
<b>PNA1-56</b>	<i>t</i> -Butylrest	$t_{1/2} = 28$ h	$t_{1/2} = 2.1$ h

Problematischer ist das vor allem das bei hohen Konzentrationen auftretende Addukt mit GSH, welches mit der Alkylierung der Nukleobasen konkurrieren könnte. Durch die räumliche Nähe des Chinonmethids zu den Nukleobasen besteht zwar eine Art „lokal hohe Konzentration“, bildet sich das Chinonmethid vor der Hybridisierung des Oligomers mit der RNA wäre dies jedoch irrelevant.

### 2.2.5. Alkylierung von RNA1

Um die Reaktionsgeschwindigkeit der neuen Konjugate mit RNA zu bestimmen und den Einfluss des GSH auf die Selektivität bzw. Ausbeute zu überprüfen, wurden nun die Alkylierungsexperimente mit RNA durchgeführt. Dies geschah unter den gleichen Bedingungen wie zuvor (6  $\mu$ M Konjugat, 3  $\mu$ M **RNA1**, 130  $\mu$ M MES pH 7.0, 130  $\mu$ M NaCl), nur dass zusätzlich

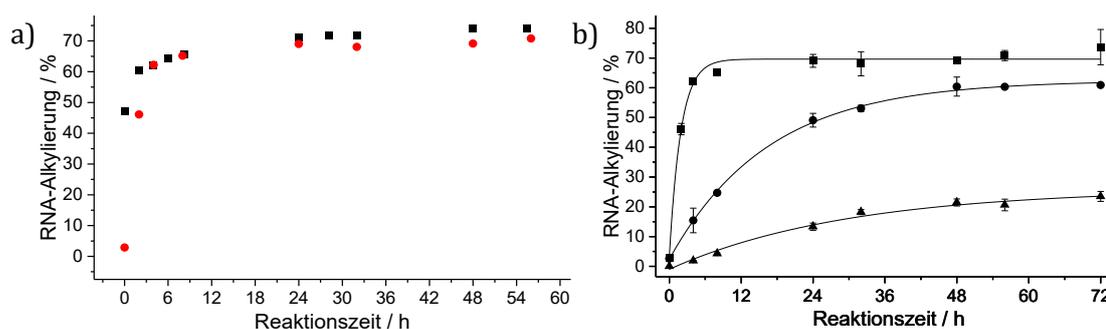
## 2. Eigene Arbeiten

0.5 mM bzw. 10 mM GSH zugesetzt wurde, wie in den Kapiteln 2.2.3 & 2.2.4. Die Analyse erfolgte wieder durch Entnahme von Proben nach bestimmten Zeitabschnitten und Analyse dieser mittels des *ALFexpress*<sup>TM</sup>. Um die Ausbeute der Alkylierung besser erfassen zu können (vgl. Kapitel 2.1.11), wurde die Gelelektrophorese nun stets bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

### 2.2.5.1. Alkylierungskinetiken bei 0.5 mM GSH

Zunächst wurde die Alkylierung bei einer GSH-Konzentration von 0.5 mM betrachtet. In den vorherigen Experimenten mit den photoaktivierbaren Konjugaten wurden die schnellen Halbwertszeiten der RNA-Alkylierung auf 0.4 Stunden und die langsamen auf 11 Stunden bestimmt. Einzig das Benzylderivat **PNA1-54** hat bei 0.5 mM GSH eine Halbwertszeit, die in diesem Größenbereich liegt. Es war somit anzunehmen, dass die Alkylierungskinetik bei den Isopropyl- und *tert*-Butyl-Derivaten durch die Geschwindigkeit der Disulfidspaltung verzögert wird.

Vergleicht man das Benzylderivat **PNA1-54** mit dem photoaktivierbaren Konjugat **PNA1-32**, erreicht es eine ähnliche Ausbeute (69 %) nach 48 Stunden und auch die Kinetiken sehen sich sehr ähnlich (Abbildung 115 a). Aufgrund des unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus startet die Alkylierung mit **PNA1-54** leicht verzögert. Wie bereits erwähnt, muss sich das Disulfid zunächst abspalten, sodass nicht so schnell die volle Konzentration an entschütztem Phenol zur Verfügung steht, wie es nach der photochemischen Entschützung der Fall ist. Wohl aufgrund dieser Verzögerung lässt sich diese Kinetik sehr gut mit einer Reaktion 1. Ordnung abbilden, für die eine Halbwertszeit von 1.3 Stunden erhalten wurde.



**Abbildung 115:** a) Vergleich der gemessenen RNA-Alkylierungs-Ausbeuten von **RNA1** durch **PNA1-54** bei 0.5 mM GSH (rote Kreise) und **PNA1-32** (schwarze Quadrate). b) Kinetiken der RNA-Alkylierung von **RNA1** (3 µM) durch **PNA1-54** (schnell), **PNA1-55** (mittel) oder **PNA1-56** (langsam), bei 0.5 mM GSH mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (Gelelektrophorese bei 25 °C, 3 µM RNA, 6 µM Konjugat, 0.5 mM GSH, 130 mM NaCl und 130 µM MES-Puffer (pH 7.0)).

Für das Isopropyl- und *tert*-Butylderivat wurden mit 12 Stunden und 21 Stunden Halbwertszeiten gemessen, die wie erwartet durch die langsamere Disulfidspaltung deutlich verlängert wurden.

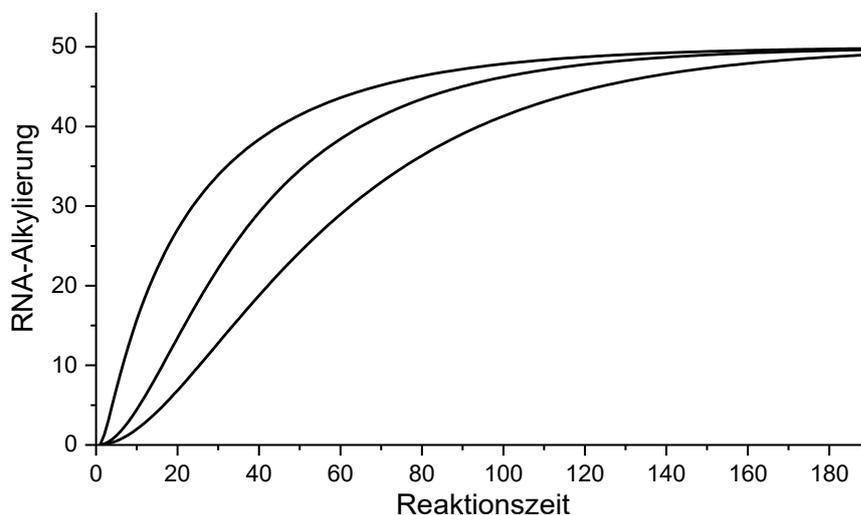
## 2. Eigene Arbeiten

**Tabelle 7:** Vergleich zwischen Disulfidspaltungs- und RNA-Alkylierungskinetik bei 0.5 mM GSH.

		$t_{1/2}$ Disulfidspaltung	$t_{1/2}$ RNA-Alkylierung
<b>PNA1-54</b>	Benzylrest	0.22 h	1.3 h
<b>PNA1-55</b>	Isopropylrest	3.0 h	12 h
<b>PNA1-56</b>	<i>t</i> -Butylrest	28 h	21 h

Das Isopropylderivat zerfällt mehr als 10-mal langsamer als das Benzylderivat und erreicht auch eine um den Faktor 10 langsamere Alkylierung. Die Werte sind jedoch nur bedingt quantitativ zu vergleichen, da bei der Inkubation mit RNA die zweifache Menge an Konjugat verwendet wurde, sodass sich theoretisch nach einer Halbwertszeit des Disulfidzerfalls bereits genügend entschütztes Phenol für die vollständige Alkylierung der RNA gebildet haben könnte. So scheint es auch zunächst verwunderlich, wie die RNA-Alkylierung durch das *tert*-Butylderivats **PNA1-56** schneller ablaufen kann als die Spaltung des Disulfids, jedoch ist durch den Überschuss an Konjugat im Vergleich zu RNA die Verlangsamung der Reaktion nicht so stark.

Bei einem sehr starken Geschwindigkeitsunterschied zwischen der Disulfidspaltung und Alkylierung müsste es zu einer Induktionsperiode kommen, was jedoch nicht zu beobachten war. Erkennbar wäre das am zunächst flachen Kurvenverlauf der RNA-Alkylierung-Ausbeute, der sich durch den Wendepunkt am Anfang unterscheiden würde, aber durch die begrenzte Anzahl an Messpunkten möglicherweise nicht sichtbar ist (Abbildung 116).



**Abbildung 116:** Simulierte Alkylierungskinetik bei langsamer Disulfidspaltung mit schnell:  $k_1 \gg k_2$ , mittel:  $k_1 = k_2$ , langsam:  $k_1 \ll k_2$ ,  $k_1$  ist bei allen Graphen gleich. Alkylierungs-Ausbeute und Reaktionszeit sind willkürlich gewählt.

### 2.2.5.2. Alkylierungskinetiken bei 10 mM GSH

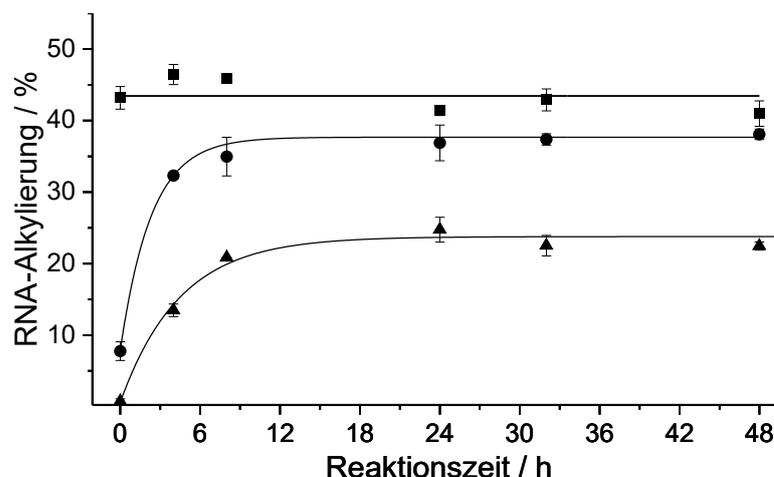
Für die Analyse der Alkylierung bei hoher GSH-Konzentration, die dem Eintritt in die Zelle gleichkommen, wurden die Experimente ebenso mit 10 mM GSH unter ansonsten gleichen

## 2. Eigene Arbeiten

Bedingungen wiederholt. Wie erwartet, geschah die Aktivierung bei allen Derivaten bedeutend schneller, was sich auf die Alkylierungskinetik auswirkte. Für das *tert*-Butylderivat **PNA1-56** wurde nun eine Halbwertszeit von 3.1 Stunden gemessen und für das Isopropylderivat **PNA1-55** eine Halbwertszeit von 1.6 Stunden. Die Halbwertszeit des Benzylderivats **PNA1-54** ließ sich nicht bestimmen, da die Alkylierung bereits wenige Minuten nach Zugabe des GSH beendet war und schon bei der ersten Probe die maximale Alkylierungsausbeute erreicht war. Die anderen Derivate erreichen nach ca. 10 Stunden ihr Maximum. Durch die hohe GSH-Konzentration wurden die Ausbeute jedoch deutlich gemindert: Das Benzylderivat **PNA1-54** erreicht mit 43 % die höchste Ausbeute, gefolgt vom Isopropylderivat **PNA1-55** mit 37 % und dem *tert*-Butylderivat **PNA1-56** mit 23 % (Abbildung 117).

**Tabelle 8:** Vergleich zwischen Disulfidspaltungs- und RNA-Alkylierungskinetik bei 10 mM GSH.

		$t_{1/2}$ Disulfidspaltung	$t_{1/2}$ RNA-Alkylierung
<b>PNA1-54</b>	Benzylrest	< 5min	< 5min
<b>PNA1-55</b>	Isopropylrest	0.34 h	1.62 h
<b>PNA1-56</b>	<i>t</i> -Butylrest	2.05 h	3.09 h



**Abbildung 117:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-54** (Quadrate), **PNA1-55** (Kreise) oder **PNA1-56** (Dreiecke) aktiviert mit 10 mM GSH mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (Gelelektrophorese bei 25 °C, 3  $\mu$ M RNA, 6  $\mu$ M Konjugat, 10 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

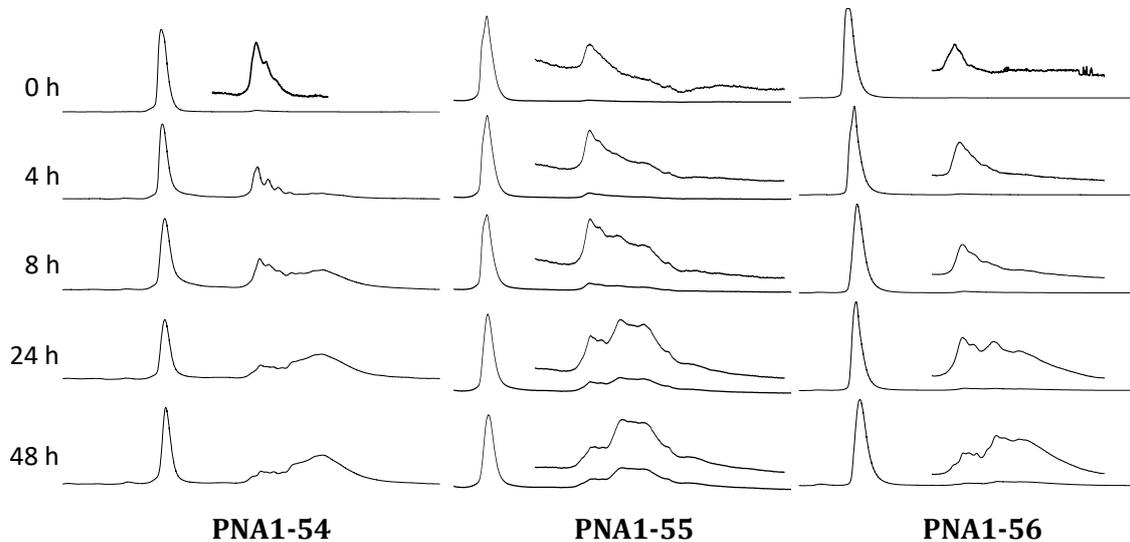
### 2.2.5.3. Analyse der Elektropherogramme

Da die Gelelektrophorese bei 25 °C erfolgte, kann wie beim photoaktivierbaren Konjugat die Entstehung von Alkylierungsprodukten mit niedriger Retentionszeit verfolgt werden, die sich mit fortlaufender Reaktion zu Produkten mit höherer Retentionszeit umwandeln. Bei 0.5 mM GSH ist

## 2. Eigene Arbeiten

---

vor allem das Signalmuster des Benzylderivats dem des photoaktivierbaren Konjugats am ähnlichsten (Abbildung 118).



**Abbildung 118:** Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-54**, **PNA1-55** und **PNA1-56** nach Zugabe von 0.5 mM GSH mit vergrößertem Ausschnitt der Alkylierungsprodukte über dem jeweiligen Elektropherogramm. (Gelelektrophorese bei 25 °C, 3  $\mu$ M RNA, 6  $\mu$ M Konjugat, 10 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

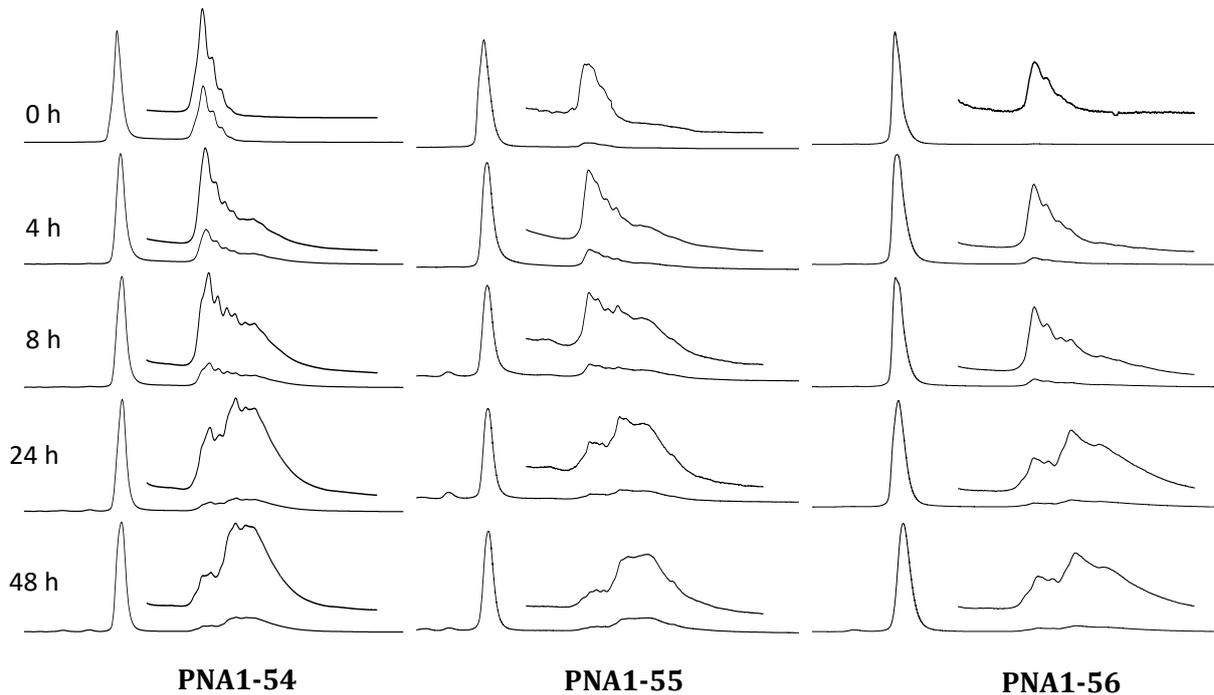
Mit sinkender Reaktionsgeschwindigkeit wird auch der Anteil der langsam migrierenden Produkte weniger. So haben sich beim *tert*-Butylderivat **PNA1-56** nach 8 Stunde noch kaum die Produkte mit höherer Retentionszeit gebildet. Und auch nach 48 Stunden ist beim Isopropyl-**PNA1-55** und *tert*-Butylderivat **PNA1-56** der Anteil dieser Alkylierungsprodukte nicht so deutlich ausgeprägt, wie beim Benzylderivat **PNA1-54**. Dies könnte daran liegen, dass bei den Derivaten mit hoher Halbwertszeit noch nicht alle Disulfide abgespalten sind, wenn schon ein Teil der RNA reversible oder irreversibel alkyliert ist. Somit bilden sich ständig neue, entschützte Phenole nach, die wiederum zu Chinonmethiden reagieren und dann vorwiegend schnell migrierende Produkte bilden.

Bei der Induktion der Alkylierung durch die hohe GSH-Konzentration von 10 mM ist bei allen Derivaten ein ähnliches Signalmuster wie bei 0.5 mM GSH zu sehen (Abbildung 119). Die hohe GSH-Konzentration führt zwar zu einer geringeren Alkylierungsausbeute durch eine Konkurrenzreaktion, es scheint sich jedoch anhand des Signalmusters das gleiche Verhältnis an Alkylierungsprodukten mit höherer und niedrigerer Retentionszeit einzustellen. Dies macht es wahrscheinlich, dass die Reaktion des Chinonmethids mit GSH nur vor der Alkylierung der Nucleobasen geschieht. Andernfalls würde sich ein geringerer Anteil der stabilen Alkylierungsprodukte bilden, da das Chinonmethid bei der Umlagerung zum stabilen Produkt von GSH abgefangen würde. Vor allem wird dies beim schnell reagierenden Benzylderivat sichtbar.

## 2. Eigene Arbeiten

---

Hier bleibt die Ausbeute während der Reaktion konstant, während sich das Signalmuster aufgrund der Umlagerung ändert.



**Abbildung 119:** Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-54**, **PNA1-55** und **PNA1-56** nach Zugabe von 10 mM GSH mit vergrößertem Ausschnitt der Alkylierungsprodukte über dem jeweiligen Elektropherogramm. (Gelelektrophorese bei 25 °C, 3  $\mu$ M RNA, 6  $\mu$ M Konjugat, 10 mM GSH, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0)).

### 2.2.5.4. Weitere Aktivatoren

Neben GSH sollten auch andere Thiole durch Austausch mit der Disulfidgruppe reagieren und damit das Phenol freisetzen können. Die Thiole *N*-Acetylcystein (NAC), Cysteamin und DTT werden in der Medizin und Biochemie benutzt, um Disulfidbrücken zu brechen. Ebenso wird auch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) als ein Reduktionsmittel verwendet, das kein Thiol enthält.

Von Pullela *et al.* wurde gezeigt, dass sich alle vier Verbindungen aufgrund ihres Redoxpotentials in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit mit Disulfiden unterscheiden. Am schnellsten geschah die Spaltung mit TCEP, gefolgt von DTT, GSH, Cysteamine und NAC.<sup>[210]</sup> Mit diesen vier Stoffen wurden ebenfalls Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob sie die Alkylierung von RNA initiieren können.

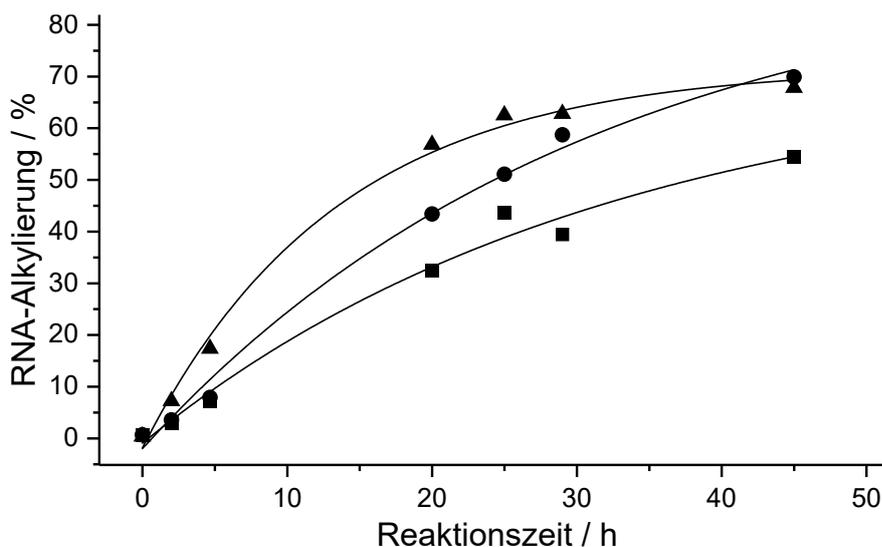
Zunächst wurde überprüft, ob Cysteamin in den Konzentrationen 25, 75 oder 150  $\mu$ M in der Lage ist das *tert*-Butylderivat **PNA1-56** zu aktivieren. Nach 7 Tagen konnte bei 150  $\mu$ M Cysteamin lediglich 3 % RNA-Alkylierung festgestellt werden. DTT wurde in den Konzentrationen 10, 25 und 50  $\mu$ M mit dem *tert*-Butylderivat inkubiert, was jedoch nicht ausreichte, um die

## 2. Eigene Arbeiten

---

Alkylierungsprodukte mit RNA zu bilden. Mit 50  $\mu\text{M}$  TCEP ergab sich eine Ausbeute von ca. 4 % nach 72 Stunden Inkubation.

Am Benzylderivat **PNA1-54** wurde der Einfluss von NAC bei einer Konzentration von 50, 100 und 500  $\mu\text{M}$  überprüft. Hier wurde bei allen Konzentrationen die Alkylierung ausgelöst, was zum einen daran liegt, dass das Benzylderivat reaktiver ist und zum anderen wurde das Reduktionsmittel in höherer Konzentration eingesetzt. Die Alkylierungsgeschwindigkeit korreliert dabei mit der NAC-Konzentration, ist bei 500  $\mu\text{M}$  NAC aber langsamer als bei 500  $\mu\text{M}$  GSH.



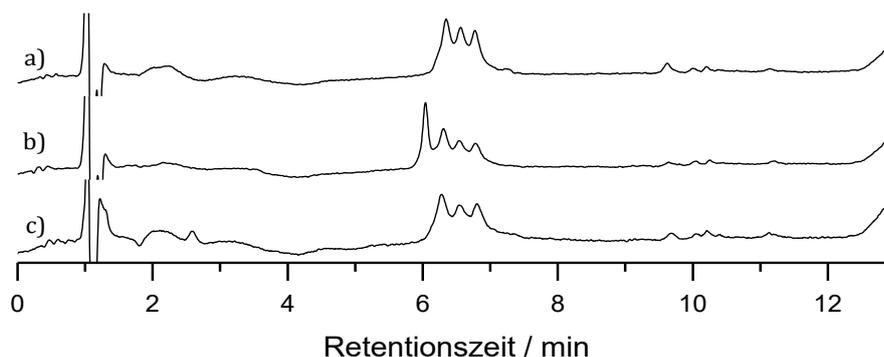
**Abbildung 120:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-54**, aktiviert mit 50  $\mu\text{M}$  (Quadrate), 100  $\mu\text{M}$  (Kreise) oder 500  $\mu\text{M}$  (Dreiecke) NAC. (Gelelektrophorese bei 57  $^{\circ}\text{C}$ , 3  $\mu\text{M}$  RNA, 6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 130 mM NaCl und 130  $\mu\text{M}$  MES-Puffer (pH 7.0)).

### 2.2.6. Beeinträchtigung des photoaktivierbaren Derivats durch GSH und DTT

Da die reduktiv-aktivierbaren Derivate bei hohen GSH-Konzentrationen auch durch GSH abgefangen werden, wurde untersucht, wie es sich beim photoaktivierbaren Chinonmethidderivat verhält. Hierfür wurde **PNA1-32** in der gleichen GSH-Puffer-Lösung (10 mM GSH) wie die reduktivaktivierbaren Derivate bestrahlt und für 16 Stunden bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Vergleich zur Probe, die keine GSH enthält, sieht man hier im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 121) auch deutlich ein zusätzliches Signal, das mittels MALDI-MS dem GSH-Addukt zugeordnet werden konnte.

## 2. Eigene Arbeiten

---

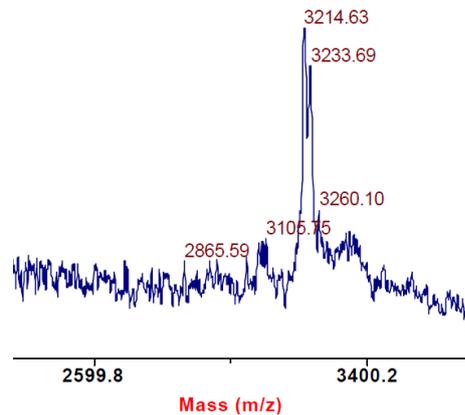


**Abbildung 121:** HPLC-Chromatogramme nach der Bestrahlung von PNA1-32 in a) Puffer und mit Zusatz von b) 10 mM GSH oder c) 10 mM DTT und 16 h Inkubation bei 37 °C.

Anhand des Integrals lässt sich abschätzen, dass etwa 30 % der Chinonmethide ein Addukt mit GSH eingegangen sind, während die restlichen 70 % das Selbstaddukt gebildet haben. Neben GSH eignet sich auch Dithiothreitol (DTT) zur Spaltung von Disulfiden, zudem besitzt es mit zwei Thiolgruppen eine hohe Nucleophilie, weshalb auch 10 mM DTT mit dem photoaktivierbaren Chinonmethid inkubiert wurde, um mögliche Nebenreaktionen zu überprüfen. Überraschend stellte sich heraus, dass im HPLC-Chromatogramm nach 16 Stunden Inkubation keine Nebenprodukte entstanden sind und es dem Chromatogramm ohne DTT gleicht.

Zur Frage, welche Thiole und Nucleophile präferiert mit Chinonmethiden reagieren, gibt es je nach Publikation andere Ergebnisse. Rokita zeigte, dass die Gegenwart von 2-Mercaptoethanol keinen Einfluss auf die Alkylierungsausbeute von DNA hatte, wenn Selbstaddukt und Ziel-DNA zusammen inkubiert wurden.<sup>[132]</sup> Währenddessen zeigten Modica *et al.*, dass thermisch (in H<sub>2</sub>O pH 7,0, 80 °C) generierte Chinonmethide mit GSH und 2-Mercaptoethanol in hohen Ausbeuten reagieren.<sup>[33]</sup> Eine weitere Erklärung könnte sein, dass bei Glutathion nicht das Thiol angegriffen wird, sondern das Amin, wobei dieses bei pH 7,0 jedoch protoniert vorliegen sollte, laut Modica sind RSH und RNH<sub>2</sub> etwa gleich nucleophil gegenüber *o*-Chinonmethiden.

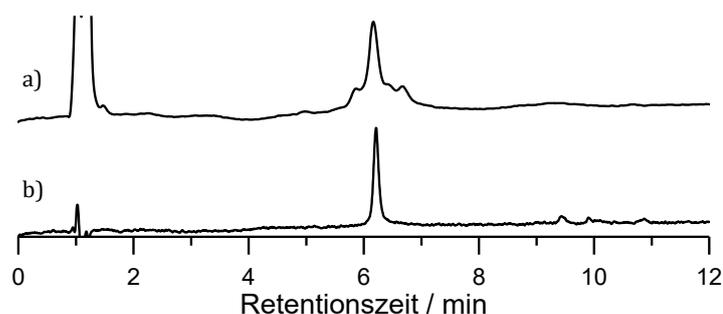
Zur Verifizierung wurden die Produkte der Inkubation mit DTT isoliert und mittels MALDI-MS analysiert (Abbildung 122). Auch im MALDI-MS-Spektrum wurden lediglich das Selbstaddukt (3214,63 m/z) und das Wasseraddukt (3233,69 m/z) detektiert, während das DTT-Addukt (3365,45 g/mol) nicht gefunden wurde. Es wäre möglich, dass das DTT-Addukt eine gänzlich andere Retentionszeit hat und deswegen bspw. im Injektionspeak eluiert. Dagegen spricht jedoch, dass sich die Polarität mit und ohne DTT nicht gravierend unterscheiden sollte und zum anderen ist im Chromatogramm das Selbstaddukt deutlich zu sehen, sodass es unwahrscheinlich ist, dass ein großer Anteil an DTT-Addukt entsteht.



**Abbildung 122:** MALDI-Massenspektrum der Produkte nach Bestrahlung und Inkubation von **PNA1-32** mit 10 mM DTT (20  $\mu$ M **PNA1-32**, 10 mM DTT, 130 mM NaCl, 130 mM MES-Puffer (pH 7.0)).

### 2.2.7. Stabilität in Zelllysate

Die Experimente in Kapitel 2.2.5 zeigten, dass die Disulfid-Derivate erfolgreich mit GSH aktiviert werden konnten und in Abhängigkeit der GSH-Konzentration unterschiedliche Geschwindigkeiten und Ausbeuten bei der RNA-Alkylierung erreichen. Diese Experimente erfolgten in einem isolierten System, bestehend ausschließlich aus Puffer, RNA, Konjugat und GSH. Daher war es nun von Interesse, wie sich die Derivate in einer Umgebung verhalten, die einer Zelle ähnlicher ist. Denn neben GSH sind hier noch eine Vielzahl von Proteinen und anderer Moleküle vorhanden, die mit dem Chinonmethid reagieren könnten. Hierfür wurde das Benzylderivat **PNA1-54** mit Zelllysate aus „HeLa S3“-Zellen und Puffer inkubiert, da es die geringste Halbwertszeit besitzt und auch bei hoher GSH-Konzentration die höchste Ausbeute lieferte. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand mittels RP-HPLC analysiert. Das geschützte Konjugat wurde nicht mehr detektiert und es sind mehrere Produkte entstanden, deren Retentionszeit im Bereich (6–7 min) liegen, in dem auch vorher die Selbstkonjugate zu beobachten waren. Zudem hat sich ein Hauptsignal mit einer Retentionszeit von 6.2 min gebildet (Abbildung 123 a).



**Abbildung 123:** HPLC-Chromatogramm von a) Konjugat **PNA1-54** nach einstündiger Inkubation in Zelllysate (mit 130 mM MES-Puffer (pH 7.0), 37 °C) und b) Wasseraddukt als Referenz.

## 2. Eigene Arbeiten

Zur Analyse wurden die entstandenen Produkte isoliert und mittels MALDI-MS analysiert. Das Hauptsignal mit 3229.04 m/z entspricht dem Wasseraddukt, gefolgt vom Selbstaddukt 3210.03 m/z (Abbildung 124).

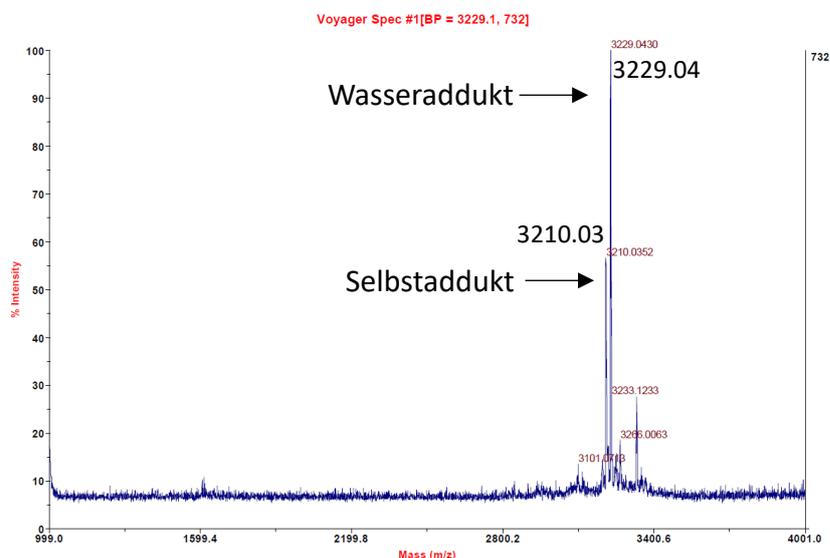


Abbildung 124: MALDI-Massenspektrum der Reaktionsprodukte von **PNA1-54** nach Inkubation in Zelllysate.

Das Wasseraddukt wurde jedoch vorher nie beobachtet, weshalb es zum Vergleich synthetisiert wurde. Hierfür wurde der Ester des photolabil geschützten Derivats **PNA1-32** zunächst hydrolysiert und anschließend bestrahlt (Abbildung 125). Das erhaltene Produkt hat die gleiche Retentionszeit (Abbildung 123 b).

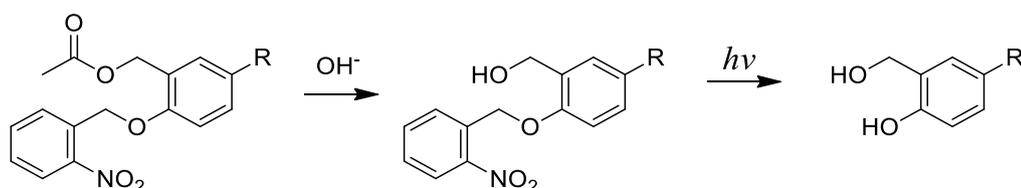


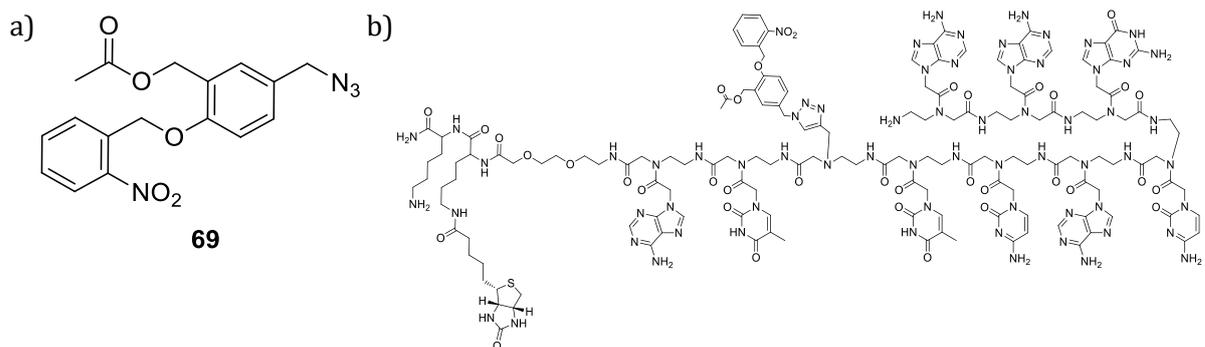
Abbildung 125: Bildung des Salicylalkohols durch Esterhydrolyse und anschließender Bestrahlung.

Da die Nucleobasen viel bessere Nucleophile als Wasser sind, ist davon auszugehen, dass es nicht durch die Reaktion des Chinonmethids mit Wasser entstanden ist, sondern vielmehr durch Spaltung des Esters und anschließenden Zerfall des Disulfids. Die Esterspaltung könnte hier enzymatisch, durch eine Esterase, erfolgt sein, was problematisch für den Einsatz der GSH aktivierbaren Derivate wäre. Vor allem bei den langsamer zerfallenden Isopropyl- und *tert*-Butylderivaten ist davon auszugehen, dass der Ester durch Esterasen angegriffen wird, bevor die Derivate in Zellen internalisiert werden und dort durch hohe GSH-Konzentration aktiviert werden.

### 2.3. Pulldown-Experimente

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die PNA-Chinonmethid-Konjugate bei optimalen Sequenzen und Umgebungsbedingungen sehr gute Alkylierungsausbeuten mit RNA liefern können. Eine weitverbreitete Technik, um die Interaktion von Biomolekülen zu untersuchen sind *Pulldown-Assays*. Hierfür wird das Biomolekül mit einem geeigneten Biotin-markierten Erkennungsmolekül gepaart. Dieses kann durch Alkylierung mit dem Biomolekül irreversibel verbunden werden und anschließend mithilfe von Streptavidin isoliert werden. Streptavidin bindet das Biotin und ist immobilisiert auf „Magnetic Beads“ erhältlich. Chinonmethid-Konjugate würde sich gut für diese Technik eignen, da schon nach wenigen Stunden die Alkylierungsausbeute hoch genug sein sollte, um damit RNA isolieren zu können.

Für den *Pulldown* wurde somit eine Biotin-modifizierte PNA benötigt. Um eine mögliche Wechselwirkung zwischen Biotin und dem Chinonmethid zu unterbinden, wurde das Biotin am C-Terminus, nach dem Lysin angebracht. Da das Biotin zur Isolation an Streptavidin, einem sterisch anspruchsvollen Peptid, binden soll, wurde ein AEEA-Linker (PEG2) zwischen dem Biotin-Teil und der ersten Nukleobase eingefügt, um Repulsion zu vermeiden (Abbildung 126). Das fertige Konjugat basiert auf der Sequenz von **PNA5**, die das interne Alkin enthält. Idealerweise sollte es mit diesem Konjugat später möglich sein, miRNA-20a in einem RISC zu alkylieren und somit das gebundene AGO-Protein zu isolieren. Daher wurde auch die Kohlenstoffkette zwischen Azid und dem Benzol weiter zu Verbindung **69** verkürzt, um mögliche sterische Hinderung mit dem RISC zu vermeiden.

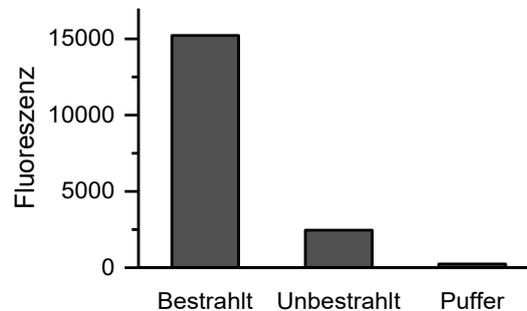


**Abbildung 126:** Neues Azid **69** (siehe experimenteller Teil) & Konjugat **PNA6-69** mit Biotin.

Um die Effektivität des *Pulldowns* zu bestimmen, wurde er zunächst modelhaft mit **RNA3** durchgeführt. Hier wurde so vorgegangen, dass **PNA6-69** (2  $\mu$ M) zusammen mit **RNA3** (1  $\mu$ M) in SSPE Puffer (80 mM, pH 8.0) bestrahlt wurde und für 72 h bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurden „Magnetic Beads“ zur Lösung gegeben und für 3 h geschüttelt. Die *Beads* wurden dann mit frischem SSPE-Puffer gewaschen. Um die Konjugate freizusetzen wurden die *Beads* mit SSPE-Puffer und NaOH versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Zum Vergleich wurde auf dieselbe Weise auch eine Probe vorbereitet, die nicht bestrahlt wurde. Die Fluoreszenz des

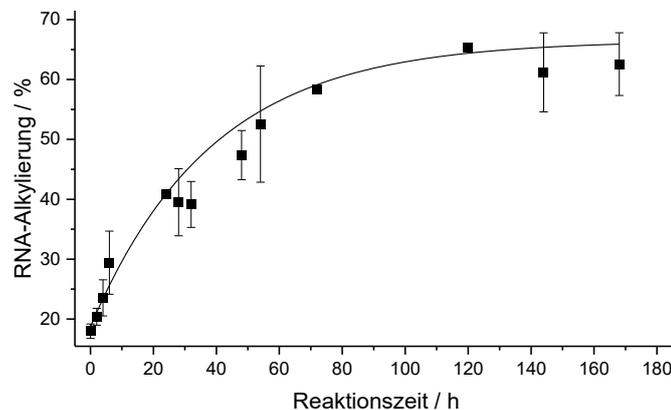
## 2. Eigene Arbeiten

Überstands wurde mithilfe eines Tecan Safire II Platten-Readers gemessen. Nachdem die reine Pufferlösung als Hintergrundsignal subtrahiert wurde, konnte in der bestrahlten Probe die 6.8-fache Menge an Fluoreszenz gemessen werden (Abbildung 127). Dies zeigt, dass die Alkylierung dazu beiträgt, dass die Bindung zwischen RNA und PNA während der Waschschrte nicht verloren geht.



**Abbildung 127:** Fluoreszenz der Proben nach Freisetzung der Konjugate durch NaOH.

Das neue Biotin-Konjugat wurde ebenfalls ohne Beads inkubiert, um überprüfen, ob die geänderte Konjugat-Struktur einen Einfluss auf die Alkylierung hat. Hierfür wurde **PNA6-69** zusammen mit **RNA3** unter den vorher verwendeten Bedingungen bestrahlt, inkubiert und der Verlauf der Reaktion durch Geltrennung der entnommenen Proben verfolgt. Die Reaktion verläuft langsamer ( $t_{1/2} = 26$  h, Geltemperatur  $57$  °C) und erzeugt auch weniger Ausbeute (65 % statt 75 %), aber dennoch sollte dies für einen *Pulldown* ausreichen.



**Abbildung 128:** Kinetik der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA6-69** mit Kurvenanpassung mit einer Reaktion 1. Ordnung. (Gelelektrophorese bei  $57$  °C,  $12$   $\mu$ M Konjugat,  $3$   $\mu$ M RNA,  $130$  mM NaCl und  $130$   $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))

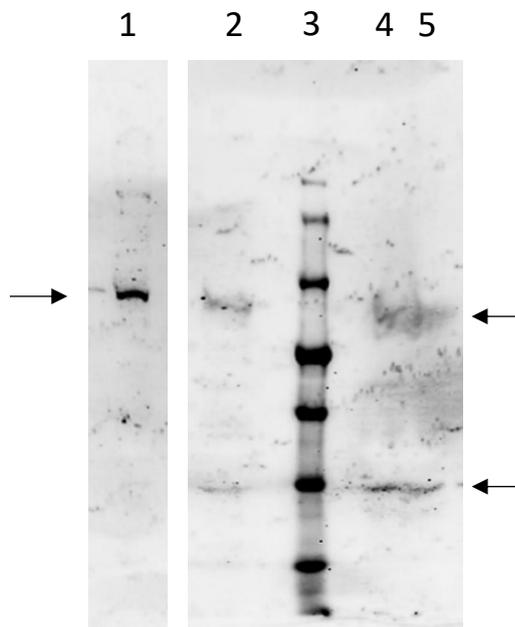
### 2.3.1. Pulldown mit Zelllysate

Die Vorversuche haben gezeigt, dass die Konjugate in „HeLa S3“-Zelllysate Wasseraddukte bilden können und verschiedene Nukleophile mit dem Chinonmethid zu Nebenreaktionen führen.

## 2. Eigene Arbeiten

---

Dennoch wurde überprüft, ob es möglichst ist, mit dem Konjugat **PNA6-69** die miRNA-20a aus Zelllysate und somit auch das AGO-Protein in einem *Pulldown*-Experiment zu isolieren. Hierfür wurden die Beads zunächst durch 72 h Inkubation in SSPE-Puffer mit **PNA6-69** beladen. Anschließend wurden die Beads gewaschen und in Zelllysate suspendiert. Die Suspension wurde bestrahlt und eine Probe für 4 Stunden, sowie eine weitere für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden das Zelllysate entfernt und die Beads mehrfach gewaschen. Nach Inkubation mit Laemmli-Puffer und 10 min Erhitzen auf 95 °C wurden die Proben mittels SDS-PAGE getrennt und mithilfe eines Westernblots analysiert, bei dem gegen hAGO2 gerichtete Antikörper verwendet wurden (Abbildung 129).



**Abbildung 129:** Westernblot der Inkubation von **PNA6-69** mit Zelllysate. Spur 1: Referenz AGO-Protein (isoliert durch Pulldown mit 7mer LNA<sup>[211]</sup>), Spur 2: Zelllysate, Spur 3: Marker, Spur 4: 24 h inkubiert, Spur 5: 4 h inkubiert. (Primärer Antikörper: AGO2 Antikörper, Rabbit PAb, IgG; Sekundärer Antikörper: Goat anti-Rabbit IgG (H+L), DyLight 633)

Leider ist an der erwarteten Position des Argonautenproteins nur eine unscharfe Bande erkennbar. Eine Ursache könnte die Reinigung der *Beads* gewesen sein: Aus dem Zelllysate sind mit der Zeit Proteine ausgefallen, die sich an die *Beads* angeheftet haben. Es war nicht möglich diese Feststoffe vollständig zu entfernen, denn bei jedem Waschschrift ist auch ein Teil der *Beads* verloren gegangen. Ausgefallene Proteine sollten eigentlich bei der anschließenden Geltrennung in der Geltasche zurückgehalten werden und daher zu keiner unscharfen Bande führen. Im unteren Bereich sieht man eine zusätzliche Bande, die nicht vom Argonautenprotein stammt und daher auch nicht in der Positivkontrolle (Spur 1) vorhanden ist. In Spur 2 welche das gesamte Zelllysate enthält, ist diese Bande jedoch auch vorhanden. Somit ist es am wahrscheinlichsten, dass die detektierten Banden durch Zelllysate-Rückstände auf den *Beads* kommen, die nicht vollständig durch Waschen entfernt wurden. Hätte der *Pulldown* funktioniert, hätte die Bande des

## 2. Eigene Arbeiten

Argonautenproteins angereichert sein müssen, stattdessen ist das Intensitätsverhältnis vergleichbar mit dem des gesamten Zelllysats.

### 2.3.2. Alternativen zum Essigsäureester

Wie bereits zuvor beschrieben ist ein Problem der hergestellten Derivate wahrscheinlich die Stabilität des Esters im Zelllysats. Um die Stabilität zu erhöhen, muss dieser durch eine Abgangsgruppe ersetzt werden, die nicht von Proteinen angegriffen wird und somit erst nach Entschützung des Phenols, bei der Bildung des Chinonmethids abgespalten wird. Es ist bekannt, dass sich aus Aminomethylphenol-Derivaten durch Licht- oder Wärmeeinwirkung auch Chinonmethide bilden können<sup>[33]</sup>, daher wurde dies als erster Ansatz für verbesserte Chinonmethide gewählt. Außerdem wurden mit Benzoyl- und Pivaloyl-ester veränderte Ester-Derivate synthetisiert, die gegenüber Esterasen eine höhere Stabilität haben sollten.

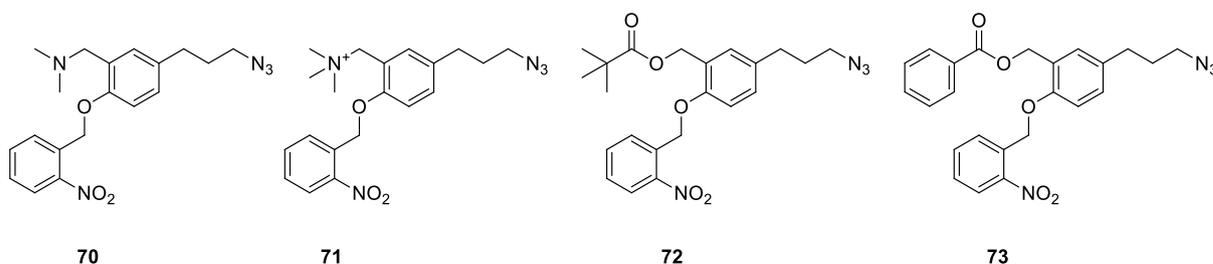


Abbildung 130: Alternative Chinonmethid-Präkursoren, die keinen Essigsäureester enthalten.

Die Synthesen ging dabei von Verbindung **49** aus, aus der sich alle Derivate in wenigen Schritten herstellen ließen.

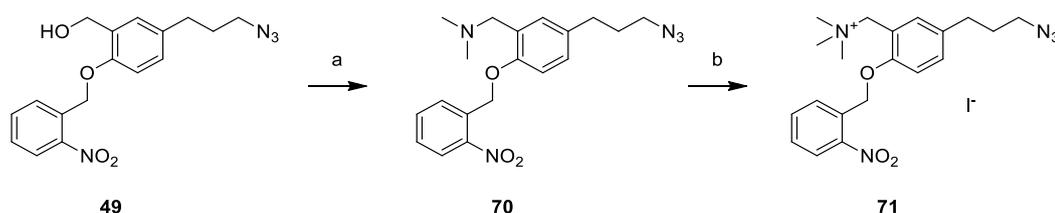
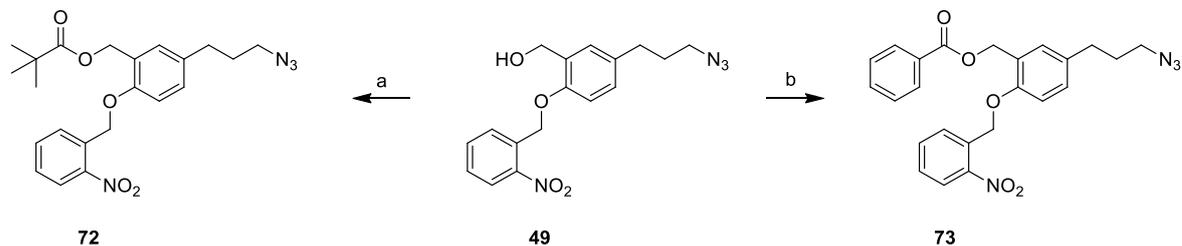


Abbildung 131: Synthese des quartären Ammoniums Salzes **71**. a) MsCl, DIPEA, Me<sub>2</sub>NH in EtOH, DCM, RT, 16 h, 61 %. b) MeI, DCM, RT, 16 h, 67 %.

Durch Umsetzung von Verbindung **49** mit Methansulfonylchlorid und Diisopropylethylamin wurde zunächst das Mesylat gebildet, das anschließend ohne Aufarbeitung mit einer ethanolischen Dimethylamin-Lösung umgesetzt wurde, um das entsprechende Aminomethyl-Derivat zu erhalten (61 % Ausbeute). Die Umsetzung zum quartären Amin **71** erfolgte durch Methylierung mit Methyljodid in DCM (64 % Ausbeute). Trotz des ionischen Charakters war eine Reinigung mittels Säulenchromatographie problemlos möglich. Die Ester **72** und **73** konnten

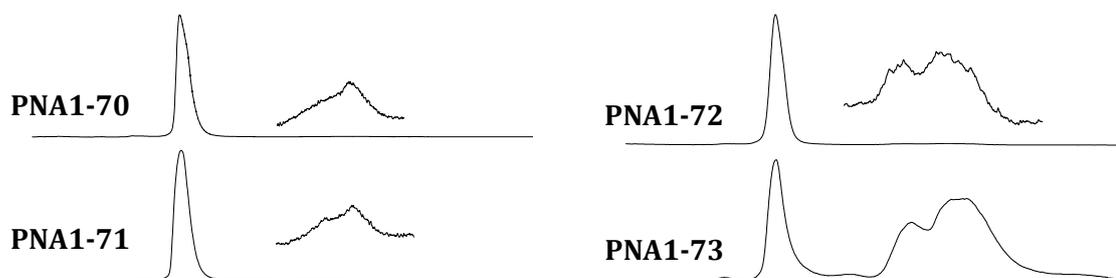
## 2. Eigene Arbeiten

durch Zugabe des entsprechenden Säurechlorids zu einer Lösung von Verbindung **49** in Pyridin erhalten werden (Pivalylester **72**: 98 % Ausbeute, Benzoylester **73**: 90 % Ausbeute).



**Abbildung 132:** Synthese der alternativen Esterderivate **72** und **73**. a) PivCl, Pyridin, RT, 16 h, 98 %. b) BzCl, Pyridin, RT, 16 h, 90 %.

Von den neuen geschützten Chinonmethiden wurden Konjugate mit **PNA1** hergestellt und ihre Fähigkeit, **RNA1** zu alkylieren überprüft. Das Pivaloyl-Derivat erreicht nach 48 Stunden nur 4 % Ausbeute, während der Benzoylester mit 72 % vergleichbar mit dem Acetylester ist. Bei den Aminoderivaten wurden nur Ausbeuten von 1 % erreicht.

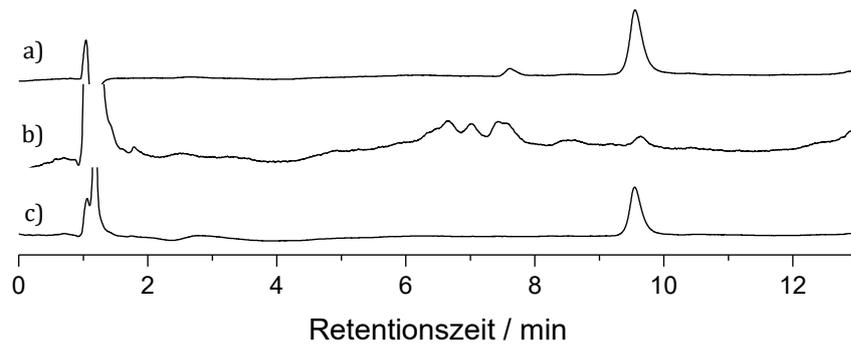


**Abbildung 133: Elektropherogramme der Alkylierung von RNA1 (3  $\mu$ M) durch PNA1-72 (12  $\mu$ M), PNA1-73 (12  $\mu$ M), PNA1-70 (6  $\mu$ M), PNA1-71 (6  $\mu$ M), 48 Stunden nach Bestrahlung. (Gelelektrophorese bei 25 °C, 130 mM NaCl und 130  $\mu$ M MES-Puffer (pH 7.0))**

Die Konjugate **PNA1-72** und **PNA1-73** wurden daraufhin mit Zelllysatz inkubiert, um ihre Stabilität zu überprüfen. Nach 2 h Inkubation in Zelllysatz bei 37 °C ohne Bestrahlung wurde von **PNA1-72** nur noch ein geringer Anteil im HPLC-Chromatogramm detektiert, stattdessen sind mehrere neue Produktsignale (6–8 min) entstanden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei **PNA1-73** nach 1 Stunde Inkubation keine Reaktion (Abbildung 134).

## 2. Eigene Arbeiten

---



**Abbildung 134:** HPLC-Chromatogramm a) **PNA1-72** in H<sub>2</sub>O b) **PNA1-72** nach 2 h Inkubation in Zelllysatsat 37 °C c) **PNA1-73** nach 1 h Inkubation in Zelllysatsat 37 °C (130 mM MES Puffer (pH 7.0))

Da Konjugat **PNA1-73** mit Benzoylester im Zelllysatsat stabil war und als einziges Derivat eine gute Alkylierungsausbeute lieferte, wäre es ein guter Kandidat für zukünftige *Pulldown*-Experiment.

## 3. Zusammenfassung & Ausblick

### 3.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Chinonmethid-Präkursoren synthetisiert, die photoinduziert oder mit Reduktionsmitteln wie Glutathion aktiviert werden können und als Konjugat mit Peptidnukleinsäuren gezielt RNAs alkylieren. Die Stabilität der Konjugate und die Kinetik der Alkylierung wurde mittels RP-HPLC und dPAGE untersucht. Dies geschah um eine Basis für die Verbesserung von anti-miRs und den Angriff auf miRNA in Argonautenproteinen zu schaffen.

Zunächst wurde das Verhalten des photolabilen Konjugats **PNA1-32** nach Bestrahlung ohne RNA untersucht. Die Synthese erfolgte durch CuAAC aus dem nach neuer Route hergestellten *o*-Nitrobenzyl-geschützten Chinonmethid-Präkursor **32** und **PNA1**. Mittels RP-HPLC und MALDI-MS konnte gezeigt werden, dass das Chinonmethid nach der Bestrahlung ohne die komplementäre **RNA1** mit den Nukleobasen der PNA reagiert und somit ein Selbstaddukt bildet. Die Kinetik folgte dabei einer Reaktion 1. Ordnung, für die eine Halbwertszeit von 0.43 Stunden bestimmt wurde.

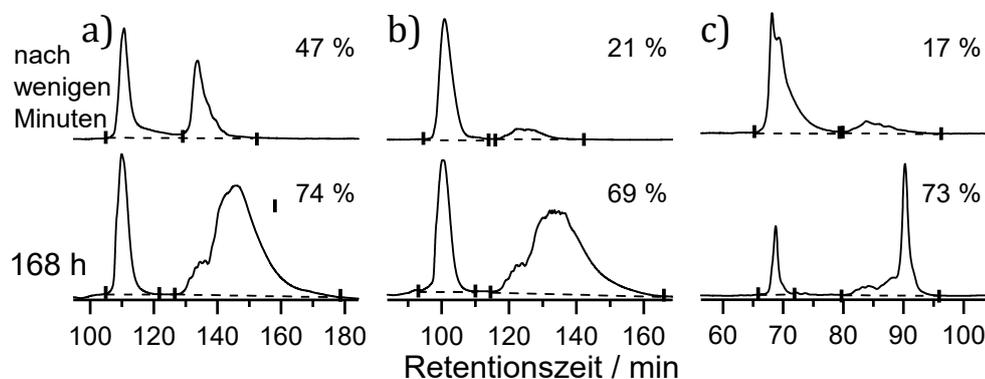
Eine Voraussetzung für die Vermeidung von *off-target* Effekten ist die sequenzspezifische RNA-Alkylierung, die durch den PNA-Teil der Konjugate erreicht werden soll. Anhand einer **PNA2** mit permutierter Bindungssequenz wurde die Sequenzspezifität bewiesen, da sich nach Bestrahlung und Inkubation von Konjugat **PNA2-32** mit der Cy5-markierten **RNA1** mittels dPAGE keine signifikante RNA-Alkylierung beobachten ließ. Außerdem hatte die Bindungssequenz keinen Einfluss auf die Alkylierung, da bei Alkylierung von **RNA2** durch **PNA2-32** vergleichbare Kinetiken und Ausbeuten wie bei **RNA1** und **PNA1-32** erreicht wurden.

Während die Selbstalkylierung des Konjugats **PNA1-32** einer Reaktion 1. Ordnung folgte, traf diese bei der Analyse der Alkylierung von **RNA1** mittels dPAGE nicht zu. Der Grund ist die komplexe Mischung an Alkylierungsprodukten, die nun mit RNA und PNA entstehen können. Hinzu kommt die Nukleobasen-abhängige Reversibilität der Alkylierung.

Es hat sich gezeigt, dass die Temperatur während der Gelelektrophorese einen entscheidenden Einfluss auf die detektierten Alkylierungsprodukte hatte. Bei einer Geltemperatur von 57 °C werden die anfänglich entstehenden reversiblen Addukte gebrochen und nicht als Produkt detektiert, wodurch eine scheinbar langsamere Kinetik gemessen wird als bei einer Geltemperatur von 25 °C. Durch Erhitzen der Proben für 2 h auf 60 °C in Ladepuffer mit anschließender Gelelektrophorese bei 25 °C wurde gezeigt, dass die hohe Temperatur zum Bindungsbruch der reversiblen Addukte führt und somit die gleiche Kinetik wie bei einer Gel-Temperatur von 57 °C gemessen wird. Ebenso wurde ausgeschlossen, dass die detektierten

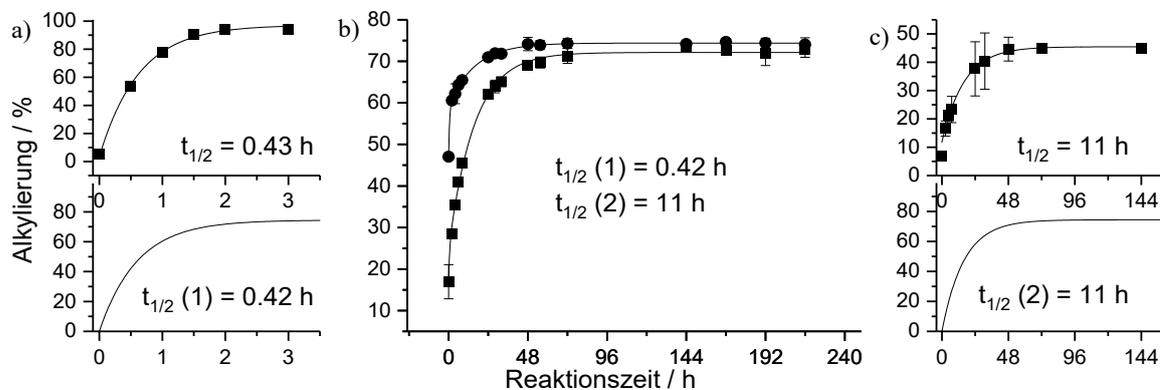
### 3. Zusammenfassung & Ausblick

Signale allein durch Hybridisierung entstehen, da es ohne Bestrahlung zu keiner Bildung von Produktsignalen im Elektropherogramm kam. Auf die maximale Ausbeute hatte die Geltemperatur keinen Einfluss (Abbildung 135).



**Abbildung 135:** Elektropherogramme der Alkylierung von **RNA1** durch **PNA1-32**: a) direkte Analyse bei einer Geltemperatur von 25 °C, b) nach Erhitzen der Proben für 2 h im Ladepuffer auf 60 °C und Analyse bei einer Geltemperatur von 25 °C c) direkte Analyse bei einer Geltemperatur von 57 °C mit berechneten Ausbeuten in Prozent. (Integrationsgrenzen sind durch Striche markiert.)

Die Kinetik lässt sich durch zwei parallel ablaufende Reaktionen 1. Ordnung beschreiben: Zum einen die direkte reversible Reaktion des Chinonmethids mit der RNA und zum anderen die Reaktion eines reversiblen Addukts zu einem irreversiblen Addukt mit der RNA. Bei einer Elektrophorese-Temperatur von 25 °C wurden für diese Kinetiken Halbwertszeiten von 0.42 Stunden, ähnlich der Halbwertszeit der Bildung des Selbstaddukt und 11 Stunden erhalten. Bei 57 °C ergab die Kurvenanpassung ebenfalls eine Halbwertszeit von 11 Stunde, wenn für die schnelle Kinetik  $t_{1/2} = 0.42$  Stunden als konstant vorgegeben wird. Die Gesamt-Kinetiken bei 25 °C und 57 °C unterscheiden sich durch den Beitrag der langsamen und schnellen Kinetik, sodass in der Summe ein schneller oder langsamer Anstieg der Ausbeute gemessen wird (Abbildung 136).



**Abbildung 136:** a) Vergleich der Kinetik der Selbstalkylierung (**PNA1-32**) mit der schnellen Kinetik der RNA-Alkylierung ( $t_{1/2}$  (1)). b) Kinetiken der RNA-Alkylierung bei einer Gelelektrophorese-Temperatur von 25 °C (Kreise) und 57 °C (Quadrate). c) Vergleich der Kinetik der Zugabe der **RNA1** erst nach Bestrahlung von **PNA1-32** mit der langsamen Kinetik der RNA-Alkylierung ( $t_{1/2}$  (2)).

### 3. Zusammenfassung & Ausblick

---

In einem weiteren Experiment wurde zunächst nur Konjugat **PNA1-32** bestrahlt und die komplementäre **RNA1** erst nach 5 Minuten hinzugegeben. Die Kinetik entsprach einer Reaktion 1. Ordnung, bei der eine Halbwertszeit von 11 Stunden erhalten wurde, aber nur eine Ausbeute von 45 % erzielt wurde. Ohne RNA können sich zunächst nur Selbstaddukte bilden, die Alkylierung der **RNA1** muss daher anschließend durch Reaktion mit reversiblen Selbstaddukten geschehen. Die identischen Halbwertszeiten zeigen, dass wenn schon **RNA1** während der Bestrahlung gegenwärtig ist, die langsame Kinetik der Umlagerung von reversiblen Addukten entspricht.

Neben der Kinetik wurde auch versucht die Position der Alkylierung bestimmt. Hierfür wurde mittels präparativer Gelelektrophorese das Alkylierungsprodukt aus **PNA1-32** und **RNA1** isoliert, um damit anschließend *in-line probing* durchzuführen. Die Auswertung gestaltet sich jedoch schwierig, da auch nicht alkylierte **RNA1** vorhanden war, entweder da sie nicht vollständig abgetrennt wurde oder durch die Reversibilität der Alkylierung. Für die Nucleobasen 12–15 wurden keine durch Alkylierung retardierte Hydrolyseprodukte detektiert, sodass aufgrund der Hybridisierung A16, A17 und G18 die wahrscheinlichsten Positionen für die Alkylierung wären (Abbildung 137). Diese deckt sich mit den Erkenntnissen von Rokita, dass Adenosin bevorzugt angegriffen wird, da es sowohl reversible als auch irreversible Addukte bilden kann.



**Abbildung 137:** Hydrolyseprodukte, von denen retardierte Fragmente gefunden wurden (rot) oder keine nachgewiesen wurden (grün). (Rote Buchstaben zeigen die Bindungssequenz der PNA.)

Die Entstehung und Identität des Alkylierungsprodukts wurde anhand der permutierten **RNA2** und **PNA2-32** bestätigt. Mittels RP-HPLC wurde das Reaktionsprodukt isoliert, das den langsam migrierenden Produkten der Gelelektrophorese entspricht und durch MALDI-MS als Masse des Alkylierungsprodukts nachgewiesen.

Als weitere Ziel-RNA wurde miRNA-20a ausgewählt, da diese zusammen mit Argonautenproteinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs spielt. Die Bindungsstelle der PNA wurde so gewählt, dass sie die biologisch wichtige *seed*-Sequenz abdeckt. Zwei komplementäre 10mer und 15mer PNA-Konjugate lieferten lediglich Ausbeuten von 14 % und 38 %. Als Ursache wurde die ungünstige Konstellation an RNA- und PNA-Basen in Reichweite des Chinonmethids gesehen. Beim 10mer endet die Sequenz mit zwei Adeninen, was wahrscheinlich überwiegend zur Selbstalkylierung führt und beim 15mer ist die letzte Nucleobase ebenfalls ein Adenin. In der RNA hingegen findet sich nur ein Adenin kurz nach der Bindungssequenz (Tabelle 9).

### 3. Zusammenfassung & Ausblick

Tabelle 9: Zur Alkylierung von RNA3 verwendete PNA-Sequenzen. (X = Verbindung 11).

Bezeichnung	Sequenz
RNA3	5' Cy5-T10-UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG-T4 3'
PNA3	LysLys-ATTTACGAATATCA-(C <sub>6</sub> )-(Alkin)
PNA4	Lys-ATTTACGAA-(C <sub>6</sub> )-(Alkin)
PNA5	Lys-ATXTCAGAA-NH <sub>2</sub>

Zur Verbesserung wurde durch Ersetzen einer PNA-Nukleobase ein Konjugat mit internem *Linker* (Verbindung 11) zum Chinonmethid hergestellt. Damit steht das Chinonmethid den drei Adeninen der *seed*-Sequenz gegenüber und die Ausbeute konnte auf 70 % nach 48 h Inkubation bei 37 °C gesteigert werden, was mit den vorherigen Alkylierungsexperimenten vergleichbar ist. Da nur noch 9 Nukleobasen zur Hybridisierung zur Verfügung stehen, wurde eine Schmelztemperatur von 54.8 °C gemessen, für PNA1-32 war es 64.8 °C und für PNA2-32 66.1 °C.

Als Alternative zur photoinduzierten Aktivierung wurden Schutzgruppe entwickelt, die auf Disulfiden basieren und auf Reduktionsmittel reagieren. Dies soll es ermöglichen, dass das Konjugat bzw. Chinonmethid nach dem Eintritt in eine Zelle durch die hohe vorherrschende Glutathion-Konzentration aktiviert wird.

Die Synthese erfolgt ausgehend von Verbindung 38 durch Deprotonierung mit *tert*-Butanolat und Umsetzung mit Chloromethylmethylsulfid. Vorherige Versuche mit NaH als Base oder einer Pummerer Umlagerung, um das MTM-geschützte Phenol mit Ac<sub>2</sub>O und DMSO zu erhalten waren nicht erfolgreich. Da jedoch auch die Umsetzung mit Chloromethylmethylsulfid nicht immer reproduzierbar war, wurde eine weitere Syntheseroute mit 4-Chloromethylthiotoluol entwickelt. Nach der Veresterung konnten die gewünschten Disulfide durch Umsetzung mit SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Kaliumthiosylat und dem entsprechenden Thiol in einer Eintopfreaktion erhalten werden. Auf diese Art wurden ein Isopropyl-, Benzyl- und *tert*-Butyl-Derivat synthetisiert (Abbildung 138).

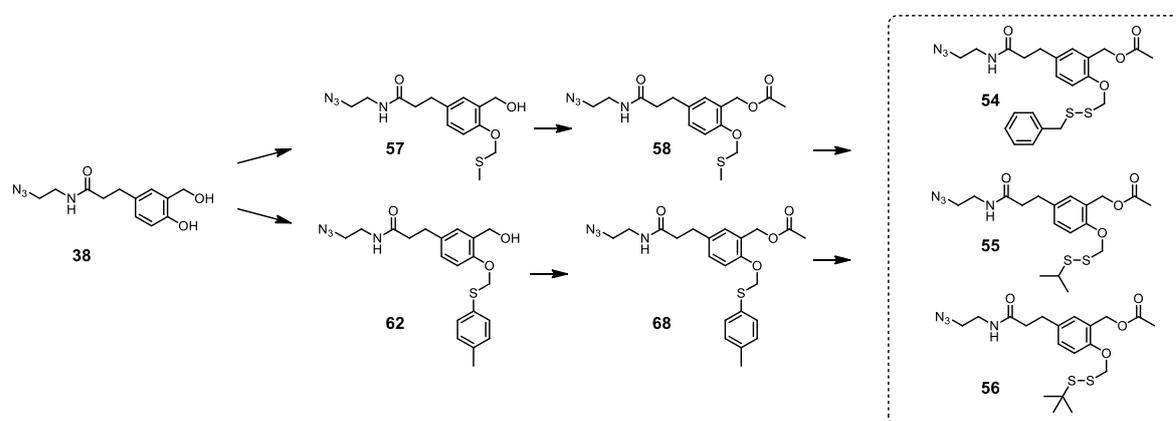


Abbildung 138: Synthese der Disulfid-Derivate durch Chloromethylmethylsulfid oder 4-Chloromethylthiotoluol.

### 3. Zusammenfassung & Ausblick

---

Zusammen mit **PNA1** wurde mittels CuAAC aus allen Disulfiden Konjugate hergestellt und zunächst die Kinetik der Entschützung bei 0.5 mM und 10 mM GSH untersucht. Entsprechend der sterischen Hinderung ist die Reaktionsgeschwindigkeit Benzyl- > Isopropyl- > *tert*-Butyl-Rest (Tabelle 10). Bei 10 mM GSH ist die Kinetik erheblich schneller, jedoch bilden sich neben dem Selbstaddukt auch GSH-Addukte.

Bei der Alkylierung der komplementären **RNA1** findet sich dieselbe Reaktivitäts-Reihenfolge wieder. Das Benzyl-Konjugat erreicht schon bei 0.5 mM GSH eine vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeit wie das photolabil geschützte Chinonmethid. Bei 10 mM GSH erreichen die Derivate zwar nach wenigen Stunden ihre maximale Ausbeute, diese beträgt jedoch nur 23 % (*tert*-Butyl-Konjugat) bis 43 % (Benzyl-Konjugat), da die Chinonmethide auch mit GSH reagieren. Dieses Nebenprodukt wurde mittels MALDI nachgewiesen.

**Tabelle 10:** Halbwertszeiten der Reaktion der Konjugate mit GSH und Reaktion der Konjugate mit **RNA1** (Alkylierung) bei 0.5 mM und 10 mM GSH basierend auf einer Kinetik 1. Ordnung und Gelelektrophorese bei 25 °C.

Konjugat	0.5 mM GSH	10 mM GSH	0.5 mM GSH & RNA1	10 mM GSH & RNA1
<b>PNA1-54</b>	0.22 h	5min	1.33 h	< 5min
<b>PNA1-55</b>	3.0 h	0.34 h	14.0 h	1.62 h
<b>PNA1-56</b>	28 h	2.1 h	20.7 h	3.09 h

Um den *Pulldown* von RNA zu ermöglichen, wurde ein Konjugat basierend auf **PNA5** hergestellt, das am *C*-Terminus zusätzlich ein Biotin trägt. Dieses konnte erfolgreich in einem Fluoreszenzpulldown eingesetzt werden. Hierfür wurde **PNA6-69** zusammen mit der komplementären **RNA3** bestrahlt und für 72 h bei 37 °C inkubiert. Eine Vergleichsprobe wurde ohne Bestrahlung inkubiert. Die Konjugate wurden mittels Streptavidin *Magnetic Beads* eingefangen und in frischer Pufferlösung mit NaOH von den *Beads* gelöst. Durch Fluoreszenzdetektion der Cy5-Markierung der RNA konnte gezeigt werden, dass die bestrahlte Probe eine deutlich höhere Fluoreszenz (6.8x) aufweist.

Des Weiteren wurde der *Pulldown* des Komplexes aus miRNA-20a und Argonautenproteinen versucht. Hierfür wurden die *Beads* erst mit **PNA6-69** beladen, dann in HeLa-Zelllysate bestrahlt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Erhitzen der *Beads* in Laemmli-Puffer auf 95 °C wurde ein Westernblot durchgeführt. Es war hier jedoch keine klare Bande des Argonautenproteins erkennbar. Die Spur glich stattdessen einer Referenz des vollständigen Zelllysates, was daran liegen könnte, dass Feststoffe aus dem Zelllysate ausgefallen waren und an den *Beads* hafteten. Diese konnten nicht abgetrennt werden, ohne dabei verhältnismäßig viele *Beads* zu verlieren.

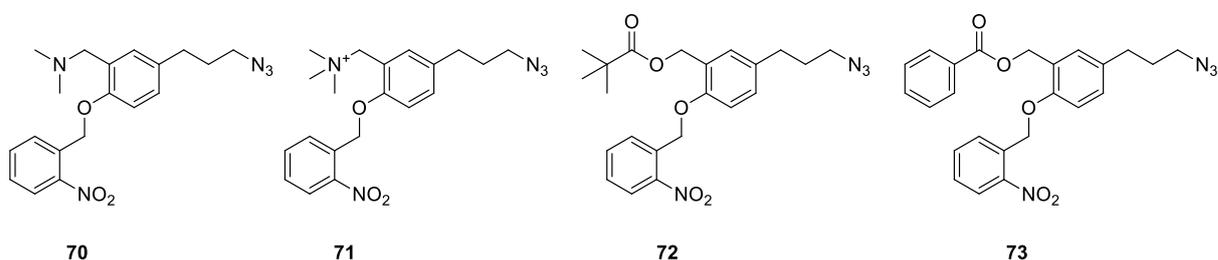
In einem weiteren Experiment wurde das reduktiv-aktivierbare Benzyl-Konjugat in Zelllysate inkubiert. Hier bildet sich ein hoher Anteil an Wasseraddukt, welches mittels MALDI-MS

### 3. Zusammenfassung & Ausblick

---

nachgewiesen wurde. Dieses wurde vorher jedoch nicht beobachtet und entstand vermutlich durch Abspaltung des Esters durch Esterasen und erst anschließendem Zerfall des Disulfids, sodass nicht die Stufe des Chinonmethids durchlaufen wird. Nach Abspaltung des Esters kann sich kein Chinonmethid mehr bilden, was auch ein Grund für das Misslingen des *Pulldowns* mit Zelllysate sein könnte.

Als Alternative zum labilen Essigsäureester wurden die Verbindungen **70–73** synthetisiert, die stattdessen eine Dimethylamino-, Trimethylammonium-, Pivaloyl- und Benzoyl-Gruppe enthalten. Esterasen können Aminogruppen nicht angreifen und sollten auch durch die sterisch anspruchsvollen Ester gehemmt werden.



In Alkylierungsexperimenten mit RNA konnte jedoch ausschließlich der Benzoyl-ester mit 72 % Ausbeute nach 48 Stunden ein dem Essigsäureester vergleichbares Ergebnis erreichen. Die anderen Konjugate erzielten < 5 %, was bei den Aminoderivaten wahrscheinlich daran liegt, dass die Abgangsgruppe nicht gut genug für die Bildung des Chinonmethids war. In Zelllysate war das Benzoyl-ester-Konjugat für mindestens 1 h stabil, während das Pivaloyl-ester-Konjugat nach 2 h fast vollständig abgebaut war.

### 3.2. Ausblick

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Konjugate nach Optimierung der Bindungssequenz reproduzierbar gute Alkylierungs-Ausbeuten erreichen können. Da dies in Zelllysate bisher noch nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte das Hauptaugenmerk auf einer Verbesserung der Chinonmethid-Präkursoren in Hinblick auf den Einsatz *in vivo* liegen. Einige Versuche zur Erhöhung der Stabilität dazu wurden bereits unternommen, jedoch führten die neuen Amino-Derivate nicht zur Alkylierung der RNA. Nur das Benzoyl-ester-Derivat war in Zelllysate stabil und konnte RNA alkylieren. Die Qualität einer Abgangsgruppe korreliert mit dem pK<sub>s</sub>-Wert ihrer konjugierten Säure, dieser ist bei Dimethylamin mit 10.77<sup>[212]</sup> und Trimethylamin mit 9.79<sup>[212]</sup> vermutlich zu hoch. Zu gute Abgangsgruppen, wie z.B. Bromid, in Form von Benzylbromid, könnten in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion reagieren, ohne Bildung des Chinonmethids und bereits, wenn die phenolische Hydroxygruppe noch geschützt vorliegt, sodass kein kontrollierter Start der Alkylierung mehr möglich ist. Acetat liegt mit pK<sub>a</sub> = 4.76<sup>[212]</sup> im idealen Bereich, als

### 3. Zusammenfassung & Ausblick

---

alternative Amine könnten sich daher auch Pyridin ( $pK_a = 5.21$ )<sup>[212]</sup> oder Anilin ( $pK_a = 4.60$ )<sup>[212]</sup> mit ähnlichen Werten eignen. Mit einem  $pK_a = 0.78$ <sup>[212]</sup> sollte Diphenylamin eine hervorragende Abgangsgruppe sein, möglicherweise würde ein darauf basierendes Derivat jedoch auch über eine unkontrollierte  $S_N2$  verlaufen und somit nicht von Nutzen sein.

Die Durchführbarkeit eines *Pull-downs* wurde im Arbeitskreis bereits von Mathias Bolz mit einer 7mer LNA und dem anschließenden Nachweis des Argonautenproteins demonstriert.<sup>[211]</sup> Um besser zu verstehen, warum dies bisher mit einem PNA-Konjugat nicht möglich war, wäre es sinnvoll, den *Pull-down* zunächst mit einem rekombinanten RISC in einem minimalen *in vitro* System durchzuführen. So kann leichter festgestellt werden, ob Proteine oder andere Bestandteile des Zellsats den *Pull-down* beeinträchtigen und das Konjugat erfolgreich an den RISC bindet.

Interessant wäre auch eine Veränderung der elektronischen Struktur des Chinonmethids. Rokita hat bereits gezeigt, dass sich durch elektronenziehende und -schiebende Substituenten am Aromaten die Reaktivität anpassen lässt.<sup>[45]</sup> In Kombination mit einer besseren Abgangsgruppe wäre ein System möglich, das schneller und irreversibler reagiert.

### 4. Experimenteller Teil

#### NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurden die Geräte AV1 250, AV2 300, AV1 400, AV3HD 500 und AV1 600 der Firma Bruker verwendet. Die chemische Verschiebung  $\delta$  der  $^1\text{H}$ -Signale wurde in ppm angegeben und auf das jeweils verwendete Lösungsmittel bezogen: DMSO- $d_6$  ( $\delta = 2.50$  ppm),  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.26$  ppm) oder  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta = 4.79$  ppm). Die Kopplungskonstanten  $J$  wurden in Hz angegeben. Die Multiplizitäten der Signale wurden mit s für Singulett, br s für breites Singulett, d für Dublett, dd für Dublett von Dublett, t für Triplet, q für Quartett und m für Multiplett bezeichnet.  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden Protonen-entkoppelt aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  der  $^{13}\text{C}$ -Signale wurde ebenfalls in ppm und relativ zum jeweiligen Lösungsmittel angegeben: DMSO- $d_6$  ( $\delta = 39.51$  ppm) oder  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77.16$  ppm). Alle Messungen erfolgten bei 300 K.

#### Schmelzpunkte

Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heiztischmikroskop nach Kofler (unkorrigiert).

#### Massenspektroskopie

Die Aufnahme von ESI-Massenspektren erfolgte mit dem Gerät ThermoFisher Surveyor MSQ. MALDI-Massenspektren wurden mit dem Gerät Perseptive Biosystems Voyager-DE STR gemessen. Für die Aufnahme von HRMS-Spektren wurde das Gerät ThermoScientific MALDI LTQ Orbitrap XL verwendet.

#### Präparative Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma Machery-Nagel verwendet.

#### Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Machery-Nagel Nr. 818333; 0.2 mm Schichtdicke). Die Laufstrecke betrug 4 bis 5 cm. Alle  $R_f$ -Werte wurden bei Kammerättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht. Als Färbereagenz diente Ninhydrinlösung (3.75 g Ninhydrin in 25 mL Aceton und 25 mL *n*-Butanol), Cer(IV)-Ammoniummolybdat-Lösung (1 g Cer(IV)-Ammoniumsulfat-Dihydrat und 1 g Ammoniummolybdat-Tetrahydrat in 10 mL Schwefelsäure und 90 mL Wasser) und eine Iodkammer zur universellen Anfärbung.

## 4. Experimenteller Teil

---

### Analytische und semipräparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die analytische und semipräparative HPLC und die Aufreinigung von PNA-Konjugaten wurden folgende Geräte verwendet:

PU-980-HPLC-Pumpe mit LG-980-02-Hochdruckgradientenmischer, DG-980-50-Entgaser, UV-970 UV/VIS-Detektor und einem MD-2010 Plus-Multiwellenlängendetektor (alle Geräte von JASCO).

### Manuelle Festphasensynthese von PNA

Die manuelle Festphasensynthese von PNAs wurde in Spritzen (2 mL) aus Polyethylen durchgeführt, die mit Scheiben aus porösem Polyethylen (Porenweite 50 µm) ausgestattet waren.

### Konzentrationsbestimmung von PNA-Konjugats-Lösungen

Die Konzentrationen von PNA-Konjugats-Lösungen wurden mithilfe eines NanoDrop 2000c Spektrophotometers der Firma Thermo Scientific, ausgestattet mit der NanoDrop 2000/2000c-Software, bestimmt.

## 4.1. Synthese der Chinonmethid-Präkursoren

### 4.1.1. 3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propansäure **39**



3-(4-Hydroxyphenyl)propansäure **33** (2.00 g; 12 mmol; 1 äq.), NaBO<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O (13.3 g; 96.5 mmol; 8 äq.) und wässrige Formaldehydlösung (37 %; 4.5 mL; 60.5 mmol; 5 äq.) wurden in Wasser (60 mL) gelöst. Der Ansatz wurde anschließend für 13 h bei 55 °C gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde mit 3 M HCl auf pH 3 angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert (8 x 30 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 1:1 + 0.5 % Essigsäure), um Verbindung **39** als farblosen Feststoff zu erhalten (2.02 g, 84 % Ausbeute).

R<sub>f</sub> = 0.27 (cHex/EtOAc 1:1 + 0.5 % Essigsäure).

Smp.: 106 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 7.08 (br. s, 1 H), 7.01 (br. d, J = 8.2 Hz, 1 H), 6.77 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 4.54 (s, 2 H), 2.76 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.56 (t, J = 7.4 Hz, 2 H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 178.0, 152.1, 132.4, 129.2, 128.9, 126.5, 115.5, 59.5, 35.5, 29.4 ppm.

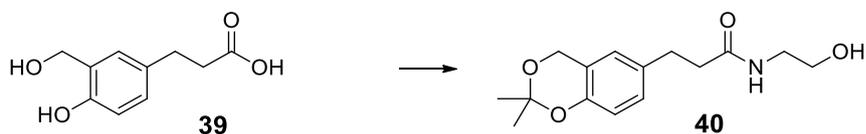
## 4. Experimenteller Teil

---

**MS (ESI):**  $m/z = 195.13$  [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 219.06285$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>+Na<sup>+</sup>: 219.06333.

### 4.1.2. 3-(2,2-Dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)-N-(2-hydroxyethyl)propanamid **40**



Zu einer Lösung von Verbindung **39** (1.00 g; 5.10 mmol; 1 äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (10 mg; 0.05 mmol; 0.01 äq.) in trockenem MeCN (27 mL) wurde 2,2-Dimethoxypropan (820  $\mu$ L; 6.69 mmol; 1.3 äq.) hinzugegeben und 45 min gerührt. Dann wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und Et<sub>3</sub>N (880  $\mu$ L; 6.35 mmol; 1.25 äq.), sowie Ethylchlorformiat (540  $\mu$ L; 5.67 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Nach weiteren 25 min wurde Wasser (10 mL) und Ethanolamine (340  $\mu$ L; 5.68 mmol; 1.1 äq.) zugegeben. Die Lösung wurde für 18 h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOH 8:2), um Acetonid **40** als farblosen Feststoff zu erhalten (0.96 g, 67 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.25 (cHex/EtOAc/EtOH 3:3:1).

**Smp.:** 87 °C.

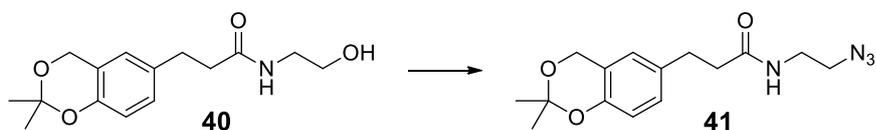
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta = 7.81$  (t,  $J = 5.5$  Hz, 1 H), 6.97 (dd,  $J = 1.9, 8.3$  Hz, 1 H), 6.87 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1 H), 6.68 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 4.76 (s, 2 H), 4.64 (br. s, 1 H), 3.36 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 3.10 (q,  $J = 6.1$  Hz, 2 H), 2.71 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 2.32 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 1.44 (s, 6 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta = 171.5, 148.9, 133.1, 127.8, 124.5, 119.2, 116.2, 99.0, 60.1, 60.0, 41.4, 37.2, 30.4, 24.5$  ppm.

**MS (ESI):**  $m/z = 278.14$  [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 280.15444$  [M + H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>+H<sup>+</sup>: 280.15488.

### 4.1.3. N-(2-Azidoethyl)-3-(2,2-dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)propanamid **41**



#### 4. Experimenteller Teil

---

Zu einer Lösung von Verbindung **40** (750 mg; 2.68 mmol; 1 äq.) in trockenem MeCN (10 mL) wurde bei 0 °C Et<sub>3</sub>N (560 µL; 4.04 mmol; 1.5 äq.) und Methansulfonylchlorid (250 µL; 3.23 mmol; 1.2 äq.) zugegeben und anschließend noch 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Natriumazid (350 mg; 5.38 mmol; 2 äq.) und TBAI (100 mg; 0.31 mmol; 0.1 äq.) hinzugegeben und für 4 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde Wasser (90 mL) hinzugefügt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (5 x 50 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 9:1 → 4:1 + 1 % Et<sub>3</sub>N), um Verbindung **41** als gelblichen Feststoff zu erhalten (705 mg, 86 % Ausbeute).

$R_f = 0.75$  (cHex/EtOAc/MeOH 3:3:1).

**Smp.:** 44 °C.

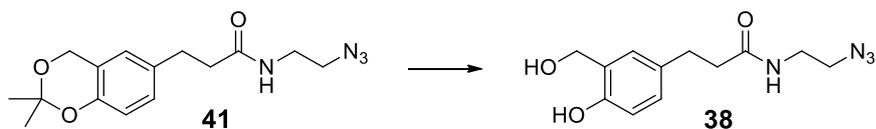
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta = 8.07$  (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 6.97 (dd,  $J = 2.3, 8.3$  Hz, 1 H), 6.87 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1 H), 6.68 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 4.76 (s, 2 H), 3.31 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2 H), 3.23 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 2.72 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 2.33 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 1.44 (s, 6 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta = 171.7, 148.9, 132.9, 127.8, 124.5, 119.2, 116.2, 99.0, 60.1, 50.0, 38.1, 37.1, 30.2, 24.5$  ppm.

**MS (ESI):**  $m/z = 303.11$  [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 327.14267$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+Na<sup>+</sup>: 327.14276.

##### 4.1.4. *N*-(2-Azidoethyl)-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamid **38**



Acetonid **41** (550 mg; 2.08 mmol; 1 äq.) wurde in einer Lösung aus THF (10 mL) und 1 M HCl (10 mL) für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub> gestoppt und mit Ethylacetat (3 x 60 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt um Verbindung **38** als gelben Feststoff zu erhalten, der ohne weitere Reinigung weiterverwendet wurde (705 mg, 84 % Ausbeute).

$R_f = 0.29$  (cHex/EtOAc/EtOH 3:3:1).

**Smp.:** 104 °C.

#### 4. Experimenteller Teil

---

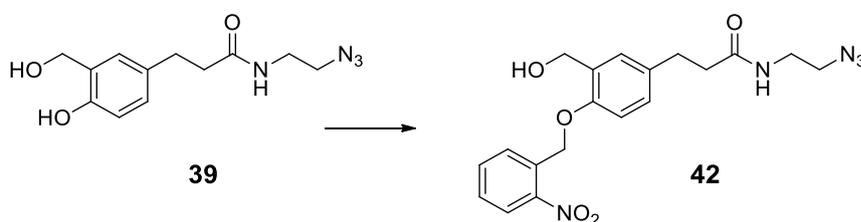
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 9.08 (s, 1 H), 8.08 (t, *J* = 5.6 Hz, 1 H), 7.11 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 6.85 (dd, *J* = 2.3, 8.1 Hz, 1 H), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 4.89 (br. s, 1 H), 4.44 (s, 2 H), 3.32 (t, *J* = 5.7 Hz, 2 H), 3.23 (q, *J* = 5.7 Hz, 2 H), 2.70 (br. t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 2.31 (brs. t, *J* = 7.9 Hz, 2 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 171.9, 152.3, 131.1, 128.2, 127.1, 126.8, 114.4, 58.3, 50.0, 38.2, 37.7, 30.6 ppm.

**MS (ESI):** *m/z* = 263.13 [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):** *m/z* = 287.11165 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+Na<sup>+</sup>: 287.11146.

##### 4.1.5. *N*-(2-Azidoethyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)propanamid **42**



Zu einer Lösung von Verbindung **39** (400 mg; 1.51 mmol; 1.0 äq.) in Aceton (10 mL) wurde TBAI (55 mg; 0.15 mmol; 0.1 äq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (417 mg; 3.02 mmol; 2.0 äq.) und 2-Nitrobenzylbromid (391 mg; 1.81 mmol; 1.2 äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 5 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 2:3 → 1:4 + 1 % EtOH). Spuren des Edukts wurden durch Lösen des Rohprodukts in Ethylacetat und Waschen mit 10 M NaOH entfernt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde Verbindung **42** als gelblicher Feststoff erhalten (492 mg, 81 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.33 (cHex/EtOAc/EtOH 3:3:1).

**Smp.:** 120 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 8.13 - 8.09 (m, 2 H), 7.82 - 7.77 (m, 2 H), 7.62 - 7.60 (m, 1 H), 7.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 7.01 (dd, *J* = 2.1, 8.3 Hz, 1 H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 5.42 (s, 2 H), 5.03 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H), 4.52 (d, *J* = 5.4 Hz, 2 H), 3.33 (t, *J* = 5.8 Hz, 2 H), 3.23 (q, *J* = 5.7 Hz, 2 H), 2.76 (br. t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 2.35 (br. t, *J* = 7.9 Hz, 2 H) ppm.

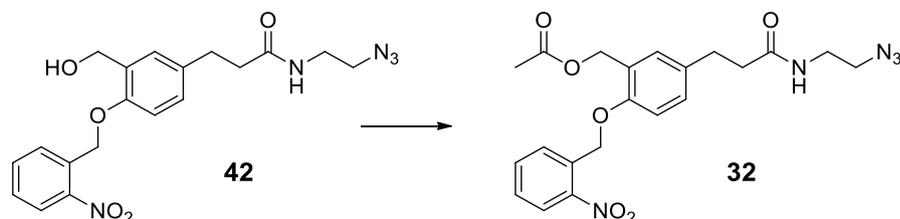
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  = 171.8, 152.8, 147.4, 134.0, 133.4, 132.8, 130.5, 129.1, 129.0, 127.1, 127.0, 124.8, 111.3, 66.3, 57.8, 50.0, 38.2, 37.4, 30.5 ppm.

## 4. Experimenteller Teil

**MS (ESI):**  $m/z = 398.18$  [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 422.14354$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>+Na<sup>+</sup>: 422.14349.

### 4.1.6. 5-(3-(2-Azidoethylamino)-3-oxopropyl)-2-(2-nitrobenzyloxy)benzylacetat **32**



Alkohol **42** (202 mg; 0.51 mmol; 1.0 äq.) wurde in Pyridin (2 mL) und Essigsäureanhydrid (2 mL) gelöst. Nach 16 h Rühren wurde Methanol (10 mL) hinzugeben, für weitere 30 min gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc/EtOH 100:4:1 → 100:32:8), um Chinonmethid-Präkursor **32** als gelben Feststoff zu erhalten (197 mg, 89 % Ausbeute).

$R_f = 0.34$  (cHex/EtOAc/EtOH 3:3:1).

**Smp.:** 87 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta = 8.13$  (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 8.08 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1 H), 7.81-7.78 (m, 2 H), 7.65-7.59 (m, 1 H), 7.17 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.14 (dd,  $J = 2.1, 8.4$  Hz, 1 H), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 5.47 (s, 2 H), 5.06 (s, 2 H), 3.32 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 3.23 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 2.76 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 2.35 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 2.04 (s, 3 H) ppm.

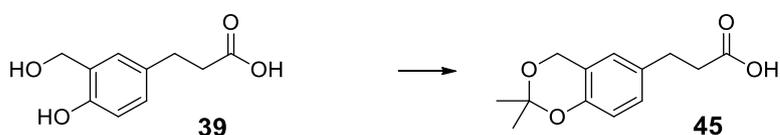
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta = 171.7, 170.2, 154.0, 147.3, 134.0, 133.7, 132.6, 129.7, 129.2, 129.1, 128.9, 124.8, 123.9, 112.1, 66.5, 61.1, 50.0, 38.1, 37.1, 30.1, 20.7$  ppm.

**MS (ESI):**  $m/z = 440.10$  [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 464.15332$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>+Na<sup>+</sup>: 464.15405.

## 4.2. Synthese eines Chinonmethid-Präkursor mit kürzerem *Linker*

### 4.2.1. 3-(2,2-Dimethyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propansäure **45**



#### 4. Experimenteller Teil

---

Zu einer Lösung von Verbindung **39** (1.20 g; 6.12 mmol; 1 äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (11 mg; 0.06 mmol; 0.01 äq.) in trockenem DMF (10 mL) wurde 2,2-Dimethoxypropan (1.41 mL; 11.4 mmol; 1.9 äq.) gegeben. Die Mischung wurde 2 h gerührt, in ges. wässrige Natriumchloridlösung (100 mL) geschüttelt und mit Ethylacetat extrahiert (4 x 60 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. wässriger Natriumchloridlösung (2 x 40 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 4:1 + 0.5 % Essigsäure), um Verbindung **45** als farblose Kristalle zu erhalten (1.15 g, 80 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.45 (cHex/EtOAc 2:1 + 0.5 % Essigsäure).

**Smp.:** 88 °C.

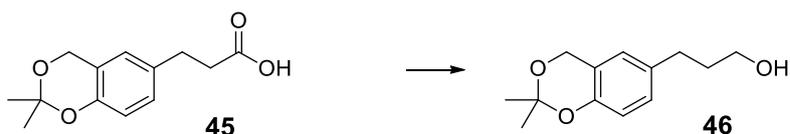
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 11.41 (br. s, 1 H), 7.00 (dd, *J* = 1.5, 8.3 Hz, 1 H), 6.80 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 6.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 4.82 (s, 2 H), 2.87 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H), 2.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 1.53 (s, 6 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 179.0, 149.8, 132.1, 128.1, 124.4, 119.5, 117.3, 99.6, 61.0, 35.9, 30.0, 24.9 ppm.

**MS (ESI):** *m/z* = 235.13 [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):** *m/z* = 275.06741 [M + K<sup>+</sup>], ber. für C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>+K<sup>+</sup>: 275.06802.

##### 4.2.2. 3-(2,2-Dimethyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propan-1-ol **46**



Verbindung **45** (1.00 g; 4.23 mmol; 1 äq.) wurde in trockenem THF (20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurde eine 1 M Lösung von LiAlH<sub>4</sub> in THF (8.6 mL; 8.6 mmol; 2 äq.) langsam hinzugegeben. Nach der Zugabe wurde die Kühlung entfernt und für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde erneut auf 0 °C gekühlt und nacheinander Wasser (0.35 mL), 15 % wässrige NaOH (0.35 mL), Wasser (1 mL) und Essigsäure (0.8 mL) hinzugegeben. Zur Lösung wurden Celite® 535 gegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das absorbierte Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 3:1 → 1:3), um Verbindung **46** als farbloses Öl zu erhalten (0.80 g, 85 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.19 (cHex/EtOAc 3:1).

#### 4. Experimenteller Teil

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 6.98 (dd,  $J$  = 1.7, 8.3 Hz, 1 H), 6.79 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1 H), 6.74 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 4.82 (s, 2 H), 3.65 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2 H), 2.62 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2 H), 1.84 (m, 6.4 Hz, 2 H), 1.53 (s, 6 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 149.4, 133.7, 128.2, 124.4, 119.3, 117.1, 99.5, 62.3, 61.1, 34.5, 31.4, 24.9 ppm.

**HRMS (MALDI):**  $m/z$  = 222.12471 [M], ber. für C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>: 222.12505.

#### 4.2.3. 6-(3-Azidopropyl)-2,2-dimethyl-4H-benzo[*d*][1,3]dioxin **47**



Zu einer Lösung von Verbindung **46** (470 mg; 2.11 mmol; 1 äq.) in trockenem DMF (15 mL) wurden bei 0 °C Et<sub>3</sub>N (440  $\mu$ L; 3.17 mmol; 1.5 äq.) und Methansulfonylchlorid (182  $\mu$ L; 2.35 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden Natriumazid (280 mg; 4.23 mmol; 2 äq.) und TBAI (80 mg; 0.21 mmol; 0.1 äq.) zugegeben und für weitere 2.5 h bei 80 °C gerührt. Dem abgekühlte Reaktionsgemisch wurde Wasser (90 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (3 x 70 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 19:1  $\rightarrow$  9:1), um Verbindung **47** als gelbliches Öl zu erhalten (457 mg, 87 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.73 (cHex/EtOAc 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 6.97 (dd,  $J$  = 1.7, 8.3 Hz, 1 H), 6.78 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1 H), 6.75 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 4.82 (s, 2 H), 3.27 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2 H), 2.62 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2 H), 1.87 (quin,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H), 1.54 (s, 6 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 149.6, 132.8, 128.2, 124.5, 119.5, 117.2, 99.6, 61.0, 50.7, 32.1, 30.7, 24.9 ppm.

**HRMS (MALDI):**  $m/z$  = 270.12126 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+Na<sup>+</sup>: 270.12130.

#### 4.2.4. 4-(3-Azidopropyl)-2-(hydroxymethyl)phenol **48**



#### 4. Experimenteller Teil

---

Acetonid **47** (300 mg; 1.21 mmol; 1 äq.) wurde in einer Lösung aus THF (10 mL) und 1 M HCl (10 mL) für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub> gestoppt und mit Ethylacetat (3 x 60 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1 → 1:1), um Verbindung **48** als gelbliche Kristalle zu erhalten (219 mg, 87 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.20 (cHex/EtOAc 3:1).

**Smp.:** 40 °C.

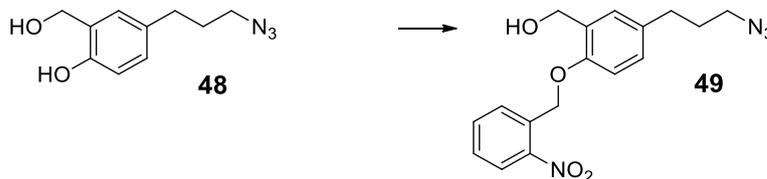
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 7.20 (s, 1 H), 7.01 (dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, 1 H), 6.85 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 4.82 (d, *J* = 3.7 Hz, 2 H), 3.26 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 2.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.48 (br. s, 1 H), 1.86 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 154.3, 132.5, 129.4, 128.0, 124.8, 116.6, 64.7, 50.7, 31.9, 30.7 ppm.

**MS (ESI):** *m/z* = 206.35 [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):** *m/z* = 230.09031 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+Na<sup>+</sup>: 230.09000.

##### 4.2.5. (5-(3-Azidopropyl)-2-(2-nitrobenzyloxy)phenyl)methanol **49**



Zu einer Lösung von Verbindung **23** (150 mg; 0.72 mmol; 1.0 äq.) in Aceton (10 mL) wurde TBAI (26 mg; 0.08 mmol; 0.1 äq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 mg; 1.45 mmol; 2.0 äq.) und 2-Nitrobenzylbromid (185 mg; 0.86 mmol; 1.2 äq.) gegeben. Die Lösung wurde anschließend für 1.5 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1 → 1:1), um Verbindung **49** als gelbe Kristalle zu erhalten (231 mg, 94 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.21 (cHex/EtOAc 3:1).

**Smp.:** 50 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 8.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.70 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.20 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.07 (dd, *J* = 2.1, 8.3 Hz, 1 H), 6.84 (d,

#### 4. Experimenteller Teil

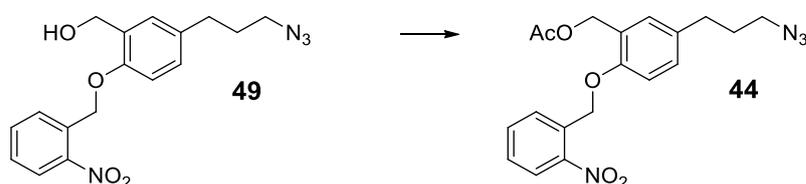
$J = 8.3$  Hz, 1 H), 5.51 (s, 2 H), 4.79 (s, 2 H), 3.28 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 2.66 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.14 (br. s, 1 H), 1.89 (quin,  $J = 7.2$  Hz, 2 H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 154.3, 147.1, 134.3, 134.0, 133.7, 129.5, 129.1, 128.9, 128.7, 128.5, 125.2, 111.9, 67.2, 61.8, 50.7, 32.0, 30.7$  ppm.

**MS (ESI):**  $m/z = 341.23$  [M - H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 365.12219$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{Na}^+$ : 365.12203.

#### 4.2.6. 5-(3-Azidopropyl)-2-(2-nitrobenzyloxy)benzylacetat **44**



Zu einer Lösung von Alkohol **49** (50 mg; 0.15 mmol; 1.0 äq.) in Essigsäureanhydrid (4 mL) wurde DMAP (5 mg; 0.04 mmol; 0.3 äq.) gegeben. Man rührte für 1 h bei Raumtemperatur stoppte die Reaktion durch Zugabe von gesättigter wässriger  $\text{NaHCO}_3$  Lösung (20 mL) und rührte für weitere 15 min. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert (4 x 40 mL). Nach Waschen der organischen Phasen mit ges. Natriumchloridlösung und Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  entfernte man das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1  $\rightarrow$  1:1), um Verbindung **44** als gelbes Öl zu erhalten (42 mg, 73 % Ausbeute).

$R_f = 0.51$  (cHex/EtOAc 3:1).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 8.18$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H), 7.90 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 7.71 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 7.50 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 7.20 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1 H), 7.12 (dd,  $J = 2.0, 8.3$  Hz, 1 H), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 5.51 (s, 2 H), 5.25 (s, 2 H), 3.29 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H), 2.67 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.11 (s, 3 H), 1.89 (quin,  $J = 7.2$  Hz, 2 H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 171.1, 154.6, 146.9, 134.3, 134.0, 133.8, 130.4, 129.7, 128.5, 128.4, 125.2, 124.7, 112.2, 67.1, 62.0, 50.7, 32.0, 30.7, 21.2$  ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 407.10$  [M + Na<sup>+</sup>].

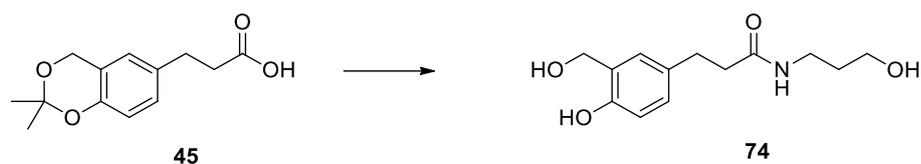
**HRMS (MALDI):**  $m/z = 407.13226$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5 + \text{Na}^+$ : 407.13259.

#### 4.3. Synthese eines Chinonmethid-Präkursors mit verlängertem *Linker*

Verbindung **43** und Vorstufen wurde zusammen mit Laura Rimmel synthetisiert.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.3.1. 3-(4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)-N-(3-hydroxypropyl)propanamid 74

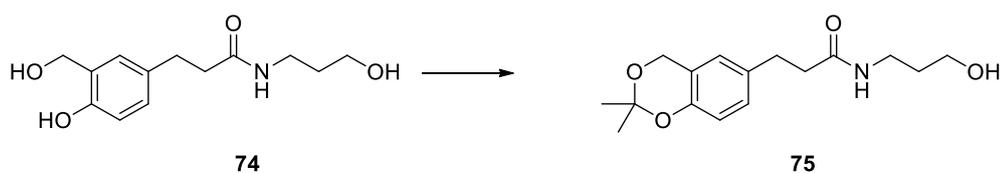


Zu einer Lösung von Verbindung **45** (1.50 g; 6.35 mmol; 1 äq.) in trockenem MeCN (40 mL) wurde bei 0 °C Et<sub>3</sub>N (1.0 mL; 7.2 mmol; 1.1 äq.), sowie Ethylchloroformiat (0.68 mL; 7.2 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Nach weiteren 60 min wurden Wasser (15 mL) und 3-Aminopropanol (0.60 mL; 7.9 mmol; 1.2 äq.) zugegeben. Man rührte die Lösung für 16 h und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 3:1 + 5 % MeOH → cHex/ EtOAc 1:1 + 10 % MeOH) um Verbindung **74** zu erhalten (1.21 g, 75 % Ausbeute).

$R_f = 0.18$  (cHex/EtOAc/MeOH 3:3:1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 9.04$  (s, 1 H), 7.74 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1 H), 7.10 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H), 6.84 (dd,  $J = 8.1, 2.2$  Hz, 1 H), 6.64 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 4.87 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 4.44 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 4.38 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1 H), 3.37 (td,  $J = 6.4, 5.2$  Hz, 2 H), 3.07 (td,  $J = 6.9, 5.7$  Hz, 2 H), 2.68 (dd,  $J = 9.0, 6.6$  Hz, 2 H), 2.28 (dd,  $J = 9.1, 6.6$  Hz, 2 H), 1.51 (quin,  $J = 6.7$  Hz, 2 H) ppm.

### 4.3.2. 3-(2,2-Dimethyl-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-yl)-N-(3-hydroxypropyl)propanamid 75



Zu einer Lösung von Verbindung **74** (1.08 g; 4.3 mmol; 1 äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (10 mg; 0.05 mmol; 0.012 äq.) in trockenem DMF (30 mL) wurde 2,2-Dimethoxypropan (0.58 mL; 4.7 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Nach 3 h Rühren wurde Et<sub>3</sub>N (1 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und mit ges. NaCl-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat (2 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 3:1 + 5 % MeOH → cHex/EtOAc 1:1 + 10 % MeOH) um Verbindung **75** als gelbes Öl zu erhalten (0.88 g, 70 % Ausbeute).

## 4. Experimenteller Teil

---

$R_f = 0.74$  (cHex/EtOAc /MeOH 3:3:2).

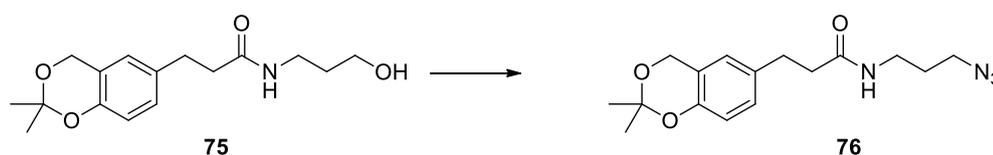
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 7.76$  (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 6.97 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1 H), 6.86 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1 H), 6.67 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 4.76 (s, 2 H), 4.39 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1 H), 3.35 (td,  $J = 6.3, 5.3$  Hz, 2 H), 3.07 (td,  $J = 7.0, 5.4$  Hz, 2 H), 2.71 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 2.30 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 1.49 (quin,  $J = 6.7$  Hz, 2 H), 1.44 (s, 6 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 171.3, 148.9, 133.0, 127.8, 124.5, 119.2, 116.2, 99.0, 60.1, 58.3, 37.2, 35.6, 32.5, 30.4, 24.5$  ppm

**MS (ESI $^+$ ):**  $m/z = 316.16$  [M + Na $^+$ ].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 294.16989$  [M + H $^+$ ], ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4 + \text{H}^+$ : 294.16998.

### 4.3.3. *N*-(3-Azidopropyl)-3-(2,2-dimethyl-4H-benzo[*d*][1,3]dioxin-6-yl)propanamid **76**



Zu einer Lösung von Verbindung **75** (0.74 g; 2.5 mmol; 1 äq.) in trockenem DMF (15 mL) wurden bei 0 °C  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.5 mL; 3.6 mmol; 1.4 äq.) und Methansulfonylchlorid (0.2 mL; 2.6 mmol; 1.05 äq.) hinzugegeben. Nach 20 min Rühren bei Raumtemperatur wurden Natriumazid (0.33 g; 5.1 mmol; 2 äq.) und TBAI (95 mg; 0.25 mmol; 0.1 äq.) zugegeben und für 2.5 h bei 80 °C gerührt. Dem abgekühlte Reaktionsgemisch wurde ges. NaCl-Lösung (90 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (5 x 50 mL). Die vereinten organischen Phasen wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 1:1 + 1 %  $\text{Et}_3\text{N} \rightarrow$  cHex/EtOAc 1:1 + 1 %  $\text{Et}_3\text{N}$  + 1 % MeOH), um Verbindung **76** als gelbliches Öl zu erhalten (0.69 g, 86 % Ausbeute).

$R_f = 0.68$  (cHex/EtOAc /MeOH 3:3:1).

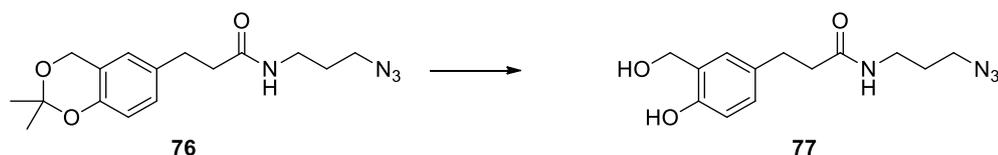
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 7.84$  (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 6.97 (dd,  $J = 8.3, 1.8$  Hz, 1 H), 6.87 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1 H), 6.68 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 4.76 (s, 2 H), 3.25 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 3.07 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2 H), 2.71 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 2.31 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 1.59 (quin,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 1.44 (s, 6 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 171.3, 148.9, 132.9, 127.8, 124.5, 119.2, 116.2, 99.0, 60.1, 48.3, 37.2, 35.7, 30.4, 28.4, 24.5$  ppm

**MS (ESI $^+$ ):**  $m/z = 341.12$  [M + Na $^+$ ].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 341.15827$  [M + Na $^+$ ], ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3 + \text{Na}^+$ : 341.15841.

### 4.3.4. *N*-(3-Azidopropyl)-3-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)propanamid **77**



Acetonid **76** (0.58 g; 1.8 mmol; 1 äq.) wurde in einer Lösung aus THF (10 mL) und 1 M HCl (10 mL) für 2 h bei RT gerührt. Das THF wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (4 x 15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen (2 x 15 mL), über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt um Verbindung **77** als gelben Feststoff zu erhalten (0.41 mg, 81 % Ausbeute).

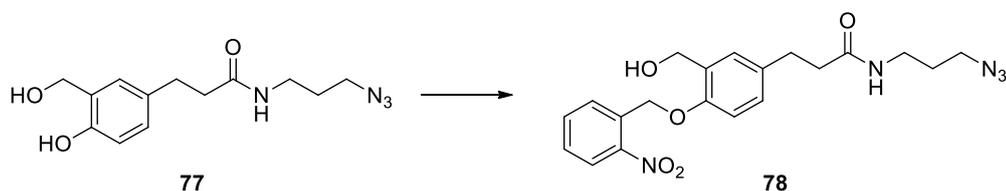
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 9.07 (s, 1 H), 7.85 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H), 7.10 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.84 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1 H), 6.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 4.89 (br. s, 1 H), 4.44 (s, 2 H), 3.28 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 3.08 (q, *J* = 6.6 Hz, 2 H), 2.69 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 2.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 1.61 (quin, *J* = 6.8 Hz, 2 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 171.5, 152.3, 131.1, 128.2, 127.1, 126.8, 114.3, 58.3, 48.3, 37.7, 35.7, 30.7, 28.4 ppm

**MS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 301.12 [M + Na<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):** *m/z* = 301.12709 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+Na<sup>+</sup>: 301.12711.

### 4.3.5. *N*-(3-Azidopropyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)propanamid **78**



Zu einer Lösung von Verbindung **77** (320 mg; 1.2 mmol; 1.0 äq.) in Aceton (15 mL) wurden TBAI (44 mg; 0.12 mmol; 0.1 äq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (330 mg; 2.4 mmol; 2.0 äq.) und 2-Nitrobenzylbromid (300 mg; 1.4 mmol; 1.2 äq.) gegeben. Die Lösung wurde anschließend für 4 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 1:1 → 1:1 + 5 % MeOH), um Verbindung **78** als braunen Feststoff zu erhalten (370 mg, 78 % Ausbeute).

#### 4. Experimenteller Teil

---

$R_f = 0.35$  (cHex/EtOAc/MeOH 3:3:1).

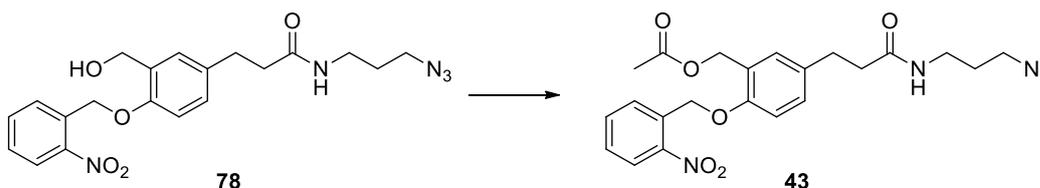
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 8.12$  (dd,  $J = 7.9, 0.8$  Hz, 1 H), 7.86 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 7.83–7.76 (m, 2 H), 7.62 (ddd,  $J = 8.3, 6.5, 2.1$  Hz, 1 H), 7.25 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1 H), 7.00 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1 H), 6.88 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 5.42 (s, 2 H), 5.02 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1 H), 4.51 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2 H), 3.26 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 3.08 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2 H), 2.75 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 2.32 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2 H), 1.60 (quin,  $J = 6.7$  Hz, 2 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 171.4, 152.7, 147.4, 134.0, 133.4, 132.7, 130.5, 129.1, 129.0, 127.1, 127.0, 124.8, 111.2, 66.3, 57.8, 48.3, 37.4, 35.7, 30.6, 28.4$  ppm

**MS (ESI $^+$ ):**  $m/z = 436.16$  [M + Na $^+$ ].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 436.15945$  [M + Na $^+$ ], ber. für C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>+Na $^+$ : 436.15914.

#### 4.3.6. 5-(3-((3-Azidopropyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat 43



Zu einer Lösung von Alkohol **78** (320 mg; 0.89 mmol; 1.0 äq.) in Ac<sub>2</sub>O (15 mL) und MeOH (2 mL) wurde DMAP (11 mg; 0.090 mmol; 0.1 äq.) gegeben. Es wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Ethylacetat (20 mL) hinzugegen und die organische Phase mit ges. Natriumchloridlösung (15 mL), ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 15 mL) und erneut Natriumchloridlösung (1 x 15 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man reinigte das Rohprodukt säulenchromatographisch, (cHex/Aceton 2:1 → 3:2) um Verbindung **43** als gelben Feststoff zu erhalten (320 mg, 91 % Ausbeute).

$R_f = 0.48$  (cHex/Aceton 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 8.14$  (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 7.86 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 7.80 (d,  $J = 4.0$  Hz, 2 H), 7.66–7.60 (m, 1 H), 7.18 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H), 7.14 (dd,  $J = 8.4, 2.2$  Hz, 1 H), 7.00 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H), 5.48 (s, 2 H), 5.06 (s, 2 H), 3.25 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 3.08 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2 H), 2.76 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.34 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 2.05 (s, 3 H), 1.59 (quin,  $J = 6.8$  Hz, 2 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta = 171.3, 170.2, 154.0, 147.4, 134.0, 133.7, 132.6, 129.7, 129.3, 129.1, 128.9, 124.9, 123.8, 112.1, 66.5, 61.1, 48.3, 37.1, 35.7, 30.2, 28.4, 20.7$  ppm

**MS (ESI $^+$ ):**  $m/z = 478.09$  [M + Na $^+$ ].

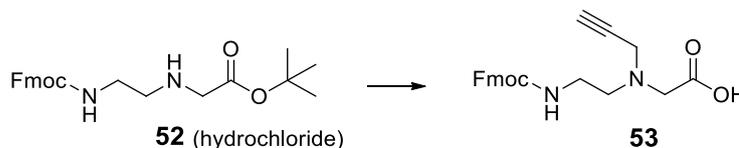
## 4. Experimenteller Teil

---

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 478.16895$  [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>+Na<sup>+</sup>: 478.16970.

### 4.4. Synthese des internen PNA-Alkin-Monomers

#### 4.4.1. 2-((2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)(prop-2-in-1-yl)amino)essigsäure **53**



Das Edukt **52** wurde nach der Vorschrift von Thomson *et al.* synthetisiert.<sup>[149]</sup>

Zu einer Lösung von Verbindung **52** (430 mg; 1 mmol; 1.0 äq.) in trockenem DCM (10 mL) wurden bei 0 °C nacheinander DIPEA (350 µL; 2 mmol; 2 äq.) und Propargylbromid (80 % in Toluol; 130 µL; 1.2 mmol; 1.2 äq.) zugetropft. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus DCM (4 mL) und TFA (4 mL) gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Erneut wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH + 0.5 % AcOH 99:1 → 90:10). Das erhaltene gelbe Öl wurde in DCM (40 mL) aufgenommen, mit Wasser (2 x 20 mL) und ges. wässriger Natriumchloridlösung (20 mL) gewaschen, über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Man erhielt Verbindung **53** als Schaum (220 mg, 54 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.42 (DCM/MeOH 9:1 + 0.5 % AcOH).

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** δ = 7.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 7.68 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 7.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 7.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 7.20 (t, *J* = 5.1 Hz, 1 H), 4.33 - 4.15 (m, 3 H), 3.48 (br. s, 2 H), 3.28 (s, 2 H), 3.17 - 3.02 (m, 3 H), 2.59 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H) ppm. Rotamere führen zur Verbreiterung der Signale.

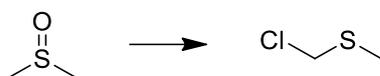
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** δ = 172.0, 156.2, 144.0, 140.8, 127.7, 127.2, 125.3, 120.2, 79.1, 76.0, 65.4, 54.2, 52.6, 46.8, 42.0, 38.5 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 379.16$  [M + H<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z = 379.16484$  [M + H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>+H<sup>+</sup>: 379.16523.

### 4.5. Synthese der reduktiv-aktivierbaren Chinonmethid-Präkursoren

#### 4.5.1. Chlormethylmethylsulfid<sup>[201]</sup>

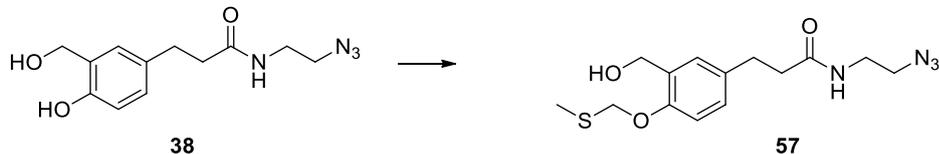


Unter Argon wurde Thionylchlorid (7.15 mL; 98.6 mmol; 1.1 äq.) in trockenem DCM (20 mL) vorgelegt und zum Sieden erhitzt. Unter Rühren wurde innerhalb von 30 min eine Lösung von trockenem DMSO (6.36 mL; 89.6 mmol; 1 äq.) in trockenem DCM (20 mL) hinzugegeben und für weitere 1.5 h unter Rückfluss zu Sieden erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend fraktioniert destilliert, um Chlormethylmethylsulfid als farblose Flüssigkeit zu erhalten (6.99 g, 80 % Ausbeute).

**Sdp.:** 104–107 °C bei Normaldruck (Lit.: 104–106 °C<sup>[201]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 4.71 (s, 2 H), 2.30 (s, 3 H) ppm.

#### 4.5.2. *N*-(2-Azidoethyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-((methylthio)methoxy)phenyl)propanamid **57**



Zu einer Lösung von Verbindung **38** (500 mg; 1.89 mmol; 1 äq.) und NaI (310 mg; 2.07 mmol; 1.1 äq.) in trockenem DMF (20 mL) wurde bei 0 °C eine 1 M Lösung von Kalium-*tert*-butanolat in THF (2.08 mL; 2.08 mmol; 1.1 äq.) zugetropft und für 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Chloromethylmethylsulfid (175 µL; 2.08 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben und für weiter 18 h gerührt, während die Lösung langsam Raumtemperatur erreichte. Es wurde Celite® 535 hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 9:1 → 1:9 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N), um Verbindung **57** als gelbes Öl zu erhalten (217 mg, 35 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.58 (cHex/Aceton 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ = 8.09 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 7.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 7.02 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1 H), 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 5.24 (s, 2 H), 4.98 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H), 4.49 (d, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 3.39–3.28 (m, 2 H), 3.28 - 3.17 (m, 2 H), 2.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 2.35 (dd, *J* = 8.9, 6.9 Hz, 2 H), 2.16 (s, 3 H) ppm.

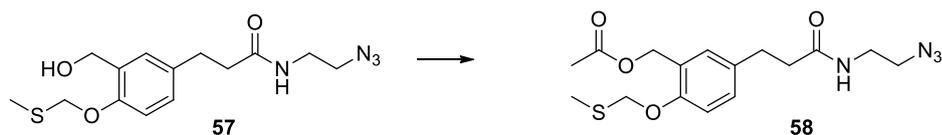
#### 4. Experimenteller Teil

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 171.8, 151.6, 133.7, 131.5, 127.2, 126.7, 113.3, 72.0, 57.9, 50.0, 38.2, 37.4, 30.5, 13.9 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 347.00 [M + Na<sup>+</sup>].

HRMS (MALDI): *m/z* = 347.11493 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S+Na<sup>+</sup>: 347.11483.

#### 4.5.3. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((methylthio)methoxy)benzylacetat **58**



Zu einer Lösung von Verbindung **57** (207 mg; 0.64 mmol; 1 äq.) in Pyridin (1.5 mL) wurde Ac<sub>2</sub>O (0.5 mL) hinzugegeben und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde MeOH (10 mL) hinzugegeben und nach 30 min das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 9:1 → 1:2), um Verbindung **58** als gelbes Öl zu erhalten (187 mg, 80 % Ausbeute).

R<sub>f</sub> = 0.64 (cHex/Aceton 1:1).

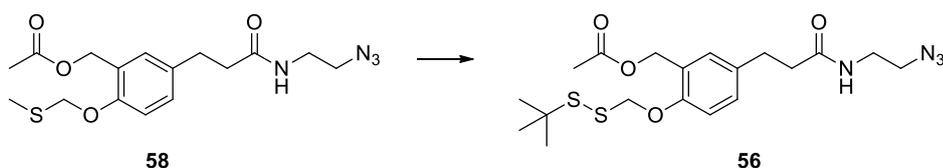
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.07 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H), 7.20–7.09 (m, 2 H), 7.01 (dd, *J* = 7.0, 2.1 Hz, 1 H), 5.28 (s, 2 H), 5.03 (s, 2 H), 3.36–3.28 (m, 2 H), 3.28–3.17 (m, 2 H), 2.76 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H), 2.35 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H), 2.16 (s, 3 H), 2.05 (s, 3 H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 171.7, 170.2, 152.8, 133.9, 129.6, 128.9, 124.8, 113.8, 72.0, 61.1, 50.0, 38.1, 37.1, 30.1, 20.7, 13.7 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 389.03 [M + Na<sup>+</sup>].

HRMS (MALDI): *m/z* = 389.12533 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S+Na<sup>+</sup>: 389.12540.

#### 4.5.4. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((tert-butylidisulfanyl)methoxy)benzylacetat **56**



Zu einer Lösung von Verbindung **58** (100 mg; 0.273 mmol; 1 äq.) in trockenem DCM (10 mL) wurde bei 0 °C nacheinander Et<sub>3</sub>N (42 µL; 0.30 mmol; 1.1 äq.) und SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23 µL; 0.27 mmol; 1 äq.)

#### 4. Experimenteller Teil

zutropft und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Kaliumthiosylat (93 mg; 0.41 mmol; 1.5 äq.) wurde weitere 3 Stunden gerührt. Abschließend wurde *tert*-Butylmercaptan (59  $\mu$ L; 0.55 mmol; 2 äq.) hinzugegeben und die wässrige Phase mit DCM (4 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung (40 mL) gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 3:1  $\rightarrow$  1:1), um Verbindung **56** als gelbes Öl zu erhalten (40 mg, 33 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.71 (cHex/Aceton 1:1).

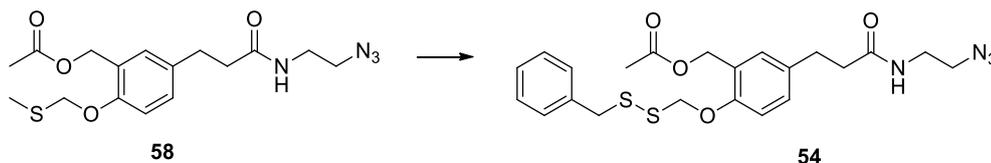
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.18 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1 H), 7.13 (dd,  $J$  = 8.3, 2.1 Hz, 1 H), 6.85 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.73 (br. s, 1 H), 5.30 (s, 2 H), 5.13 (s, 2 H), 3.46–3.27 (m, 4 H), 2.92 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 2.47 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 2.10 (s, 3 H), 1.33 (s, 9 H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 172.4, 171.1, 153.3, 134.2, 130.1, 129.2, 125.6, 113.4, 80.0, 61.8, 51.0, 47.6, 39.00, 38.5, 30.8, 30.0, 21.2 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 463.03 [M + Na<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z$  = 463.14390 [M + Na<sup>+</sup>], calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2 + \text{Na}^+$ : 463.14442.

#### 4.5.5. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((benzylidisulfanyl)methoxy)-benzylacetat **54**



Zu einer Lösung von Verbindung **58** (60 mg; 0.16 mmol; 1 äq.) in trockenem DCM (5 mL) wurde bei 0 °C nacheinander  $\text{Et}_3\text{N}$  (25  $\mu$ L; 0.18 mmol; 1.1 äq.) und  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (15  $\mu$ L; 0.18 mmol; 1.1 äq.) zutropft und die Lösung für 1 h min bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Kaliumthiosylat (56 mg; 0.246 mmol; 1.5 äq.) wurde weitere 1.5 h gerührt. Abschließend wurde Benzylmercaptan (43  $\mu$ L; 0.32 mmol; 2 äq.) hinzugegeben. Nach 20 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 4:1  $\rightarrow$  1:1), um Verbindung **54** beigen Feststoff zu erhalten (55 mg, 71 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.65 (cHex/Aceton 1:1).

**Smp.:** 63 °C

#### 4. Experimenteller Teil

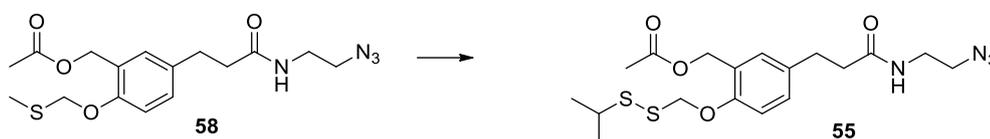
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.33–7.20 (m, 5 H), 7.19 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1 H), 7.13 (dd,  $J$  = 8.4, 2.3 Hz, 1 H), 6.80 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H), 5.72 (br. s, 1 H), 5.14 (s, 2 H), 5.09 (s, 2 H), 3.92 (s, 2 H), 3.40–3.34 (m, 4 H), 2.92 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 2 H), 2.47 (dd,  $J$  = 8.4, 6.9 Hz, 2 H), 2.07 (s, 3 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 172.3, 171.0, 153.3, 137.1, 134.3, 130.2, 129.5, 129.3, 128.7, 127.7, 125.7, 113.5, 78.2, 61.8, 51.0, 44.2, 39.0, 38.5, 30.8, 21.2 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 497.03 [M + Na<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z$  = 497.12788 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>+Na<sup>+</sup>: 497.12877.

#### 4.5.6. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((isopropylidisulfanyl)methoxy)-benzylacetat **55**



Zu einer Lösung von Verbindung **58** (60 mg; 0.16 mmol; 1 äq.) in trockenem DCM (5 mL) wurde bei 0 °C nacheinander Et<sub>3</sub>N (25  $\mu$ L; 0.18 mmol; 1.1 äq.) und SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15  $\mu$ L; 0.18 mmol; 1.1 äq.) zugetropft und die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Kaliumthiosylat (56 mg; 0.246 mmol; 1.5 äq.) wurde weitere 2 h gerührt. Abschließend wurde Isopropylmercaptan (30  $\mu$ L; 0.32 mmol; 2 äq.) hinzugegetropft. Nach 23 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 4:1  $\rightarrow$  1:1) um Verbindung **55** als gelbes Öl zu erhalten (58 mg, 83 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.72 (cHex/Aceton 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.18 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1 H), 7.13 (dd,  $J$  = 8.3, 2.2 Hz, 1 H), 6.86 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.71 (br. s, 1 H), 5.31 (s, 2 H), 5.13 (s, 2 H), 3.43–3.35 (m, 4 H), 3.04 (quin,  $J$  = 6.7 Hz, 1 H), 2.93 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 2.47 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2 H), 2.11 (s, 3 H), 1.30 (s, 3 H), 1.27 (s, 3 H) ppm.

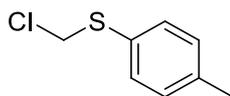
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 172.4, 171.1, 153.4, 134.2, 130.2, 129.3, 125.6, 113.4, 79.4, 61.8, 51.0, 41.6, 39.0, 38.5, 30.8, 22.7, 21.2 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 449.07 [M + Na<sup>+</sup>].

**HRMS (MALDI):**  $m/z$  = 449.12824 [M + Na<sup>+</sup>], ber. für C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>+Na<sup>+</sup>: 449.12877.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.5.7. 4-Chloromethylthiotoluol<sup>[213]</sup>

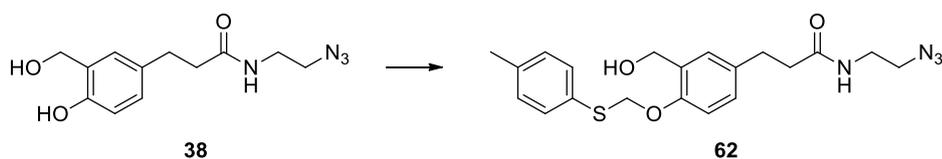


In einer Apparatur mit Rückflusskühler und Abluftschlauch wurde Paraformaldehyd (1.35 g; 45.5 mmol; 1.3 äq.) in einer Mischung aus konz. wässriger HCl (35 mL) und Toluol (10 mL) gelöst und auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurde eine Lösung von Thiocresol (4.35 g; 35 mmol; 1 äq.) in Toluol (10 mL) bei konstanter Temperatur innerhalb von 40 min hinzugegeben und für 1 h bei 50 °C und weitere 2 h bei RT gerührt. Die Apparatur wurde mit Argon durchgespült und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Toluol (2 x 20 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen über NaSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Toluol wurde bei Raumdruck destilliert und das verbleibende Rohprodukt wurde fraktioniert im Ölpumpenvakuum destilliert, um das Produkt als farblose Flüssigkeit zu erhalten (2.1 g, 35 % Ausbeute).

**Sdp.:** 85–86 °C bei < 1 mbar (Lit.: 106–107 °C bei 11 mm Hg<sup>[214]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ = 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 7.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 4.93 (s, 2 H), 2.36 (s, 3 H) ppm.

### 4.5.8. *N*-(2-Azidoethyl)-3-(3-(hydroxymethyl)-4-(*p*-tolylthio)methoxy)phenylpropanamid **62**



Zu einer Lösung von Verbindung **38** (100 mg; 0.378 mmol; 1 äq.) in trockenem MeCN (5 mL) und DMF (5 mL) wurde bei RT eine 1 M Lösung von Kalium-*tert*-butanolat in THF (378 µL; 0.378 mmol; 1 äq.) zugetropft und für 10 min gerührt. Anschließend wurde 4-Chloromethylthiotoluol (66 mg; 0.416 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben und für weitere 16 h gerührt. Die Lösung wurde in ges. NaCl-Lösung (60 mL) geschüttet und mit Ethylacetat (4 x 40 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 3:1 → 1:1), um Verbindung **62** als gelben Feststoff zu erhalten (120 mg, 79 % Ausbeute).

**R<sub>f</sub>** = 0.36 (cHex/Aceton 4:1).

**Smp.:** 70 °C.

#### 4. Experimenteller Teil

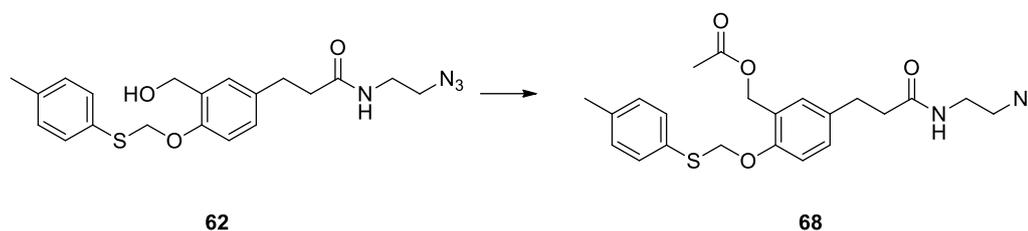
---

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.37 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2 H), 7.18–7.07 (m, 4 H), 6.85 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.72 (br. s, 1 H), 5.43 (s, 2 H), 4.59 (s, 2 H), 3.43–3.34 (m, 4 H), 2.92 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 2.47 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 2.33 (s, 3 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 172.5, 153.2, 138.0, 134.2, 131.7, 130.8, 130.7, 130.1, 129.2, 128.6, 113.4, 73.9, 61.8, 51.0, 39.0, 38.5, 30.9, 21.2 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 423.23 [M + Na<sup>+</sup>].

#### 4.5.9. 5-(3-((2-Azidoethyl)amino)-3-oxopropyl)-2-((*p*-tolylthio)methoxy)benzylacetat **68**



Verbindung **62** (280 mg; 0.70 mmol; 1 äq.) wurde in einer Mischung aus Pyridin (2 mL), Ac<sub>2</sub>O (1 mL) und DCM (10 mL) gelöst und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde MeOH (5 mL) hinzugegeben und nach 30 min das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 9:1 → 1:1), um Verbindung **68** als farbloser Feststoff zu erhalten (210 mg, 68 % Ausbeute).

**Smp.:** 67 °C

**R<sub>f</sub>** = 0.47 (cHex/Aceton 4:1).

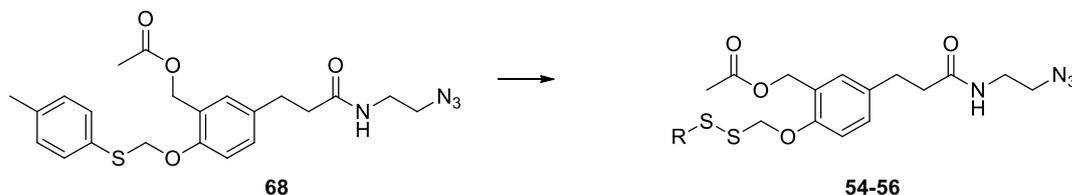
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 7.37 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2 H), 7.18 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1 H), 7.07 - 7.16 (m, 3 H), 6.87 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.71 (br. s, 1 H), 5.43 (s, 2 H), 5.08 (s, 2 H), 3.42–3.34 (m, 4 H), 2.92 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 2.47 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2 H), 2.33 (s, 3 H), 2.06 (s, 3 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 172.4, 171.0, 153.3, 137.7, 134.0, 131.4, 131.3, 130.2, 130.0, 129.2, 125.7, 113.5, 73.9, 61.90, 51.0, 39.0, 38.5, 30.8, 21.2, 21.2 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 443.35 [M + H<sup>+</sup>].

## 4. Experimenteller Teil

### 4.5.10. Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Disulfide 54-56 aus dem *p*-Tolylthiomethylether 68



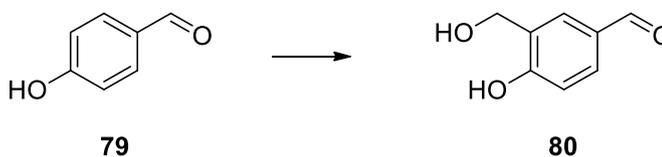
Zu einer Lösung von Verbindung **68** (1 äq.) in trockenem DCM (5 mL) wurde  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  (1.01 äq.) zuge tropft und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Cyclohexen (1.7 äq.) und weitere 20 min gerührt. Nach der Zugabe von Kaliumthiosylat (1.6 äq.) wurde weitere 25 min gerührt. Abschließend wurde das entsprechende Thiol hinzugegeben (10 äq.). Nach 16 h wurde  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.7 mL) hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 9:1  $\rightarrow$  1:1)

	<b>Edukt 68</b>	<b>Ausbeute (Masse)</b>	<b>Ausbeute (%)</b>
Benzyl-Derivat <b>54</b>	70 mg / 0.16 mmol	21 mg	23 %
Isopropyl-Derivat <b>55</b>	31 mg / 0.07 mmol	21 mg	70 %
<i>tert</i> -Butyl-Derivat <b>56</b>	31 mg / 0.07 mmol	24 mg	78 %

Die spektroskopischen Eigenschaften der drei Produkte **54**, **55** und **56** stimmten jeweils mit den weiter oben beschriebenen Daten überein.

## 4.6. Synthese des Chinonmethid-Präkursors für die *Pulldown*-Experimente

### 4.6.1. 4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)benzaldehyd 80



4-Hydroxybenzaldehyd **79** (1.00 g; 8.19 mmol; 1 äq.),  $\text{NaBO}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (9.17 g; 65.5 mmol; 8 äq.) und wässrige Formaldehydlösung (37 %; 3.1 mL; 41 mmol; 5 äq.) wurden in Wasser (40 mL) gelöst. Der Ansatz wurde anschließend für 3 h bei 80 °C gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde mit 3 M HCl auf pH 3 angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert (3 x 50 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung (40 mL) gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde

#### 4. Experimenteller Teil

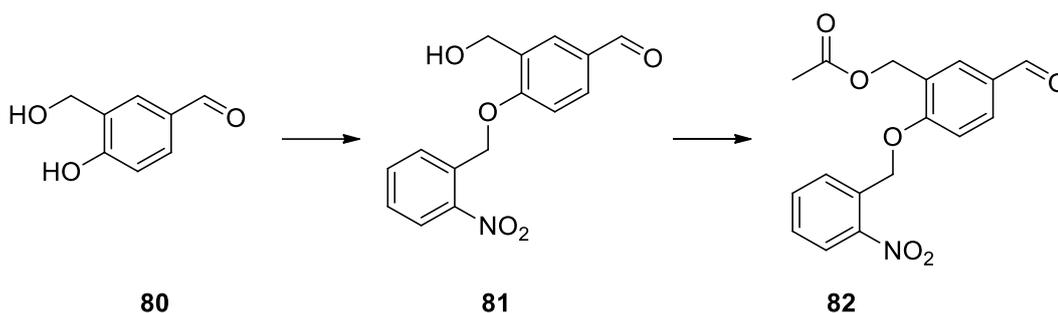
---

säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 2:1 → 1:2), um Verbindung **80** als gelblicher Feststoff erhalten (0.39 g, 31 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.18 (cHex/EtOAc 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 9.85 (s, 1 H), 7.76 (dd,  $J$  = 8.3, 2.0 Hz, 1 H), 7.60 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1 H), 7.01 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 4.99 (s, 2 H) ppm.

##### 4.6.2. 5-Formyl-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat **82**



Zu einer Lösung von Verbindung **80** (0.39 g; 2.57 mmol; 1.0 äq.) in Aceton (15 mL) wurde TBAI (90 mg; 0.24 mmol; 0.1 äq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.06 g; 7.68 mmol; 3.0 äq.) und 2-Nitrobenzylbromid (610 mg; 2.82 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 2.5 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1 → 1:1), um Verbindung **81** als gelbes Öl zu erhalten (0.40 g).

$R_f$  = 0.42 (cHex/EtOAc 1:1).

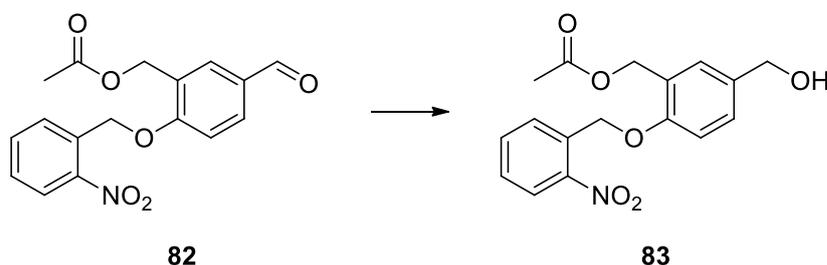
Verbindung **81** wurde direkt durch 18 h Rühren in Ac<sub>2</sub>O (3 mL) und Pyridin (3 mL) verestert. Dann wurde Ethylacetat (200 mL) hinzugegeben und mit Wasser (30 mL), ges. NaHCO<sub>3</sub> (2 x 30 mL) und ges. NaCl-Lösung (1 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/Aceton 9:1 → 1:1), um Verbindung **82** als beige Feststoff zu erhalten (0.37 g, 44 % Ausbeute über 2 Schritte).

$R_f$  = 0.61 (cHex/EtOAc 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 9.90 (s, 1 H), 8.22–8.13 (m, 1 H), 7.87–7.98 (m, 2 H), 7.75–7.87 (m, 2 H), 7.59–7.72 (m, 1 H), 7.34 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.66 (s, 2 H), 5.15 (s, 2 H), 2.07 (s, 3 H) ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 352.44 [M + Na<sup>+</sup>].

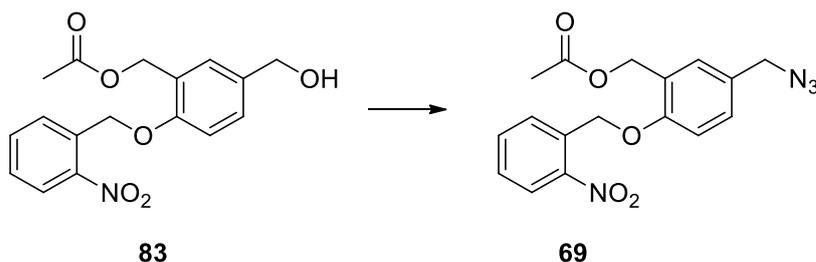
### 4.6.3. 5-(Hydroxymethyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat **83**



Verbindung **82** (0.15 g; 0.46 mmol; 1 äq.) wurde in THF (20 mL) gelöst und NaBH<sub>4</sub> (0.35 g; 9.2 mmol; 20 äq.), sowie MeOH (1 mL) hinzugegeben. Nach 1 h bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (100 mL) und Ethylacetat (200 mL) gestoppt. Nach Trennung der Phasen wurde die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1 → 2:3), um Verbindung **83** als gelben Feststoff zu erhalten (0.14 g, 93 %).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.70 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.51 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.40 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.31 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1 H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 5.54 (s, 2 H), 5.27 (s, 2 H), 4.65 (s, 2 H), 2.12 (s, 3 H) ppm.

### 4.6.4. 5-(Azidomethyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylacetat **69**



Zu einer Lösung von Verbindung **83** (48 mg; 0.144 mmol; 1 äq.) in trockenem DMF (5 mL) wurden bei 0 °C Et<sub>3</sub>N (22 µL; 0.16 mmol; 1.1 äq.) und Methansulfonylchlorid (12.4 µL; 0.16 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde Natriumazid (11.4 mg; 0.175 mmol; 1.2 äq.) zugegeben und für 3 h bei 80 °C gerührt. Dem abgekühlte Reaktionsgemisch wurde Wasser (30 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert (3 x 50 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1 → 1:1), um Verbindung **69** als weißen Feststoff zu erhalten (39 mg, 76 % Ausbeute).

## 4. Experimenteller Teil

---

$R_f = 0.79$  (cHex/EtOAc 1:1).

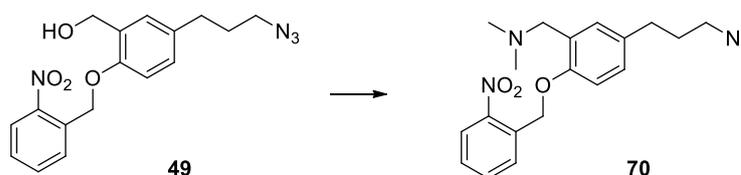
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 8.19$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H), 7.88 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1 H), 7.71 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 7.51 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1 H), 7.35 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1 H), 7.26 (dd,  $J = 8.2, 2.1$  Hz, 1 H), 6.95 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 5.54 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 4.31 (s, 2 H), 2.13 (s, 3 H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 171.0, 156.0, 147.0, 134.3, 133.5, 130.2, 129.9, 128.6, 128.5, 128.4, 125.3, 125.2, 112.2, 67.2, 61.7, 54.4, 21.2$  ppm.

$\text{MS (ESI}^+)$ :  $m/z = 379.00$  [ $\text{M} + \text{Na}^+$ ].

### 4.7. Synthese von Chinonmethid-Präkursoren mit alternativer Abgangsgruppe

#### 4.7.1. 1-(5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)-*N,N*-dimethylmethanamin 70



Verbindung **49** (50 mg; 0.146 mmol; 1 äq.) wurde in trockenem DCM (5 mL) gelöst. Bei 0 °C wurden Methansulfonylchlorid (13  $\mu\text{L}$ ; 0.161 mmol; 1.1 äq.) und DIPEA (28  $\mu\text{L}$ ; 0.161 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben. Nach 40 Minuten wurde eine Dimethylaminlösung in Ethanol (260  $\mu\text{L}$ ; 33 % in Ethanol 5.6 M; 1.46 mmol; 10 äq.) hinzugegeben und für weiter 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 3:1  $\rightarrow$  1:1 + 1 %  $\text{Et}_3\text{N}$ ), um Verbindung **70** als gelbes Öl zu erhalten (33 mg, 61 % Ausbeute).

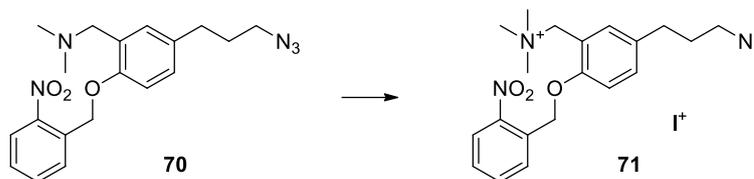
$R_f = 0.84$  (cHex/Aceton 4:1).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 8.16$  (dd,  $J = 8.2, 0.9$  Hz, 1 H), 7.95 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 7.70 (td,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 1 H), 7.50 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1 H), 7.21 (s, 1 H), 7.05 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1 H), 6.86 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 5.48 (s, 2 H), 3.59 (s, 2 H), 3.28 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 2.66 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.33 (s, 6 H), 1.90 (quin,  $J = 7.2$  Hz, 2 H) ppm.

$\text{MS (ESI}^+)$ :  $m/z = 370.15$  [ $\text{M} + \text{H}^+$ ].

## 4. Experimenteller Teil

### 4.7.2. 1-(5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)phenyl)-*N,N,N*-trimethylmethanaminiumiodid **71**



Verbindung **70** (33 mg; 0.087 mmol; 1 äq.) wurde in trockenem DCM (3 mL) gelöst, Methyliodid (8.1  $\mu$ L; 0.13 mmol; 1.5 äq.) hinzugegeben und die Mischung für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ethanol (6 mL) hinzugegeben und für weitere 1.5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 9:1), um Verbindung **71** als braunen Feststoff zu erhalten (30 mg, 66 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.39 (DCM/MeOH 9:1).

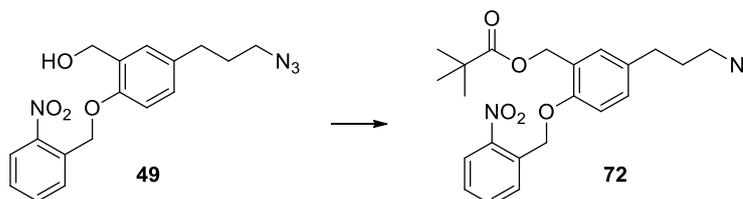
**Smp.:** > 300 °C

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 8.10 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1 H), 7.77 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H), 7.69 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1 H), 7.62 (s, 1 H), 7.57 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H), 7.30 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1 H), 6.98 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1 H), 5.50 (s, 2 H), 4.82 (s, 2 H), 3.35 (s, 9 H), 3.30 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2 H), 2.71 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2 H), 1.91 (quin,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  = 156.0, 148.0, 135.6, 135.3, 134.6, 133.2, 131.4, 129.9, 129.8, 125.4, 116.0, 113.4, 68.4, 64.4, 53.7, 50.8, 31.7, 30.5 ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 384.34 [ $\text{M}^+$ ].

### 4.7.3. 5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzylpivalat **72**



Verbindung **49** (17 mg; 0.05 mmol; 1 äq.) wurde in Pyridin (2 mL) gelöst, Pivaloylchlorid (12  $\mu$ L; 0.10 mmol; 2 äq.) hinzugegeben und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1  $\rightarrow$  1:1), um Verbindung **72** als gelbes Öl zu erhalten (21 mg, 98 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.53 (cHex/Aceton 4:1).

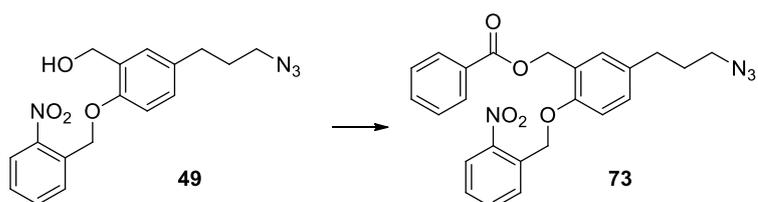
## 4. Experimenteller Teil

---

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.19 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1 H), 7.93 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H), 7.70 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1 H), 7.50 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1 H), 7.19 (s, 1 H), 7.11 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1 H), 6.88 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.51 (s, 2 H), 5.25 (s, 2 H), 3.29 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2 H), 2.67 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2 H), 1.89 (quin,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H), 1.22 (s, 9 H) ppm.

**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 449.33 [M+Na<sup>+</sup>].

### 4.7.4. 5-(3-Azidopropyl)-2-((2-nitrobenzyl)oxy)benzoat **73**



Verbindung **49** (16 mg; 0.047 mmol; 1 äq.) wurde in Pyridin (2 mL) gelöst, Benzoylchlorid (10.8  $\mu$ L; 0.094 mmol; 2 äq.) hinzugegeben und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (cHex/EtOAc 9:1  $\rightarrow$  1:1), um Verbindung **73** als beigen Feststoff zu erhalten (19 mg, 91 % Ausbeute).

$R_f$  = 0.63 (cHex/Aceton 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  = 8.17 (dd,  $J$  = 8.2, 1.3 Hz, 1 H), 8.15–8.06 (m, 2 H), 7.85 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1 H), 7.70 (td,  $J$  = 7.6, 1.2 Hz, 1 H), 7.66–7.58 (m, 1 H), 7.56–7.43 (m, 3 H), 7.20 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1 H), 7.07 (dd,  $J$  = 8.4, 2.3 Hz, 1 H), 6.84 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1 H), 5.52 (s, 2 H), 4.79 (s, 2 H), 3.28 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2 H), 2.67 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2 H), 1.89 (quin,  $J$  = 7.2 Hz, 2 H) ppm.

## 4.8. Allgemeine Synthese und Reinigung der PNA

Die verwendeten PNAs wurden durch manuelle Festphasensynthesen auf Rink Amid MBHA Harz in 2 mL Polyethylen-Spritzen mit Fritte durch Fmoc-Chemie hergestellt.

Beispiel-Prozedur A: 43.6 mg Harz (Beladung: 0.51 mmol/g) wurden für 2 h in DCM aufgequollen und mit DMF gewaschen (3 x 1 mL). Für die Kupplung wurden HOBt (17.0 mg; 111.2  $\mu$ mol; 5 äq.), DIC (17.4  $\mu$ L; 111.2  $\mu$ mol; 5 äq.) und Fmoc-Lys(Boc)-OH (52.1 mg; 111.2  $\mu$ mol; 5 äq.) in 350  $\mu$ L DMF gelöst und in die Spritze aufgezogen. Das Harz wurde für 1 h bei RT geschüttelt und mit DMF (3 x 1 mL) und DCM (3 x 1 mL) gewaschen. Um die vollständige Kupplung zu überprüfen wurde ein Kaisertest durchgeführt und der Kupplungsschritt bei unvollständiger Kupplung wiederholt. Das Harz wurde mit DMF (3 x 1 mL) gewaschen und zur Entschützung dreimal mit 2 mL 20 %

#### 4. Experimenteller Teil

---

Piperidin in DMF (20 min, 7 min & 2 min) geschüttelt. Dann wurde das Harz mit DMF (3 x 1 mL) und DCM (3 x 1 mL) gewaschen und die Entschützung mit dem Kaisertest überprüft. Nach Waschen mit DMF (3 x 1 mL) wurde das nächste Monomer (5 äq.) unter denselben Bedingungen gekuppelt. Der Kupplungs- und Entschützungs-Zyklus wurde wiederholt, bis die Sequenz vollständig war. Abschließend wurde das Harz mit DCM (3 x 1 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung der PNA von der Festphase wurde das Harz zweimal 1 h mit 1.5 mL einer Mischung aus TFA, Wasser und TIPS (9.5:0.25:0.25) geschüttelt und die Lösung aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde im Luftstrom entfernt und das Rohprodukt in Reinstwasser gelöst.

Beispiel-Prozedur B: Dieses schnellere und kosteneffizientere Synthese-Protokoll wurde von Avitabile *et al.*<sup>[215]</sup> adaptiert:

15 mg Harz (Beladung: 0.51 mmol/g) wurden für 2 h in DCM aufgequollen und mit DMF gewaschen (3 x 1 mL). Für die Kupplung wurden 86 µL einer 0.22 mM Lösung HOBt in DMF (19 µmol; 2.5 äq.), 86 µL einer 0.22 mM Lösung HBTU in DMF (19 µmol; 2.5 äq.) und 190 µL einer 0.2 mM Lösung NMM in trockenem Pyridin (38 µmol; 5 äq.) zu Fmoc-Lys(Boc)-OH (9.3 mg; 19 µmol; 2.5 äq.) in 86 µL DMF gegeben, für 2 min geschüttelt und dann in die Spritze aufgezogen. Das Harz wurde für 20 min bei RT geschüttelt und mit DMF (3 x 1 mL) und DCM (3 x 1 mL) gewaschen. Um die vollständige Kupplung zu überprüfen wurde ein Kaisertest durchgeführt und der Kupplungsschritt bei unvollständiger Kupplung wiederholt. Anschließend wurde das Harz mit einer Mischung aus Ac<sub>2</sub>O, 2,6-Lutidine und DMF (5:6:89, Gesamtvolumen: 2 mL) für 5 min acetyliert. Das Harz wurde mit DMF (3 x 1 mL) gewaschen und zur Entschützung einmal mit 2 mL 20 % Piperidin in DMF (7 min) geschüttelt. Dann wurde das Harz mit DMF (3 x 1 mL) und DCM (3 x 1 mL) gewaschen und die Entschützung mit dem Kaisertest überprüft. Nach Waschen mit DMF (3 x 1 mL) wurde das nächste Monomer (2.5 äq.) unter denselben Bedingungen gekuppelt. Der Kupplungs- und Entschützungs-Zyklus wurde wiederholt, bis die Sequenz vollständig war. Abschließend wurde das Harz mit DCM (3 x 1 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Abspaltung der PNA von der Festphase wurde das Harz zweimal 1 h mit 1.5 mL einer Mischung aus TFA, Wasser und TIPS (9.5:0.25:0.25) geschüttelt und die Lösung aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde im Luftstrom entfernt und das Rohprodukt in Reinstwasser gelöst.

Synthetisiert nach Methode A: **PNA1, PNA2, PNA4, PNA5**

Synthetisiert nach Methode B: **PNA6**

Für die Synthese von PNA3 siehe: *Dogandzhiyski et al., Bioconjugate Chem.* 2015, 26, 2514–2519.<sup>[216]</sup>

### 4.9. Allgemeine Synthese der Konjugate und Reinigung

Für die Synthese der Konjugate wurden PNA und der entsprechende Chinonmethid-Präkursor durch CuAAC in Lösung verbunden. Die ungereinigte PNA (üblicherweise 300 µL einer 400 µM Lösung) wurden mit 5 äq. des Chinonmethid-Präkursors in einer DMSO:H<sub>2</sub>O 1:1 Lösung mit 500 µM Cu<sup>II</sup>-TBTA Komplex und 5 mM Natriumascrobat für 2 h bei 37 °C inkubiert (Gesamtvolumen: 1000 µL). (TBTA: Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine).

Die Reinigung erfolgte durch RP-HPLC mit einem System der Marke JASCO bestehend aus: PU-980-HPLC-Pumpe mit LG-980-02-Hochdruckgradientenmischer, DG-980-50-Entgaser, UV-970 UV/VIS-Detektor und einem MD-2010 Plus-Multiwellenlängendetektor.

#### 4.9.1. PNA1-32

**MS (MALDI)**  $m/z = 3408.4 [M+H]^+$ , ber. für C<sub>142</sub>H<sub>181</sub>N<sub>65</sub>O<sub>38</sub>+H<sup>+</sup>: 3405.4

##### HPLC-Bedingungen:

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 10–32.2 % MeCN in 0.1 % TFA für 30 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 254 nm,  $t_R = 17.3$  min.

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 50 °C, 1 mL/min, 260 nm,  $t_R = 11.0$  min.

#### 4.9.2. PNA2-32

**MS (MALDI)**  $m/z = 3404.1 [M+H]^+$ , ber. für C<sub>142</sub>H<sub>181</sub>N<sub>65</sub>O<sub>38</sub>+H<sup>+</sup>: 3405.4

##### HPLC-Bedingungen:

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 6–50 % MeCN in 0.1 % TFA für 40 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 254 nm.  $t_R = 18.2$  min.

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 11.2$  min.

#### 4.9.3. PNA1-43

**MS (MALDI)**  $m/z = 3417.4 [M+H]^+$ , ber. für C<sub>143</sub>H<sub>183</sub>N<sub>65</sub>O<sub>38</sub>+H<sup>+</sup>: 3420.4

##### HPLC Bedingungen:

## 4. Experimenteller Teil

---

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 4–50 % MeCN in 0.1 % TFA für 17 min, 4.0 mL/min, 260 nm,  $t_R = 16.2$  min.

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 18.1$  min

### 4.9.4. PNA1-44

**MS (MALDI)**  $m/z = 3330.43$  [M-O+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>140</sub>H<sub>178</sub>N<sub>64</sub>O<sub>36</sub>+H<sup>+</sup>: 3333.41

**HPLC Bedingungen:**

**Präparativ & analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 50 °C, 1 mL/min, 260 nm,  $t_R = 13.2$  min.

### 4.9.5. PNA3-32

**MS (MALDI)**  $m/z = 4902.6$  [M+H]<sup>+</sup>, ber. für C<sub>204</sub>H<sub>261</sub>N<sub>95</sub>O<sub>54</sub>+H<sup>+</sup>: 4906.1

**HPLC-Bedingungen:**

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 10–32.2 % MeCN in 0.1 % TFA für 30 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 254 nm,  $t_R = 17.4$  min.

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 10.9$  min.

### 4.9.6. PNA4-32

**MS (MALDI)**  $m/z = 3443.80$  [M+H]<sup>+</sup>, ber. für C<sub>144</sub>H<sub>182</sub>N<sub>66</sub>O<sub>38</sub>+H<sup>+</sup>: 3444.4

**HPLC-Bedingungen:**

**Analytisch & präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 11.2$  min.

### 4.9.7. PNA5-44

**MS (MALDI)**  $m/z = 3095.6$  [M+H]<sup>+</sup>, ber. für C<sub>129</sub>H<sub>164</sub>N<sub>62</sub>O<sub>32</sub>+H<sup>+</sup>: 3095.8

**HPLC Bedingungen:**

#### 4. Experimenteller Teil

---

**Analytisch & präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 10.0$  min.

##### 4.9.8. PNA1-54

**MS (MALDI)**  $m/z = 3438.9$  [M+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>143</sub>H<sub>184</sub>N<sub>64</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>: 3439.5

**HPLC Bedingungen:**

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 27.0$  min.

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 0–50 % MeCN in 0.1 % TFA für 17 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 17.1$  min.

##### 4.9.9. PNA1-56

**MS (MALDI)**  $m/z = 3404.2$  [M+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>140</sub>H<sub>186</sub>N<sub>64</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>: 3406.5

**HPLC Bedingungen:**

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 25.1$  min.

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 0–50 % MeCN in 0.1 % TFA für 17 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 17.3$  min.

##### 4.9.10. PNA1-55

**MS (MALDI)**  $m/z = 3391.9$  [M+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>139</sub>H<sub>184</sub>N<sub>64</sub>O<sub>36</sub>S<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>: 3392.5

**HPLC Bedingungen:**

**Analytisch & präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 25.5$  min.

##### 4.9.11. PNA6-69

**MS (MALDI)**  $m/z = 3566.0$  [M+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>149</sub>H<sub>197</sub>N<sub>67</sub>O<sub>38</sub>S+H<sup>+</sup>: 3567.65

**HPLC Bedingungen:**

## 4. Experimenteller Teil

---

**PNA6** wurde zunächst mit Fmoc-geschütztem *N*-Terminus synthetisiert und konjugiert:

**Präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 8–30 % MeCN in 0.1 % TFA für 21 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 20.7$  min.

Anschließend wurde das Konjugate für 30 min in 20 % Piperidin in DMF inkubiert und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde erneut mittels RP-HPLC gereinigt.

**Präparativ:** Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A, 250 x 10, 10 µm, linearer Gradient von 4–10 % MeCN in 0.1 % TFA für 21 min, 4.0 mL/min, 50 °C, 260 nm,  $t_R = 15.5$  min.

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 5 % MeCN, linearer Gradient von 5–60 % MeCN in 0.1 % TFA für 15 min, 1 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_R = 10.8$  min.

### 4.9.12. PNA1-70

**MS (MALDI)**  $m/z = 3320.29$  [M-O+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>140</sub>H<sub>181</sub>N<sub>65</sub>O<sub>34</sub>+H<sup>+</sup>: 3319.4

**HPLC Bedingungen:**

**Analytisch & präparativ:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_R = 17.2$  min.

### 4.9.13. PNA1-71

**MS (MALDI)**  $m/z = 3334.6$  [M-O+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>141</sub>H<sub>184</sub>N<sub>65</sub>O<sub>34</sub><sup>+</sup>: 3333.4

**HPLC Bedingungen:**

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_R = 17.2$  min.

**Präparativ:** Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A, 250 x 10, 10 µm, 5 min 0 % MeCN, linearer Gradient von 0–30 % MeCN in 0.1 % TFA für 16 min, 4 min 70 % MeCN, 4.0 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_R = 21.4$  min.

### 4.9.14. PNA1-72

**MS (MALDI)**  $m/z = 3256.35$  [M-Nitrobenzyl+H<sup>+</sup>], ber. für C<sub>136</sub>H<sub>179</sub>N<sub>63</sub>O<sub>35</sub>+H<sup>+</sup>: 3257.28

**HPLC Bedingungen:**

#### 4. Experimenteller Teil

---

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_{\text{R}}$  = 17.5 min.

**Präparativ:** Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , 5 min 0 % MeCN, linearer Gradient von 0–30 % MeCN in 0.1 % TFA für 16 min, 4 min 70 % MeCN, 4.0 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_{\text{R}}$  = 21.4 min.

##### 4.9.15. PNA1-73

**MS (MALDI)**  $m/z$  = 3293.4 [M-Nitrobenzyl+ $\text{NH}_4^+$ ], ber. für  $\text{C}_{138}\text{H}_{175}\text{N}_{63}\text{O}_{35}+\text{NH}_4^+$ : 3294.31

**MS (MALDI)**  $m/z$  = 3276.5 [M-Nitrobenzyl+ $\text{NH}_4^+$ ], ber. für  $\text{C}_{138}\text{H}_{175}\text{N}_{63}\text{O}_{35}+\text{H}^+$ : 3277.27

##### HPLC Bedingungen:

**Analytisch:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_{\text{R}}$  = 19.8 min.

**Präparativ:** Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A, 250 x 10, 10  $\mu\text{m}$ , 5 min 0 % MeCN, linearer Gradient von 0–30 % MeCN in 0.1 % TFA für 16 min, 4 min 70 % MeCN, 4.0 mL/min, 260 nm, 50 °C,  $t_{\text{R}}$  = 23.5 min.

#### 4.10. Photochemische Entschützung der Chinonmethid-Präkursoren

Die Bestrahlung erfolgte in einer eigens dafür gebauten Apparatur (Abbildung 139). Dafür wurden zwei LZ1-10UV00 (LED Engin Inc.) 365 nm UV-LEDs auf einem Kühlkörper angebracht. Darüber befindet sich ein Halter für zwei Glasröhrchen (Carl Roth 50 x  $\varnothing$  10 mm) bzw. 1.5 mL Eppendorfgefäße, der so angebracht wurde, dass die Proben von unten bestrahlt werden. Mithilfe eines Labornetzgeräts wurden die LEDs mit einer konstanten Stromstärke von 0.4 A betrieben, was einer Strahlungsleistung von 550 mW entspricht.



Abbildung 139: Apparatur zur Bestrahlung der Proben.

### 4.11. Alkylierungsexperimente

#### 4.11.1. Bestrahlung der Konjugate und Messung der Selbstalkylierungs-Kinetik

Eine Lösung aus 30  $\mu\text{M}$  **PNA1-32**, 130 mM MES Puffer (pH 7.0) und 130 mM NaCl mit einem Endvolumen von 140  $\mu\text{L}$  wurde in einem Eppendorfgefäß gemischt. Die Lösung wurde für 2 min im Eppendorfgefäß bestrahlt und bei 37 °C inkubiert. 20  $\mu\text{L}$  Proben wurden nach den entsprechenden Zeitintervallen entnommen und mittels RP-HPLC analysiert. Zur Bestimmung der Selbstalkylierung wurde der Anteil der Fläche des primären Photolyseproduktes **PNA1-32b** (vor Eliminierung des Acetatrestes) an der Gesamtfläche aus anfänglichem Signal und den entstehenden Signalen (entspricht den Selbstaddukten) berechnet.

**HPLC-Bedingungen:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 7–40 % MeCN in 0.1 M TEAA Puffer (pH 7.0) für 10 min, 2 mL/min, 50 °C, 260 nm.

#### 4.11.2. Handhabung von Proben mit RNA

Bei der Vorbereitung und Durchführung von Inkubationen wurden stets Einweghandschuhe (Latex) getragen, um die Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Die verwendeten Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße wurden in einem Autoklaven sterilisiert. Glasgeräte wurden in einem Ofen mindestens 6 Stunden auf 180 °C erhitzt. Für die Inkubationen wurde mit DEPC behandeltes Wasser verwendet.

#### 4.11.3. Bestrahlung und Inkubation der Konjugate mit RNA

Sofern nicht anders angegeben, wurde eine Lösung aus 6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA (Cy5 markiert), 130 mM MES Puffer (pH 7.0) und 130 mM NaCl mit einem Endvolumen von 20  $\mu\text{L}$  in einem Eppendorfgefäß (DNA LoBind) gemischt. Die Lösung wurde anschließend für 2 min in der erwähnten Apparatur bestrahlt (Entweder direkt im Eppendorfgefäß oder nach Überführung in ein Glasröhrchen (50 x  $\varnothing$  10 mm)). Nach der Bestrahlung wurde die Lösung in einem Eppendorfgefäß bei 37 °C inkubiert. 1  $\mu\text{L}$  Proben wurden nach den entsprechenden Zeitintervallen entnommen, auf 10  $\mu\text{L}$  mit DEPC-Wasser verdünnt und bei -20 °C bis zu Analyse aufbewahrt. Für jede Messreihe wurden zwei identische Proben parallel inkubiert.

### 4.11.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proben wurden mittels denaturierender PAGE (16 % Acrylamid, 7 M Harnstoff, 150 x 310 mm oder 270 x 310 mm) auf einem DNA-Sequenziergerät (ALFexpress™, GE Healthcare/Amersham Bioscience) analysiert.

Vor der Analyse wurden alle Proben auf eine RNA-Konzentration von 150 nM verdünnt. 10 µL Probe wurden mit 15 µL Ladepuffer (8 M Harnstoff, 20 mM EDTA und 0.2 % Crocein Orange in DEPC-Wasser) versetzt. In einer Alf-Gelkassette wurde ein Polyacrylamid-Gel vorbereitet (Für 150 x 310 mm: 40 mL 16 % Monomer, 7 M Harnstoff, 450 µL 10 % APS, 45 µL TEMED). Die Gelkassette wurde in den „ALFexpress II“-DNA-Sequenzierer eingehängt und die Pufferreservoirs mit 1x TBE-Puffer gefüllt. 5 µL jeder vorbereiteten Probe wurden in eine Tasche des Polyacrylamid-Gels geladen. Es wurden folgende Laufbedingungen gewählt: 1500 V (Maximum), 60 mA (Maximum), 25 W (konstant), 25 °C oder 57 °C, 2 s Probenintervall.

Das erhaltene Elektropherogramm wurde mit der AlleleLinks 1.01 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) Software ausgewertet. Die Software zeigt das Fluoreszenzsignal jeder Bahn in Abhängigkeit von der Zeit und ermöglicht die Integration der Signalfächen. Aus dem Verhältnis der Integrale zwischen alkylierter und freier RNA wurde der Anteil der alkylierten RNA berechnet. Die graphische Auftragung und Kurvenanpassung erfolgte mit der OriginPro Software (OriginLab, Northampton, MA).

### 4.12. Messung der Kinetik des Disulfidzerfalls

Eine Lösung aus 20 µM Konjugat, 130 mM MES Puffer (pH 7.0), 130 mM NaCl und 0.5 mM bzw. 10 mM GSH mit einem Endvolumen von 140 µL wurde in einem Eppendorfgefäß gemischt und bei 37 °C inkubiert. 20 µL Proben wurden nach den entsprechenden Zeitintervallen entnommen und mittels HPLC analysiert. Zur Bestimmung der Selbstalkylierung wurde der Anteil der Fläche des anfänglichen Signals (entspricht dem Disulfid) an der Gesamtfläche aus anfänglichem Signal und den entstehenden Signalen (entspricht dem O,S-Acetal, freien Phenol und Folgeprodukten) berechnet.

**HPLC-Bedingungen:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, linearer Gradient von 7–40 % MeCN in 0.1 M TEAA Puffer (pH 7.0) für 10 min, 2 mL/min, 50 °C, 260 nm

Nur Konjugat **PNA1-56** bei 0.5 mM GSH:

**HPLC-Bedingungen:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, 2 min 4 % MeCN, linearer Gradient von 4–35 % MeCN in 0.1 % TFA für 25 min, 1 mL/min, 50 °C, 260 nm.

### 4.12.1. Messung der RNA-Alkylierung durch die reduktiv-aktivierbaren Konjugate

Eine Lösung aus 6  $\mu\text{M}$  Konjugat, 3  $\mu\text{M}$  RNA (Cy5 markiert), 130 mM MES Puffer (pH 7.0), 130 mM NaCl und 0.5 mM bzw. 10 mM GSH mit einem Endvolumen von 20  $\mu\text{L}$  wurden in einem Eppendorfggefäß (DNA LoBind) gemischt und bei 37 °C inkubiert. 1  $\mu\text{L}$  Proben wurden nach den entsprechenden Zeitintervallen entnommen, auf 10  $\mu\text{L}$  mit DEPC Wasser verdünnt und bei -20 °C bis zu Analyse aufbewahrt.

Bei der Verwendung der anderen Aktivatoren wurde auf gleiche Weise vorgegangen, nur das GSH entsprechend ersetzt.

### 4.12.2. Isolation des Alkylierungsprodukts aus PNA2-32 und RNA2 mittels HPLC

Für die Isolation des Alkylierungsprodukts aus **PNA2-32** und **RNA2** wurde wie bei „Bestrahlung und Inkubation der Konjugate mit RNA“ vorgegangen, mit einer höheren Konzentration von **PNA2-32** (20  $\mu\text{M}$ ) und **RNA2** (10  $\mu\text{M}$ ) in einem Endvolumen von 120  $\mu\text{L}$ . Nach 24 h wurde die Probe mittels HPLC getrennt. Die Fraktion, die das Alkylierungsprodukt enthielt, wurde gesammelt und durch einen zweiten HPLC-Lauf entsalzt. Der Eluent wurde anschließend in einem Vakuumkonzentrator entfernt und der Rückstand mittels MALDI-MS charakterisiert.

#### HPLC-Bedingungen:

**Präparativ:** Phenomenex Synergi 10  $\mu\text{m}$  Hydro-RP 80A HPLC Säule 250 x 4.6 mm, 4 min 10 % MeCN, linearer Gradient von 10–50 % MeCN in 0.1 M TEAA Puffer (pH 7.0) für 36 min, 1 mL/min, 50 °C.

**Entsalzung:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , 4 min 0 % MeCN, linearer Gradient von 0–70 % MeCN in DEPC Wasser für 2 min, 4 min 70 % MeCN, 2 mL/min, 254 nm, 30 °C.

**MS (MALDI)**  $m/z = 17377.47$  [M+H<sup>+</sup>], ber. für  $\text{C}_{583}\text{H}_{735}\text{N}_{211}\text{O}_{334}\text{P}_{43} + \text{H}^+$ : 17375.17

### 4.12.3. Isolation des Alkylierungsprodukts aus PNA1-32 und RNA1 mittels dPAGE und *in-line Probing*

Für die Isolation des Alkylierungsprodukts wurde wie bei „Bestrahlung und Inkubation der Konjugate mit RNA“ vorgegangen, mit höheren Konzentrationen von **PNA1-32** (24  $\mu\text{M}$ ) und **RNA1** (12  $\mu\text{M}$ ) in einem Endvolumen von 92  $\mu\text{L}$ . Nach 72 h wurde die Probe mittels denaturierender

## 4. Experimenteller Teil

---

PAGE (16 % Acrylamid, 7 M Harnstoff) getrennt. Die Band des Alkylierungsprodukts wurde mittels *UV shadowing* sichtbar gemacht und aus dem Gel geschnitten. Das Gelstück wurde zerkleinert und in Elutionspuffer (500 mM Natriumacetat (pH 5.2), 1 % SDS, 1 mM EDTA) für 16 h inkubiert. Die Probe wurde durch „Quantum Prep Freeze'N Squeeze“ *spin columns* gefiltert und das Alkylierungsprodukt durch EtOH bei -20 °C gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt und das Pellet in DEPC-Wasser gelöst.

Für das *in-line probing* wurde das isolierte Alkylierungsprodukt für 20 h bei 37 °C in MgCl<sub>2</sub>-Puffer inkubiert (3 µM Alkylierungsprodukt, 50 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, pH 8.3) mithilfe des ALFexpress™ analysiert (270 x 310 mm Gelkassette).

Das *in-line Probing* von **PNA1-32** und **RNA1** ohne vorherige Alkylierung sowie von **RNA1** wurde von Dr. Ute Scheffer durchgeführt.

### 4.13. Schmelzkurven

Für die Messung der Schmelzkurven wurden 1 µM Konjugat, 1 µM RNA (Cy5 markiert), 130 mM MES Puffer (pH 7.0), 130 mM NaCl in einem Endvolumen von 1000 µL gemischt. Die Messung erfolgte mit einem Jasco V-650 Spectrophotometer bei 260 nm bei einer Heizrate von 0.5 °C pro Minute. Die Messung von **RNA1** erfolgte ebenfalls bei 1 µM.

### 4.14. Beeinträchtigung der Selbstadduktbildung von PNA1-32 durch GSH oder DTT

Eine Lösung aus 20 µM **PNA1-32**, 130 mM MES Puffer (pH 7.0), 130 mM NaCl und 10 mM GSH oder 10 mM DTT mit einem Endvolumen von 20 µL wurden in einem Eppendorfgemisch und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Probe mittels HPLC analysiert.

HPLC Bedingungen: Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5 µm, linearer Gradient von 7–40 % MeCN in 0.1 M TEAA Puffer (pH 7.0) für 10 min, 2 mL/min, 50 °C, 260 nm.

### 4.15. Experimente mit HeLa-Zelllysat und *Pulldown*

Das verwendete „HeLa S3“-Zelllysat wurde von Frau Elisabeth Kalden und Frau Ute Scheffer hergestellt.<sup>[211]</sup>

### 4.15.1. Stabilität in Zelllysate

Es wurden Zelllysate (28  $\mu\text{L}$ ), 130 mM MES Puffer (pH 7.0) und 8  $\mu\text{M}$  Konjugat in einem Endvolumen von 55  $\mu\text{L}$  gemischt und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

**HPLC-Bedingungen:** Phenomenex Gemini C18, 150 x 4.6, 5  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient von 7–40 % MeCN in 0.1 M TEAA Puffer (pH 7.0) für 10 min, 2 mL/min, 50 °C, 260 nm.

### 4.15.2. Pulldown von RNA1 mit PNA6-69

Eine Lösung aus 2  $\mu\text{M}$  **PNA6-69**, 1  $\mu\text{M}$  **RNA3** (Cy5 markiert), 80 mM SSPE Puffer (pH 8.0) mit einem Endvolumen von 20  $\mu\text{L}$  wurden in einem Eppendorfgemisch, für 2 min bestrahlt und bei 37 °C für 72 h inkubiert. Eine zweite Probe wurde auf die gleiche Art vorbereitet, mit der Ausnahme, dass diese nicht bestrahlt wurde.

200  $\mu\text{L}$  *Magnetic Beads* (Promega, Ladekapazität 0.75 pmol/ $\mu\text{L}$ ) wurden dreimal mit jeweils 200  $\mu\text{L}$  80 mM SSPE Puffer (pH 8.0) gewaschen. Die Beads wurden in zwei Eppendorfgemische (DNA LoBind) aufgeteilt und die Lösung durch die inkubierten Proben ersetzt. Die Beads wurden dann für weitere 3 h geschüttelt. Die *Beads* wurden erneut mit 100  $\mu\text{L}$  80 mM SSPE Puffer (pH 8) gewaschen. Nun wurde zu jedem Eppendorfgemische 95  $\mu\text{L}$  SSPE Puffer (pH 8.0) und 5  $\mu\text{L}$  NaOH 0.1 M gegeben und die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Fluoreszenz des Überstandes mithilfe eines Tecan Safire II Platten-Readers gemessen.

### 4.15.3. Pulldown mit Lysate

In zwei Eppendorfgemischen (DNA LoBind) wurden jeweils 30  $\mu\text{L}$  *Magnetic Beads* (Promega, Ladekapazität 0.75 pmol/ $\mu\text{L}$ ) dreimal mit jeweils 100  $\mu\text{L}$  80 mM SSPE Puffer (pH 8) gewaschen. Dann wurde in jedes Eppendorfgemisch 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus 80 mM SSPE Puffer (pH 8) und **PNA6-69** (9.7  $\mu\text{M}$ ) gegeben und die Proben für 72 h auf einem Schüttelblock inkubiert. Die *Beads* wurden dreimal mit je 100  $\mu\text{L}$  MES (100 mM, pH 7.0) gewaschen und zu jedem Eppendorfgemischen 300  $\mu\text{L}$  Zelllysate und 75  $\mu\text{L}$  MES-Puffer (500 mM, pH 7.0, Endkonzentration 100 mM) gegeben. Die Proben wurden dann für 2 min bestrahlt, wobei nach 1 min die Lösung durch Invertieren gemischt wurde. Eine Probe wurde für 4 Stunden, die andere für 24 Stunden bei RT auf einem Schüttelblock inkubiert. Die *Beads* wurden dann jeweils dreimal mit 80 mM SSPE Puffer (pH 8.0) gewaschen, mit 6  $\mu\text{L}$  2x Laemmli-Puffer (100 mM Tris·HCl pH 6.8, 20 % Glycerin 4 % SDS, 200 mM DTT, 0.1 % Bromphenolblau) versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt.

#### 4. Experimenteller Teil

---

Der folgende Teil wurde von Mathias Bolz durchgeführt:

Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE (8 % Acrylamid, 120 V) analysiert und auf eine PVDF Membran bei 8 W für 30 min transferiert. Die Membran wurde mit 10 % Roti-Block über Nacht bei 4 °C blockiert. Danach wurde die Membran mit dem Primär-Antikörper (Sino Biological, 11079-T36) 1:400 verdünnt in TBS-Puffer mit 10 % Roti-Block inkubiert. Woraufhin die Membran dreimal mit TBS-Puffer mit 0.1 % *Tween 20* gewaschen wurde und der farbstoffmarkierte Sekundär-Antikörper (ThermoFisher Scientific, 35563) in 1:1000 verdünnt hinzugegeben wurde. Die Fluoreszenz wurde auf einem FUSION Xpress™ Multi-Imaging System detektiert.<sup>[211]</sup>

### 5. Anhang

#### 5.1. Abkürzungsverzeichnis

äq	Äquivalente
Ac	Acetyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
cHex	Cyclohexan
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	et alii
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
J	Kopplungskonstante
Lit.	Literatur
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Me	Methyl
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
miRISC	<i>RNA-induced silencing complexe</i>
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA

## 5. Anhang

---

MS	Massenspektrometrie
NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PNA	Peptidnukleinsäure
ppm	<i>parts per million</i>
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	small interfering RNA
Smp	Schmelzpunkt
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilan
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	time of flight
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vs	versus

### 5.2. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [2] J. Drews, *Science* **2000**, *287*, 1960–1964.
- [3] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [4] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, *337*, 816–821.
- [5] P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, *Cell* **2014**, *157*, 1262–1278.
- [6] Y. Li, K. V. Kowdley, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2012**, *10*, 246–253.
- [7] M. Al Mahroos, M. Yaar, T. J. Phillips, J. Bhawan, B. A. Gilchrest, *Arch. Dermatol.* **2002**, *138*, 1480–1485.
- [8] J. Imig, A. Brunschweiler, A. Brümmer, B. Guennewig, N. Mittal, S. Kishore, P. Tsikrika, A. P. Gerber, M. Zavolan, J. Hall, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 107–114.
- [9] Y. Matsuyama, A. Yamayoshi, A. Kobori, A. Murakami, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1003–1007.
- [10] D. A. Galton, L. G. Israels, J. D. Nabarro, M. Till, *Br. Med. J.* **1955**, *2*, 1172–1176.
- [11] H. Wang, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 44–60.
- [12] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498.
- [13] A. M. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. den Hartog, P. H. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry* **1985**, *24*, 707–713.
- [14] Z. Suo, S. J. Lippard, K. A. Johnson, *Biochemistry* **1999**, *38*, 715–726.
- [15] Y. Corda, C. Job, M. F. Anin, M. Leng, D. Job, *Biochemistry* **1991**, *30*, 222–230.
- [16] A. M. Burger, J. A. Double, D. R. Newell, *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 638–644.
- [17] K. Stevens, A. Madder, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1555–1565.
- [18] L. L. G. Carrette, E. Gyssels, N. de Laet, A. Madder, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1539–1554.
- [19] M. op de Beeck, A. Madder, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796–807.
- [20] L. L. G. Carrette, E. Gyssels, J. Loncke, A. Madder, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 931–935.
- [21] J. Elskens, A. Manicardi, V. Costi, A. Madder, R. Corradini, *Molecules* **2017**, *22*.
- [22] J. Sun, X. Tang, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10473.
- [23] F. Nagatsugi, K. Uemura, S. Nakashima, M. Maeda, S. Sasaki, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 421–424.
- [24] M. M. Ali, M. Oishi, F. Nagatsugi, K. Mori, Y. Nagasaki, K. Kataoka, S. Sasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3136–3140.
- [25] F. Nagatsugi, T. Kawasaki, D. Usui, M. Maeda, S. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6753–6754.

- [26] S. Imoto, T. Hori, S. Hagihara, Y. Taniguchi, S. Sasaki, F. Nagatsugi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6121–6124.
- [27] S. Hagihara, S. Kusano, W.-C. Lin, X.-G. Chao, T. Hori, S. Imoto, F. Nagatsugi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3870–3872.
- [28] S. Kusano, T. Haruyama, S. Ishiyama, S. Hagihara, F. Nagatsugi, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3951–3954.
- [29] B. Barker, L. Diao, P. Wan, *J. Photoch. Photobio. A* **1997**, *104*, 91–96.
- [30] M. M. Toteva, J. P. Richard, *Adv. Phys. Org. Chem.* **2011**, *45*, 39–91.
- [31] D. C. Thompson, Y. N. Cha, M. A. Trush, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3957–3965.
- [32] M. Di Antonio, F. Doria, M. Mella, D. Merli, A. Profumo, M. Freccero, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8354–8360.
- [33] E. Modica, R. Zanaletti, M. Freccero, M. Mella, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 41–52.
- [34] W. F. Veldhuyzen, Y. F. Lam, S. E. Rokita, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1345–1351.
- [35] M. G. Willcockson, M. M. Toteva, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 3579–3585.
- [36] F. Dufrasne, M. Gelbcke, J. Neve, R. Kiss, J.-L. Kraus, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3995–4011.
- [37] S. Sreeramulu, S. L. Gande, M. Göbel, H. Schwalbe, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5967–5969.
- [38] J. L. Bolton, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 61–69.
- [39] P. W. Fan, F. Zhang, J. L. Bolton, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 45–52.
- [40] M. M. Marques, F. A. Beland, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1949–1954.
- [41] T. Li, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7771–7773.
- [42] P. Pande, J. Shearer, J. Yang, W. A. Greenberg, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6773–6779.
- [43] E. E. Weinert, K. N. Frankenfield, S. E. Rokita, *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1364–1370.
- [44] Y. Liu, S. E. Rokita, *Biochemistry* **2012**, *51*, 1020–1027.
- [45] E. E. Weinert, R. Dondi, S. Colloredo-Melz, K. N. Frankenfield, C. H. Mitchell, M. Freccero, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11940–11947.
- [46] C. Huang, S. E. Rokita, *Front. Chem. Sci. Eng.* **2016**, *10*, 213–221.
- [47] X. Weng, L. Ren, L. Weng, J. Huang, S. Zhu, X. Zhou, L. Weng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8020–8023.
- [48] P. Wang, R. Liu, X. Wu, H. Ma, X. Cao, P. Zhou, J. Zhang, X. Weng, X.-L. Zhang, J. Qi et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1116–1117.
- [49] F. Doria, S. N. Richter, M. Nadai, S. Colloredo-Mels, M. Mella, M. Palumbo, M. Freccero, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6570–6579.
- [50] D. Verga, S. N. Richter, M. Palumbo, R. Gandolfi, M. Freccero, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 233–235.
- [51] F. M. H. de Groot, A. C. W. de Bart, J. H. Verheijen, H. W. Scheeren, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5277–5283.

- [52] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, H. Zhao, Y. H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Guan, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3657–3667.
- [53] P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479–480.
- [54] M. P. Hay, B. M. Sykes, W. A. Denny, C. J. O'Connor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2759–2770.
- [55] R. A. McBride, E. R. Gillies, *Macromolecules* **2013**, *46*, 5157–5166.
- [56] F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 4490–4494.
- [57] R. Weinstein, P. S. Baran, D. Shabat, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1783–1791.
- [58] K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas, D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 716–720.
- [59] S. Y. Kim, J.-I. Hong, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3109–3112.
- [60] J. Kim, J. Park, H. Lee, Y. Choi, Y. Kim, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9353–9356.
- [61] H. Zhang, C. Xu, J. Liu, X. Li, L. Guo, X. Li, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7031–7034.
- [62] X. Wu, L. Li, W. Shi, Q. Gong, H. Ma, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 14728–14732.
- [63] M. Yoda, T. Kawamata, Z. Paroo, X. Ye, S. Iwasaki, Q. Liu, Y. Tomari, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 17–23.
- [64] L. He, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531.
- [65] X. Bofill-De Ros, A. Yang, S. Gu, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2020**, *1863*, 194373.
- [66] T. J. Cui, C. Joo, *RNA Biol.* **2019**, *16*, 1093–1107.
- [67] A. G. Telonis, P. Loher, Y. Jing, E. Londin, I. Rigoutsos, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 9158–9175.
- [68] K. Nishikura, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 83–96.
- [69] J. G. Ruby, C. H. Jan, D. P. Bartel, *Nature* **2007**, *448*, 83–86.
- [70] Y. Hu, S.-S. Rao, Z.-X. Wang, J. Cao, Y.-J. Tan, J. Luo, H.-M. Li, W.-S. Zhang, C.-Y. Chen, H. Xie, *Theranostics* **2018**, *8*, 169–184.
- [71] S. Rüegger, H. Großhans, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 436–446.
- [72] M. H. Sohel, *Achiev. Life Sci.* **2016**, *10*, 175–186.
- [73] K. Bohmert, I. Camus, C. Bellini, D. Bouchez, M. Caboche, C. Benning, *EMBO J.* **1998**, *17*, 170–180.
- [74] J. Höck, G. Meister, *Genome Biol.* **2008**, *9*, 210.
- [75] M. Jinek, J. A. Doudna, *Nature* **2009**, *457*, 405–412.
- [76] S. Mi, T. Cai, Y. Hu, Y. Chen, E. Hodges, F. Ni, L. Wu, S. Li, H. Zhou, C. Long et al., *Cell* **2008**, *133*, 116–127.
- [77] W. R. Becker, B. Ober-Reynolds, K. Jouravleva, S. M. Jolly, P. D. Zamore, W. J. Greenleaf, *Mol. Cell* **2019**, *75*, 741–755.

- [78] E. Elkayam, C.-D. Kuhn, A. Tocilj, A. D. Haase, E. M. Greene, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Cell* **2012**, *150*, 100–110.
- [79] A. Eulalio, E. Huntzinger, E. Izaurralde, *Cell* **2008**, *132*, 9–14.
- [80] C. P. Petersen, M.-E. Bordeleau, J. Pelletier, P. A. Sharp, *Mol. Cell* **2006**, *21*, 533–542.
- [81] R. S. Pillai, S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, W. Filipowicz, *Science* **2005**, *309*, 1573–1576.
- [82] T. Fukaya, H.-O. Iwakawa, Y. Tomari, *Mol. Cell* **2014**, *56*, 67–78.
- [83] T. P. Chendrimada, K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli, R. Shiekhattar, *Nature* **2007**, *447*, 823–828.
- [84] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, E. Izaurralde, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1885–1898.
- [85] E. Elkayam, C. R. Faehnle, M. Morales, J. Sun, H. Li, L. Joshua-Tor, *Mol. Cell* **2017**, *67*, 646–658.
- [86] L. M. Alemán, J. Doench, P. A. Sharp, *RNA* **2007**, *13*, 385–395.
- [87] C. D. Sedano, P. Sarnow, *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 257–264.
- [88] J. M. Luna, T. K. H. Scheel, T. Danino, K. S. Shaw, A. Mele, J. J. Fak, E. Nishiuchi, C. N. Takacs, M. T. Catanese, Y. P. de Jong et al., *Cell* **2015**, *160*, 1099–1110.
- [89] J. Sheu-Gruttadauria, P. Pawlica, S. M. Klum, S. Wang, T. A. Yario, N. T. Schirle Oakdale, J. A. Steitz, I. J. MacRae, *Mol. Cell* **2019**, *75*, 1243–1255.
- [90] F. Fuchs Wightman, L. E. Giono, J. P. Fededa, M. de La Mata, *Front. Genet.* **2018**, *9*, 435.
- [91] D. E. Golden, V. R. Gerbasi, E. J. Sontheimer, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 309–312.
- [92] D. M. Ozata, I. Gainetdinov, A. Zoch, D. O'Carroll, P. D. Zamore, *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 89–108.
- [93] D. J. Gary, N. Puri, Y.-Y. Won, *J. Control. Release*, **2007**, *121*, 64–73.
- [94] S. Oliveira, I. van Rooy, O. Kranenburg, G. Storm, R. M. Schiffelers, *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 211–214.
- [95] A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561–569.
- [96] J.-P. Vert, N. Foveau, C. Lajaunie, Y. Vandenbrouck, *BMC Bioinform.* **2006**, *7*, 520.
- [97] Y. Pei, T. Tuschl, *Nat. Methods*. **2006**, *3*, 670–676.
- [98] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols et al., *RNA* **2006**, *12*, 1197–1205.
- [99] D. W. Bartlett, M. E. Davis, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 322–333.
- [100] J. F. Alterman, B. M. D. C. Godinho, M. R. Hassler, C. M. Ferguson, D. Echeverria, E. Sapp, R. A. Haraszti, A. H. Coles, F. Conroy, R. Miller et al., *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 884–894.
- [101] P. E. Saw, E.-W. Song, *Sci. China Life Sci.* **2020**, *63*, 485–500.

- [102] M. Thomas, K. Lange-Grünweller, E. Dayyoub, U. Bakowsky, U. Weirauch, A. Aigner, R. K. Hartmann, A. Grünweller, *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1088–1098.
- [103] M. M. Fabani, M. J. Gait, *RNA* **2007**, *14*, 336–346.
- [104] E. Brognara, E. Fabbri, F. Aimi, A. Manicardi, N. Bianchi, A. Finotti, G. Breveglieri, M. Borgatti, R. Corradini, R. Marchelli et al., *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 2119–2127.
- [105] M. F. Schmidt, O. Korb, C. Abell, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2122–2126.
- [106] A. Gupta, E. Quijano, Y. Liu, R. Bahal, S. E. Scanlon, E. Song, W.-C. Hsieh, D. E. Braddock, D. H. Ly, W. M. Saltzman et al., *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *9*, 111–119.
- [107] T. Soudah, S. Khawaled, R. I. Aqeilan, E. Yavin, *ACS Omega* **2019**, *4*, 13954–13961.
- [108] Y. Liu, Y. Han, H. Zhang, L. Nie, Z. Jiang, P. Fa, Y. Gui, Z. Cai, W. C. S. Cho, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52280.
- [109] J. A. Barltrop, P. J. Plant, P. Schofield, *Chem. Commun.* **1966**, 822–823.
- [110] C. G. Bocheta, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142.
- [111] D. Y. Wong, T. Ranganath, A. M. Kasko, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139307.
- [112] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491–496.
- [113] M. Bojtár, A. Kormos, K. Kis-Petik, M. Kellermayer, P. Kele, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 9410–9414.
- [114] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [115] F. M. Rossi, M. Margulis, C.-M. Tang, J. P. Y. Kao, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32933–32939.
- [116] G. C. R. Ellis-Davies, R. J. Barsotti, *Cell Calcium* **2006**, *39*, 75–83.
- [117] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [118] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328–1332.
- [119] B. Wang, R. I. Kitney, N. Joly, M. Buck, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 508.
- [120] M. E. Schwartz, R. R. Breaker, G. T. Asteriadis, J. S. deBear, G. R. Gough, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1019–1024.
- [121] J. Houk, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6825–6836.
- [122] M. Deponte, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3217–3266.
- [123] J. Kerr, J. L. Schlosser, D. R. Griffin, D. Y. Wong, A. M. Kasko, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2822–2829.
- [124] B. Packard, M. Edidin, A. Komoriya, *Biochemistry* **1986**, *25*, 3548–3552.
- [125] E. A. Hoyt, P. M. S. D. Cal, B. L. Oliveira, G. J. L. Bernardes, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 147–171.
- [126] H. Saneyoshi, K. Kondo, N. Sagawa, A. Ono, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 622–625.
- [127] H. Saneyoshi, T. Ohta, Y. Hiyoshi, T. Saneyoshi, A. Ono, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 862–866.
- [128] A. Choi, S. C. Miller, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1346–1349.
- [129] I. Ojima, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 108–119.
- [130] M. H. Lee, J. Y. Kim, J. H. Han, S. Bhuniya, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12668–12674.

- [131] S. Santra, C. Kaittanis, O. J. Santiesteban, J. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16680–16688.
- [132] Q. Zhou, S. E. Rokita, *PNAS* **2003**, *100*, 15452–15457.
- [133] M. G. Peter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 555–570.
- [134] S. R. Byrne, K. Yang, S. E. Rokita, *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32*, 917–925.
- [135] L.-C. Lo, Y.-L. Chiang, C.-H. Kuo, H.-K. Liao, Y.-J. Chen, J.-J. Lin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *326*, 30–35.
- [136] J. Jiang, D. Zeng, S. Li, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 635–638.
- [137] J. Liu, S. Li, N. A. Aslam, F. Zheng, B. Yang, R. Cheng, N. Wang, S. Rozovsky, P. G. Wang, Q. Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9458–9462.
- [138] S. Arumugam, J. Guo, N. E. Mbua, F. Friscourt, N. Lin, E. Nekongo, G.-J. Boons, V. V. Popik, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1591–1598.
- [139] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628–1644.
- [140] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [141] H. Isobe, T. Fujino, *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 41–51.
- [142] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [143] Y. Miyajima, T. Ishizuka, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2657–2662.
- [144] J.-C. Wu, Q.-C. Meng, H.-M. Ren, H.-T. Wang, J. Wu, Q. Wang, *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38*, 798–805.
- [145] N. J. Peffer, J. C. Hanvey, J. E. Bisi, S. A. Thomson, C. F. Hassman, S. A. Noble, L. E. Babiss, *PNAS* **1993**, *90*, 10648–10652.
- [146] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310–1313.
- [147] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5–23.
- [148] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull et al., *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 175–183.
- [149] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. Fred Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe et al., *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179–6194.
- [150] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat Struct Mol Biol* **1996**, *3*, 410–413.
- [151] S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science* **1994**, *265*, 777–780.
- [152] A. Kiliszek, K. Banaszak, Z. Dauter, W. Rypniewski, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1937–1943.
- [153] H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*, 98–101.
- [154] F. Totsingan, R. Marchelli, R. Corradini, *Artif. DNA PNA XNA* **2011**, *2*, 16–22.

- [155] A. Sen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3367–3374.
- [156] V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 62–71.
- [157] M. Egholm, L. Christensen, K. L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 217–222.
- [158] P. E. Nielsen, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 105–110.
- [159] G. Devi, Z. Yuan, Y. Lu, Y. Zhao, G. Chen, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 4008–4018.
- [160] T. Zengeya, P. Gupta, E. Rozners, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12761–12764.
- [161] T. Endoh, D. Hnedzko, E. Rozners, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 899–903.
- [162] C. Annoni, T. Endoh, D. Hnedzko, E. Rozners, N. Sugimoto, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7935–7938.
- [163] P. Gupta, T. Zengeya, E. Rozners, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11125–11127.
- [164] A. B. Eldrup, O. Dahl, P. E. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11116–11117.
- [165] Y. Kirillova, N. Boyarskaya, A. Dezhnevov, M. Tankevich, I. Prokhorov, A. Varizhuk, S. Eremin, D. Esipov, I. Smirnov, G. Pozmogova, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140468.
- [166] C. Avitabile, L. Moggio, G. Malgieri, D. Capasso, S. Di Gaetano, M. Saviano, C. Pedone, A. Romanelli, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35774.
- [167] R. Mitra, K. N. Ganesh, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5696–5704.
- [168] A. Dragulescu-Andrasi, P. Zhou, G. He, D. H. Ly, *Chem. Commun.* **2005**, 244–246.
- [169] T. Sugiyama, Y. Imamura, Y. Demizu, M. Kurihara, M. Takano, A. Kittaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7317–7320.
- [170] B. Sahu, I. Sacui, S. Rapireddy, K. J. Zanotti, R. Bahal, B. A. Armitage, D. H. Ly, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5614–5627.
- [171] J. J. Turner, G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6837–6849.
- [172] S. Y. Oh, Y. Ju, S. Kim, H. Park, *Oligonucleotides* **2010**, *20*, 225–230.
- [173] H. Dong, J. Lei, L. Ding, Y. Wen, H. Ju, X. Zhang, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6207–6233.
- [174] J.-E. Hornung, *Synthese von Chinonmethid-PNA-Konjugaten zur Fixierung komplementärer Ziel-RNAs*, **2015**.
- [175] H.-J. Li, Y.-Y. Wu, Q.-X. Wu, R. Wang, C.-Y. Dai, Z.-L. Shen, C.-L. Xie, Y.-C. Wu, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3100–3107.
- [176] K. Matsumura, M. Endo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2019–2020.
- [177] a) G. Kovács, Z. Timár, Z. Kupihár, Z. Kele, L. Kovács, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1266–1270; b) Y. Wei, M. Marino, B. Thompson, J. E. Girard, *J. Chromatogr. A* **1999**, *864*, 49–57.
- [178] A. J. Tackett, D. R. Corey, K. D. Raney, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 950–957.

- [179] F. Danneberg, A. Ghidini, P. Dogandzhiyski, E. Kalden, R. Strömberg, M. W. Göbel, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 493–498.
- [180] U. Scheffer, A. Strick, V. Ludwig, S. Peter, E. Kalden, M. W. Göbel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2211–2217.
- [181] T. Maniatis, A. Jeffrey, H. van deSande, *Biochemistry* **1975**, *14*, 3787–3794.
- [182] H. Perry-O'Keefe, X.-W. Yao, J. M. Coull, M. Fuchs, M. Egholm, *PNAS* **1996**, *93*, 14670–14675.
- [183] P. J. A. Cock, T. Antao, J. T. Chang, B. A. Chapman, C. J. Cox, A. Dalke, I. Friedberg, T. Hamelryck, F. Kauff, B. Wilczynski et al., *Bioinformatics (Oxford, England)* **2009**, *25*, 1422–1423.
- [184] H. T. Allawi, J. SantaLucia, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10581–10594.
- [185] U. Giesen, W. Kleider, C. Berding, A. Geiger, H. Orum, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5004–5006.
- [186] A. Kundu, J. Schauss, B. P. Fingerhut, T. Elsaesser, *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124*, 2132–2138.
- [187] R. Lorenz, S. H. Bernhart, C. Höner Zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, P. F. Stadler, I. L. Hofacker, *Algorithms Mol. Biol.* **2011**, *6*, 26.
- [188] T. Tedeschi, A. Tonelli, S. Sforza, R. Corradini, R. Marchelli, *Artif. DNA PNA XNA* **2010**, *1*, 83–89.
- [189] A. Guttman, N. Cooke, *J. Chromatogr. A* **1991**, *559*, 285–294.
- [190] J. Rabinä, M. Mäki, E. M. Savilahti, N. Järvinen, L. Penttilä, R. Renkonen, *Glycoconj. J.* **2001**, *18*, 799–805.
- [191] C. Percivalle, A. La Rosa, D. Verga, F. Doria, M. Mella, M. Palumbo, M. Di Antonio, M. Freccero, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3096–3106.
- [192] L. Moody, S. Dvoretzkiy, R. An, S. Mantha, Y.-X. Pan, *Cancers* **2019**, *11*.
- [193] K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, J. T. Mendell, *Nature* **2005**, *435*, 839–843.
- [194] K. Conkrite, M. Sundby, S. Mukai, J. M. Thomson, D. Mu, S. M. Hammond, D. MacPherson, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1734–1745.
- [195] P. Mestdagh, A.-K. Boström, F. Impens, E. Fredlund, G. van Peer, P. de Antonellis, K. von Stedingk, B. Ghesquière, S. Schulte, M. Dews et al., *Mol. Cell* **2010**, *40*, 762–773.
- [196] D. Miyamoto, M. Murayama, *Neurosci. Res.* **2016**, *103*, 1–9.
- [197] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760.
- [198] J.-S. Zheng, H.-K. Cui, G.-M. Fang, W.-X. Xi, L. Liu, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 511–515.
- [199] A. Semenyuk, A. Földesi, T. Johansson, C. Estmer-Nilsson, P. Blomgren, M. Brännvall, L. A. Kirsebom, M. Kwiatkowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12356–12357.
- [200] J. D. Albright, L. Goldman, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2416–2423.
- [201] F. G. Bordwell, B. M. Pitt, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 572–577.

- [202] K.-S. Masters, A. Bihlmeier, W. Klopper, S. Bräse, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17827–17835.
- [203] a) T. Iwasaki, Y. Miyata, R. Akimoto, Y. Fujii, H. Kuniyasu, N. Kambe, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9260–9263; b) H.-L. Li, M. Kanai, Y. Kuninobu, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5944–5947; c) C.-V. T. Vo, T. A. Mitchell, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14082–14089.
- [204] K. Sato, S. Inoue, K. Ozawa, M. Tazaki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 2715–2719.
- [205] P. Claus, *Monatsh. Chem.* **1968**, *99*, 1034–1044.
- [206] T. Benneche, P. Strande, K. Undheim, *Synthesis* **1983**, *1983*, 762–763.
- [207] T. Benneche, K. Undheim, I.-M. Åstrand, J.-E. Berg, T. W. Dingle, R. V. Williams, R. Mahedevan, *Acta Chem. Scand.* **1983**, *37b*, 93–96.
- [208] K. F. Morgan, I. A. Hollingsworth, J. A. Bull, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5265–5272.
- [209] a) G. Y. Kreitman, J. C. Danilewicz, D. W. Jeffery, R. J. Elias, *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *65*, 2564–2571; b) C. Esmieu, M. Orio, L. Le Pape, C. Lebrun, J. Pécaut, S. Ménage, S. Torelli, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 6208–6217.
- [210] P. K. Pallela, T. Chiku, M. J. Carvan, D. S. Sem, *Anal. Biochem.* **2006**, *352*, 265–273.
- [211] M. Bolz, L. Thomas, U. Scheffer, E. Kalden, R. K. Hartmann, M. W. Göbel, *Chem. Biodivers.* **2020**, *17*, e2000272.
- [212] J. Sangster, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1111–1229.
- [213] E. Carbonnel, X. Pannecoucke, T. Besset, P. Jubault, T. Poisson, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2491–2493.
- [214] J. Cheng, W. R. Roush, *Org. Synth.* **2002**, *78*, 169.
- [215] C. Avitabile, L. Moggio, L. D. D'Andrea, C. Pedone, A. Romanelli, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3716–3718.
- [216] P. Dogandzhiyski, A. Ghidini, F. Danneberg, R. Strömberg, M. W. Göbel, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2514–2519.

### **5.3. Lebenslauf**

### 5.4. Publikationsliste

Jan-Erik Hornung, Nils Hellwig, Michael W Göbel, *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 639–645.

*“Peptide Nucleic Acid Conjugates of Quinone Methide Precursors Alkylate Ribonucleic Acid after Activation with Light.”*

### 5.5. Wissenschaftliche Vorträge

III. DNG-Doktorandenseminar, 22.–23.09.2016, Bad Herrenalb.

*„Sequenzspezifische Alkylierung von RNA durch photolabil geschützte Chinonmethide“*

### 5.6. Posterbeiträge

Summer School on Nucleic Acid Chemistry and Synthetic Biology, 28.07.–02.08.2019, Würzburg

Jan-Erik Hornung und Michael W. Göbel

*“Light-activatable PNA Conjugates of Quinone Methide Precursors for the Alkylation of RNA”*

### 5.7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

**„Photo- und redoxaktivierbare Chinonmethide zur Alkylierung von RNA“**

selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

Frankfurt am Main, den

Jan-Erik Hornung