



**Chemo-enzymatische Synthese
lichtaktivierbarer RNA
&
Synthese lichtregulierbarer Oligonukleotide zur
spektroskopischen Strukturaufklärung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Anja Blümmler
aus Dieburg

Frankfurt am Main, 2022
(D30)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Alexander Heckel angefertigt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation: 04.08.2022

Die Wissenschaft gibt mir eine teilweise Erklärung für das Leben. Soweit es geht, basiert es auf
Fakten, Erfahrungen und Experimenten.

Rosalind Franklin (Biochemikerin)

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Das wachsende Verständnis für das fein abgestimmte Zusammenspiel aus Struktur und Funktion von Nukleinsäuren resultiert aus unzähligen Forschungsprojekten. Forschende stehen dabei vor der Herausforderung, dass die zu untersuchenden Oligonukleotide sowohl modifiziert als auch in ausreichender Menge und Reinheit dargestellt werden müssen. Die chemische Festphasensynthese ist ein bewährtes Mittel zur Synthese hochmodifizierter DNA und RNA. Allerdings werden Oligonukleotide mit zunehmender Länge unzugänglicher, da die einzelnen Kupplungsreaktionen nicht quantitativ ablaufen, was zu schwer abtrennbaren Abbruchsequenzen führt. Hinzu kommt, dass während der chemischen Synthese harsche Reaktionsbedingungen nötig sind, denen die gewünschten Modifikationen standhalten müssen. (Chemo-) enzymatische Methoden können diese Hürden überwinden und somit den Zugang zu biologisch interessanten, längeren modifizierten Sequenzen ermöglichen. Jedoch erfolgt der enzymatische Einbau von Modifikationen ohne aufwendige Optimierung lediglich statistisch verteilt. Um weitere Erfolge im Bereich der Strukturaufklärung zu erzielen, werden somit Synthesemethoden benötigt, die sich zum positionsspezifischen Einbau von Modifikationen eignen und gleichzeitig den Zugang zu längeren Oligonukleotiden ermöglichen. Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion haben sich in den letzten Jahren lichtadressierbare Verbindungen als gefragte Modifikationen erwiesen. Der Einsatz von Licht als mildes, nicht-invasives Auslösesignal stellt besonders im biologischen Kontext eine interessante Herangehensweise dar. Um hochwertige Aussagen über das Verhalten von Oligonukleotiden in komplexer biologischer Umgebung machen zu können, muss durch die gezielte Platzierung lichtaktivierbarer Verbindungen ein effizientes AN/AUS-Verhältnis geschaffen werden. Der Einbau photolabiler Schutzgruppen erlaubt eine vorübergehende Beeinflussung der Oligonukleotidstruktur, die durch Abspaltung der Schutzgruppe irreversibel (re-) aktiviert werden kann. Im Gegensatz dazu ermöglicht der Einbau von Photoschaltern eine reversible Adressierbarkeit durch Isomerisierungsprozesse. Die Synthese komplexer gezielt-markierter Oligonukleotide erfolgt zumeist chemisch und ist daher längenlimitiert.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, beide Fragestellungen zu vereinen und eine chemo-enzymatische Methode zur RNA-Synthese zu untersuchen, die zum einen die positionsspezifische Modifizierung mit lichtaktivierbaren Einheiten erlaubt und darüber hinaus die Längenlimitierung der chemischen Festphasensynthese überkommt. Im Zentrum der Methode stehen drei enzymatische Reaktionsschritte zum Einbau von photolabil- und photoschaltbar-modifizierten Nukleosid-3',5'-Bisphosphaten: I) eine 3'-Verlängerung, in der die modifizierten Bisphosphate mit *T4* RNA Ligase 1 mit dem 3'-Ende einer RNA verknüpft werden; II) die Dephosphorylierung des 3'-Phosphats mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* und III) die Verknüpfung der 3'-terminal modifizierten RNA mit einem zweiten 5'-phosphorylierten RNA-Fragment, wodurch eine Gesamtsequenz mit gezielt platzierter Modifikation entsteht (Abb. I).

Im ersten Teilprojekt wurden in kollaborativer Arbeit zunächst benötigte photolabile NPE- und photoschaltbare Azobenzol-C-Nukleosid-3',5'-Bisphosphate synthetisiert und grundlegende Bedingungen der enzymatischen Reaktionen erarbeitet. Hierbei konnte der enzymatische Syntheseansatz erfolgreich in Lösung umgesetzt und der chemo-enzymatische Einbau aller synthetisierten Bausteine nachgewiesen werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Methode in eigenständigen Arbeiten weiterverfolgt, um den multiplen Einbau NPE-modifizierter

Nukleosid-3',5'-Bisphosphate in direkter Nachbarschaft sowie deren Einbau in DNA/RNA-Mixmere mit Phosphodiester- oder Phosphorthioatrückgrat zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Enzyme neben lichtaktivierbaren Modifikationen zusätzliche Anpassungen der Phosphateinheit sowie unterschiedliche Ribosebausteine in Kombination tolerieren. Da exogene RNA schnell von Exonukleasen abgebaut und somit unwirksam wird, werden zahlreiche stabilisierende Anpassungen an synthetischen RNAs vorgenommen. Zu den häufigsten zählen Phosphorthioate und Modifikationen der Ribose. Mit der erfolgreichen Modifikation der chimären Oligonukleotide eröffnet die erarbeitete Methode einen wichtigen Zugang zu therapeutisch interessanten Oligonukleotiden. Ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung biologisch relevanter Anwendungsmöglichkeiten konnte mit der Synthese, Charakterisierung und Umsetzung eines DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates (**pU^{DEACM}p**) errungen werden. Im Vergleich zur verwendeten NPE-Schutzgruppe ist das Absorptionsspektrum der DEACM-Schutzgruppe bathochrom-verschoben, was eine Abspaltung mit Wellenlängen > 400 nm erlaubt. Dadurch können Zellschäden vermieden und Oligonukleotide mit NPE- und DEACM-Modifikation wellenlängenselektiv angesprochen werden. Außerdem ist eine chemische Einführung eines DEACM-geschützten Uridins selbst unter UltraMILD-Bedingungen tückisch, da die photolabile Schutzgruppe bei der basischen Aufarbeitung nach erfolgter Synthese dazu neigt, hydrolytisch abgespalten zu werden. Somit konnte durch die erfolgreiche Ligation von **pU^{DEACM}p** eine Möglichkeit zum Einbau labiler Modifikationen gezeigt werden, die unter chemischen Bedingungen nicht zugänglich sind.

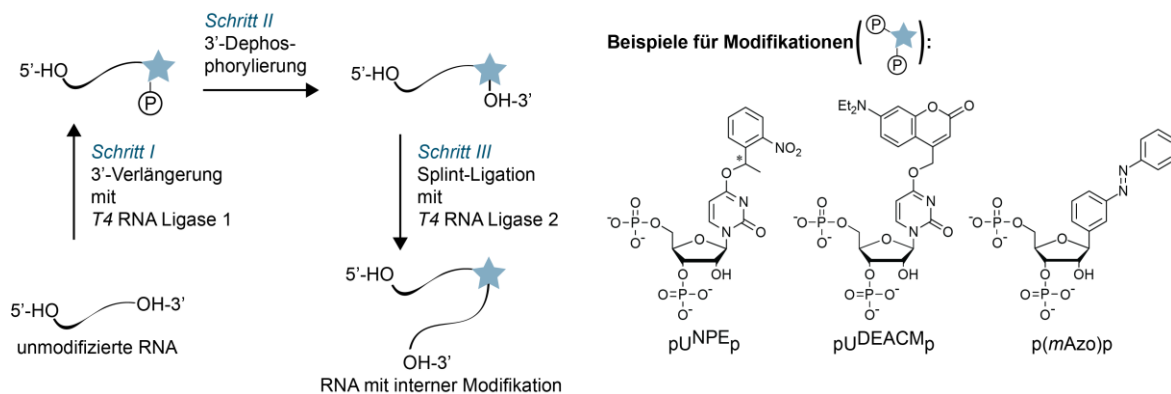


Abb. I: Drei chemo-enzymatische Reaktionsschritte zum Einbau modifizierter 3',5'-Bisphosphate (z.B. pU^{NPE}p, pU^{DEACM}p oder p(mAzo)p).

Das Hauptprojekt dieser Arbeit profitiert von den gesammelten Erkenntnissen des ersten Teilprojektes. Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen wurde die chemo-enzymatische Methode zur Synthese lichtaktivierbarer RNA auf ein Festphasen-basiertes System übertragen. Angelehnt an die chemische Festphasensynthese wurden Reagenzien im Überschuss eingesetzt, Waschschrte ermöglicht und zeitaufwendige Aufreinigungsschritte zwischen den einzelnen enzymatischen Reaktionen eingespart. Als Festphasensystem wurden magnetische Streptavidin Beads gewählt. Streptavidin weist eine besonders hohe Bindungsaffinität zu Biotin auf und eignet sich daher besonders gut zur Immobilisierung biotinylierter RNA. Zudem sind die Beads gegenüber vieler Reaktionsbedingungen stabil und dadurch vielseitig einsetzbar. Die Immobilisierung erfolgte über eine biotinylierte Start-RNA, die anschließend chemo-enzymatisch modifiziert wurde. Die zuvor erarbeiteten enzymatischen Reaktionen konnten ohne nennenswerte Einschränkung durch das gewählte Festphasensystem durchgeführt werden. Limitierungen wurden eher durch die begrenzte Akzeptanz der Ligasen hervorgerufen. Besonders Splint-Ligationen mit T4 RNA Ligase 2

zeigten eine starke Sequenzabhängigkeit, welche sich häufig als Nadelöhr eines Reaktionsverlaufes herausstellte. Durch die einfache Handhabung der Streptavidin Beads konnten die enzymatischen Reaktionen wiederholt durchgeführt werden. Ein linearer Syntheseverlauf zum Einbau mehrerer Modifikationen konnte realisiert werden. Dieses Vorgehen stellte sich allerdings als sehr zeitaufwendig heraus, da sich die Reaktionszeiten schnell aufsummieren. Zusätzlich litt die Gesamtausbeute darunter, dass einzelne Reaktionen besonders geringe Ausbeuten zeigten. Zur Optimierung wurden die drei enzymatischen Schlüsselschritte der chemo-enzymatischen Methode leicht abgewandelt. Zunächst wurden alle RNA-Fragmente in Lösung am 3'-Ende modifiziert. Anschließend wurde durch *T4* Polynukleotidkinase in einer simultanen Reaktion das 3'-Ende dephosphoryliert und die benötigte 5'-Phosphatgruppe eingeführt. Im weiteren Verlauf wurden die vorbereiteten modifizierten RNAs in Streptavidin-gebundenen Splint-Ligationen zu einer Gesamtsequenz mit mehreren internen Modifikationen verknüpft. Die 3'-Verlängerungen mit *T4* RNA Ligase 1 wurden parallel vorbereitet. Der Einbau der Modifikationen konnte durch Analyse der kürzeren Fragmente eindeutig bestätigt werden. In Festphasen-basierten Splint-Ligationen konnten erfolgreich mehrere NPE- und Azobenzol-Gruppen in eine RNA-Sequenz, angelehnt an die Sequenz der tRNA^{Met}, eingebaut und massenspektrometrisch bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass die erarbeitete Methode einen synthetischen Zugang zu längeren RNAs mit mehreren Modifikationen bietet, die durch die chemische Festphasensynthese nur schwer und unter großem Aufreinigungsaufwand zugänglich wären (Abb. II). Insgesamt konnten in verschiedenen Untersuchungen facettenreiche Möglichkeiten zum Einsatz der Methode gezeigt werden. Neben der Festphasen-basierten chemo-enzymatischen Synthese einer Sequenz, die sowohl eine photoschaltbare Azobenzol-Einheit als auch eine photolabile NPE-Schutzgruppe trägt, konnte die Synthese einer wellenlängenselektiv adressierbaren RNA mit NPE- und DEACM-Funktion erzielt und deren selektive Belichtung gezeigt werden. Die Methode eignet sich zusätzlich zum Einbau von Dinukleotiden mit photospaltbarem Zucker-Phosphatrückgrat, wodurch lichtinduzierte Strangbrüche herbeigeführt werden können. Zusammen mit Oliver Pereira konnte neben dem Einbau der photospaltbaren Dinukleotide auch eine rein enzymatische Zyklisierung von RNAs mit fragmentierbarem Rückgrat durch Ligationsreaktionen mit *T4* RNA Ligase 1 gezeigt werden. Dadurch ist eine Zyklisierung von RNA unter nahezu nativen Bedingungen möglich und der Einsatz zellschädigender Zusätze und Katalysatoren kann umgangen werden.

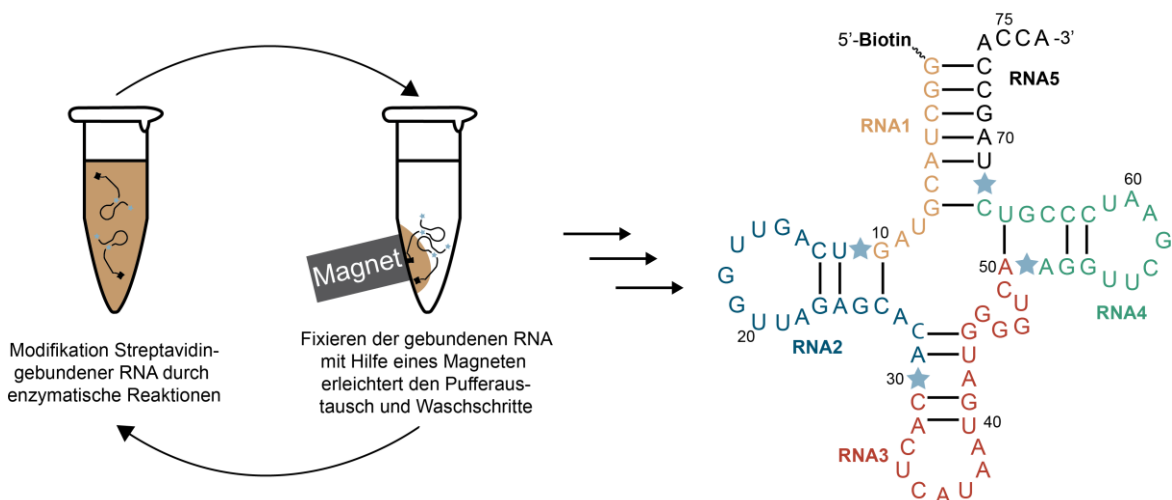


Abb. II: Die Festphasen-basierte chemo-enzymatische RNA-Synthese ermöglicht den Zugang zu längeren positionsspezifisch modifizierten RNAs.

Des Weiteren wurden im Rahmen verschiedener Kollaborationsarbeiten lichtaktivierbare Oligonukleotide hergestellt und charakterisiert. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten Kollaborationspartner wichtige Erkenntnisse zu Faltungsprozessen gewinnen. So konnte Dr. Tassilo Grün (AK Schwalbe) mit Hilfe verschiedener photolabil-geschützter DNA-Sequenzen wichtige Faltungswege und -dynamiken in der Ausbildung der G-Quadruplexstruktur der Guanosinreichen cMYC-Promoterregion aufdecken und zeigen, dass ein zusätzlicher fünfter G-reicher Abschnitt maßgeblich an deren Faltung und Umfaltung beteiligt ist (Abb. III). In Zusammenhang mit dieser Kollaboration wurden zwei weitere photolabil-geschützte DNA-Sequenzen aus der cMYC-Promotorregion mit zusätzlicher Inosin-Mutation synthetisiert, welche anschließend im AK Mittermaier (*Department of Chemistry, McGill University Montreal*) mittels NMR-Spektroskopie untersucht wurden. In einem weiteren kollaborativen Projekt wurden bistabile RNAs durch Einführung einer photolabilen Schutzgruppe in einer Konformation „gefangen“. Die lichtinduzierte Umfaltung durch Interaktion mit dem RNA-Chaperon StpA konnte von Katharina Hohmann (AK Fürtig) ebenfalls NMR-spektroskopisch analysiert werden. Zur CD-Charakterisierung minimaler G-Quadruplexmotive wurden Azobenzol-verbrückte DNA- und RNA-5mere hergestellt. Diese wurden von Dr. Chavdar Slavov und Florian Hurter (beide AK Wachtveitl) in CD-spektroskopischen Experimenten untersucht.

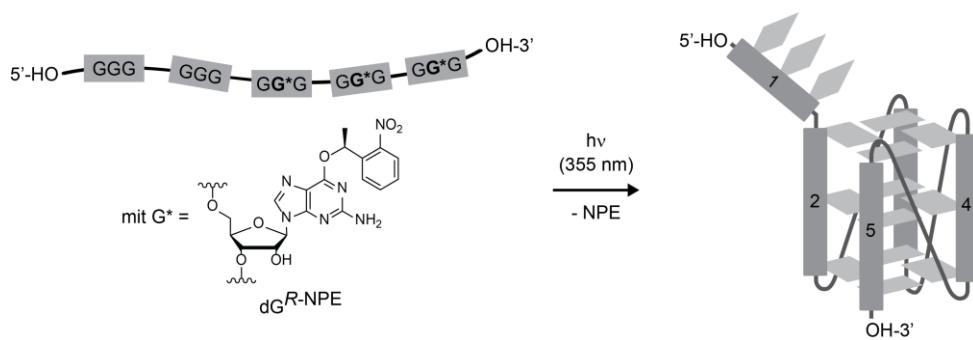


Abb. III: Schematische Darstellung der lichtinduzierten Ausbildung von Sekundärstrukturen, hier am Beispiel eines G-Quadruplexes.

Abstract

The growing understanding of the precisely tuned interplay between the structure and function of nucleic acids is the result of countless research projects. Researchers are faced with the challenge that the oligonucleotides to be studied must be both modified and prepared in sufficient quantity and purity. Chemical solid-phase synthesis is a well-established technique for the synthesis of highly modified DNA and RNA. Unfortunately, oligonucleotides become more inaccessible with increasing length because the individual coupling reactions do not proceed quantitatively, resulting in truncated sequences that are difficult to separate. In addition, chemical synthesis requires harsh reaction conditions that the desired modifications have to withstand. (Chemo-) enzymatic methods can overcome these hurdles and thus provide access to biologically interesting, longer modified sequences. However, the enzymatic incorporation of modifications is only statistically distributed without extensive optimization. In order to achieve further success in the field of structure elucidation, synthesis methods are needed that are suitable for the position-specific incorporation of modifications and at the same time allow access to longer oligonucleotides. To study the relationships between structure and function, light-addressable compounds have emerged as popular modifications in recent years. The use of light as a mild, non-invasive trigger signal represents an interesting approach, especially in a biological context. In order to make high-quality statements about the behavior of oligonucleotides in complex biological environments, an efficient on/off ratio must be achieved through the selective placement of light-activatable compounds. The incorporation of photolabile protecting groups allows a temporary manipulation of the oligonucleotide structure, which can be irreversibly (re-)activated by cleavage of the protecting group. In contrast, the incorporation of photoswitches allows reversible addressability by isomerization processes. The synthesis of complex specifically labeled oligonucleotides is mostly done chemically and therefore length-limited.

This dissertation aimed to combine both issues and to investigate a chemo-enzymatic method for RNA synthesis that, on the one hand, allows position-specific modification with light-activatable units and, on the other hand, overcomes the length limitation of chemical solid-phase synthesis. The method centers on three enzymatic reaction steps for the incorporation of photolabile- and photoswitchable-modified nucleoside 3',5'-bisphosphates: I) a 3'-extension in which the modified bisphosphates are linked to the 3'-end of an RNA with *T4* RNA Ligase 1; II) dephosphorylation of the 3'-phosphate with *Shrimp Alkaline Phosphatase*; and III) linkage of the 3'-terminally modified RNA to a second 5'-phosphorylated RNA fragment, resulting in an overall sequence with specifically placed modification (Fig. I).

In the first subproject, required photolabile NPE and photoswitchable azobenzene C-nucleoside 3',5'-bisphosphates were synthesized and basic conditions of the enzymatic reactions were elaborated in collaborative work. Here, the enzymatic synthesis approach was successfully realized in solution and the chemo-enzymatic incorporation of all synthesized building blocks was demonstrated. Based on these findings, the method was independently further investigated for the multiple incorporations of NPE-modified nucleoside 3',5'-bisphosphates in adjacent positions as well as for their incorporation into DNA/RNA mixmers with phosphodiester or phosphorothioate backbones. It could be shown that the enzymes used tolerate not only light-activatable modifications but also additional adaptations of the phosphate unit as well as different ribose building blocks in combination. Since exogenous RNA is rapidly degraded by exonucleases and thus

becomes ineffective, numerous stabilizing adaptations are made to synthetic RNAs. Among the most common are phosphorothioates and modifications of ribose. With the successful modification of chimeric oligonucleotides, the developed method opens important access to therapeutically interesting oligonucleotides. Another important step toward biologically relevant applications could be achieved with the synthesis, characterization and conversion of a DEACM-protected uridine 3',5'-bisphosphate ($\text{pU}^{\text{DEACM}}\text{p}$). Compared to the NPE protecting group used, the absorption spectrum of the DEACM protecting group is bathochromically shifted, allowing cleavage with wavelengths > 400 nm. This prevents cell damage and enables oligonucleotides with NPE and DEACM modification to be addressed in a wavelength-selective manner. Moreover, the chemical introduction of DEACM-protected uridine is tricky even under UltraMILD conditions, as the photolabile protecting group tends to be hydrolytically cleaved during basic workup after synthesis. Thus, the successful ligation of $\text{pU}^{\text{DEACM}}\text{p}$ demonstrated a possibility for the incorporation of labile modifications that are not accessible under chemical conditions.

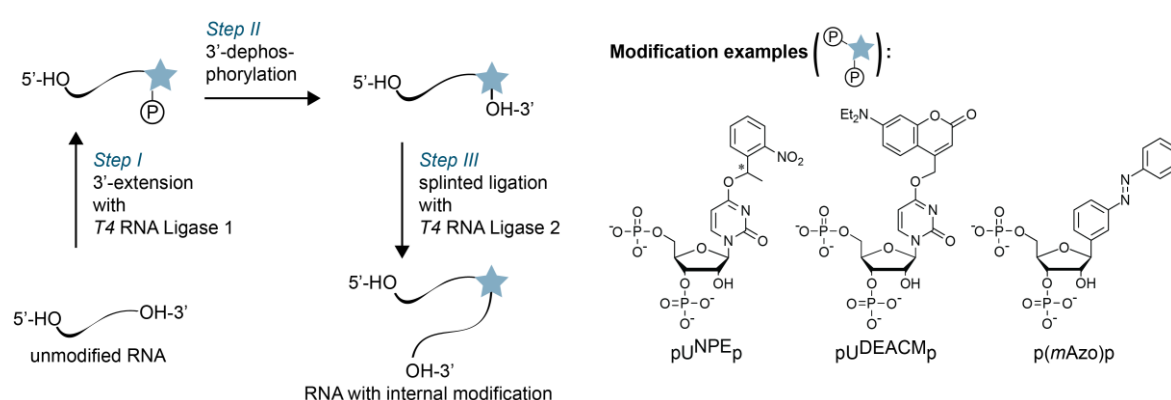


Fig. I: Three chemo-enzymatic reaction steps for the incorporation of modified 3',5'-bisphosphates (e.g. pUNPEp , pUDEACMp or $\text{p}(m\text{Azo})\text{p}$).

The main project of this thesis profits from the collected knowledge of the first subproject. Based on the promising results, the chemo-enzymatic method for the synthesis of light-activatable RNA was transferred to a solid-phase-supported system. Based on the chemical solid-phase synthesis, reagents were used in excess, washing steps were performed, and time-consuming purification steps between the individual enzymatic reactions were eliminated. Magnetic streptavidin beads were chosen as the solid phase system. Streptavidin has a particularly high binding affinity for biotin and is therefore especially suitable for immobilizing biotinylated RNA. In addition, the beads are stable to many reaction conditions and thus versatile. Immobilization was carried out using a biotinylated starting RNA, which was subsequently chemo-enzymatically modified. The previously established enzymatic reactions could be carried out without any significant limitation by the chosen solid phase system. Limitations were rather caused by the limited acceptance of the ligases. Especially splint ligations with *T4* RNA ligase 2 showed a strong sequence dependence, which often turned out to be the bottleneck of a reaction pathway. Due to the easy handling of the streptavidin beads, the enzymatic reactions could be carried out repeatedly. A linear synthesis procedure for the incorporation of several modifications could be realized. However, this procedure turned out to be very time-consuming, as the reaction times quickly added up. In addition, the overall yield suffered from the fact that individual reactions showed particularly low yields. For optimization, the three key enzymatic steps of the chemo-enzymatic method were slightly modified. First, all RNA fragments in solution were modified at the 3'-end. Then, *T4* polynucleotide kinase dephosphorylated the 3'-end in a simultaneous reaction and introduced the required 5'-phosphate

group. In the further course, the prepared modified RNAs were linked in streptavidin-linked splint ligations to form a total sequence with several internal modifications. The 3'-extensions with *T4* RNA ligase 1 were prepared in parallel. The incorporation of the modifications was clearly confirmed by analysis of the shorter fragments. In solid-phase-based splint ligations, multiple NPE and azobenzene groups were successfully incorporated into an RNA sequence aligned to the sequence of tRNA^{Met} and confirmed by mass spectrometry. Thus, it has been shown that the established method provides synthetic access to longer RNAs with multiple modifications that would be difficult to access by chemical solid-phase synthesis and require a significant effort for purification. Overall, various investigations demonstrated diverse possibilities for the application of the method. In addition to the solid-phase-based chemo-enzymatic synthesis of a sequence carrying both a photoswitchable azobenzene moiety and a photolabile NPE protecting group, the synthesis of a wavelength-selective addressable RNA with NPE and DEACM function could be achieved and its selective uncaging upon irradiation demonstrated. The method is additionally suitable for the incorporation of dinucleotides with photocleavable sugar-phosphate backbones, allowing light-induced strand breaks. Together with Oliver Pereira, in addition to the incorporation of photocleavable dinucleotides, a purely enzymatic cyclization of RNAs with fragmentable backbones was demonstrated by ligation reactions with *T4* RNA Ligase 1. Thus, cyclization of RNA is possible under near-native conditions and the use of cell-damaging additives and catalysts can be avoided.

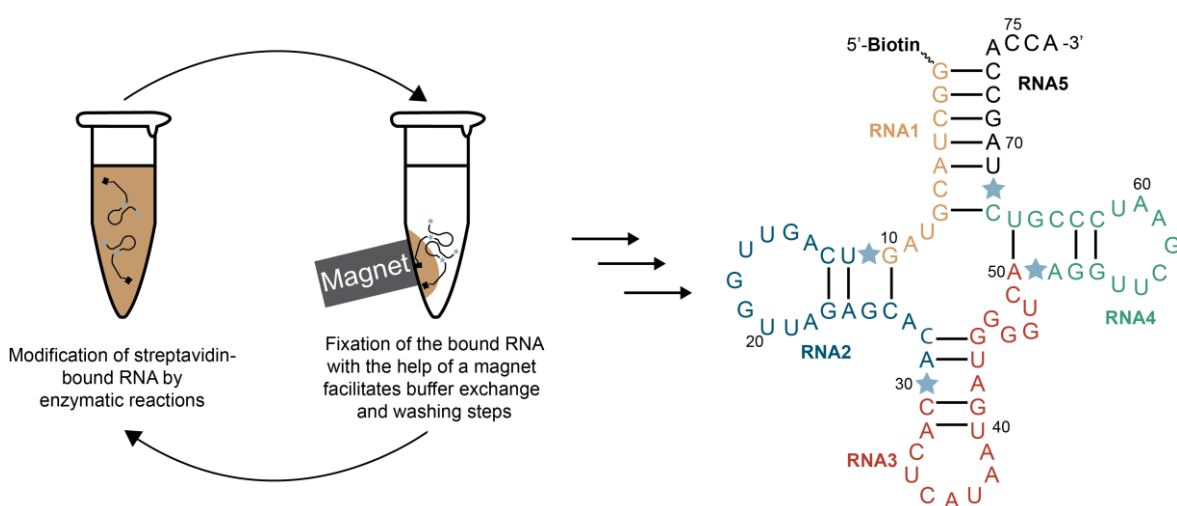


Fig. II: Solid-phase-based chemo-enzymatic RNA synthesis provides access to longer position-specific modified RNAs.

Furthermore, light-activatable oligonucleotides were prepared and characterized as part of various collaborative efforts. Through NMR spectroscopic investigations, collaboration partners were able to gain important insights into folding processes. For example, Dr. Tassilo Grün (AK Schwalbe) was able to uncover important folding pathways and dynamics in the formation of the G-quadruplex structure of the guanosine-rich cMYC promoter region using various photolabile-protected DNA sequences and show that an additional fifth G-rich segment is significantly involved in its folding and refolding (Fig. III). In connection with this collaboration, two additional photolabile-protected DNA sequences were synthesized from the cMYC promoter region with additional inosine mutation, which were subsequently analyzed by NMR spectroscopy in AK Mittermaier (Department of Chemistry, McGill University Montreal). In another collaborative project, bistable RNAs were "trapped" in a conformation by introducing a photolabile protecting group. Light-induced refolding by interaction with the RNA chaperone StpA could also be analyzed by NMR spectroscopy by

Katharina Hohmann (AK Fürtig). Azobenzene-bridged DNA and RNA 5mers were prepared for CD characterization of minimal G-quadruplex motifs. These were studied by Dr. Chavdar Slavov and Florian Hurter (both AK Wachtveitl) in CD spectroscopic experiments.

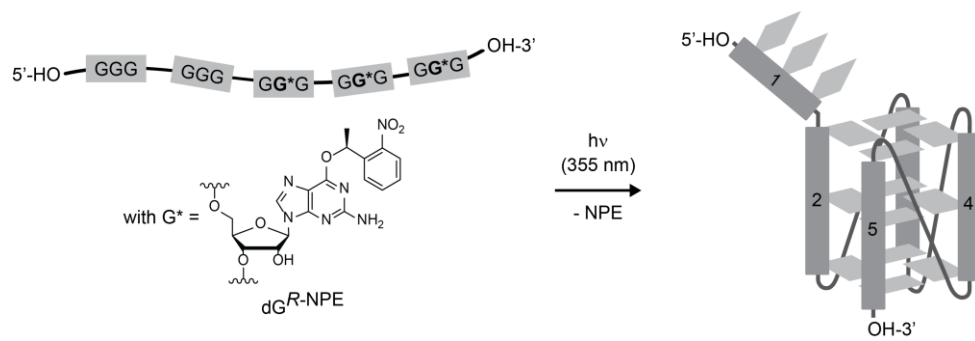


Fig. III: Schematic representation of the light-induced formation of secondary structures, here using the example of a G-quadruplex.

Teile dieser Doktorarbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

„Solid-Phase-Supported Chemoenzymatic Synthesis of a Light-Activatable tRNA-Derivative“

A. Blümmler, H. Schwalbe*, A. Heckel*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, 61, e202111613 (doi:10.1002/anie.202111613).

“The RNA Chaperone StpA Enables Fast RNA Refolding by Destabilization of Mutual Exclusive Base Pairs Within Competing Secondary Structure Elements”

K. F. Hohmann, A. Blümmler, A. Heckel, B. Fürtig*, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, 49, 11337-11349 (doi:10.1093/nar/gkab876).

„Unravelling the Kinetics of Spare-Tire DNA G-Quadruplex Folding“

J.T. Grün, A. Blümmler, I. Burkhart, J. Wirmer-Bartoschek, A. Heckel, H. Schwalbe*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 6185-6193 (doi:10.1021/jacs.1c01089).

„Parallel Reaction Pathways Accelerate Folding of a Guanine Quadruplex“

R. W. Harkness[‡], C. Hennecker[‡], J. T. Grün, A. Blümmler, A. Heckel, H. Schwalbe, A. K. Mittermaier*, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, 49, 1247-1262 (doi:10.1093/nar/gkaa1286).

„Chemo-Enzymatic Synthesis of Position-Specifically Modified RNA for Biophysical Studies Including Light Control and NMR Spectroscopy“

S. Keyhani[‡], T. Goldau[‡], A. Blümmler, A. Heckel*, H. Schwalbe*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 12017-12021 (doi:10.1002/anie.201807125).

Präsentationen:

IOCB Mini-Symposium „Light Control of Biomolecular Processes“, 28.05.2019, Prag, Tschechien.

Poster-Präsentationen:

IV. DNG-Doktorandenseminar, 20.-21.09.2018 Bad Herrenalb, Deutschland.

Sommerschule CLiC Graduiertenkolleg, 12.-16.08.2018, Konstanz, Deutschland.

Konferenz „27th International Symposium on Photochemistry (PhotoIUPAC)“, 08.-13.07.2018 Dublin, Irland.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Modifizierte Nukleinsäuren	1
1.1.1	Chemische Synthese modifizierter Nukleinsäuren	4
1.1.2	(Chemo-) Enzymatische Synthese modifizierter RNA	8
1.1.3	Festphasenmaterialien und magnetische Streptavidin Beads	13
1.1.4	Zyklisierung von RNA	17
1.2	Adressierbarkeit von Biomolekülen durch Licht	20
1.2.1	Irreversible Regulation durch photolabile Schutzgruppen	21
1.2.2	Reversible Regulation durch Azobenzol-Photoschalter	26
1.2.3	Lichtregulation von Nukleinsäuren	29
1.3	Strukturmotive von Nukleinsäuren und deren Funktion	35
1.4	Strukturaufklärung von Oligonukleotiden	40
2	Motivation und Zielsetzung	43
3	Ergebnisse und Diskussion	46
3.1	Chemo-enzymatische Synthese lichtaktivierbarer RNA	46
3.1.1	Die zugrunde liegende Methode und kollaborative Arbeiten	46
3.1.2	Multipler Einbau NPE-modifizierter Adenosin-3',5'-Bisphosphate	51
3.1.3	Synthese eines DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates und erste Ligationstests	54
3.1.4	Enzymatische Modifikation von DNA/RNA-Mixmeren	56
3.1.5	Enzymatische Modifikation von 2'-O-Methyl-RNA	59
3.1.6	Zusammenfassung der Erkenntnisse	61
3.2	Festphasen-basierte chemo-enzymatische RNA-Synthese	63
3.2.1	Synthese 5'-terminal biotinylierter RNA zur Interaktion mit Streptavidin Beads	63
3.2.2	Festphasen-basierte chemo-enzymatische Synthese eines tRNA-Derivats	72
3.2.2.1	Vergleich der enzymatischen Reaktionen in Lösung und gebunden an Streptavidin Beads	73
3.2.2.2	Linearer Reaktionsverlauf zur enzymatischen Synthese des tRNA-Derivats	77
3.2.2.3	Konvergenter Reaktionsverlauf zur enzymatischen Synthese des tRNA-Derivats	80
3.2.1	Synthese einer RNA mit Azobenzol- und NPE-Modifikation	91
3.2.2	Synthese einer wellenlängenselektiv adressierbaren RNA	92
3.2.3	Ligation eines Dinukleotids mit photospaltbarem Rückgrat	94
3.2.4	Chemo-enzymatische Zyklisierung photospaltbarer RNA	96
3.2.5	Optionales Capping und 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie	103
3.2.6	Zusammenfassung und Ausblick	106
3.3	Lichtregulierbare Oligonukleotide zur Strukturaufklärung mittels NMR und CD Spektroskopie	109
3.3.1	NPE-geschützte DNA zur Untersuchung der G-Quadruplexfaltung innerhalb der cMYC-Promoterregion	109
3.3.1.1	Synthese des NPE-geschützten Phosphoramidits und DNA-Synthesen	109
3.3.1.2	NMR-Messungen und Erkenntnisse	113

3.3.2	NPE-geschützte bistabile RNA zur Untersuchung der Interaktion des RNA-Chaperons StpA	115
3.3.2.1	Synthese der photolabil-geschützten Phosphoramidite und RNA-Synthesen ..	116
3.3.2.2	NMR-Messungen und Erkenntnisse	120
3.3.3	Azobenzol-modifizierte G-Quadruplex-Sequenzen für CD-Messungen.....	121
3.3.3.1	Synthese eines Azobenzol-Phosphoramidits und Oligonukleotidsynthesen.....	122
3.3.3.2	CD-Messungen und Erkenntnisse	124
3.3.4	Zusammenfassung und Ausblick	125
4	Experimenteller Teil.....	126
4.1	Materialien, Geräte und Methoden.....	126
4.2	Chemische Festphasensynthesen	130
4.2.1	Synthesen der Oligonukleotide zur Verwendung in chemo-enzymatischen Experimenten	130
4.2.2	Synthesen der Oligonukleotide zur chemo-enzymatischen Zyklisierung	133
4.2.3	Synthesen NPE-geschützter DNA zur Untersuchung der G-Quadruplexfaltung	134
4.2.4	Synthesen bistabiler RNAs zur Untersuchung der StpA-Interaktion.....	135
4.2.5	Synthese der Azobenzol-modifizierten G-Quadruplex-Sequenzen.....	136
4.3	Enzymatische Synthesen.....	136
4.3.1	Verwendete Enzyme und Puffer	136
4.3.2	Vorbereitung der magnetischen Streptavidin Beads und Pufferaustausch.....	138
4.3.3	Enzymatische 3'-Verlängerung mit <i>T4</i> RNA Ligase 1.....	139
4.3.4	Enzymatische 3'-Dephosphorylierung mit <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	140
4.3.5	(Re-) Phosphorylierung mit <i>T4</i> Polynukleotidkinase.....	141
4.3.6	Splint-Ligationen mit <i>T4</i> RNA Ligase 2.....	141
4.3.7	Abbau von DNA mit <i>TURBOTM DNase</i>	144
4.3.8	Enzymatische Zyklisierungen	144
4.3.9	NaIO ₄ -Capping und 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie	145
4.4	Chemische Synthesen	146
4.4.1	Synthese der lichtaktivierbaren Uridin-3',5'-Bisphosphate pU ^{NPE} p (32) und pU ^{DEACM} p (39)	146
4.4.2	Synthese des fluoridlabilen Cyclooctin-Initiatornukleosids (50).....	151
4.4.3	Synthese des Initiator-nukleosids mit fluoridlabiler Biotineinheit (51)	154
4.4.4	Synthese des DEACM-geschützten Uridin-Phosphoramidits (92).....	156
5	Anhang	160
5.1	Zusätzliche Spektren.....	160
5.2	Abkürzungsverzeichnis	177
5.3	Erklärung zum Urheberrecht und Copyright ©.....	179
5.4	Abbildungsverzeichnis	180
5.5	Literaturverzeichnis	189

1 Einleitung

1.1 Modifizierte Nukleinsäuren

Das Interesse, biologisch relevante Nukleinsäuren zu erforschen, ist in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. Da Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) für die Speicherung der Erbinformationen verantwortlich und an allen entscheidenden zellulären Prozessen beteiligt sind, besteht das Ziel vieler Forschungsansätze darin, ihre Struktur und die damit verbundenen Funktionen zu verstehen und zu regulieren. Die Untersuchung synthetischer Nukleinsäuren bringt dabei ganz eigene Herausforderungen und Anforderungen mit sich. Bereits vor der Entwicklung der automatisierten chemischen Festphasensynthese (siehe Kapitel 1.1.1) wurden erste synthetische Oligonukleotide *in vivo* untersucht. Im Jahr 1978 wurde erstmals eine einzelsträngige 13 Nukleobasen lange DNA in Zellen eingebracht, um durch komplementäre Basenpaarung die virale Replikation des Rous-Sarkom-Virus zu inhibieren.^[1] Damit wurde auch der Grundstein der Antisense-Technologie gelegt und das Interesse an therapeutisch einsetzbaren Oligonukleotiden geweckt.^[2] In den darauffolgenden Jahren wurden einige bedeutende Entwicklungen und Forschungserkenntnisse erzielt, die auch von den ständig weiterentwickelten Synthesemethoden profitierten. Es folgte die Erforschung der Aptamer-Technologie ab dem Jahr 1990.^[3,4] Hierbei bilden kurze einzelsträngige Oligonukleotide Sekundärstrukturen aus, die hochaffin und hochspezifisch mit Zielmolekülen, wie beispielsweise Proteinen, interagieren und dadurch deren Aktivität beeinflussen.^[5,6] Im Jahr 1998 wurde dann RNA-Interferenz (RNAi) in eukaryotischen Zellen entdeckt. Hierbei werden doppelsträngige RNAs in der Zelle zu kurzen *small interfering* RNAs (siRNA) prozessiert, die posttranskriptionell eine zielgerichtete Hemmung der Genexpression auslösen.^[7-9] Eine weitere bedeutende Anwendung von therapeutischen Nukleinsäuren ergibt sich durch die Entwicklung des CRISPR/Cas-Verfahrens, welches eine gezielte Genomeditierung ermöglicht.^[10] CRISPR steht hierbei für **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein**.^[11,12] Die Tatsache, dass für die Entdeckung der RNA-Interferenz 2006 der Medizin-Nobelpreis und für die Entwicklung des CRISPR/Cas-Verfahrens 2020 der Chemie-Nobelpreis vergeben wurden, zeigt, wie bedeutend und präsent Oligonukleotid-basierte Technologien sind.

Während zelleigene, endogene DNAs und RNAs überwiegend stabil gegenüber Nukleasen sind, werden vor allem exogene RNAs schnell abgebaut. Synthetische, unmodifizierte Oligonukleotide haben in Zellen somit nur eine geringe Halbwertszeit (meist nur im Bereich von wenigen Minuten) und sind daher für therapeutische Ansätze ungeeignet.^[2,9,13] Durch den Einbau und die Kombination unterschiedlicher Modifikationen können verschiedene Aspekte in Bezug auf Stabilität gegenüber Endo- und Exonukleasen sowie konformationelle Eigenschaften, die die Bindungsaffinität zur Zielstruktur beeinflussen, adressiert werden. Außerdem kann durch Modifikationen die Aufnahme synthetischer Nukleinsäuren in Zellen gefördert werden. Besonders die Stabilität von RNA kann durch Modifikationen positiv beeinflusst werden. Dadurch ergeben sich zahlreiche *in vivo* Anwendungsmöglichkeiten, die mit unmodifizierter RNA nicht möglich wären. Es gibt verschiedene Ansatzpunkte für Modifikationen von Oligonukleotiden: das Phosphatrückgrat, die Zuckereinheit oder die Nukleobasen (siehe Abb. 1).^[9,14-17]

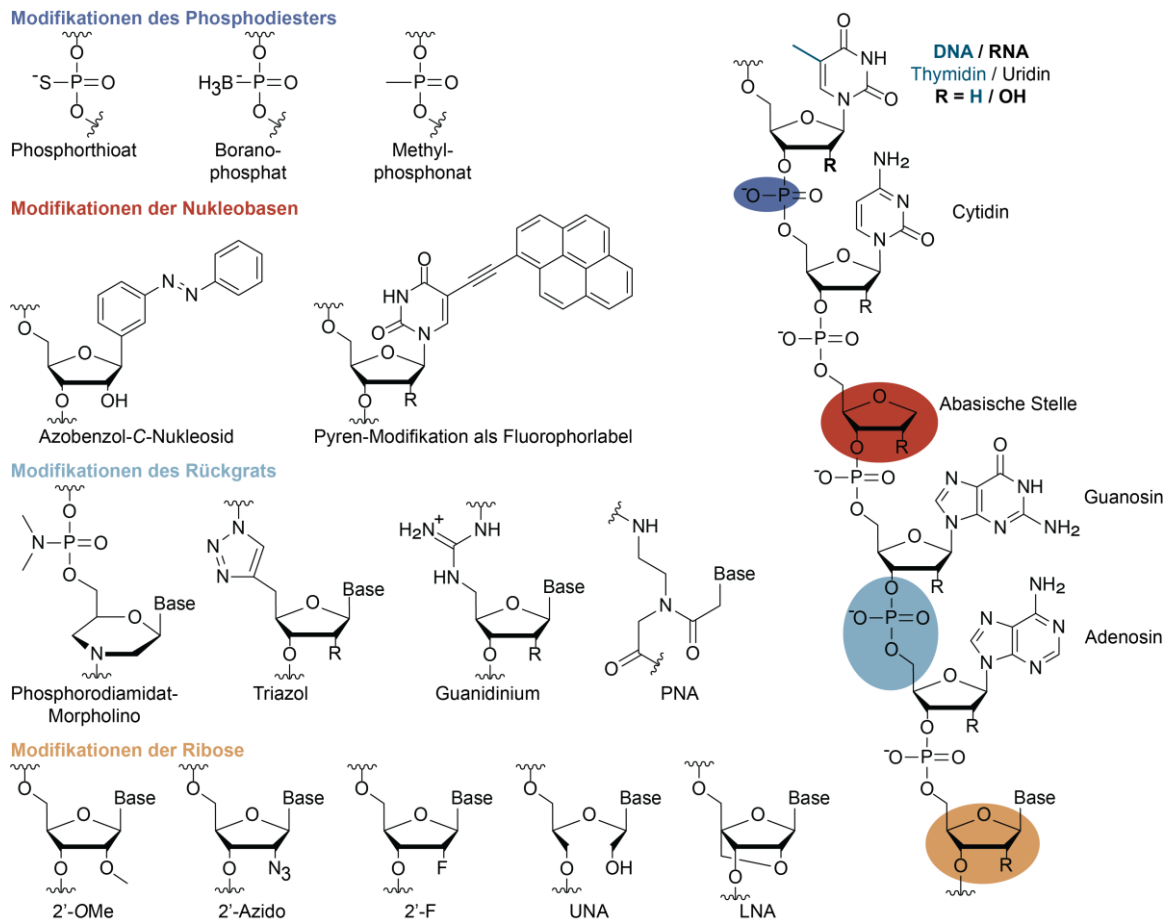


Abb. 1: Übersicht über ausgewählte Modifikationsmöglichkeiten, die häufig in der Synthese therapeutisch-interessanter Oligonukleotide verwendet werden. Abbildung angelehnt an Ochoa *et al.*^[14] und erweitert nach Literatur^[15–17].

Zu den häufigsten Modifikationen des Phosphodiesters zählt die Einführung von Phosphorthioaten (PO^- zu PS^-) zur Erhöhung der Nukleaseresistenz. Seit der ersten Veröffentlichung dieser Modifikation im Jahr 1966 hat sie sich als in weiten Bereichen angewendete Standardmodifikation durchgesetzt.^[17–19] Die Thiolierung des Phosphodiesters ist ohne größeren Aufwand während der chemischen Festphasensynthese möglich. Der erste von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA zugelassene antivirale Antisense-Wirkstoff *Fomivirsen* kam 1998 auf den Markt^[20] (1999 auch in Europa und Brasilien zugelassen). Es handelt sich hierbei um eine 21 Nukleobasen lange Antisense-DNA mit vollständig thioliertem Phosphatrückgrat, die zur Behandlung einer entzündlichen Augenerkrankung bei AIDS-Patienten eingesetzt wurde. Das Antisense-Oligonukleotid inhibiert die Transkription des Cytomegalovirus (CMV).^[21] Durch das chirale Phosphoratom entstehen bei der Substitution von Phosphodiestern zu Phosphorthioaten neue stereogene Zentren, was schnell zu einer steigenden Anzahl an Diastereomeren führt. Zwar wird die Stabilität gegenüber Nukleasen erhöht, allerdings kommt es auch zu unspezifischen Proteininteraktionen und die Bindungsaffinität zu komplementären Ziel-Sequenzen wird herabgesetzt. Deshalb werden häufig nur endständige Basen der synthetischen Oligonukleotide thioliert.^[16,17,22] Weitere Modifikationen des Phosphodiesters sind zum Beispiel Boranophosphate, durch die der anionische Charakter des Rückgrates erhalten bleibt.^[17,23,24] Daneben ist auch die Einführung von Methylphosphonaten möglich, die ein neutrales Phosphatrückgrat generieren.^[25,26]

Wird die Phosphodiesterereinheit durch eine Triazoleinheit ersetzt, ergibt sich ebenfalls ein neutrales Rückgrat.^[27,28] Ein Ersatz durch eine Guanidiniumeinheit resultiert hingegen in einer positiven

Ladung des Oligomers.^[29,30] Neben der Modifikation der Phosphodiesterseinheit ist es auch möglich das Rückgrat noch umfangreicher anzupassen. So ist beispielsweise bei Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligonukleotiden (PMO) auch der Zucker des Rückgrates verändert.^[31–34] Peptid-Nukleinsäuren (PNA) unterscheiden sich in ihrer Struktur sogar noch weiter. Bei PNAs wird das gesamte Zucker-Phosphatrückgrat durch eine Pseudopeptidstruktur ersetzt. Die beiden letztgenannten Modifikationen sind aufgrund ihrer hohen Nukleaseresistenz in Plasma und *in vivo* sowie ihrer herausragenden Bindungsaffinität zu komplementären Sequenzen interessante Ansatzpunkte zur Synthese therapeutischer Oligonukleotide. Sie können zum Beispiel zur gezielten Inhibierung der Translation oder zur Regulierung des Spleißvorgangs verwendet werden.^[35,36]

Strukturell kleinere, aber dennoch sehr effektive Modifikationen lassen sich in der Kategorie der Ribose-Modifikationen zusammenfassen. Hier sind zum einen Anpassungen an der 2'-Position zu nennen, wie 2'-O-Methyl-, 2'-Azido- oder 2'-Fluoro-RNA. Sie führen alle zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Nukleasen und einer verbesserten Bindungsaffinität. Grund hierfür ist die C3'-endo-Konformation, die durch die Substitutionen an der 2'-Position hervorgerufen wird. Bei sogenannten *locked nucleic acids* (LNAs) wird die C3'-endo-Konformation durch die Verbrückung der 2'-O- mit der 4'-C-Position dauerhaft herbeigeführt. Im Gegensatz zu LNAs stehen *unlocked nucleic acids* (UNAs), die durch die fehlende 2',3'-C-C-Bindung mehr Flexibilität aufweisen. Häufig werden chimäre Sequenzen aus LNA oder UNA in Kombination mit unmodifizierten DNA-Nukleotiden synthetisiert.^[5,14,16,37–40] In Tabelle 1 sind einige der genannten Eigenschaften zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht über ausgewählte Modifikationen und ihren Einfluss auf die Nukleaseresistenz und die Bindungsaffinität zu komplementären Ziel-Sequenzen. Angelehnt an Xiong *et al.*^[41] und erweitert nach Clavé *et al.*^[17]

Angriffspunkt	Modifikation	Nukleaseresistenz	Bindungsaffinität	Toxizität ^[41]
Phosphodiester	Phosphorthioat	+	-	++
	Boranophosphat	++	-	
	Methylphosphonat	+	-	+
Rückgrat	PMO	++	++	sicherer
	Triazol	+	-	
	Guanidinium	++	--	
Ribose	2'-OMe	++	++	+
	2'-F	+	+	
	LNA	++	+++	++

Auch die Nukleobasen selbst können Angriffspunkte für gezielte Modifikationen sein. Typische Modifikationen der Nukleobasen sind Methylierungen (nicht in Abb. 1 dargestellt) sowie die Einführung funktionaler Gruppen (z.B. -NH₂, -Cl, -Alkine, -SH, -NO₂) in Form von „wandelbaren“ (*convertible*) Nukleosiden. Funktionale Gruppen bieten weitläufige Möglichkeiten für postsynthetische Modifikationen beispielsweise durch Click-Reaktionen, NHS-Ester-Labeling von Fluorophoren oder die Modifikation des 3'- bzw. 5'-Endes. Durch postsynthetische Verfahren können auch Modifikationen eingeführt werden, die während der Festphasensynthese nicht den chemischen Bedingungen standhalten würden.^[24,42–44] Fluorophor-Label eignen sich zur Visualisierung und Nachverfolgung der exogenen Oligonukleotide in Zellen.^[45] Sie können auch durch modifizierte Phosphoramidite wie Pyren-rU eingebaut werden.^[46,47] Fehlt die Nukleobase vollständig, spricht man von einer abasischen Seite.^[48] Alternativ können die Nukleobasen auch durch nicht-natürlich vorkommende Nukleoside ersetzt werden. An dieser Stelle können Azobenzol-C-Nukleoside genannt werden, die als photoschaltbare Einheiten in Oligonukleotide

eingebaut werden können.^[49] Hier sei generell auf photoaktivierbare Modifikationen verwiesen, auf die in Abschnitt 1.2 näher eingegangen wird.

Bis dato gibt es mindestens 14 zugelassene therapeutische Oligonukleotide, über 60 befinden sich in klinischen Phasen.^[41] Sie adressieren unter anderem Tumorerkrankungen, Diabetes oder genetisch bedingte Krankheiten wie die Duchenne-Muskeldystrophie. Auch das aktuelle Weltgeschehen rund um die Corona-Pandemie hat gezeigt, wie wichtig der Zugang zu synthetischen Oligonukleotiden ist und wie mächtig modifizierte Nucleinsäuren im Kampf gegen Erkrankungen sein können. Die Aufklärung von Struktur und Funktion von Nucleinsäuren und deren gezielte Kontrolle erfordert die Synthese modifizierter Oligonukleotide. Es ist der fortschreitenden Entwicklung der Synthese- und Analysemöglichkeiten zu verdanken, dass wichtige Erkenntnisse in den letzten Jahrzehnten gewonnen und genutzt werden konnten. Auch die Vielzahl an Modifikationsmöglichkeiten und der Einsatz als Therapeutika verlangt hocheffiziente Synthesemethoden. Prinzipiell erfolgt der Einbau von Modifikationen mittels chemischer Festphasensynthese, durch enzymatische Methoden oder postsynthetisch. In den folgenden Abschnitten soll näher auf die Möglichkeiten zur Synthese von (modifizierten) Nucleinsäuren eingegangen sowie Vorteile und Nachteile verschiedener Methoden beleuchtet werden.

1.1.1 Chemische Synthese modifizierter Nucleinsäuren

Die chemische Synthese von (modifizierten) Oligonukleotiden erfolgt mittels automatisierter Festphasensynthese basierend auf der Phosphoramidit-Methode nach Beaucage und Caruthers.^[50] Die Anfänge der chemischen Oligonukleotidsynthese gehen bis in die 1950er-Jahre zurück. Damals begannen Khorana *et al.*, noch ohne feste Phase, einzelne mit Schutzgruppen versehene Nucleoside mittels Phosphodiester-Methode miteinander zu kurzen Oligonukleotiden zu verknüpfen.^[51,52] Den Grundstein der Festphasensynthese legten Merrifield *et al.*, die 1963 erstmals eine feste Phase zur Synthese von Polypeptiden einsetzten und damit die entscheidende Idee publizierten.^[53] Die Verwendung eines Trägermaterials liefert den Vorteil, dass die benötigten Reagenzien im Überschuss eingesetzt und durch Waschschrte zwischen den einzelnen Reaktionsschritten sehr leicht wieder entfernt werden können. Dadurch werden zeit- und arbeitsaufwendige Aufreinigungsschritte erspart. Letsinger *et al.* befassten sich in den darauffolgenden Jahren mit der Entwicklung der Phosphotriester-Methode.^[54-56] Dabei übernahmen sie auch Merrifields Idee und verwendeten unlösliche Styrol-Divinylbenzol-Polymere als feste Phase in der schrittweisen Synthese von Oligonukleotiden. Durch ihre Phosphotriester-Methode gelangen effiziente Kupplungsreaktionen sowie die Unterbindung von unerwünschten Nebenprodukten, wie Pyrophosphaten und falsch-verzweigten Nucleosid-Bausteinen. Nachteil der 1975 veröffentlichten Methode war allerdings die Hydrolyse- und Sauerstoffempfindlichkeit der eingesetzten Chlorphosphit-Spezies.^[56] Der Durchbruch gelang Beaucage und Caruthers 1981 durch die Kombination der Vorteile aus vorangegangenen Studien und ihrer Veröffentlichung der Phosphoramidit-Methode.^[50,57] Die von ihnen vorgestellten Nucleosidderivate sind luftstabil, leicht durch Azol-Verbindungen zu aktivieren und erlauben Reaktionen bei Raumtemperatur. Somit können Phosphoramidite in einem automatisierten Prozess eingesetzt werden, der noch heute als Standardmethode in der chemischen Synthese von Oligonukleotiden gilt.

Entgegen der natürlichen Syntheserichtung findet der chemische Aufbau von Nucleinsäuren in 3' → 5'-Richtung statt. Das erste Nucleosid ist an seiner 3'-Position über einen Succinyl-Linker an der festen Phase immobilisiert, wodurch die Syntheserichtung vorgegeben wird.^[58,59] Als Festphasenmaterial werden entweder Polystyrol-Harze (PS, auch Merrifield-Harze genannt)^[60] oder poröses Glas mit einer definierten Porengröße (*controlled pore glass*, CPG)^[61] eingesetzt (siehe Kapitel 1.1.3). Um im Laufe des Synthesesyklus unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, werden die funktionellen Gruppen der verwendeten Phosphoramidite mit verschiedenen orthogonal zueinander abspaltbaren Schutzgruppen versehen. Während die 5'-Hydroxygruppe des Zuckers mit einer transienten säurelabilen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr)^[62] versehen ist, werden die exozyklischen Aminogruppen der Nucleobasen durch persistente basenlabile Schutzgruppen während des gesamten Synthesesyklus blockiert. Im Falle von RNA-Amiditen werden die zusätzlichen 2'-Hydroxygruppen der Ribose mit fluoridlabilen Silyl-Schutzgruppen wie beispielsweise *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)^[63] oder [(Triisopropylsilyl)oxy]methyl (TOM)^[64] geschützt. In Abb. 2A ist beispielhaft ein Isobutyryl-geschütztes Guanodin-Phosphoramidit gezeigt, wie es zur Oligonucleotidsynthese eingesetzt werden kann. Abb. 2B zeigt den Zyklus der chemischen Festphasensynthese, auf dessen Teilschritte im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

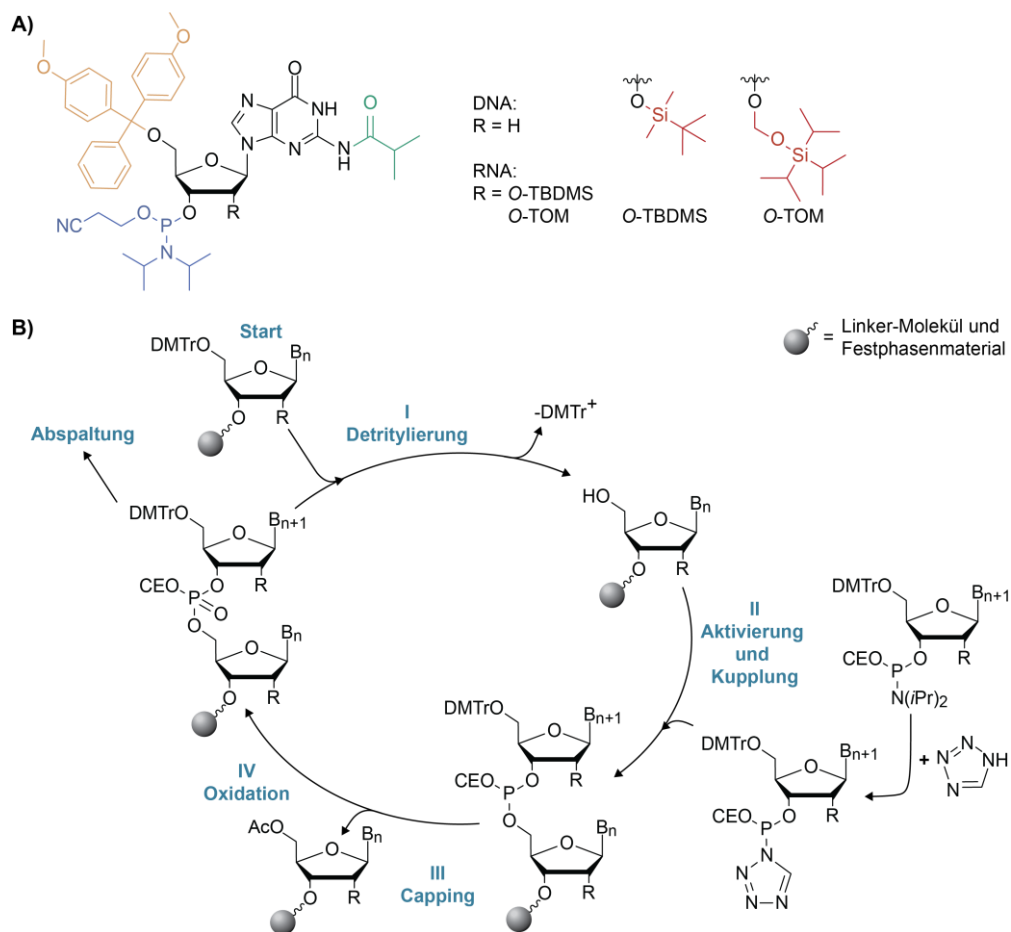


Abb. 2: Chemische Festphasensynthese von Nucleinsäuren nach der Phosphoramidit-Methode. A) Isobutyryl-geschütztes Guanodin-Phosphoramidit zum Einsatz in der chemischen Festphasensynthese. Die funktionellen Einheiten sind farblich hervorgehoben: säurelabile DMTr-Schutzgruppe (gelb), basenlabile Isobutyryl-Schutzgruppe (grün), fluoridlabile Silyl-Schutzgruppen (rot) und Cyanoethyl-geschützte Phosphoramidit-Einheit (blau). B) Schematische Darstellung des Synthesesyklus der chemischen Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode (B_n = beliebige Nucleobase).

Ausgangspunkt der chemischen Oligonukleotidsynthese ist das kovalent über das 3'-Ende mit der festen Phase verbundene Start-Nukleosid (Abb. 2B „Start“). Der erste Schritt des Synthesesyklus ist die selektive Abspaltung der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe an 5'-Position (I), wodurch die 5'-Hydroxygruppe zugänglich wird. Zur Detritylierung wird Dichlor- oder Trichloressigsäure verwendet. Im zweiten Schritt (II) folgt zunächst die Protonierung der *N,N*-Diisopropylamino-Gruppe an 3'-Position des nächsten Phosphoramidits durch Aktivierung mit einer milden Brønsted-Säure. Anschließend erfolgt dessen Kupplung mit der zuvor freigesetzten 5'-OH-Gruppe des vorherigen Nukleosids, wodurch eine internukleosidische Phosphitriester-Bindung ausgebildet wird. Als Aktivatoren werden schwach azide Azol-Derivate eingesetzt. Hierbei wird häufig auf 1*H*-Tetrazol, 5-Ethylthio-1*H*-tetrazol (ETT)^[65], 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (BTT)^[66] oder auf 4,5-Dicyanoimidazol (DCI)^[67] in Acetonitril zurückgegriffen. Nach erfolgter Kupplungsreaktion findet ein sogenannter Capping-Schritt (III) mit Essigsäureanhydrid (Ac₂O) oder Phenoxyessigsäureanhydrid (Pac₂O) und *N*-Methylimidazol statt. Durch die Acetylierung zuvor nicht umgesetzt und somit freier 5'-Hydroxygruppen wird deren weitere Verlängerung und die Entstehung fehlerhafter Sequenzen vermieden. Letzter Teilschritt des Zyklus ist die Oxidation (IV) des Phosphitriesters (Oxidationsstufe +III) zum Phosphat (Oxidationsstufe +V) unter Verwendung einer wässrigen Iodlösung. Durch Abspaltung der neuen DMTr-Schutzgruppe an 5'-Position kann ein weiterer Zyklus zur Kupplung des nächsten Nukleotids gestartet werden. Auf diese Weise wird der Synthesesyklus wiederholt durchlaufen und weitere Nukleotide der wachsenden Oligonukleotidkette hinzugefügt, bis die gewünschte Sequenzlänge erreicht ist. Nach beendeter Synthese muss das finale Oligonukleotid unter basischen Bedingungen vom Festphasenmaterial abgespalten werden. Da hierbei auch die Cyanoethyl-Schutzgruppen (CEO) des Phosphatrückgrates in einer β-H-Eliminierung abgespalten werden und es zu unerwünschten Acrylnitril-Addukten an *N*³-Position von Thymidin- oder Uridinbasen kommen kann, wird zunächst ein Waschschriff mit 20% Diethylamin in Acetonitril (DEA-Wash) empfohlen. Anschließend wird durch Zugabe von Ammoniak oder Methylamin der Succinyl-Linker hydrolysiert und die persistenten Schutzgruppen abgespalten. Der Einsatz von sogenannten UltraMILD-geschützten Phosphoramiditen ermöglicht eine Abspaltung unter milderen Bedingungen. UltraMILD-Amidite sind mit labileren exozyklischen Schutzgruppen versehen (z.B. *para*-Isopropylphenoxyacetyl (*iPrPac*)- anstelle von Benzoyl (Bz)- oder Isobutyryl (*iBu*)-Schutzgruppen), die eine finale Abspaltung mit einer Mischung aus Ammoniak/Ethanol (3:1) oder mit 0,05 M Kaliumcarbonat in Methanol erlauben. Außerdem können unter UltraMILD-Bedingungen die Dauer und benötigte Temperatur der Abspaltungsreaktion deutlich verringert werden. Das gelöste Oligonukleotid kann dann durch Filtration vom Festphasenmaterial abgetrennt und weiter aufgearbeitet werden. Im Falle einer RNA-Synthese müssen die zusätzlichen fluordlabilen Silyl-Schutzgruppen an 2'-Position durch Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) oder Hydrofluorid (HF) entfernt werden.^[68,69] Zur Aufreinigung des Oligonukleotids eignen sich Fällungen, präparative Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) oder chromatographische Methoden, wie Anionenaustauschchromatographie (*anion-exchange*, AEX) oder Umkehrphasen-HPLC (*reversed phase*, RP-HPLC). Häufig erfolgt keine automatisierte Abspaltung der letzten 5'-ständigen DMTr-Schutzgruppe, da diese die Polarität des Oligonukleotids verringert und die finale Aufreinigung positiv beeinflusst. Bei einer Auftrennung über RP-HPLC trägt somit nur das Vollängenprodukt die DMTr-Schutzgruppe, wodurch eine Abtrennung von polarerer Abbruchsequenzen (besonders von *n*-1) deutlich erleichtert wird. Die DMTr-Schutzgruppe kann abschließend mit 80% Essigsäure abgespalten werden.

Da bei der chemischen Festphasensynthese einzelne Nucleosid-Bausteine nacheinander zu einem Oligonucleotid gekuppelt werden, spielen nahezu quantitative Ausbeuten je Reaktionsschritt eine entscheidende Rolle. Besonders bei der Synthese von längeren Oligonucleotiden erweisen sich die erzielten Kupplungsausbeuten als limitierender Faktor. Geht man von der Synthese eines 50 Nucleobasen langen Oligonucleotids mit 99% Ausbeute je Kupplung aus, kann somit eine maximale Ausbeute von $0,99^{49} = 61\%$ erreicht werden. Sinkt die durchschnittliche Kupplungsausbeute auf 95% ab, ist eine Gesamtausbeute von lediglich $0,95^{49} = 8\%$ möglich. Die Effizienz der Kupplungsreaktionen kann während der gesamten Synthese beobachtet werden. Hierbei nutzt man die Entstehung des charakteristisch orangefarbenen DMTr-Kations zur spektroskopischen oder konduktometrischen Quantifizierung.^[70,71] RNA-Amidite sind durch die zusätzliche 2'-O-Schutzgruppe sterisch anspruchsvoller als DNA-Amidite, weshalb die durchschnittlichen Kupplungsausbeuten bei RNA-Synthesen geringer ausfallen, was auch zu einer Abnahme der Gesamtausbeute führt. Aus diesem Grund werden die Kupplungszeiten von etwa 30 Sekunden (DNA) für RNA auf 12-15 Minuten verlängert.^[64,72] Außerdem sollte in diesem Fall der Aktivator gezielt gewählt werden. DCI (pK_s 5.2)^[72,73] ist beispielsweise weniger azid als BTT (pK_s 4.1)^[72] und wird aufgrund dessen bevorzugt für die Synthese längerer Oligonucleotide, bei verlängerten Kupplungszeiten oder bei großen Synthesemaßstäben eingesetzt. Durch die geringere Azidität kann bei längeren Kupplungszeiten oder einer größeren Anzahl an Synthesesyklen ein ungewolltes Abspalten der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe und damit ein unbeabsichtigter Einbau von Dimeren unterbunden werden. Besonders bei dG-reichen Sequenzen wird die Bildung von Dimeren unter zu aziden Reaktionsbedingungen beobachtet, da das dG-Amidit am schnellsten detrityliert wird (gefolgt von dA > dC > dT).^[74] Hinzu kommt, dass RNA mit freien 2'-OH-Gruppen im Vergleich zu DNA unter basischen Bedingungen deutlich schneller hydrolysiert wird, was besonders die Handhabung von längeren RNA-Konstrukten erschwert.^[75]

Dank der chemischen Festphasensynthese ist es möglich, verschiedene Modifikationen an definierten Positionen gezielt und mit guten Ausbeuten in Oligonucleotide einzubringen. Außerdem können unterschiedliche Modifikationen innerhalb der Zielsequenz miteinander kombiniert und so hochmodifizierte DNA- und RNA-Proben synthetisiert werden. Inzwischen sind zahlreiche modifizierte Phosphoramidite kommerziell erhältlich. Hierbei sind besonders 2'-OMe- oder LNA-Amidite zu nennen, aber auch der Einbau von photolabilen Schutzgruppen, Linkern, Fluorophoren und funktionaler Gruppen, die eine postsynthetische Modifikation ermöglichen, sind seit Jahren etabliert. Allerdings ist zu beachten, dass die gewünschten Modifikationen allen Reaktionsbedingungen während des Synthesesyklus sowie während der Abspaltung standhalten müssen und die finale Aufreinigung deutlich erschweren können. Sehr labile Modifikationen, wie beispielsweise eine photolabile 3-Nitro-2-ethyl-dibenzofuran (NDBF)- Schutzgruppe an Position O⁴ einer Thymin-/Uridinbase bzw. an Position O⁶ eines Guanosins sind nicht in Oligonucleotidsequenzen einführbar, da sie beim Abspalten von der festen Phase auch unter UltraMILD-Bedingungen nicht stabil sind.^[76,77] Des Weiteren kann die Modifikation des Zucker-Phosphatrückgrates zur Verbesserung der Stabilität gegenüber Nucleasen realisiert werden. In diesem Zusammenhang sei auf die Einführung von Phosphorthioaten^[17,22], Morpholinomodifikationen^[31-33] oder LNA-Bausteinen^[14,16,37] verwiesen, um an dieser Stelle nur die bekanntesten Methoden zu nennen (siehe auch Kapitel 1.1). Durch den technischen Fortschritt und ständige Optimierungen der eingesetzten Reagenzien konnte der Synthesemaßstab in den letzten Jahren deutlich vergrößert werden. Während die ersten Synthesizer auf einen maximalen Syntheseansatz von bis zu 10 µmol (*Applied Biosystems* „ABI 380 A/B“, 1983) begrenzt waren,

ermöglichen neuere Geräte Synthesen von 60 mmol (*GE Healthcare „Oligopilot 400“*, 2005) bis hin zu 1800 mmol (*GE Healthcare „OligoProcess“*, 2009). Mit solchen Synthesizern können bis zu mehreren hundert Kilogramm Oligonukleotid pro Jahr hergestellt werden. Dabei sind die Synthesen zusätzlich in verhältnismäßig kurzer Zeit möglich. Sequenzlängen von bis zu etwa 150 Nukleotiden^[78,79] im Falle von DNA können erreicht werden. Durch die verringerte Kupplungsausbeute können RNAs hingegen nur bis zu einer Länge von etwa 70-100 Nukleotiden^[12,64,80–83] synthetisiert werden. Der Einbau von sterisch anspruchsvollen modifizierten Sonderamiditen kann zu zusätzlichen Ausbeuteeinbußen führen, weshalb die erreichbare Maximallänge hochmodifizierter Oligonukleotide deutlich herabgesetzt ist.

Somit ist die chemische Festphasensynthese eine machtvolle Methode zur Synthese kürzerer und positionsspezifisch modifizierter Oligonukleotidsequenzen. Da viele biologisch relevante und interessante Nukleinsäuren jedoch deutlich länger sind und daher jenseits der Möglichkeiten der chemischen Festphasensynthese liegen, wird an alternativen Synthesestrategien geforscht. Hier haben enzymatische Methoden entscheidende Vorteile, die zahlreiche Modifikationsoptionen bieten. Ein Überblick über enzymatische Methoden ist im folgenden Abschnitt gegeben.

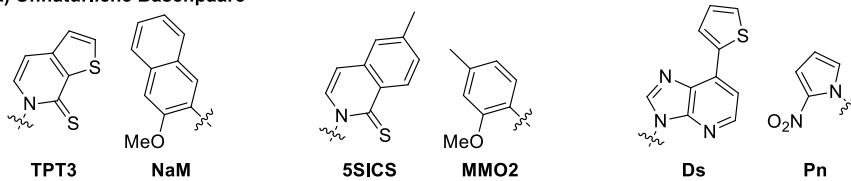
1.1.2 (Chemo-) Enzymatische Synthese modifizierter RNA

Die Untersuchung vieler biologisch relevanter Oligonukleotide stellt Forschende immer wieder vor eine besondere Herausforderung: häufig ist eine chemische Synthese der benötigten modifizierten Nukleinsäuren nicht möglich, da die geforderten Zielsequenzen schlichtweg zu lang sind. Um die gewünschten modifizierten Konstrukte dennoch zu erhalten, wird auf verschiedene enzymatische Methoden zurückgegriffen. Dabei ist sowohl die enzymatische Synthese von DNA als auch von RNA möglich. Etablierte Methoden basieren auf *in vitro* Transkriptionen mit Hilfe von (mutierten) Polymerasen^[84–88] oder auf Modifikationen durch verschiedene Transferasen^[89–94]. Im Grunde sind durch enzymatische Reaktionen Synthesen ohne Längenlimitierung möglich. Im Rahmen der natürlichen Genexpression ist eine möglichst kleine Fehlerrate bei allen ablaufenden Reaktionen enorm wichtig, um Zellschäden und daraus resultierende Erkrankungen zu vermeiden. Dies wird vor allem durch die hohe Selektivität der Enzyme gegenüber von ihnen akzeptierter Substrate erreicht. Daher werden zum erfolgreichen Einbau von modifizierten Nukleotiden häufig angepasste, mutierte Enzyme^[88–90] benötigt. Doch auch wenn mutierte Enzyme diese anspruchsvollen Synthesen teilweise ermöglichen, werden dennoch nicht alle Modifikationen als Substrate akzeptiert und zugänglich. Zudem erfolgt der Einbau unnatürlicher Bausteine meist statistisch verteilt. Positionsspezifische Modifikationen sind ebenso erreichbar, erfordern allerdings viel Optimierung.

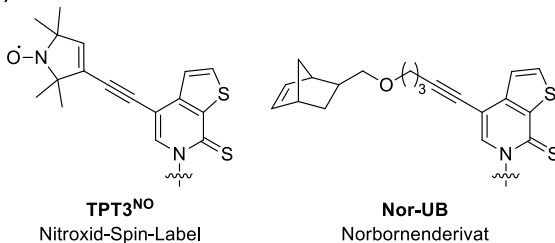
Synthesemethoden basierend auf Polymerasereaktionen benötigen einen DNA-Templatstrang. Hieraus ergeben sich allerdings Einschränkungen, da die Anlagerung des nächsten zu verknüpfenden Nukleosidtriphosphates (NTPs) durch Watson-Crick-Franklin-Basenpaarung bestimmt wird.^[95,96] Die Templat-DNA kann mittels Festphasensynthese oder Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) hergestellt werden. Der positionsspezifische Einbau unnatürlicher Nukleotide in RNAs kann durch die gezielte Modifikation des Templatstranges erfolgen. Hierzu eignet sich beispielsweise die Methode der Erweiterung des genetischen Alphabets um unnatürliche Basenpaare (siehe Abb. 3A).^[78,97–99] Unter anderen

wendeten Domnick *et al.* diese Methode an, um mittels *in vitro* Transkription unnatürliche Spin-labelierte^[87] (**TPT3^{NO}**) oder Norbornen-Triphosphate^[100] (**Nor-UB**) in RNAs einzufügen (siehe Abb. 3B). Auf diese Weise werden Elektronenspinresonanz-Messungen (*electron paramagnetic resonance*, EPR) von langen nicht-codierenden RNAs (*long non-coding RNAs*, lncRNAs) oder spezifische post-transkriptionelle Diels-Alder-Cycloadditionen mit Biotin- oder Fluorophormarkierten Tetrazinderivaten ermöglicht. Neben Modifikationen an Sequenz-internen Positionen sind auch 5'-endständige Anpassungen durch Polymerasen möglich. Hierzu können modifizierte Initiator-nukleotide synthetisiert werden, die keine 5'-Triphosphateinheit tragen. Werden solche Initiator-nukleotide im Überschuss bezogen auf die unmodifizierten NTPs zum Transkriptionsansatz gegeben, können sie lediglich am 5'-Ende eingebaut werden, da ein interner Einbau durch die fehlende Triphosphateinheit nicht möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass ein Einbau besonders dann effizient abläuft, wenn die zu synthetisierende Sequenz mit einer oder zwei aufeinanderfolgenden Purinnukleotiden beginnt (bevorzugt mit GG). Somit werden zumeist Guanosin (G)- oder alternativ auch Adenosin (A)-Derivate als Initiator-nukleotide verwendet.^[86,95,101,102] Auf diese Weise konnte das 5'-Ende von RNAs zum Beispiel mit Biotin^[102], Amino- und Thiol-Gruppen^[86], Alkinresten^[103] oder auch Fluorophoren^[104] erfolgreich durch Transkription funktionalisiert werden. In Abb. 3 sind einige Beispiele für unnatürliche Nukleotide zusammengefasst, die von Polymerasen akzeptiert und umgesetzt werden.

A) Unnatürliche Basenpaare



B) Zusätzlich modifizierte unnatürliche Nukleotide



C) 5'-modifizierte Initiator-nukleotide

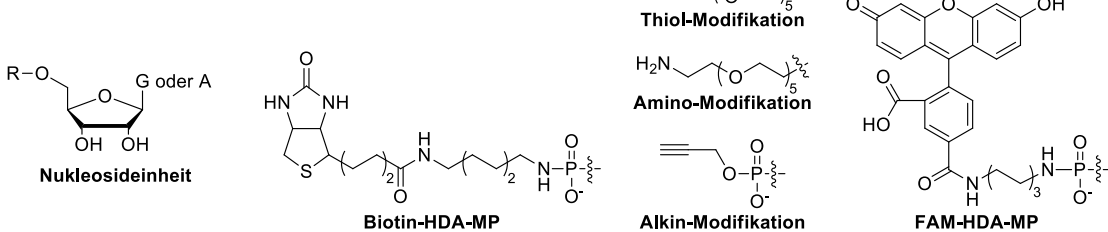


Abb. 3: Unnatürliche Basenpaare und Nukleotide, die von Polymerasen als Substrate akzeptiert werden und sich somit zur positionsspezifischen enzymatischen Modifikation von RNAs eignen. A) Unnatürliche Basenpaare zur Erweiterung des genetischen Alphabets. B) Beispiele für zusätzlich modifizierte unnatürliche Nukleotide, die als Triphosphate mittels Polymerasen in RNA eingebaut werden können (Zucker-Phosphateinheit zur besseren Übersicht nicht gezeigt). C) Ausgewählte modifizierte Initiator-nukleotide, die sich zur enzymatischen Modifikation des 5'-Endes von RNA eignen.

Durch den Einsatz von Transferasen können 5'-Modifikationen auch postsynthetisch durchgeführt werden.^[91,105] Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rentmeister (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) beschäftigt sich beispielsweise intensiv mit der chemo-enzymatischen RNA-Modifikation

durch Methyltransferasen. Im Fokus stehen dabei enzymatische Übertragungen von Propargyleinheiten^[93,106] für spätere Click-Reaktionen, photolabilen Schutzgruppen^[106,107] oder photoaktivierbaren Quervernetzern^[91]. Zusätzlich können Nukleotidyltransferasen funktionalisierte Nucleosidtriphosphate (z.B. Azid-^[90] oder Biotinfunktionen^[108]) mit dem 3'-Ende von Oligonukleotiden verknüpfen. Ein Nachteil dieser Art der 3'-Verlängerung besteht darin, dass der Einbau nicht auf ein einzelnes modifiziertes Nucleotid limitiert ist. Aufgrund des 5'-Triphosphates und der freien 3'-Hydroxygruppe des modifizierten Nucleotids kommt es zu unerwünschten multiplen Verknüpfungen, die nur durch sorgfältige Anpassung der Reaktionsbedingungen kontrolliert werden können.^[89,90]

Eine weitere eigenständige Enzymklasse, die zur (chemo-) enzymatischen Synthese modifizierter RNAs eingesetzt werden kann, bilden Ligasen. Diese Enzyme verknüpfen zuvor hergestellte (modifizierte) Oligonukleotid-Fragmente zu einer Gesamtsequenz und stehen im Fokus dieser Arbeit. Die Hauptreaktion des Ligationsvorganges besteht aus der Ausbildung einer kovalenten 3'-5'-Phosphodiesterbindung durch die Verknüpfung einer 5'-endständigen Phosphatgruppe eines Donor-Oligonukleotids mit einer 3'-terminalen Hydroxygruppe einer Akzeptor-Nucleinsäure unter ATP- oder NAD⁺-Verbrauch. Die Wahl der Ligase richtet sich jeweils nach der geplanten Anwendung. Zur Ligation einzelsträngiger RNA-Sequenzen wird auf *T4* RNA Ligase 1 (Rnl1) zurückgegriffen. Doppelsträngige Fragmente (DNA:DNA, RNA:DNA oder RNA:RNA) werden entweder mit Hilfe von *T4* DNA Ligase (Dnl) oder mit *T4* RNA Ligase 2 (Rnl2) verknüpft. Die Interaktion mit Nucleinsäuren findet dabei über die *N*-terminale Adenyltransferase-Domäne der Enzyme statt (siehe Abb. 4).^[109-113]

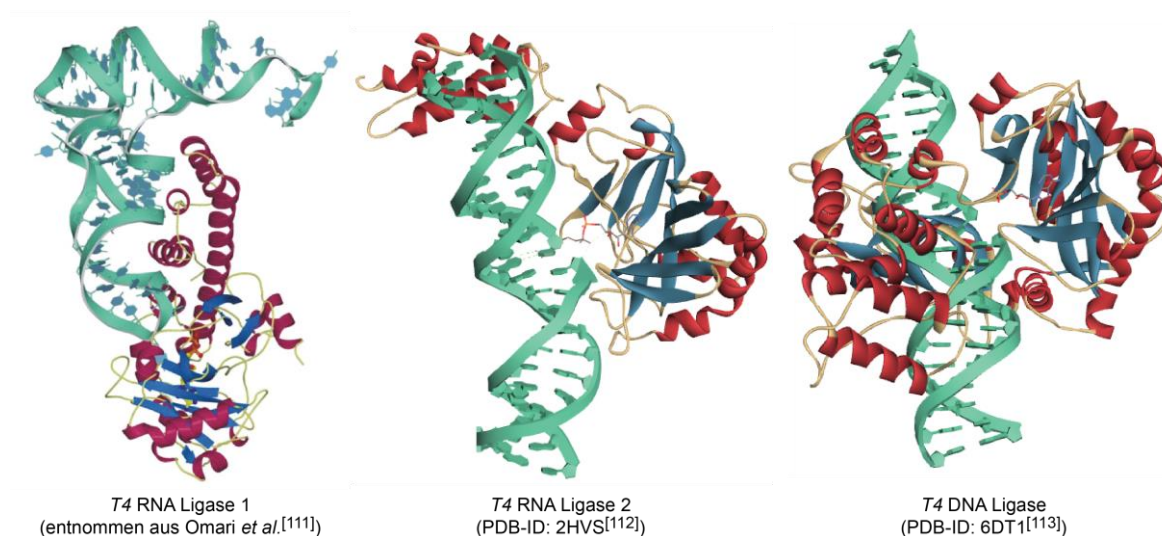


Abb. 4: Interaktion verschiedener Ligasen mit Oligonukleotidfragmenten (türkis). Darstellung der *T4* RNA Ligase 1 mit einzelsträngiger tRNA mit Erlaubnis entnommen aus ^[111] (Nachdruck, CC BY 4.0 Lizenz). Die veröffentlichten Kristallstrukturen der Interaktionen der *T4* RNA Ligase 2^[112] und der *T4* DNA Ligase^[113] mit Nucleinsäureduplexen und ATP im aktiven Zentrum wurden der Proteindatenbank PDB entnommen und mit *Biovia Discovery Studio*^[114] dargestellt.

Grundsätzlich lässt sich der Ablauf der Ligationsreaktion in drei Abschnitte unterteilen. Zunächst kommt es zu einer Adenylierung des aktiven Zentrums des Enzyms (Schritt I). Hierbei findet ein nukleophiler Angriff eines Lysinrestes des Enzyms an der α -Phosphatgruppe des Adenosinribose-5-phosphates (ATPs) statt. Durch Ausbildung einer kovalenten Bindung wird ein Ligase-(Lysin-*N*)-Adenosinmonophosphat (AMP)-Komplex gebildet und Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt. Anschließend wird das AMP auf das 5'-endständige Phosphat des Donor-Oligonukleotids

übertragen, wodurch eine 5'-5'-Phosphoanhydridbindung entsteht (Schritt II). Im letzten Schritt greift die 3'-Hydroxygruppe des Akzeptor-Fragments nukleophil an der 5'-Phosphatgruppe an, wodurch eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung entsteht und das AMP durch Spaltung der 5'-5'-Phosphoanhydridbindung freigesetzt wird (Schritt III). Der Vorgang ist in Abb. 5 zusammengefasst.^[111,112,115]

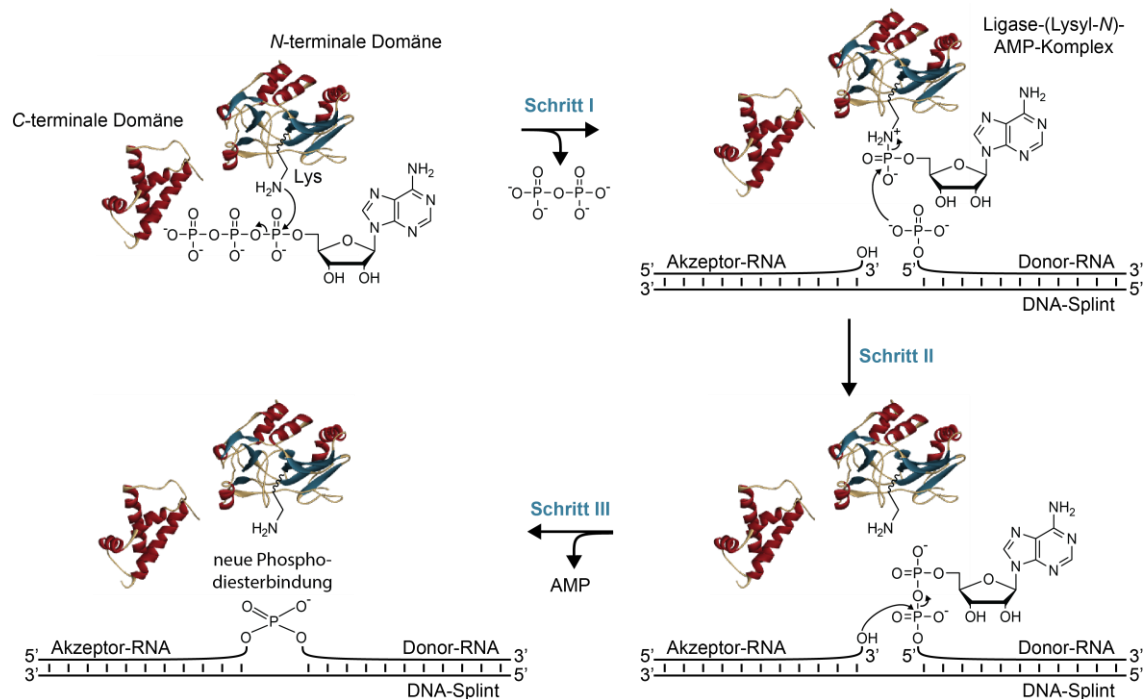


Abb. 5: Schematische Darstellung der enzymatischen Ligation mit *T4* RNA Ligase 2. Dargestellt sind die drei Schritte der Adenylierung des Enzyms unter Abspaltung von PP_i (I), der 5'-5'-Phosphoanhydridbindungsbildung (II) und der Ausbildung der neuen Phosphodiesterbindung zwischen Donor- und Akzeptor-RNA (III) angelehnt an Nandakumar *et al.*^[112]. Die Kristallstruktur der Ligase (PDB-ID: 2HVS^[112]) wurde mit *Biovia Discovery Studio*^[114] verkleinert dargestellt.

Inzwischen sind zahlreiche Ligasen aus Pro- und Eukaryoten bekannt, die unter anderem an Spleiß- und Reparaturvorgängen beteiligt sind. Die erste entdeckte und seither ausführlich untersuchte Ligase ist die RNA Ligase 1 aus dem *T4* Bakteriophagen (Rnl1).^[116] Aufgrund ihrer hohen Aktivität und ihrer breiten Anwendungsmöglichkeiten wird diese Ligase häufig für Forschungszwecke in Laboren eingesetzt. Neben der Verknüpfung einzelsträngiger RNA-Fragmente kann Rnl1 auch zur enzymatischen Verlängerung des 3'-Endes verwendet werden.^[109,111,112,117] Bereits 1978 konnten Uhlenbeck *et al.* zeigen, dass die gezielte 3'-terminale Verlängerung von RNA um einzelne Nucleoside mit Hilfe von Ligasen möglich ist. Sie synthetisierten eine Reihe (modifizierter) Nucleosid-3',5'-Bisphosphate und verknüpften diese mittels *T4* RNA Ligase 1 mit dem 3'-Ende einer Akzeptor-RNA.^[118] Im Rahmen ihrer Untersuchungen konnten Uhlenbeck *et al.* zeigen, dass 3',5'-Bisphosphate die kleinste, vom Enzym akzeptierte Donoreinheit bilden, während Akzeptor-RNAs aus mindestens drei Nucleotiden bestehen müssen, um als Substrate erkannt zu werden. Zusätzlich wurde in verschiedenen Publikationen darauf hingewiesen, dass die endständigen Nucleoside der Akzeptorsequenz einen Einfluss auf die Ligationsausbeute haben und unterschiedlich von der Rnl1 präferiert werden. Für das 3'-Ende wird die Akzeptanz wie folgt angegeben: A > G ≥ C > U.^[119-121] Die Umsetzung der unmodifizierten Bisphosphate erfolgte ebenfalls mit unterschiedlicher Effizienz (pCp > pUp > pAp > pGp). Unter Verwendung von 5'-Adenosinmonophosphat (AMP) oder 2',5'-Bisphosphaten fand keine Umsetzung statt. Damit konnte die Notwendigkeit der 3'-ständigen Phosphatgruppe bewiesen werden. DNA-3',5'-Bisphosphate wurden, verglichen mit den

entsprechenden RNA-3',5'-Bisphosphaten, deutlich schlechter akzeptiert und umgesetzt.^[119] Die Anwesenheit der 3'-Phosphatgruppe verhindert des Weiteren den multiplen Einbau mehrerer Bisphosphate, wodurch die Reaktion automatisch auf eine einzelne 3'-terminale Modifikation beschränkt ist.^[115,118,119,121] Weitere Nucleosid-3',5'-Bisphosphate, die neben unmodifizierten Bisphosphaten auf diese Weise erfolgreich ligiert werden konnten, sind das radioaktiv-markierte **[5'-³²P]pCp** und **p[¹²⁵I]Cp**^[120,122], 5-Alkinuridin (**pUp^{Alk}**)^[103], 5-Fluoruridin (**pFUUp**)^[115], das fluoreszierende Derivat *N*⁶-Ethenoadenosin (**pEAp**)^[123], *N*⁶-6-Aminohexyl-Adenosin (**p(A-HA)p**)^[124], 8-Bromo-Adenosin (**p(8-Br-A)p**, *Jena Bioscience*) oder auch *N*⁶-6-Azidoethyl-Adenosin (**pA^{Azido}p**)^[125] (siehe Abb. 6).

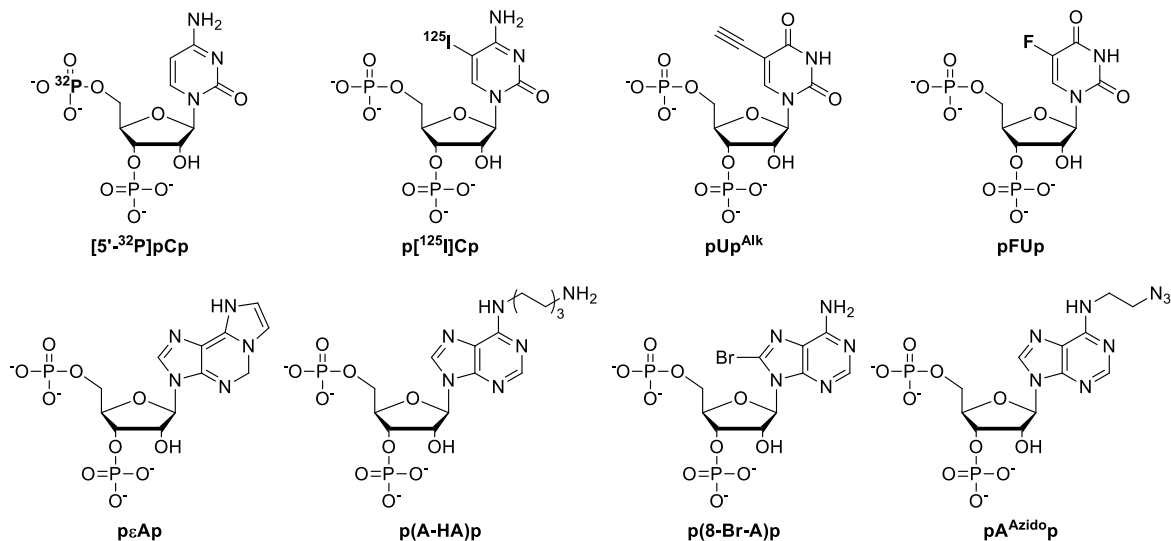


Abb. 6: Ausgewählte modifizierte Nucleosid-3',5'-Bisphosphate, die erfolgreich von Ligasen akzeptiert und mit dem 3'-Ende von RNAs verknüpft werden konnten.

Nach erfolgter enzymatischer 3'-Verlängerung kann die terminale Modifikation zunächst durch eine Phosphatase (z.B. *Shrimp Alkaline Phosphatase*, rSAP) dephosphoryliert werden, wodurch eine weitere Ligation ermöglicht wird. Anschließend kann die zuvor eingeführte endständige Modifikation mit Hilfe einer Splint-Ligation *via T4 RNA Ligase 2* ebenfalls enzymatisch in eine interne Modifikation umgewandelt werden.^[126,127] Als Splint wird eine (teilweise) zu den ligierenden RNA-Fragmenten komplementäre DNA-Sequenz bezeichnet, die die RNA-Fragmente durch Hybridisierung in räumliche Nähe bringt. Durch diese Vorkoordination wird die Ligation der 5'-Phosphatgruppe der Donor-Sequenz mit der 3'-terminalen Hydroxygruppe der Akzeptor-RNA ermöglicht und eine unerwünschte Polymerisation der einzelnen RNA-Fragmente unterbunden. Für die Ligation wird *T4 RNA Ligase 2* verwendet, die mit doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten interagiert. Durch Splint-Ligationen können verschiedene zuvor modifizierte RNA-Fragmente miteinander verknüpft und somit Gesamtsequenzen synthetisiert werden, die mittels chemischer Festphasensynthese nicht zugänglich wären.^[96,103,128-132] Die Effizienz von Ligrationsreaktionen ist dabei allerdings sowohl Fragment- als auch Substrat abhängig. Neben der benötigten 5'-Phosphatgruppe des Donor-Fragments und der zu verknüpfenden 3'-Hydroxygruppe des Akzeptors spielt auch die terminale 2'-Position der Akzeptornucleinsäure eine wichtige Rolle.^[112,133-135] Je nach Substitution der 2'-Position ändert sich die Konformation des Zuckers, was wiederum die Umsetzung mit der gewählten Ligase beeinflusst. 2'-OH, 2'-OMe, 2'-F und 2'-NH₂ als Substituenten führen zu einer C3'-endo-Konformation, wohingegen unsubstituierte (DNA-) Zucker (2'-H) in C2'-endo Konformation vorliegen. Eine Ligation durch Rnl2 kann nur effizient ablaufen, wenn eine C3'-

endo-Konformation des Zuckers vorliegt. Die Reaktionsgeschwindigkeit und erzielte Umsetzung nimmt hierbei allerdings von 2'-OH nach 2'-NH₂ ab.^[133] Ausbeuteverluste können durch Anpassungen der Reaktionsbedingungen (verlängerte Reaktionszeiten, erhöhte Enzymkonzentration, ...) teilweise ausgeglichen werden. Eine Ligation von reinen DNA-Duplexen ist mit Rnl2 aufgrund der C2'-endo-Zuckerkonformation nicht möglich. Für DNA:DNA-Ligationen wird daher DNA Ligase verwendet.

Neben der linearen Ligation von RNA-Fragmenten können Ligasen auch zur intramolekularen enzymatischen Zyklisierung eingesetzt werden (siehe Kapitel 1.1.4).^[130,136–138] Eine Ausnahme bildet die RtcB RNA Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung von 5'-OH-Fragmenten mit 2',3'-zyklisch phosphorylierter oder 3'-phosphorylierter RNA in Gegenwart von GTP und Mn²⁺. Somit läuft die Ligationsreaktion im Vergleich zu den restlichen DNA und RNA Ligasen in die entgegengesetzte Richtung ab.^[139–141]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zahlreiche enzymatische Methoden zur Modifizierung von RNA gibt, die je nach Zielkonstrukt gewählt werden können. Durch diese Methoden wird die schwierige Synthese langer, hochkomplexer RNAs zugänglicher und somit die orts- und/oder zeitaufgelöste Untersuchung deren Strukturen und Funktionen ermöglicht.^[96,142]

1.1.3 Festphasenmaterialien und magnetische Streptavidin Beads

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 angesprochen, bietet der Einsatz von Festphasenmaterialien enorme Vorteile, wodurch die Synthese von hochmodifizierten und sehr komplexen Oligonukleotiden ermöglicht wird. Reagenzien können im Überschuss eingesetzt und leicht durch Waschschritte wieder entfernt werden. Es gibt viele verschiedene Materialien, die sich als feste Phasen zur Immobilisierung von Biomolekülen eignen. In diesem Abschnitt wird kurz auf die Eigenschaften bekannter Beispiele eingegangen.

Im Rahmen der chemischen Festphasensynthese werden standardmäßig Trägermaterialien auf Silicabasis (*controlled pore glass*, CPG)^[61,143] oder Merrifield-Harze auf Polystyrolbasis (PS)^[60,144] verwendet. Das Festphasenmaterial sollte je nach geplanter Synthese gewählt werden. *Controlled Pore Glass* (CPG) wird meistens mit Porengrößen zwischen 500 – 2000Å angeboten. Die Standardbeladungsdichte liegt bei etwa 25 – 50 µmol/g. Für größere Synthesemaßstäbe von kurzen Sequenzen kann auch eine höhere Beladungsdichte bis zu 250 µmol/g gewählt werden (Produktangaben von *GlenResearch*, *LGC Link* und *Sigma Aldrich*). Glasträger haben den Vorteil nicht aufzuquellen und weitestgehend chemisch und mechanisch stabil zu sein.^[61] Da die Synthese innerhalb der definierten Poren stattfindet, sollte die Porengröße umso größer gewählt werden, je länger die zu synthetisierende Sequenz ist.^[143] 500Å CPG wird für kurze Fragmente bis zu etwa 30 Nukleotiden empfohlen. Für längere sowie hochmodifizierte Synthesen bis zu einer Länge von 100 Nukleotiden sollten 1000Å Poren verwendet werden. Hochgradig quervernetzte Polystyrol-Trägermaterialien in Kugelform werden häufig für kleinere Synthesemaßstäbe (40 – 200 nmol) eingesetzt. Die Beladungsdichte dieser Materialien liegt oftmals im Bereich von über 200 µmol/g.^[145] Im Vergleich zu CPG quillt Polystyrol während der Synthese durch den Kontakt mit Reagenzien und Lösungsmitteln auf, was bei größeren Synthesen zu Druckschwankungen und Überdruckproblemen während der Synthese führen kann.^[60,146] Das Festphasenmaterial ist

entweder mit dem ersten Nucleosid über das 3'-Ende oder alternativ mit einem *Universal Support* verbunden. *Universal Supports* können zur 3'-Modifikation während der Festphasensynthese eingesetzt werden, da sie kein Start-Nucleosid tragen.^[147,148] Verknüpfungen mit CPG-Material erfordern aufgrund der Poren einen Linker zwischen Festphase und Start-Nucleosid. Üblicherweise wird hierfür ein zusätzlicher langkettiger Alkylamin-Linker (LCAA) verwendet (Abb. 7A). Da die Derivatisierung von Polystyrolharzen direkt an deren Oberfläche erfolgt, kann hierbei auf den langkettigen LCAA-Linker verzichtet werden (siehe Abb. 7B am Beispiel eines *Universal Supports*).^[145]

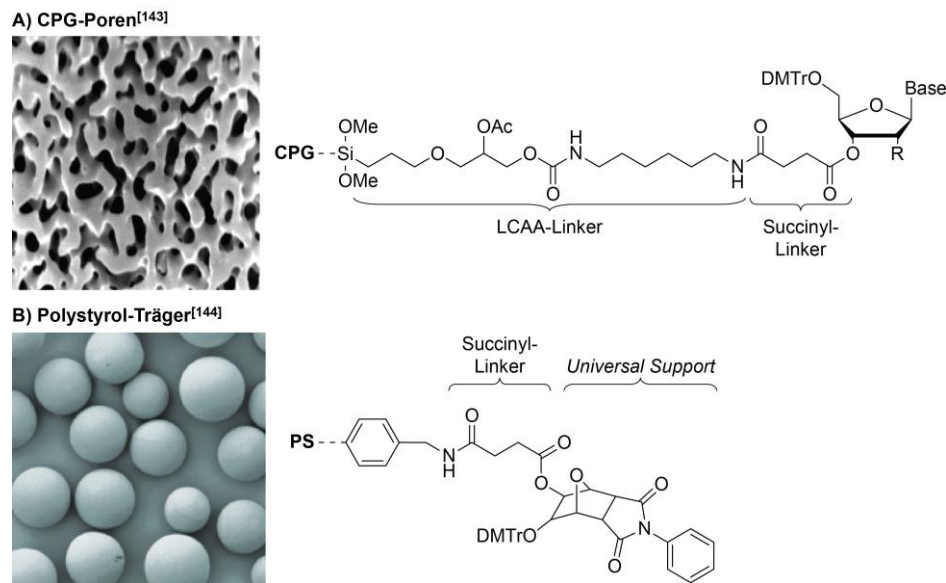


Abb. 7: CPG und Polystyrol-Trägermaterialien sowie Linkerstrukturen. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von CPG-Poren (Nachdruck mit Erlaubnis aus ^[143] © 2011, *Integrated DNA Technologies*) und Darstellung eines Start-Nucleosids, welches über einen LCAA- und einen Succinyl-Linker mit dem CPG-Material verbunden ist. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polystyrol-Kügelchen (Nachdruck mit Erlaubnis aus ^[144] © 2015, *Kinovate Life Sciences*) und Darstellung eines Succinyl-gebundenen *Universal Supports*.

Eine andere Art Material, das sich als Festphasenträger eignet, sind magnetische Nanopartikel (MNP). Diese werden zwar bisher nicht im Zusammenhang mit der automatisierten chemischen Festphasensynthese von Oligonucleotiden eingesetzt, stellen aber durch ihre magnetischen Eigenschaften und die damit verbundenen Vorteile eine interessante Möglichkeit zur Isolation und Fixierung in der organischen Synthese und der Anwendung von Biomolekülen dar (Abb. 8A).^[149–151] MNP sind aus zwei Bestandteilen aufgebaut: einem magnetischen Kern und einer funktionalisierten Hülle. Der magnetische Kern besteht meistens aus beschichtetem Eisenoxid (Fe_3O_4 oder $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^[152,153], Cobalt^[154,155] oder Nickel^[156].^[157] Die Hülle kann aus einzelnen oder mehreren funktionalisierten Carbon-, Silber-, Gold- oder Silica-Schichten aufgebaut sein. Die Größe der Nanopartikel variiert zwischen etwa 5 – 200 nm. Sie wird zum einen vom magnetischen Kern, aber auch von der Anzahl der Schichten und der Art der Funktionalisierung bestimmt. Mit magnetischen Nanopartikeln verbundene Substrate können mit Hilfe eines Magneten gut fixiert und somit innerhalb von Sekunden und dennoch effizient von sonstigen Reaktionskomponenten getrennt werden. Die verbleibenden Reaktanten können dann einfach mit dem Überstand entnommen werden.^[149,150,157] Auch Nucleinsäuren können mit magnetischen Nanopartikeln verbunden und auf verschiedene Arten isoliert werden. Eine Immobilisierung kann durch kovalente Bindungen mit funktionalisierten Partikelbeschichtungen erreicht werden (Abb. 8B a-e). Gebundene Oligonucleotide können wiederum über Watson-Crick-Franklin-Basenpaarung mit

komplementären Zielsequenzen hybridisieren (Abb. 8B f). Neben diesen Möglichkeiten sind nicht-kovalente Interaktionen ebenfalls gegeben. Die Wechselwirkungen können auch elektrostatisch zwischen den positiv-geladenen Metallionen und dem negativen Phosphatrückgrat des Oligonukleotids sein (nicht dargestellt). Außerdem können Interkalatoren an die MNP gebunden werden, die dann wiederum mit doppelsträngigen Zielsequenzen interagieren (Abb. 8B g).^[150]

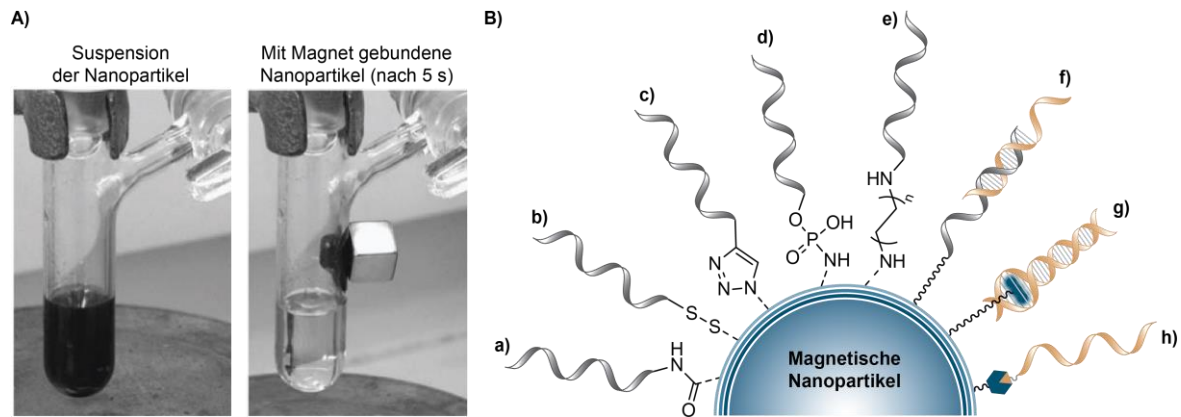


Abb. 8: Der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln und Interaktionsmöglichkeiten. A) Zu sehen ist eine Reaktionssuspension vor der Fixierung der Partikel (links) und die klare Reaktionslösung nach Isolation der Partikel mit Hilfe eines Magneten (rechts) (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus ^[155] (© 2008, *The Royal Society of Chemistry*). B) Interaktionsmöglichkeiten: a) Amidbindung; b) Disulfidbrücke; c) Bindung durch Alkin-Azid-Cycloaddition; d) Phosphoramidatbindung; e) Bindung über einen Aminolinker; f) Hybridisierung einer komplementären Zielsequenz; g) Interaktion eines Interkalators mit doppelsträngiger Nukleinsäure und h) Bindung durch Substrat-spezifische Wechselwirkung (angelehnt an ^[150]).

Eine weitere Möglichkeit der Separation von Nukleinsäuren mit magnetischen Nanopartikeln beruht auf Substrat-spezifischen Wechselwirkungen (Abb. 8B h). Hierzu können Enzyme oder Antikörper mit den Nanopartikeln verbunden werden, die dann wiederum gezielt mit der (Substrat-markierten) Zielsequenz interagieren.^[150] An dieser Stelle seien magnetische Streptavidin Beads erwähnt.^[158,159] Hierbei handelt es sich um 1 - 4 μm große superparamagnetische beschichtete Fe_3O_4 -Partikel, die kovalent mit einer hochreinen Form des Proteins Streptavidin verbunden sind. Das 52 kDa große Protein des Bakterienstammes *Streptomyces avidinii* besteht ausschließlich aus antiparallelen β -Faltblatt-Motiven, die vier identische Untereinheiten ausbilden (Homotetramer). Diese können jeweils eine Biotineinheit binden (Abb. 9).^[160,161]

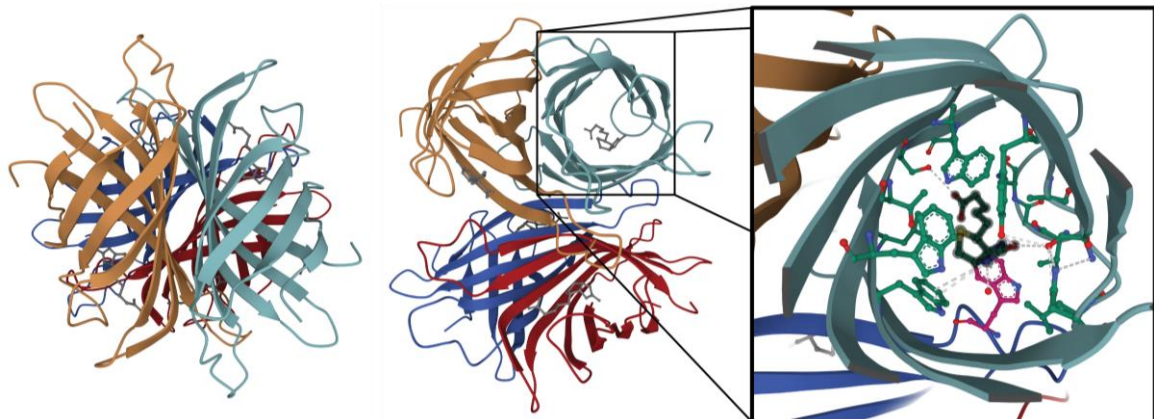


Abb. 9: Darstellung der Biotin/Streptavidin-Interaktion (PDB-ID: 6J6J^[161], dargestellt mit *Biovia Discovery Studio*^[114]). Die vier Untereinheiten sind farblich markiert. Jede Untereinheit bindet ein Biotin-Molekül. Links: Blick von oben auf das Protein. Mitte: Gesamtansicht mit Blick in eine Bindetasche. Rechts: Zoom auf die Bindetasche und die Wasserstoffbrücken-basierte Biotin-Interaktion (Biotin schwarz hinterlegt).

Die Biotin/Streptavidin-Interaktion ist nicht-kovalenter Art und basiert lediglich auf Wasserstoffbrückenbindungen.^[161] Dennoch ist die Interaktion sehr stark ($K_D = 10^{-15}$ M) und auch gegenüber hohen Salz- und Ureakonzentrationen stabil. Zusätzlich weist das Protein eine geringe Bindungsaffinität zu unspezifischen Substraten auf. Magnetische Streptavidin Partikel finden aufgrund ihrer Eigenschaften und der hohen Affinität zu Biotin-markierten Derivaten im Bereich der Biochemie zahlreiche Anwendungsoptionen. Häufig werden sie zur Isolation oder Fixierung von Antikörpern, Proteinen sowie Nukleinsäuren verwendet.^[161–163] Prinzipiell gibt es verschiedene Arten einen Biotin-Rest mit einem Oligonukleotid zu verknüpfen. Je nach Art der Verknüpfung können unterschiedliche 5'-Enden nach beendeter Synthese generiert werden. Die einfachste und stabilste Verbindung zwischen Biotineinheit und Oligonukleotid ist eine kovalente Bindung über einen Alkyl- oder Polyethylenglykol (PEG)-Linker (Abb. 10A). Nach beendeter Synthese verbleibt die Biotineinheit am 5'-Ende des hergestellten Oligonukleotids. Nach Bedarf kann sie in weiteren Versuchen zur Fixierung oder Aufreinigung dienen. Da biotinylierte Linker als Phosphoramidite kommerziell erhältlich sind, können sie einfach, schnell und effizient mittels chemischer Festphasensynthese am 5'-Ende eingebaut werden. Um die biotinylierten Produkte von den Beads zu lösen, kann mit konzentrierter Biotinlösung eluiert werden. Alternativ kann durch starke Änderung des pH-Wertes, Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) oder durch Erhitzen (> 70 °C)^[164] die Denaturierung des Proteins und damit das „Entfalten“ der Bindetasche herbeigeführt werden.^[161–163]

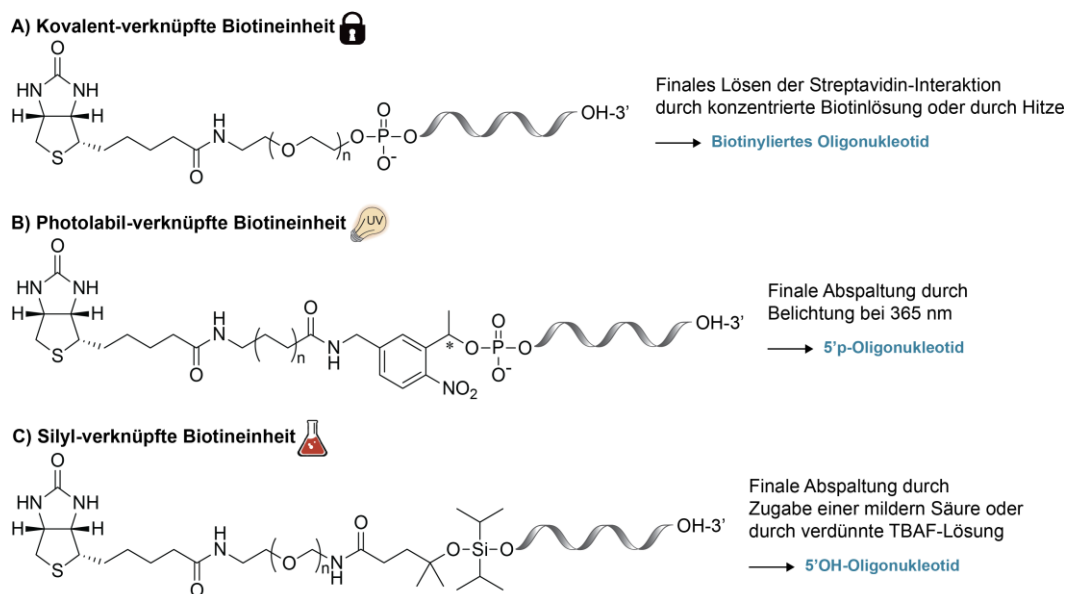


Abb. 10: Verschiedene Strategien eine Biotineinheit mit dem 5'-Ende eines Oligonukleotids zu verknüpfen. A) Kovalente Verbindung des Biotins über einen PEG-Linker. B) Photolabil-verknüpfte Biotineinheit. Die Abspaltung des Oligonukleotids erfolgt durch Bestrahlung. C) Fluoridlabile Silyl-verknüpfte Biotineinheit zur Abspaltung unter milden chemischen Bedingungen.

Eine zweite Strategie zur Verknüpfung eines Biotin-Restes besteht unter Verwendung eines photolabilen Linkers zwischen Oligonukleotid und Biotin (Abb. 10B). Der photolabile Linker kann final durch Belichtung bei 365 nm gespalten werden, wodurch das Oligonukleotid freigesetzt wird, ohne die Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin zu lösen. Am 5'-Terminus verbleibt dabei eine Phosphatgruppe. Auch der photolabile biotinylierte Linker ist als Phosphoramidit kommerziell erhältlich und per chemischer Festphasensynthese zugänglich.^[165,166] Alternativ können Alkyl-, PEG- und photolabil-verlinkte Biotineinheiten auch über *N*-Hydrosuccinimidester (NHS-Ester)-Chemie

postsynthetisch mit Aminolinkern verbunden werden.^[167,168] Eine rein enzymatische Synthese von biotinylierten Oligonukleotiden kann durch den Einsatz modifizierter Nukleosid-Monophosphate (nur 5'-terminale Biotinylierung möglich)^[102] und Nukleosid-Triphosphate (endständige und interne Modifikation möglich)^[167] in Transkriptionsreaktionen erzielt werden. Fang *et al.* stellten mit einer fluorid-absplaltbaren Biotineinheit eine weitere Variante vor (Abb. 10C).^[169,170] Das von ihnen synthetisierte Phosphoramidit konnte unter UltraMILD-Bedingungen in einer DNA-Synthese eingesetzt werden. Die verwendete Silylbindung erlaubt eine Abspaltung des Biotins mit verdünnter Säure oder durch Zugabe von 0,1 M Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF)-Lösung. Diese Bedingungen stellen eine mildere Alternative zu den herkömmlichen, vergleichsweise sehr harschen Elutionsbedingungen dar, da auch in diesem Fall nicht die Biotin/Streptavidin-Interaktion zur Elution des Produktes gelöst werden muss.

Über den Einsatz magnetischer Streptavidin Beads zur Fixierung und Aufreinigung von PCR-Produkten^[171,172] wurde ebenso berichtet, wie über die Bindung von Antisense-Oligonukleotiden^[173] und DNA-Protein-Komplexen aus Zellextrakt^[174]. Außerdem wurde bereits über Bead-gebundene enzymatische Oligonukleotidsynthesen wie PCR-Reaktionen^[175], Transkriptionen^[176] und DNA-Ligationen^[177] berichtet, was die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser Partikel nochmals hervorhebt.

1.1.4 Zyklisierung von RNA

Zyklische Ribonukleinsäuren stellen eine ganz eigene Klasse der Nukleinsäuren dar. Natürlich vorkommende End-zu-End zyklisierte RNAs (circRNA) blieben jedoch lange Zeit nach ihrer Entdeckung unterschätzt. In den letzten Jahren ist das Interesse an der Erforschung von circRNAs stark gestiegen. Inzwischen weiß man, dass sie während Transkriptions- und Spleißvorgängen gebildet und in allen Lebewesen gefunden werden können. Allerdings ist ihre biologische Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt.^[138,178–181] Ein großer Vorteil zyklischer RNAs ist ihre im Vergleich zu linearen Sequenzen erhöhte Stabilität gegenüber Exonukleasen (lineare RNA $t_{1/2}$: 11,3 - 13,2 h vs. circRNA $t_{1/2}$: 14,1 - 19,1 h in HuH 7.5 Zellen.^[182] Die Zyklisierung von RNA kann auf verschiedene Weise erfolgen und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden. Für die *in vitro*-Synthese stehen verschiedene chemische und enzymatische Methoden zur Verfügung. Der zentrale Mittelpunkt aller Methoden besteht aus der Ausbildung einer Verknüpfung des 3'- und des 5'-Endes eines linearen Oligonukleotids. Dabei müssen die Reaktionsbedingungen so angepasst werden, dass eine intramolekulare Ringschlussreaktion bevorzugt abläuft und die Bildung von linearen Oligomerisationsprodukten möglichst unterbunden wird. Hierfür werden Zyklisierungsreaktionen mit niedriger Konzentration des linearen Edukt-Oligonukleotids durchgeführt, wodurch allerdings die Synthese im präparativen Maßstab erschwert wird.^[136,138] Des Weiteren ist besonders bei chemischen Reaktionen darauf zu achten, dass die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass es weder zur Hydrolyse des Oligonukleotids (besonders bei RNA unter basischen Bedingungen^[75] zu beobachten), noch zur Spaltung der *N*-glykosidischen Bindung zwischen der Riboseeinheit und Purinbasen (Depurinierung) unter zu aziden Bedingungen^[79] kommt. Abb. 11 bietet eine Übersicht über verschiedene chemische Reaktionsmöglichkeiten zur Synthese zyklischer RNAs.

Chemische Methoden

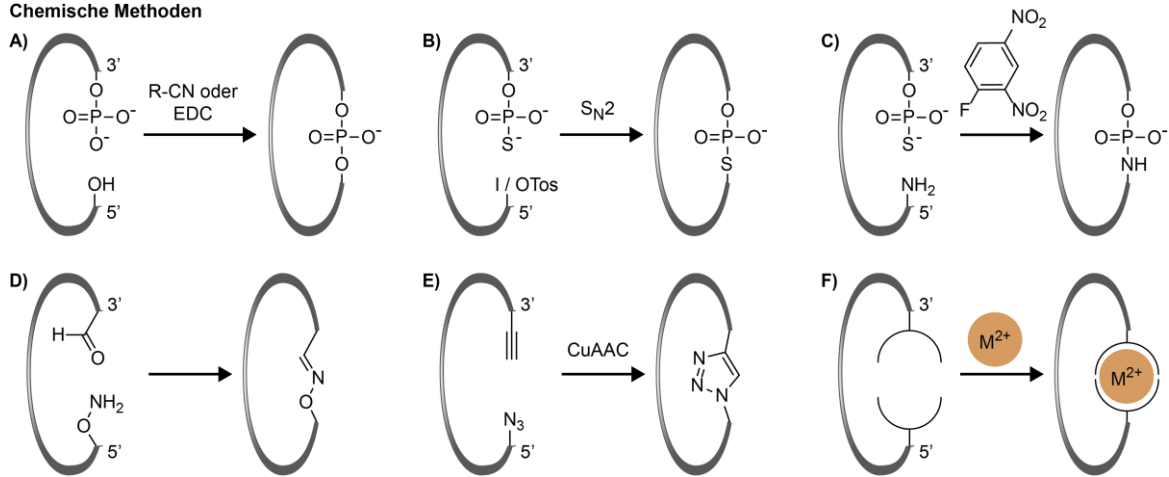


Abb. 11: Schematische Übersicht verschiedener Strategien zur chemischen Ligation (modifizierter) 3'- und 5'-Enden. A) Kondensationsreaktionen mit terminalem Phosphodiester; B) S_N2-Reaktionen mit terminalem Phosphorthioat; C) Umsetzung eines Phosphorthioates mit Sangers Reagenz; D) Ausbildung einer Oximbindung; E) Zyklisierung durch CuAAC; F) Ausbildung eines Chelatkomplexes.

Die chemische Verknüpfung eines 3'- und 5'-Endes eines Oligonukleotids wird auch als chemische Ligation bezeichnet. Ursprünglich wurden die Reaktionen zur linearen Verknüpfung von DNA-Strängen entwickelt. Durch chemische Ligation kann eine natürliche 3'-5'-Phosphodiesterbindung aufgebaut werden. Die Zyklisierungsreaktion kann direkt nach der chemischen Festphasensynthese gebunden am Festphasenmaterial durchgeführt werden.^[183] Alternativ kann die chemische Ligation einer Phosphat- und einer Hydroxygruppe mittels Cyano-Verbindungen, wie Bromcyan^[184] oder Cyanoimidazol^[185], oder in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)^[186,187] durch Kondensationsreaktionen erfolgen (Abb. 11A). Weitere Synthesemöglichkeiten ergeben sich durch terminal-modifizierte funktionelle Gruppen, die während der chemischen Festphasensynthese oder postsynthetisch durch Labeling-Reaktionen eingeführt werden können. Auch wenn dadurch bei der chemischen Zyklisierungsreaktion eine 3'-5'-Bindung entsteht, die nicht der natürlichen Phosphodiesterbindung entspricht, wird die resultierende circRNA zumeist dennoch vom biologischen System akzeptiert und ihre Funktion nicht negativ beeinflusst.^[136,138] Terminal als Abgangsgruppe eingeführte Iod-^[188] oder Tosylatfunktionen^[189] erlauben in Gegenwart eines terminalen Phosphorthioates oder einer terminalen Aminogruppe eine Bindungsbildung im Rahmen einer S_N2-Reaktion (Abb. 11B). Diese Methode wurde bisher allerdings nur im Rahmen von DNA-Zyklisierungsreaktionen angewendet. Angelehnt daran haben Maruyama *et al.* 2017 ein endständiges Phosphorthioat mit 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (auch Sangers Reagenz genannt) in eine elektrophile Gruppe umgewandelt, die von einer terminalen Aminogruppe angegriffen werden konnte. Die End-zu-End-Verknüpfung der beiden terminalen Einheiten kann dabei in beide Richtungen (3' → 5' und 5' → 3') ablaufen (Abb. 11C).^[190] Weitere Möglichkeiten der chemischen Ligation sind die Ausbildung einer Oximbindung^[191] (Abb. 11D), die kupfer-katalysierte Verknüpfung terminaler Alkin- und Azidfunktionen (CuAAC, Abb. 11E)^[192] oder eine Zyklisierung durch Ausbildung eines Chelatkomplexes (Abb. 11F)^[193]. Vor allem die kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition^[194,195] (CuAAC, Click-Reaktion) wurde bereits innerhalb des Arbeitskreises Heckel mehrfach erfolgreich angewendet.^[45,196–198] Die Kombination aus Zyklisierung eines Oligonukleotids und dem Einsatz photolabiler Schutzgruppen (siehe auch Kapitel 1.2.1) bietet die Option, die Zyklisierung durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge wieder aufzuheben. Hieraus ergibt sich die Option, die Funktionalität des Oligonukleotids effizient an- bzw. auszuschalten. Durch den zyklischen Zustand kann die Interaktion mit einer komplementären

Zielsequenz und damit ihr biologischer Effekt unterbunden werden. Durch Belichtung lässt sich der lineare Zustand wiederherstellen, wodurch auch die Hybridisierung mit dem komplementären Strang möglich wird.^[45,196–199]

Ein Nachteil chemischer Ligationsreaktionen sind häufig die Limitierung durch kleine Ausbeuten und Reaktionsansätze mit sehr niedriger Konzentration (pM - μ M), weshalb die Synthese im präparativen Maßstab deutlich erschwert wird. Ein weiterer Nachteil ist der erforderliche Einsatz von teils zellschädigenden oder schlecht wasserlöslichen Reagenzien. So werden beispielsweise im Falle von CuAAC-Reaktionen zelltoxische Cu-Spezies eingesetzt, die zudem Liganden zur Stabilisierung benötigen. Häufig weisen diese Liganden eine schlechte Wasserlöslichkeit auf und können nicht ohne Zugabe eines organischen Lösungsmittels eingesetzt werden.^[200] Für die Anwendung der synthetisierten circRNAs müssen diese nach erfolgter Synthese aufwendig aufgereinigt werden. Dieses Problem kann durch enzymatische Reaktionen unter physiologischen Bedingungen umgangen werden. Der Einsatz von Ligasen ermöglicht die Synthese einer natürlichen Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch. Mit Hilfe von *T4* RNA Ligase 1 können einzelsträngige Oligonukleotide umgesetzt werden.^[182] Um eine Zyklisierungsreaktion zu erreichen, wird auch hier mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet. Wie bei linearen Ligationsreaktionen auch, wird für die Zyklisierung ein 5'-terminales Monophosphat benötigt, das mit einer 3'-Hydroxygruppe verbunden wird (Abb. 12A).^[136,138] Die Ligation doppelsträngiger RNA mit Hilfe von *T4* DNA Ligase oder *T4* RNA Ligase 2 kann nur dann erfolgreich ablaufen, wenn die zu zyklisierende Sequenz eine doppelsträngige Struktur aufweist. Neben der Verwendung von komplementären Gegensträngen (Splints, Abb. 12B) kann eine doppelsträngige Struktur lokal an der Ligationstelle auch durch Ausbildung von Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen^[201], Schleifen^[137] oder auch G-Quadruplexen^[202] erreicht werden. Hierbei werden die zu verknüpfenden Enden durch intramolekulare Hybridisierung koordiniert und vom Enzym erkannt. Eine geschickte Synthesepaltung erlaubt in diesen Fällen die Ligation ohne zusätzliche Hilfssequenzen.

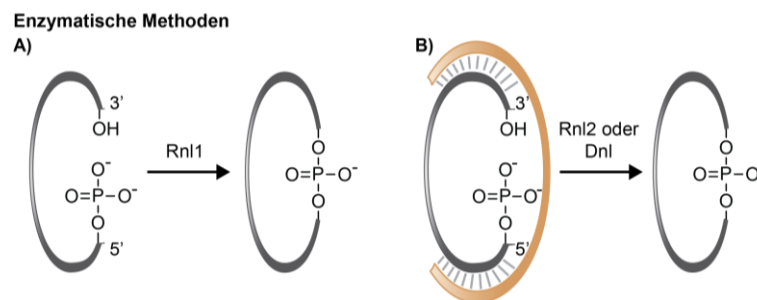


Abb. 12: Schematische Übersicht enzymatischer Zyklisierungsmethoden unter Ausbildung einer natürlichen Phosphodiesterbindung basierend auf Ligationsreaktionen.

Generell sind Ligationsausbeuten (auch im Falle von chemischen Ligationen) vorkoordinierter Strangenden verbessert. Zusätzlich wird dadurch auch die Bildung von unerwünschten Oligomeren unterbunden. Chemische Ligationen eignen sich vor allem für kürzere Sequenzen (bis zu etwa 100 Nukleotiden), wohingegen enzymatische Ligationsmethoden bis hin zu mehreren hundert Nukleotiden eingesetzt werden können.^[136,138] Der Verlauf von Zyklisierungsreaktionen und die resultierende AN/AUS-Regulierung hängt immer auch von der Länge des Oligonukleotids ab. In diesem Zusammenhang wird oftmals auf die sogenannte Persistenzlänge verwiesen, die beschreibt, wie lange sich das Zucker-Phosphatrückgrat wie eine gerade-verlaufende Einheit verhält.^[203,204] Doppelsträngige Strukturen sind viel weniger flexibel, als einzelsträngige. Für doppelsträngige DNA

wird eine Persistenzlänge von etwa 50 nm angegeben. Einzelsträngige DNAs sind dagegen sehr viel beweglicher und weisen nur wenige Nanometer Persistenzlänge auf. Daraus folgt, je kürzer die zu zyklisierende Sequenz, desto unwahrscheinlicher ist die Hybridisierung mit einer komplementären Gegensequenz. Im Gegensatz dazu stehen längere Sequenzen, die dazu neigen, Unterstrukturen und Verknotungen auszubilden, je länger sie sind. Studien von Tang *et al.*^[205] und auch von Seyfried *et al.*^[196] konnten zeigen, dass eine Zyklisierung von kurzen Oligonukleotiden (9 nt bis 25 nt) dazu führen kann, die Interaktion mit einer komplementären Sequenz zu unterbinden. Werden die zyklischen Konstrukte länger (> 40 nt)^[205], ist eine Inhibierung der Hybridisierung mit der Gegensequenz nicht mehr zielführend möglich.

CircRNAs stellen aufgrund ihrer natürlichen Häufigkeit einen interessanten Ausgangspunkt für therapeutische Ansätze dar, allerdings müssen sie dafür weiter erforscht werden. Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Synthese zyklischer RNAs in präparativen Mengen noch sehr zeit- und kostenintensiv. Die Herausforderung besteht in der Herstellung von vielseitig modifizierten circRNAs in präparativen Mengen, die zusätzlich einen hohen Reinheitsgrad aufweisen, um in Zellexperimenten angewendet werden zu können. Die existierenden Synthesemethoden bilden eine gute Grundlage für weitere Erkenntnisse auf diesem Forschungsgebiet.

1.2 Adressierbarkeit von Biomolekülen durch Licht

Um biologische Prozesse untersuchen und nachvollziehen zu können, bedarf es Methoden, die temporär eine gezielte Regulierung von Biomolekülen ermöglichen, ohne das zu untersuchende System zu beschädigen oder durch Nebenreaktionen zu beeinflussen. Photochemische Methoden haben sich hierfür in den letzten Jahren als sehr vielversprechend erwiesen, da sie orthogonal zu chemischen und physikalischen Auslösesignalen, wie Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes oder der Konzentration, genutzt werden können. Durch die Möglichkeit der Fokussierung sowie der Anpassung von Belichtungsdauer und -intensität erweist sich Licht mit geeigneter Wellenlänge als selektives, nicht-invasives, zeit- und orts aufgelöstes Auslösesignal. Für die Anwendung in biologischen Systemen sollte Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von langwelligem ultraviolettem (UV-A) oder besser sichtbarem Licht (vis) gewählt werden (~ 350 – 750 nm), um Photoschäden, wie beispielsweise die Bildung von Thymidin-Dimeren^[206,207] oder von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffspezies^[207,208], zu vermeiden. Wird die adressierte Verbindung mit Licht bestrahlt, kann diese durch Absorption der Photonen in einen energetisch angeregten Zustand versetzt werden. Aus diesem Zustand sind verschiedene Reaktionswege möglich, durch die die Energie umgesetzt oder abgegeben und der energetische Grundzustand wiederhergestellt werden kann. Neben strahlenden Vorgängen der Energieabgabe, wie Fluoreszenz und Phosphoreszenz, können auch strahlungslose Vorgänge, wie Isomerisierungsreaktionen und Bindungsbrüche durch Bestrahlung induziert und für photochemische Reaktionen genutzt werden.^[209–211]

Im Wesentlichen stellt die Photochemie drei Möglichkeiten zur Verfügung, wie Licht als Werkzeug zur Regulierung zu untersuchender Systeme eingesetzt werden kann: I) irreversible (Re-) Aktivierung durch photolabile Schutzgruppen; II) reversible Isomerisierung durch Photoschalter und III) Regulierung durch genetisch kodierte licht-sensitive Triggerproteine (Optogenetik).^[209–211]

Die Verwendung photolabiler Schutzgruppen (siehe Kapitel 1.2.1) und Azobenzol-basierter Photoschalter (siehe Kapitel 1.2.2) steht im Fokus dieser Arbeit.

1.2.1 Irreversible Regulation durch photolabile Schutzgruppen

Der Einsatz photolabiler Schutzgruppen (engl. *photoremovable protecting groups*, PPGs), auch als *Cages*^[212] bezeichnet, zur gezielten (Re-) Aktivierung von Biomolekülen hat sich als vielseitiges Werkzeug herausgestellt. Ziel der Methode ist es, die Interaktion funktioneller Gruppen durch die Anwesenheit einer lichtsensitiven Gruppe vorübergehend zu stören oder zu unterbinden. Eine geschickte Platzierung photolabiler Schutzgruppen kann im besten Fall eine vollständige Unterbindung der Molekülaktivität erreichen. Durch Belichtung wird die Schutzgruppe irreversibel abgespalten und die Funktionalität wiederhergestellt. Erstmals wurde die Untersuchung photolabiler Schutzgruppen 1962 von Barltrop und Schofield publiziert.^[213] Allerdings lag die verwendete Wellenlänge zur Photolyse bei 254 nm und somit im zellschädigenden UV-C-Bereich. Die erste biologisch relevante Anwendung folgte 15 Jahre später von Engels und Schlaeger, die zeigen konnten, dass die Interaktion von zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP, **2**) mit einer Proteinkinase erst nach erfolgter Photolyse bei 366 nm (UV-A-Bereich) stattfinden kann (Abb. 13).^[214] Seitdem wurden immer weitere Anwendungsfelder untersucht und neue photolabile Schutzgruppen mit unterschiedlichen photochemischen Eigenschaften entwickelt.^[209–211,215]

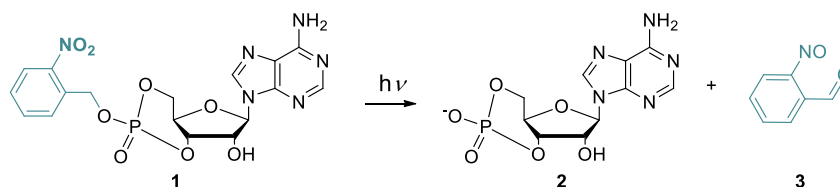


Abb. 13: Photolyse eines *ortho*-Nitrobenzyl-geschützten zyklischen Adenosinmonophosphates (**1**) nach Engels *et al.*^[214] als erste publizierte Anwendung in biologischem Kontext.

Um als geeignete photolabile Schutzgruppe für Anwendungen in biologischen Systemen in Frage zu kommen, sollten einige Anforderungen erfüllt sein. Hierzu gehört neben einer Absorption im UV/vis-Bereichs (> 315 nm) eine gute Löslichkeit im Anwendungsmedium und gleichzeitig eine hohe Stabilität gegenüber verschiedener Reaktionsbedingungen. Die Schutzgruppe sollte synthetisch einfach zugänglich sein und selektiv an die gewünschte Position angebracht werden können. Darüber hinaus sollte die PPG idealerweise orthogonal zu allen anderen funktionellen Gruppen adressierbar sein, einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ und eine möglichst hohe Quantenausbeute ϕ_u aufweisen. Die entstehenden Photolyseprodukte sollten so wenig wie möglich im Bereich der geschützten Ausgangsverbindung absorbieren, um Konkurrenzreaktionen zu verhindern und sich nicht toxisch auf das Anwendungssystem auswirken. Die Abspaltung muss schneller ablaufen als der zu untersuchende Prozess. Im Idealfall wird die Schutzgruppe vollständig abgespalten, sodass die native Form des freigesetzten Biomoleküls wiederhergestellt wird. Umso mehr dieser Anforderungen erfüllt werden, umso besser eignet sich eine photolabile Schutzgruppe für die geplante Anwendung.^[209,216]

Die wohl am meisten untersuchten photolabilen Schutzgruppen sind Derivate von *ortho*-Nitrobenzyl (*o*NB)-Verbindungen. Ausgehend von unsubstituiertem *o*NB ist die Verwendung von 1-

(2-Nitrophenyl)ethyl (NPE) mit zusätzlicher Methylgruppe eine beliebte Schutzgruppe.^[209,217] Sie sind einfach zu synthetisieren, sehr gut charakterisiert, mit vielen funktionellen Gruppen kompatibel und unter vielen Bedingungen stabil. Daher werden sie auch heute noch weitverbreitet eingesetzt. *o*NB-basierte Schutzgruppen können zur temporären Blockade von Alkoholen^[218], Aminen^[219], Phosphaten^[214], Thiolen^[220] oder auch Carbonsäuren^[221] verwendet werden. Der Mechanismus der Photolyse der *o*NB- und der NPE-Schutzgruppe^[209,216] ist in Abb. 14 dargestellt.

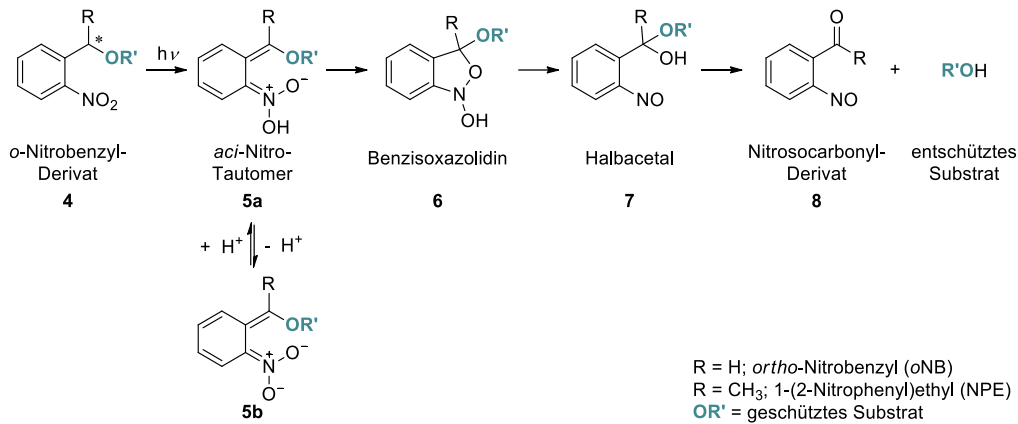


Abb. 14: Mechanismus der Photolyse von *o*-Nitrobenzyl-basierten photolabilen Schutzgruppen.^[209,216]

Durch Bestrahlung ($h\nu$) des Grundzustandes des *o*-Nitrobenzyl-Derivats **4** kommt es zu einer intramolekularen [1,5]-H-Abstraktion, wodurch ein *aci*-Nitro-Tautomer als kurzlebiges Zwischenprodukt entsteht (**5a** und **5b**). Zwischen protonierter **5a** und deprotonierter Form **5b** besteht ein Gleichgewicht. Die Zerfallsrate des *aci*-Tautomers liegt bei $\sim 10^2 - 10^4 \text{ s}^{-1}$ und ist abhängig vom jeweiligen Derivat (*o*NB, NPE, ...), dem verwendeten Lösungsmittel, sowie dem pH-Wert. Irreversible Zyklisierung führt zu 1,3-Benzisoxazolidin **6**, welches unter Ringöffnung zu einem Halbacetal **7** weiterreagiert. Durch Hydrolyse wird ein Nitrosocarbonyl-Derivat **8** gebildet und das Substrat **9**, auch als Abgangsgruppe (engl. *leaving group*, LG) bezeichnet, freigesetzt.^[209] Ein Nachteil der unsubstituierten *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe ist die Bildung eines reaktiven und toxischen Nitrosoaldehyden als Photolysenebenprodukt. Deshalb wird für biologisch relevante Anwendungen bevorzugt auf NPE zurückgegriffen, da das entstehende Nitrosoketon weniger reaktiv und das Absorptionsmaximum im Gegensatz zu dem von *o*NB rotverschoben ist. Zusätzlich läuft die Photolysereaktion schneller ab.^[209,222]

Eine weitere häufig verwendete Schutzgruppenklasse sind Cumarine. Seit der ersten Verwendung des Naturstoffs als photolabile Schutzgruppe durch Givens *et al.*^[223] 1984 zur Freisetzung von Phosphateestern, sind viele Derivate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern synthetisiert und untersucht worden. Im Vergleich mit *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen weisen Cumarin-Schutzgruppen höhere Extinktionskoeffizienten bei bathochrom-verschobenen Wellenlängen ($> 400 \text{ nm}$) und schnellere Photolyseraten auf.^[209] Ein zusätzlicher Vorteil zur Nachverfolgung des geschützten Moleküls ist die Fluoreszenz von Cumarin-Verbindungen. Die Einführung unterschiedlicher Substituenten kann zur Wasserlöslichkeit und Rotverschiebung des Absorptionsmaximums führen. Das wohl bekannteste Beispiel ist die Einführung einer elektronendonierenden Diethylamino-Gruppe an Position 7, wodurch (7-Diethylaminocumarin-4-yl)methyl (DEACM) mit einem Absorptionsmaximum bei 400 nm entsteht. Der Photolysemechanismus Cumarin-basierter Schutzgruppen wurde häufig diskutiert. Im Allgemeinen wird auf den von Schade *et al.* postulierten Mechanismus der Lösungsmittel-unterstützten Photoheterolyse verwiesen (siehe Abb. 15).^[209,224]

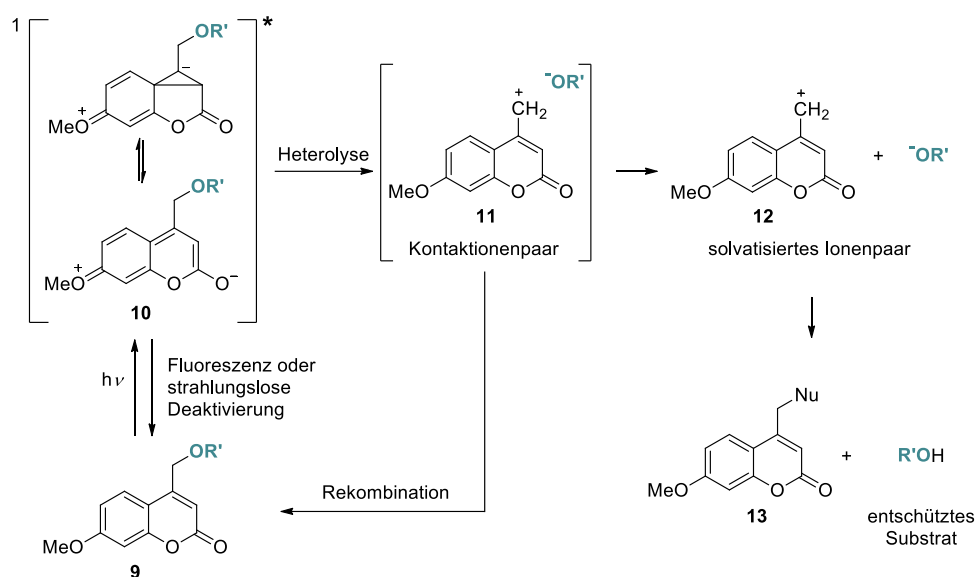


Abb. 15: Mechanismus der Photolyse von Cumarin-basierten photolabilen Schutzgruppen nach Schade *et al.*^[209,224].

Durch Belichtung ($h\nu$) wird Verbindung **9** in den ersten angeregten π - π^* -Singulett-Zustand (**10**) versetzt. Aus diesem S_1 -Übergangszustand findet eine Heterolyse der C-OR'-Bindung statt. Die heterolytische Spaltung steht dabei in einer Konkurrenzreaktion zu einem strahlungslosen Übergang oder einer Fluoreszenzemission zurück in den elektronischen Grundzustand. Das heterolytische Kontaktionenpaar **11** wird durch die Unterstützung eines polaren Lösungsmittels solvatisiert (**12**). Im Folgenden reagiert es entweder mit dem Lösungsmittel selbst oder mit einem nukleophilen Reaktionspartner unter Freisetzung des Substrates zu Cumarin-Derivat **13**. Da ausgehend vom Kontaktionenpaar auch eine Rekombination zum geschützten Ausgangssubstrat **9** möglich ist, werden häufig Elektronen-schiebende Substituenten an Position 6 oder 7 des Cumarin-Gerüsts eingeführt, die sich stabilisierend auf das Ionenpaar auswirken und damit den Reaktionspfad der Solvatisierung unterstützen.^[209,224,225] Für einen Photolyse-Mechanismus einiger Cumarin-geschützter Amin-Derivate sei auf einen radikalisch ablaufenden Reaktionspfad verwiesen.^[209,226]

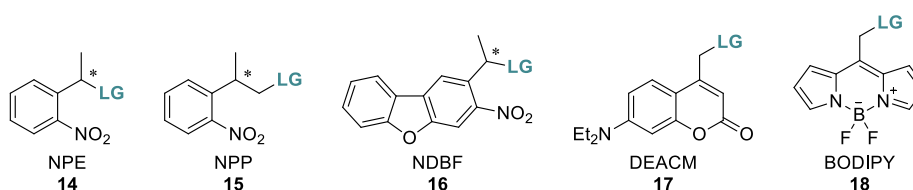


Abb. 16: Strukturen wichtiger Vertreter photolabiler Schutzgruppen (LG = Abgangsgruppe).

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Nitrobenzyl-Derivaten 1-(2-Nitrophenyl)ethyl (NPE, **14**) und 2-(2-Nitrophenyl)propyl (NPP, **15**) sowie der (7-Diethylaminocumarin-4-yl)methyl (DEACM, **17**)-Schutzgruppe sind rotverschobener anregbare Vertreter wie Nitrodibenzofuran (NDBF, **16**)^[227], 4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (Bordipyromethen, BODIPY, **18**)^[228,229] oder auch Heptamethincyanin (Cy7)-basierte Schutzgruppen^[230,231] inzwischen beliebte Alternativen. Insgesamt decken sie einen weiten Teil des elektromagnetischen Spektrums im UV/vis-Bereich ab. Das Interesse an bathochrom-verschobenen photolabilen Schutzgruppen begründet sich aus der Nachfrage nach *in vivo* und therapeutisch einsetzbaren Verbindungen. Die Anwendung photolabiler Schutzgruppen mit kleinem aromatischem π -System, wie es bei NPE oder auch DEACM der Fall ist,

konnte im biologischen Kontext bereits mehrfach auch *in vivo* erfolgreich gezeigt werden. Allerdings wird dabei meistens auf transparente Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) Fadenwürmer oder auf Zebrafische in den ersten Entwicklungsstadien zurückgegriffen.^[12,232,233] Alternativ beschränkt sich der Einsatz dieser PPGs auf dünne Gewebeschichten, wie die oberen Hautschichten oder auf oberflächliche Anwendungen.^[234] Verschiedene Gründe führen zu diesen eingeschränkten Anwendungsmöglichkeiten. Nach wie vor basieren die meisten Schutzgruppen eben auf diesen im Bereich von 300 – 450 nm absorbierenden Nitrobenzyl- und Cumarin-Gerüsten.^[217] Die Energie, die von Photonen dieses kurzwelligigen UV-Lichts absorbiert werden kann (Energie eines Photons mit $\lambda = 300$ nm beträgt $95,6 \text{ kcal mol}^{-1}$)^[209], reicht zwar aus, um Bindungsspaltungen, Isomerisierungen oder Umlagerungsreaktionen zu induzieren, allerdings kann dieses Licht aufgrund von starker optischer Streuung und der Absorption zelleigener Bestandteile (z.B. Wasser, β -Carotin in Pflanzen oder Hämoglobin in Blut und Melanin in Haut) nur begrenzt in Gewebe eindringen. Zusätzlich können lange Bestrahlungen mit hoher Intensität und energiereichem UV-Licht zu Gewebeschäden und einem Überhitzen der Probe führen.^[207,209,235,236] Aus diesem Grund beschäftigte sich die Forschung in den letzten Jahren vermehrt mit der Synthese und Erforschung bathochrom-verschoben adressierbarer Schutzgruppen, um den Einsatz langwelligeren sichtbaren Lichts oder im Nahinfrarot-Bereich (NIR) zu ermöglichen und die genannten Hindernisse zu umgehen.^[209,215,229,230,237,238]

Betrachtet man das Lichtspektrum unter Berücksichtigung der bekannten Einschränkungen im Kontext mit möglichen Anwendungsgebieten, ergeben sich aus phototherapeutischer Sicht zwei interessante Bereiche: für Pflanzen die sogenannte „Grünlücke“ (engl. *Green Gap*) im Bereich von $\sim 500 - 600$ nm^[239,240] und in Bezug auf Säugetiere und Menschen ein als „phototherapeutisches Fenster“ bezeichneter Bereich von $\sim 650 - 900$ nm^[241–243]. In diesen beiden Bereichen weisen die jeweiligen zelleigenen Bestandteile die geringste Absorption auf. Somit eignen sich diese beiden Lücken besonders gut zur Anwendung photolabiler Schutzgruppen, da keine konkurrierenden Absorptionsvorgänge stattfinden, wenn mit den entsprechenden Wellenlängen angeregt wird. Um eine effektive Lichtregulation in Pflanzen zu erreichen, müssen lichtaktivierbare Verbindungen mit Absorptionen im Bereich der Grünlücke verwendet werden. Definiert wird diese Lücke durch die Kombination der Absorptionsspektren zelleigener Chromophore, wie Chlorophyll a und Chlorophyll b sowie β -Carotin, die gemeinsam den Lichtsammelkomplex bilden, der zur Photosynthese benötigt wird (siehe Abb. 17).^[239,240]

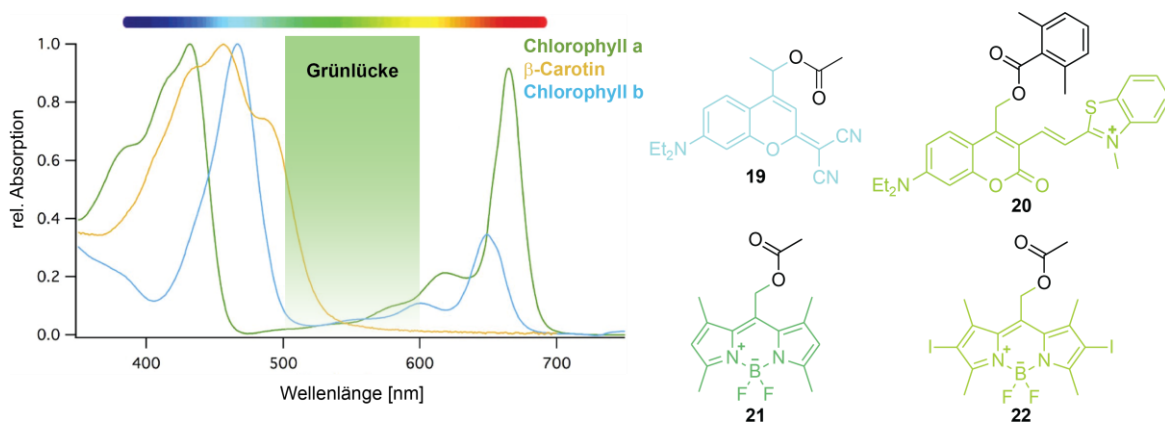


Abb. 17: Darstellung der Grünlücke durch Kombination der Absorptionsspektren von Pflanzenbestandteilen (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus Johnson *et al.*^[239] und angepasst; CC BY 4.0 Lizenz) sowie ausgewählte photolabile Schutzgruppen, die sich zum Einsatz in der Grünlücke eignen.

Um Schutzgruppen zu erhalten, deren Absorptionsmaximum zwischen 500 – 600 nm liegt, kann das π -System bekannter Schutzgruppen erweitert und/oder verschiedene Substituenten eingebracht werden. Beispielsweise eignet sich das Cumarin-Gerüst für solche Modifikationen. Die Einführung einer Malonitril-Einheit anstelle des Carbonyl-Sauerstoffs an Position 2 (**19**) führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 489 nm (in 1:1 Tris/MeCN).^[244] Alternativ berichteten Bojtár *et al.* von einem wasserlöslichen Grünlicht-aktivierbarem Cumarin-Derivat **20**. Die Erweiterung an Position 3 um einen Heterozyklus begünstigt ein $\lambda_{\max} = 538$ nm (in H₂O und DMSO).^[237] Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung bekannter Fluorophore, wie BODIPY, als photolabile Schutzgruppe. Diese Option wurde von den Arbeitsgruppen Winter^[245] und von Weinstain^[246] bereits 2015 unabhängig voneinander publiziert. Das Absorptionsmaximum der BODIPY-Verbindung **21** liegt bei 515 nm und kann durch Einführung der Iod-Reste in **22** auf $\lambda_{\max} = 553$ nm (beide in MeOH) verschoben werden.^[245] Daraufhin wurden verschiedene BODIPY-Derivate untersucht, deren Absorptionsmaximum noch weiter in den langwelligen Bereich verschoben ist. Derivate wie **23** ($\lambda_{\max} = 661$ nm (in MeOH))^[229] könnten sich als gute Werkzeuge für Belichtungsexperimente im phototherapeutischen Fenster und damit in Gewebe oder Blut herausstellen. Der Bereich des phototherapeutischen Fensters wird unterhalb einer Wellenlänge von 600 nm hauptsächlich durch die Absorption von Vitaminen, Melanin und Hämoglobin definiert (siehe Abb. 18). Die obere Grenze des Fensters von etwa 900 nm ergibt sich aus der auftretenden Absorption von Wasser.^[241–243] Neben BODIPY-Derivaten weisen auch Cy7-basierte Schutzgruppen wie **24** ein großes π -System und Photolysereaktionen bei Bestrahlungen oberhalb von 690 nm auf.^[230,231]

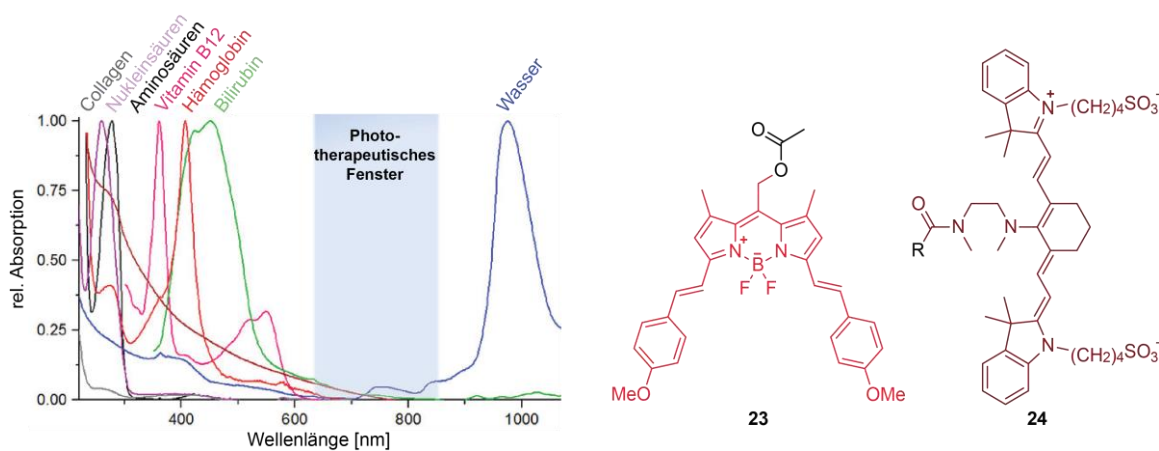


Abb. 18: Darstellung des phototherapeutischen Fensters durch Kombination der Absorptionsspektren von zelleigenen Chromophoren (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus Dąbrowski *et al.*^[241] und angepasst; © 2016, Elsevier B. V.) sowie ausgewählte photolabile BODIPY (**18**)- und Cy7 (**19**)-basierte Schutzgruppen.

Ein Problem großer Chromophore besteht oftmals in ihrer schlechten Wasserlöslichkeit und Membranpermeabilität, was biologische Anwendungen erschwert. Die Einführung hydrophiler Reste, wie Polyethylenglykol (PEG)-^[229], Sulfonyl-^[230] oder Carboxylgruppen^[215], kann diese Eigenschaften verbessern. Außerdem weisen sie häufig eine geringere Quantenausbeute als Schutzgruppen mit kleinerem π -System auf, was eine effiziente Abspaltung erschwert. Erste Anwendungen photolabiler Schutzgruppen, die durch Bestrahlungen mit roteverschobenem Licht abgespalten werden, konnten bereits in biologisch relevanten Studien gezeigt werden.^[198,231,247]

Die Vielzahl der unterschiedlichen photolablen Schutzgruppen, die heute zur Verfügung stehen, bietet zahlreiche Vorteile. So können durch geschickt kombinierte Schutzgruppen mit

unterschiedlichen Absorptionsmaxima verschiedene Prozesse orthogonal zueinander aktiviert werden.^[248–250] An dieser Stelle sei auch das Prinzip der Zwei-Photonen-Anregung erwähnt, die besonders für mikroskopische Untersuchungen hervorragende Ortsauflösung und somit weitere Optionen bietet.^[251–254]

Die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten von photolabilen Schutzgruppen erstrecken sich unter anderem von der Regulierung von Ionen und niedermolekularen Verbindungen, wie biologisch relevante Liganden, über Peptide, Proteine, Neurotransmitter, Fettsäuren oder auch Nukleinsäuren.^[209–211,222] Durch ihre unterschiedlichen spektroskopischen und chemischen Eigenschaften kann die jeweils passende Schutzgruppe für beliebige Anwendungen gewählt werden. Die photochemische Regulierung von Nukleinsäuren wird in Kapitel 1.2.3 näher betrachtet und dabei auf aktuelle Anwendungsbeispiele eingegangen.

1.2.2 Reversible Regulation durch Azobenzol-Photoschalter

Neben irreversibel abspaltbaren photolabilen Schutzgruppen bilden reversible Photoschalter (engl. *photoswitches*) eine weitere Gruppe lichtadressierbarer Verbindungen.^[255,256] Anders als bei photolabilen Schutzgruppen resultiert die Anregungsenergie nicht in einem Bindungsbruch zur Abspaltung der Einheit, sondern in einer Isomerisierung der belichteten Verbindung. Im Grunde sind Photoschalter bistabile Moleküle, die im elektronischen Grundzustand ein thermodynamisch stabiles (A) und ein metastabiles Isomer (B) annehmen können. Durch Belichtung wird das Molekül in einen angeregten Zustand versetzt, aus dem es die jeweils andere isomere Form annehmen kann (Abb. 19A). Dabei ändert sich neben der Konformation auch das Absorptionsspektrum des Photoschalters (Abb. 19B). Der Vorgang ist reversibel, sodass eine Rückisomerisierung durch Belichtung innerhalb des neuen Absorptionsmaximums stattfinden kann. Neben einer photochemisch-induzierten (P-Typ) ist auch eine thermische (T-Typ) Rückisomerisierung möglich. Damit die photochemischen Isomerisierungsreaktionen zielgerichtet ablaufen, sollten möglichst nur zwei Isomere Formen auftreten und sich die Absorptionsspektren beider Isomere deutlich voneinander unterscheiden. Ist das der Fall, haben die beiden Isomere häufig auch unterschiedliche Farben, weshalb Photoschalter auch als Photochromophore^[257] bezeichnet werden.^[255,256]

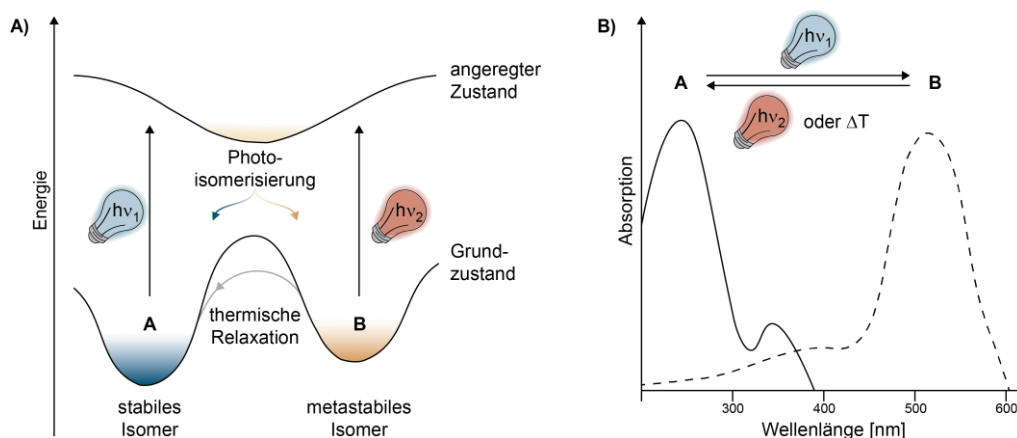


Abb. 19: Durch Anregung des thermodynamisch stabilen Isomers A in den angeregten Zustand, kann eine Photoisomerisierung in das metastabile Isomer erfolgen. Die Rückisomerisierung ist sowohl photochemisch, als auch thermisch möglich. A) Schematische Darstellung potentieller Energieebenen. B) Schematische Darstellung der Absorptionsspektren der Isomere A und B. (Abb. angelehnt an die Literatur^[255,256]).

Grundlegend lassen sich bistabile Photochromophore in zwei Subtypen unterteilen. Zum einen gibt es *cis/trans* (auch als *E/Z* bezeichnet) Photoschalter, die um eine Doppelbindung isomerisieren. Hierzu gehören Stilbene, Azobenzole oder Hemithioindigos. Zum anderen gibt es beispielsweise Fulgide, Spiropyrane oder Diarylethene, die perizyklische Reaktionen durchlaufen und zwischen einer offenen und einer geschlossenen Form isomerisieren (Abb. 20). Die Isomerisierung ändert nicht nur die spektroskopischen Eigenschaften eines Photoisomers, sondern führt auch zu Konformationsänderungen, die ein Anwendungssystem sterisch beeinflussen können. Im Falle von Ringschlussreaktionen verliert das entsprechende Isomer an Flexibilität. ^[210,255,256]

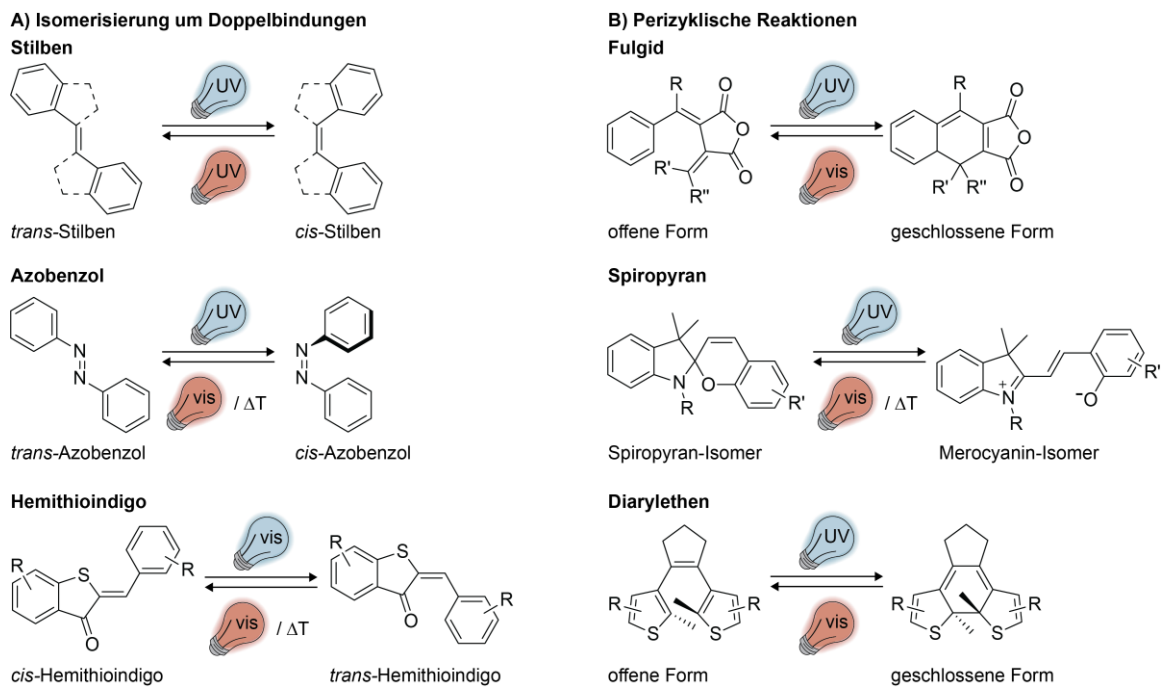


Abb. 20: Überblick über bekannte und häufig genutzte Photoschalter (angelehnt an Literatur^[255,256]). A) Photoschalter die um eine Doppelbindung isomerisieren: Stilben, Azobenzol und Hemithioindigo. B) Photoschalter, die perizyklische Reaktionen eingehen und zwischen einer offenen und geschlossenen Form isomerisieren: Fulgid, Spiropyran und Diarylethen.

Zu den bekanntesten und häufig (auch in biologisch interessanten Anwendungen) verwendeten Photoschaltern zählen Azobenzole, die erstmals 1937 von Hartley *et al.* als solche untersucht wurden.^[258] Liegt eine unsubstituierte Azobenzolverbindung unbelichtet im thermodynamischen Gleichgewicht vor, dominiert die stabilere *trans*-(*E*)-Konformation. In diesem Zustand liegt eine Gesamtlänge des Moleküls von 9 Å sowie eine nahezu planare und unpolare Struktur vor (Abb. 21A).^[259] Bestrahlung bei etwa 350 nm induziert eine *trans/cis*-Isomerisierung (*E/Z*) um die N=N-Doppelbindung. Im *cis*-(*Z*)-Zustand sind die beiden Benzolringe um 55° zueinander verdreht, wodurch eine sterische Störung, z.B. bei der Duplexausbildung eines Oligonukleotid-Duplexes, hervorgerufen werden kann.^[260] Außerdem erhöht sich die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln (das *cis*-Isomer ist je nach Substituenten 6 - 40 x löslicher in Wasser als das *trans*-Isomer)^[261], das Dipolmoment liegt bei 3 D und die Gesamtlänge verkürzt sich auf 5,5 Å.^[262] Der *trans*-zu-*cis*-Übergang entspricht einem π - π^* -Übergang. Die Rückisomerisierung kann sowohl photochemisch bei etwa 450 nm als auch thermisch erfolgen. Der metastabile *cis*-Zustand kann durch unterschiedliche Donor-Akzeptor-Substitutionsmuster stabilisierend beeinflusst werden.^[210,260] Die Absorptionsspektren beider unsubstituierter Isomere entsprechen nicht denen eines idealen Photoschalters, da sie sich stark überlappen (Abb. 21B). Im Spektrum des *trans*-Isomers lässt sich,

resultierend aus einem symmetrieverbotenen Übergang, eine schwache $n\text{-}\pi^*$ -Bande bei 440 nm und ein ausgeprägter symmetrieerlaubter $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergang bei etwa 320 nm erkennen. Der *cis*-Zustand weist einen stärkeren $n\text{-}\pi^*$ -Übergang ebenfalls bei 440 nm und zusätzliche Banden bei 250 nm und 280 nm auf.^[260] Photochemisch lässt sich der *cis*-Zustand nur zu etwa 80% erreichen. Das bedeutet, dass der photostationäre Zustand (engl. *photostationary state*, PSS) unsubstituierter Azobenzole ein *cis/trans*-Verhältnis von 80/20 aufweist. Das *trans*-Isomer kann durch Belichtung zu 95% erzeugt werden. Erfolgt die Rückisomerisierung thermisch (dauert etwa 3 – 4 Tage), sind bis zu >99,99% des *trans*-Zustandes erreichbar. Große Vorteile von Azobenzolen sind, dass sie in wässriger Lösung eingesetzt werden können, synthetisch leicht zugänglich sind und über viele Schaltzyklen hinweg nur wenig bis keine Photoermüdung zeigen. Hinzu kommt eine schnelle *trans/cis*-Isomerisierung im fs- bis ps-Bereich.^[263] Damit sind sie unter sehr kontrollierbaren Bedingungen anwendbar.^[255,256,260,264]

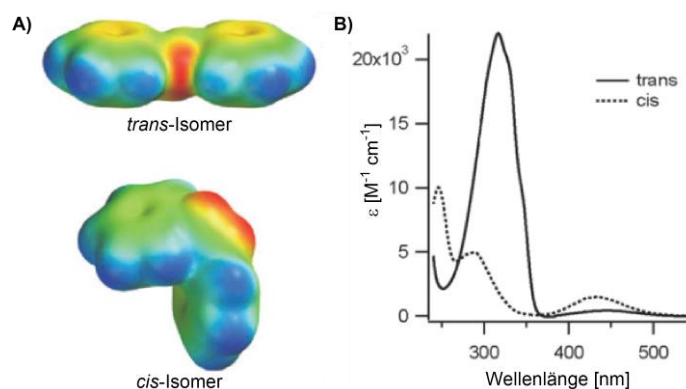


Abb. 21: A) Darstellung des elektrostatischen Potentials der beiden Azobenzol-Isomere (rot: negativ; blau: positiv). Die Entstehung des Dipols in *cis*-Konformation ist deutlich zu erkennen. B) Absorptionsspektren der beiden Azobenzol-Isomere (durchgezogene Linie: *trans*; gestrichelte Linie: *cis*). Nachdruck (angepasst) mit Erlaubnis entnommen aus Beharry *et al.*^[260] (© 2011, *The Royal Society of Chemistry*).

Ähnlich zu photolabilen Schutzgruppen kann auch bei Photoschaltern das π -System erweitert oder ein Push-Pull-System durch die Einführung von elektronendonierenden Gruppen auf einer Seite und elektronenziehende Substituenten auf der anderen Seite aufgebaut werden, um eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge zu erzielen. Dabei sollte darauf geachtet werden, konformationelle Freiheitsgrade durch Verbrückungen zu minimieren, um eine zielgerichtete Isomerisierungsreaktion zu erreichen. Zusätzlich können größere Schalter einen größeren sterischen Einfluss auf das Anwendungssystem haben.^[255,256,264–266] Azobenzole, die durch Substitutionsmuster eine bathochrome Verschiebung aufweisen, besitzen in der Regel schnellere thermische Relaxationsraten.^[264,267,268] In Abb. 22 sind Beispiele rotverschobener Azobenzole im Vergleich zu unsubstituiertem Azobenzol **25** dargestellt.^[256,268]

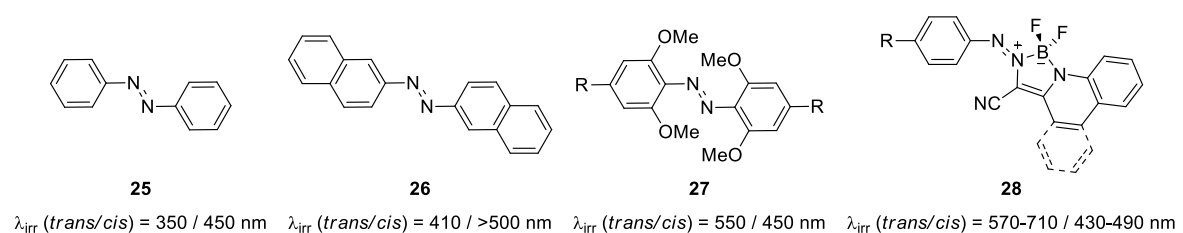


Abb. 22: Strukturen bathochrom-verschobener Azobenzol-Derivate im Vergleich zu unsubstituiertem Azobenzol **25**. Zusätzlich sind 2,2'-Azonaphthalen **26** mit erweitertem π -System, tetra *ortho*-Methoxy-substituiertes Azobenzol **27** und BF_2 -koordiniertes Azobenzol **28** dargestellt.

Die Anwendungen von Photoschaltern sind sehr vielfältig. Von kleinen sich photochemisch-bedingt fortbewegenden *Molecular Machines*^[269–271] auf Goldoberflächen (Nobelpreis für Bernard „Ben“ Feringa 2016), über die Regulierung von Proteinstrukturen und -funktionen in Neuronen^[272–275] bis hin zu isomerisierbaren Membranlipiden^[276–278] wurde berichtet. Auch Nucleinsäuren können mittels Azobenzol-Photoschalter reguliert werden. Da auch in dieser Arbeit auf diese Art der Photoschalter zurückgegriffen wurde, werden diese im nächsten Kapitel im Zusammenhang mit lichtadressierbaren Oligonucleotiden aufgegriffen.

1.2.3 Lichtregulation von Nucleinsäuren

Aufgrund der guten räumlich-zeitlichen Auflösung und der nicht-invasiven Kontrollmöglichkeiten werden photochemische Methoden inzwischen regelmäßig zur Regulierung und Untersuchung von Biomolekülen verwendet. Das Anwendungsgebiet erstreckt sich von kleinen niedermolekularen Verbindungen bis hin zu komplexen Makromolekülen wie Proteinen und Nucleinsäuren.^[209–211] In den letzten Jahren ist das Interesse an therapeutisch einsetzbaren Oligonucleotiden enorm gestiegen. Besonders die Regulation von Aptameren^[198,279], Riboschaltern^[280], siRNAs^[281] und microRNAs^[282] steht immer wieder im Fokus der Arbeit mit lichtadressierbaren Verbindungen.^[211,283–285]

Um Nucleinsäuren gezielt mittels photochemischer Methoden beeinflussen oder gar vollständig regulieren zu können, müssen photolabile Schutzgruppen und Photoschalter geschickt innerhalb von Oligonucleotiden platziert werden. Es bietet sich die Modifikation einzelner funktioneller Einheiten von Nucleosiden mit lichtadressierbaren Verbindungen an. Die unterschiedlichen Ansatzpunkte zum Einbau photolabiler Schutzgruppen sind in Abb. 23 gezeigt. Prinzipiell können die Schutzgruppen direkt mit den Nucleobasen verbunden werden. Hier beeinflussen sie entweder die Watson-Crick-Franklin- und/oder die Hoogsteen-Interaktionen durch ihre Sterik, durch die Bildung der enolen Form von Thyminen/Uridinen (an O^4 -Position) und Guanosinen (an O^6 -Position) oder durch Blockade der Aminofunktion von Cytidinen (an N^4 -Position) und Adenosinen (an N^6 -Position), wodurch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindert wird (Abb. 23A)^[279,286–290].

Ansatzpunkte photolabiler Schutzgruppen an Nucleobasen

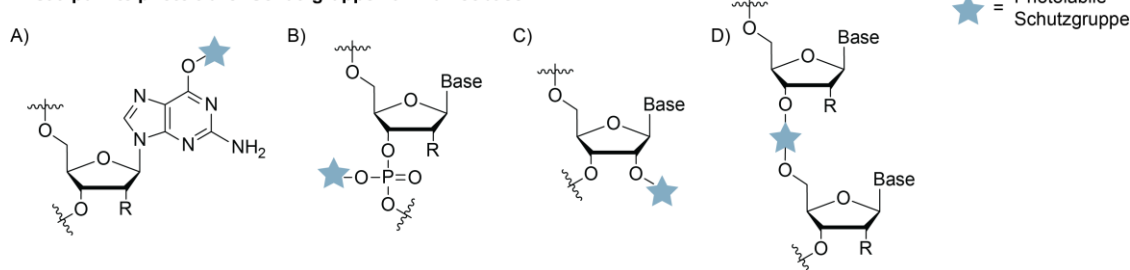


Abb. 23: Überblick über verschiedene Ansatzpunkte zum Einbringen photolabiler Schutzgruppen in Nucleoside und Oligonucleotide (angelehnt an Literatur^[210]). A) Einbau auf Watson-Crick-Franklin-Basenpaarungsseite; B) Einbau am Phosphodiester; C) Einbau an 2'-OH von RNA; D) Einbau als Linker zwischen zwei Nucleosiden im Rückgrat.

Weitere Strategien sind die Verknüpfung der Schutzgruppe mit der Phosphateinheit des Rückgrates (Abb. 23B)^[291,292] oder über die 2'-Hydroxygruppe eines RNA-Nucleosids (Abb. 23C)^[293], wodurch Enzymaktivitäten unterbunden werden können. Die vierte Option ist der Einsatz einer photolabilen

Schutzgruppe als Linker im Zucker-Phosphatrückgrat. Hierdurch wird eine lichtinduzierte Spaltung des Oligonukleotidstranges ermöglicht (Abb. 23D).^[232,233] Die unterschiedlichen Ansatzpunkte eröffnen eine Reihe an Regulationsoptionen. Ziel ist es dabei jeweils, eine möglichst kontrollierbare Oligonukleotidsequenz mit einem eindeutigen AN/AUS-Verhalten zu erhalten. Der Einbau kann, wie bei anderen Modifikationen auch, positionsspezifisch per chemischer Festphasensynthese (mit modifizierten Phosphoramiditen) erfolgen. Bei der chemischen Synthese ist zu beachten, dass im Laufe des Synthesesyklus und der Abspaltung vom Trägermaterial sowohl saure, als auch basische Reaktionsbedingungen herrschen und die gewünschten photoaktivierbaren Phosphoramidite diesen standhalten müssen. Alternative Möglichkeiten bieten sich mittels enzymatischer Reaktionen (mit modifizierten Bis- oder Triphosphaten *via* Ligasen^[294] und Polymerasen^[295] oder durch Transferasen^[106]) oder durch Umsetzung eines Diazo-Derivats^[291,292] der Schutzgruppe mit der Nukleinsäure an. Im Falle enzymatischer Methoden ist zu beachten, dass nicht alle Modifikationen von Enzymen toleriert und umgesetzt werden und der Einbau überwiegend statistisch verteilt erfolgt. Die Umsetzung mit Diazo-Verbindungen führt zu statistisch verteilten Modifikationen des Phosphatrückgrates wodurch der Einbau nicht kontrollierbar ist.

Neben der Wahl der Schutzgruppe und des photolabil-geschützten Nukleosids spielt auch das Design der zu schützenden Oligonukleotidsequenz je nach gewünschter Anwendung eine entscheidende Rolle. Die Interaktion mit Proteinen oder Enzymen ist stark von der korrekten Faltung der Nukleinsäure und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen abhängig. Durch kleine Abweichungen von der nativen Faltung oder durch das Einbringen von sterisch anspruchsvollen Verbindungen, können strukturabhängige Funktionen eingeschränkt oder blockiert werden. Dies ist eine Art Schutzmechanismus, um zu verhindern, dass im Rahmen der Genexpression fehlerhafte Sequenzen umgesetzt und falsche Signale ausgelöst werden. Es bieten sich unterschiedliche Strategien an, um strukturabhängige Vorgänge zu adressieren (Abb. 24).

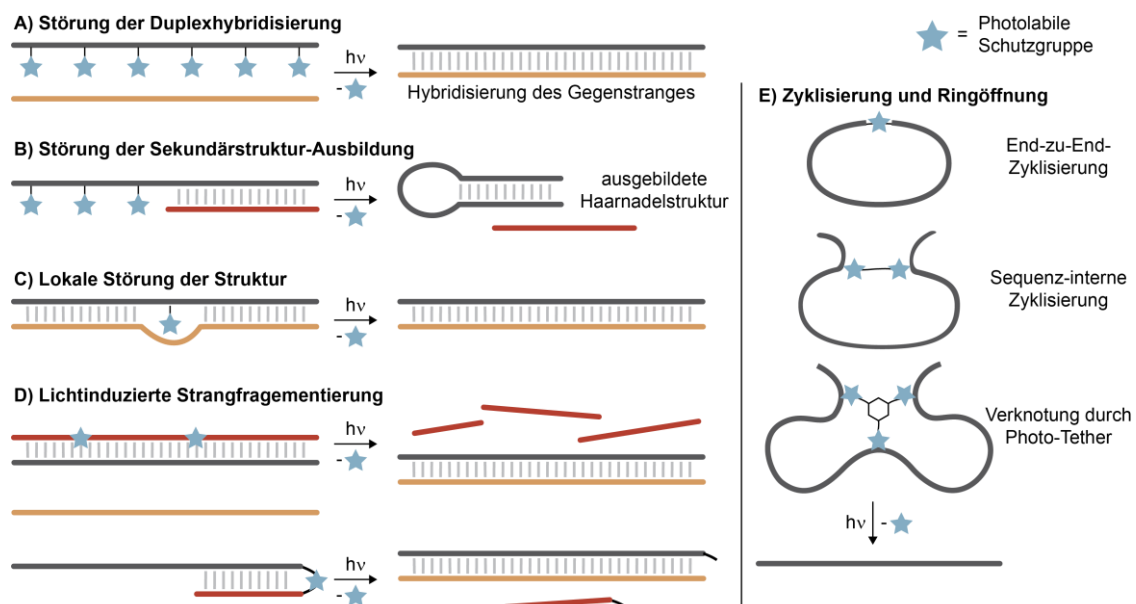


Abb. 24: Übersicht über verschiedene Strategien zur Nutzung von photolabilen Schutzgruppen zur Regulation von Oligonukleotiden. A) Störung der Duplexbildung; B) Störung der Ausbildung sekundärer Strukturen am Beispiel einer Haarnadelstruktur; C) Lokale Störung der Interaktion mit einem Gegenstrang; D) Lichtinduzierte Fragmentierung; E) verschiedene Zyklisierungsansätze.

Werden Nukleoside mit photolabil-geschützter Watson-Crick-Franklin-Basenpaarseite in eine Sequenz eingebaut, kann die Hybridisierung mit einer komplementären Zielsequenz destabilisiert und unterbunden werden (Abb. 24A). Photoaktivierbare Oligonukleotide, die erst nach Belichtung eine Duplexhybridisierung ermöglichen, finden vielseitigen Einsatz.^[211,234,285,296,297] Verschiedene Studien zeigten allerdings, dass für ein gutes AN/AUS-Verhältnis häufig mehrere Schutzgruppen an verschiedenen Positionen innerhalb der Sequenz notwendig sind. Dadurch werden zum vollständigen Abspalten der Schutzgruppen längere Belichtungszeiten oder erhöhte Intensitäten benötigt, was zu einer großen Anzahl an Nebenprodukten und Einschränkungen bei Anwendungen in Zellen führt. Hinzu kommt die erhöhte Wahrscheinlichkeit nur teilweise entschützter Oligonukleotide.^[234,282,298] Basierend auf dieser Strategie konnten Joshi *et al.* 2012 demonstrieren, dass sieben photolabile Schutzgruppen benötigt werden, um eine Interaktion der Schleifensequenz eines *Molecular Beacons* mit der komplementären 19 Nukleobasen langen Ziel-RNA zu blockieren. *Molecular Beacons* sind Fluoreszenzsonden, die eine Stamm-Schleifen-Struktur aufweisen. Am 3'- und am 5'-Ende befinden sich aufeinander abgestimmt ein Fluorophor und ein passender Quencher. Solange die Stamm-Schleifen-Struktur vorliegt, wird die Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch Försterresonanzenergietransfer (FRET) ausgelöscht. Die Abspaltung der Schutzgruppen führte zu einer Aktivierung der Hybridisierung der Schleifensequenz mit einem Ziel-Oligonukleotid. Dadurch wird die Distanz zwischen Fluorophor und Quencher vergrößert und die Fluoreszenz kann detektiert werden. Wurden nur fünf photolabile Schutzgruppen in der Schleifensequenz platziert, konnte die Hybridisierung lediglich um 80% reduziert werden.^[298] Zur Regulierung der 21 Nukleobasen langen anti-miR-92a-Sequenz benötigten Schäfer *et al.* 2013 sechs photolabile Schutzgruppen auf Watson-Crick-Franklin-Basenpaarseite. Sie konnten durch Belichtung die anti-miR-92a-Sequenz freisetzen, wodurch die Ziel-RNA exprimiert und die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) angeregt wurde.^[234,282] Die relativ große Anzahl an PPGs im Vergleich zu der Anzahl an Nukleotiden, die es zu stören galt, beschränkt diese Strategie auf sehr kurze Oligonukleotide. In diesem Maße ist diese Strategie für die Regulation längerer Sequenzen uninteressant.

Um zu vermeiden, dass biologische Systeme durch harsche Belichtungsbedingungen beschädigt werden, wurden weitere Caging-Strategien untersucht. Neben der Störung der Interaktion mit einer komplementären Sequenz, kann auch die korrekte Ausbildung einer Sekundärstruktur (z.B. einer Haarnadelstruktur) gestört oder verhindert werden (Abb. 24B). Ist das Zusammenspiel von Struktur und Funktion eines Oligonukleotids bekannt, können bereits wenige, strategisch platzierte Schutzgruppen zu einer Entfaltung der Sekundärstruktur führen. Werden die photolabilen Schutzgruppen nur auf einer Seite einer selbstkomplementären Stammstruktur eingeführt, ist der unmodifizierte Teil des Oligonukleotids nach wie vor zugänglich und kann mit einer komplementären zweiten (Ziel-) Sequenz interagieren. Die Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen initiiert eine Konformationsänderung. Da intramolekulare Wechselwirkungen bevorzugt eingegangen werden, kommt es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur und zur Freisetzung der zuvor hybridisierten Gegensequenz. Es ist zu beachten, dass die Zeitauflösung bei dieser Strategie von der Verdrängungsreaktion und der Erfolg dieser Strategie von der Sequenz und damit auch von der entsprechenden Bindungskinetik (Dissoziationskonstante K_D) abhängig ist. Besonders bei GC-reichen Sequenzen kann es sein, dass die Bindung mit der komplementären Sequenz aufgrund vieler ausgebildeter Wasserstoffbrückenbindungen zu stark ist und diese auch nach Belichtung nicht dissoziiert und gebunden bleibt.^[299,300] Lokale Störungen der Struktur (Abb. 24C) können genutzt werden, um die katalytische Aktivität eines Oligonukleotids zu beeinflussen

oder um beispielsweise die Interaktion mit Proteinen oder Transkriptionsfaktoren zu manipulieren.^[301] Bereits drei photolabile Schutzgruppen an Phosphorthioatgruppen genügen, um die Aktivität von DNAzymen zu blockieren.^[301] Erst nach Abspaltung der Schutzgruppen kann das Enzym mit der DNA interagieren und diese spalten. Im Bereich der Promotorregion (TATA-Box) eines Plasmids platzierte photolabile Schutzgruppen können die Transkription beispielsweise eines grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) reduzieren (es genügen eine bis drei Schutzgruppen).^[302] Durch Belichtung kann die Transkription des Proteins reaktiviert werden. Auch das in der Arbeitsgruppe Heckel mehrfach untersuchte 15 Nucleobasen lange Anti-Thrombin-Aptamer kann durch eine lokale Störung beeinflusst werden.^[198,299,303] In der nativen Form bildet die Sequenz eine antiparallele Guanodin-Quadruplexstruktur (G-Quadruplex, G4) aus, die mit der Fibrinogen-Bindestelle (Exosite I) der Serinprotease Thrombin interagiert, wodurch es die Blutgerinnung hemmt. Der Einbau einer einzigen NPP-Schutzgruppe kann diese Interaktion des Aptamers mit der substratspezifischen Bindestelle blockieren und es kommt zur Blutgerinnung. Das photolabil-geschützte Anti-Thrombin-Aptamer hat somit Potential als lichtaktivierbarer Blutgerinnungshemmer (Antikoagulans).^[198,299,303]

Eine weitere Strategie beruht auf der Verwendung photospaltbarer Linker (PL), die in das Zucker-Phosphatrückgrat eingebaut werden (Abb. 24D).^[304] Ein so modifiziertes Oligonucleotid kann eine komplementäre Gegensequenz bis zur Belichtung binden und dadurch ihre Aktivität unterdrücken. Durch Belichtung kommt es zu einer Fragmentierung des Oligonucleotids, gefolgt von einer Verdrängung der entstandenen Fragmente durch die eigentliche Zielsequenz. Das Prinzip kann sowohl für einen doppelsträngigen Duplex angewendet werden, als auch auf einzelsträngige Sequenzen, die intramolekular einen Duplex ausbilden, übertragen werden. Ähnlich zur zuvor genannten Störung der Sekundärstrukturausbildung (Abb. 24B) spielt auch beim Einsatz photolabiler Linker die Sequenz sowie die Länge der Fragmente und die Konzentration eine entscheidende Rolle für die Dissoziation. Richards *et al.* konnten mit einem 18 Nucleobasen langen photospaltbaren Oligonucleotid die Interaktion von Ribosomen mit mRNA temporär verhindern.^[305] Durch Belichtung teilte der asymmetrische Photolinker das blockierende Oligonucleotid in ein 6mer und ein 12mer. Beide Fragmente konnten verdrängt und die Translation von GFP wieder aktiviert werden. Hemphill *et al.* zeigten 2015, dass sie mit dieser Strategie Spleißvorgänge beeinflussen können.^[306] Den Einsatz rotverschobener photospaltbarer Cy7-Linker zur Spaltung des Thrombin-bindenden Aptamers und damit zur Aktivierung der Blutgerinnung, zeigten Müller *et al.* 2021.^[198] Die photospaltbare Verknüpfung eines Antisense-Fragments (siehe Abb. 24D unten) stellt eine weitere Möglichkeit dar.^[233,307] Weyel *et al.* verwendeten diese Strategie in Kombination mit einem Cumarin-basierten photospaltbaren Linker.^[308] In einem Strangverdrängungsexperiment konnte die Zwei-Photonen-Aktivierbarkeit des PL im Hydrogel gezeigt werden, woraufhin das Konzept auch *in vivo* zur Regulierung der NF- κ B-gesteuerten Transkription von GFP untersucht wurde. Im Vergleich zur Störung der Duplexbildung mit vielen photolabilen Schutzgruppen, können durch Strangfragmentierungen die Anzahl an benötigten Schutzgruppen verringert und damit die Belichtungsanforderungen verbessert werden. Allerdings erfordert diese Strategie mehr Planung und Anpassung der Experimentbedingungen. Photolabile Linker können auch zur Zyklisierung von Oligonucleotiden eingesetzt werden (Abb. 24E). In Kapitel 1.1.4 wurde bereits auf unterschiedliche chemischen und enzymatische Methoden zur Zyklisierung eingegangen. Neben 3',5'-End-zu-End-Zyklisierungen^[187,205,281] (siehe Kapitel 1.1.4) können PLs auch zur Sequenz-internen Zyklisierung^[45] oder zur Verknötung^[196] einer Oligonucleotidsequenz genutzt werden, um die Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz zu unterbinden. Auf diese

Weise werden wesentlich weniger photolabile Schutzgruppen für ein deutliches AN/AUS-Verhalten benötigt, als bei den zuvor genannten Strategien. Entscheidend für die Regulierung ist dabei die Länge des zu zyklisierenden Oligonukleotids je nach Anwendung.^[197] Eine beliebte Methode zum Einbau und zur Verwendung photolabiler Linker basiert auf Alkin-Azid-Cycloadditionen. Hierbei werden Alkin-Funktionen mit Azid-Gruppen durch Click-Chemie verknüpft. Sowohl die Azid- als auch die Alkin-Funktionalität kann mittels chemischer Festphasensynthese, z.B. durch Verwendung eines entsprechenden Modifiers oder über modifizierte Nucleobasen, in ein Oligonukleotid eingebracht werden. Der PL kann dann über die jeweils andere Funktionalität verbunden werden. Die lichtinduzierte Spaltung des photolabilen Linkers resultiert in einer Ringöffnung.^[197,309] Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen mit zusätzlicher Alkin-Funktion innerhalb der Oligonukleotidsequenz, welche anschließend mit einem Azid-Linker verbunden werden können. Seyfried *et al.* bezeichneten die Verwendung von Bisazid- und Trisazid-Linkern zur Sequenz-interne Zyklisierung und zur temporären Verknotung einer 90 Nucleobasen langen Aptamersequenz als *Photo-Tethering*.^[196]

Die Verwendung photolabiler Schutzgruppen im Oligonukleotid-Kontext erstreckt sich über weite Anwendungsbereiche, mitunter auch mit deutlich sichtbaren Ergebnissen. So wurde inzwischen von lichtaktivierbaren Oligonukleotiden in Zebrafischexperimenten^[12], der Regulation der Angiogenese^[234] oder von lichtaktivierbarer Blutgerinnung^[198] berichtet, um nur einige Beispiele an dieser Stelle zu nennen (Abb. 25).

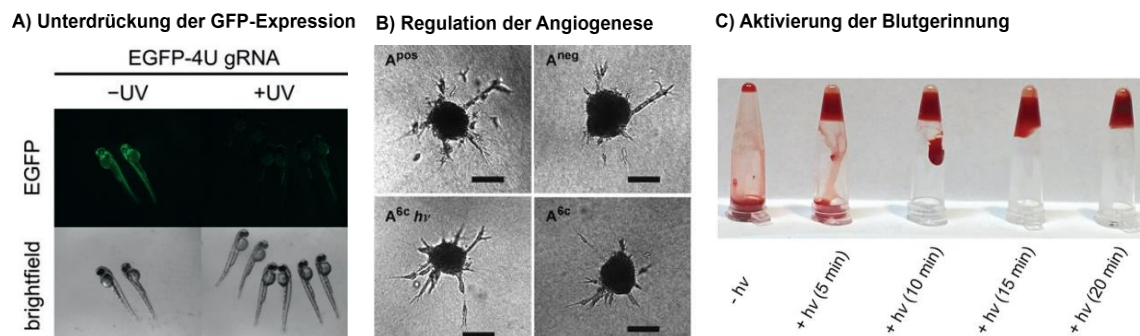
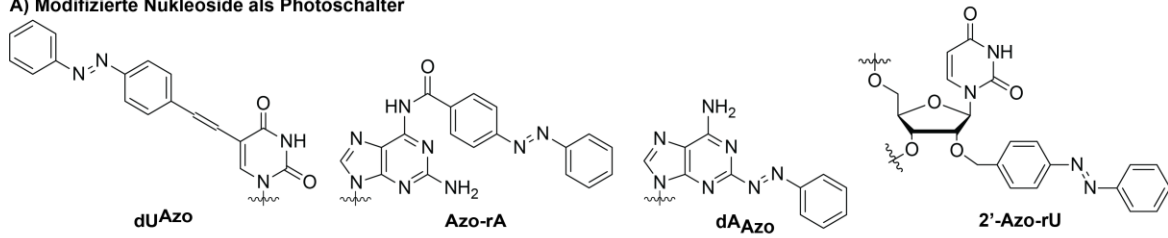


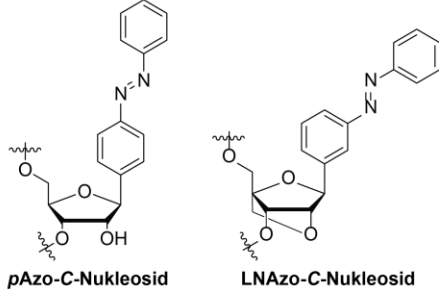
Abb. 25: Ausgewählte Beispiele verschiedener Anwendungen von lichtaktivierbaren Oligonukleotiden mit deutlich sichtbarem Ergebnis. A) Unterdrückung der GFP-Expression in Zebrafischen vor und nach Belichtung (Nachdruck mit Erlaubnis^[12] (© 2020, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA). B) Regulation der Angiogenese (Nachdruck mit Erlaubnis^[234] (© 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA). C) Aktivierung der Blutgerinnung (Nachdruck mit Erlaubnis^[198]; CC BY 4.0 Lizenz).

Vergleichbar zu photolabilen Schutzgruppen können auch Photoschalter über verschiedene Positionen und im Zusammenhang verschiedener Strategien in Oligonukleotide eingebracht werden, um deren Funktion zu regulieren. Der kovalent-verknüpfte Einbau von Photoschaltern führt zu einer permanenten Änderung der nativen Form des zu untersuchenden Oligonukleotids, erlaubt aber im Gegensatz zu photolabilen Schutzgruppen eine reversible Regulierung und mehrere Schaltzyklen. Hierdurch können Experimente oder Vorgänge wiederholt gesteuert und untersucht werden. Die meistgenutzten Photoschalter im Oligonukleotidkontext sind Azobenzol-basiert, aber auch Spiropyran und Stilbene finden Anwendung.^[310–312] Die im Folgenden erläuterten theoretischen Hintergründe treffen auch auf Spiropyran und Stilbene zu, in Bezug auf diese Arbeit werden sie dennoch anhand von Azobenzol-basierten Beispielen dargestellt. Eine Möglichkeit zum Einbau photoschaltbarer Einheiten in Nucleinsäuren ist die Erweiterung der natürlichen Nucleobasen an verschiedenen Stellen, um diese zu funktionalisieren (Abb. 26A).

A) Modifizierte Nucleoside als Photoschalter



B) Photoschaltbare Nucleoside



C) Photoschaltbare Linker

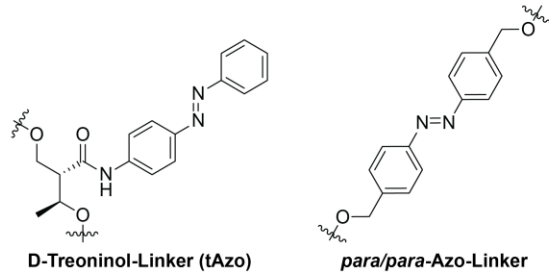


Abb. 26: Azobenzol-Modifikationen zur reversiblen Regulierung von Nucleinsäuren. A) Modifizierte Nucleobasen; B) Photoschaltbare C-Nucleoside; C) Azobenzol-Linker zum Einbau in das Zucker-Phosphatrückgrat.

Die Modifikation der Nucleobasen kann an verschiedenen Positionen stattfinden. Mori *et al.* führten die Azobenzol-Funktionalität an C5-Position von Desoxyuridin (**dUAzo**) ein.^[313] Dahingegen entschieden sich Liu *et al.* gezielt die für die Watson-Crick-Franklin-Basenpaarung benötigte exozyklische Aminogruppe eines Adenosins (**Azo-rA**) mit dem Photoschalter zu verknüpfen, um die Wechselwirkung mit einem Aptamer zu kontrollieren.^[314] Diese beiden Derivate haben vergleichsweise eher geringen Einfluss auf die Hybridisierung von Oligonucleotiden, da die Azobenzol-Einheiten in die große Furche (engl. *major groove*) der Doppelhelix ragen. Um die Photoregulierung zu verbessern, synthetisierten Grebenovsky *et al.* 2-Phenyldiazanyl-Purine, wie das Adenosin-basierte **dAAzo**, die als *cis*-Isomer in die kleine Furche (engl. *minor groove*) ragen. Allerdings wurde durch die Substitution an Position 2 die Duplexstabilität erhöht, sodass die Belichtung nur bedingt Isomerisierungseffekte zeigte.^[315] Asanuma *et al.* präsentierten 2'-Azobenzol-modifiziertes Uridin (**2'-Azo-rU**) zur lichtinduzierten Duplexdestabilisierung.^[316] Neben Nucleobasen-Derivaten, können auch unnatürliche photochrome Nucleoside in Oligonucleotide eingebaut werden (Abb. 26B). Hierbei werden die natürlichen Nucleobasen komplett gegen die isomerisierbare Einheit ersetzt. Goldau *et al.* präsentierten 2015 *meta*- und *para*-substituierte Azobenzol-C-Nucleoside (**mAzo**- und **pAzo-C-Nucleosid**) zur reversiblen Regulierung der DNA- und auch RNA-Hybridisierung.^[49,317] Zusätzlich wurde von Grebenovsky *et al.* 2019 ein LNA-basiertes C-Nucleosid vorgestellt (**LNAzo-C-Nucleosid**).^[318] Bemerkenswert ist die gute Effizienz der *trans/cis*-Isomerisierung von bis zu 98% bei Bestrahlung mit 365 nm bei Raumtemperatur.^[49,317] Damit beeinflussen Azobenzol-C-Nucleoside die Duplexstabilität deutlich besser, als der azyklische D-Threoninol-Linker (**tAzo**, Abb. 26C).^[319] Mit der Verwendung des **tAzo** gingen Asanuma *et al.* noch einen Schritt weiter und ersetzten das gesamte Nucleosid durch einen photoschaltbaren Linker im Zucker-Phosphatrückgrat, der in den Basenstapel hineinragt. Durch das fehlende Zucker-Phosphat-Gerüst, weist dieser Linker mehr Flexibilität als C-Nucleoside auf.^[319] Eine weitere Möglichkeit der Verwendung lichtinduziert isomerisierbarer Linker stellt der Einbau solcher in das Phosphatrückgrat dar. In Abb. 26C ist ein *para/para*-Azobenzol-Linker als Vertreter dieser Gruppe dargestellt. Basierend auf Arbeiten von Yamana *et al.* wurden verschiedene Linker unterschiedlicher Länge und Anzahl an Azobenzol-Einheiten untersucht. Durch photoschaltbare Linker im Phosphatrückgrat kann beispielsweise die Ausrichtung einzelsträngiger Oligonucleotidfragmente in

Haarnadelstrukturen beeinflusst werden. Hierzu werden die Linker in der Schleifenregion der Haarnadelstruktur platziert.^[320–323] Eine Regulierung der Duplexausbildung ist durch die alleinige Modifikation des Phosphatrückgrates jedoch nicht zu erzielen, da sie die ausgebildeten Watson-Crick-Franklin-Wechselwirkungen der Nucleobasen nicht stark genug beeinträchtigt.^[310–312]

Auch beim Einbau photoschaltbarer Einheiten steht die Regulierung der Struktur und Funktion des modifizierten Oligonucleotids im Fokus. Die Idee bei der Verwendung von Photoschaltern wie Azobenzolen ist die, dass das unpolare und nahezu planare *trans*-Isomer während der Hybridisierung in den Basenstapel interkalieren kann und diesen durch π - π -Wechselwirkungen stabilisiert. Durch Belichtung im UV-Bereich wird das Azobenzol in die sterisch anspruchsvollere, verdrehte *cis*-Form überführt, die die Watson-Crick-Franklin-Interaktionen der benachbarten Nucleotide stört und zu einer Aufweitung des Basenstapels führt.^[264,310–312] Je nach Anzahl der eingebauten Photoschalter und nach Wahl der Einbauposition können verschiedene Effekte hervorgerufen werden. Es gilt zu beachten, dass der Einbau einzelner Azobenzole durch *trans/cis*-Isomerisierung eine lokale Störung in der Duplexstruktur hervorruft, aber in den meisten Fällen nicht ausreicht, um eine vollständige Dissoziation der beiden Stränge herbeizuführen.^[324,325] Durch Belichtung >400 nm können *cis*-Azobenzole reisoformiert werden, wodurch ein stabiler Duplex wiederhergestellt werden kann (Abb. 27). Zur Beurteilung des Einflusses von Azobenzolen auf die Duplexstabilität wird in der Regel die Schmelztemperatur des Duplex untersucht. Nakasone *et al.* betrachteten das Diffusionsverhalten von **tAzo**-modifizierter DNA-Doppelstränge zur Beurteilung des Dissoziations-/Assoziationsverhaltens.^[325] Hierzu betrachteten sie einen 12 Nucleobasen langen DNA-Duplex mit einem zentral platzierten **tAzo** (6 nt-**tAzo**-6nt). Auch wenn die *trans/cis*-Isomerisierung des Azobenzol-Linkers selbst innerhalb von Pikosekunden stattfindet, läuft die nachfolgende lichtinduzierte Dissoziation des Doppelstranges $\sim 10^7$ x langsamer (670 μ s bei einer 200 μ M Probe) ab. Die Assoziation des Duplexes nach *cis/trans*-Isomerisierung findet noch langsamer (innerhalb von 3,6 ms (200 μ M)) statt. Beide Vorgänge sind sowohl temperatur-, als auch konzentrationsabhängig.^[325] In vorherigen Studien zeigten Asanuma *et al.*, dass insgesamt neun **tAzo** Einheiten in einer 20 Nucleobasen langen Sequenz benötigt werden, um ein gutes AN/AUS-Verhältnis durch Belichtung zu erreichen.^[324]

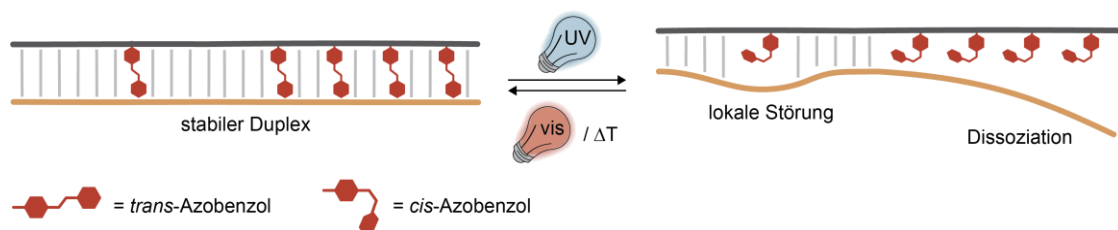


Abb. 27: Schematische Darstellung reversibler Regulationsmöglichkeiten von Oligonucleotiden durch Azobenzol-Photoschalter. Je nach Position und Anzahl kann durch lichtinduzierte Isomerisierung des Photoschalters ein stabiler Duplex lokal gestört werden oder eine Dissoziation der Stränge erfolgen.

1.3 Struktur motive von Nucleinsäuren und deren Funktion

Die Struktur aller Nucleinsäuren wird maßgeblich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleobasen bestimmt. Dabei liegen doppelsträngige

Oligonukleotide meistens in der berühmten helikalen Duplexstruktur^[326] vor. Die native DNA-Struktur besteht aus zwei antiparallel verlaufenden Strängen mit komplementärer Sequenz. Die Nukleobasen ragen nahezu senkrecht zur Helixachse ins Innere des Duplex. Durch Watson-Crick-Franklin-Basenpaarungen ($G \equiv C$ und $A = T/U$) und die $C2'$ -endo-Konformation der Desoxyribose wird hauptsächlich eine stabile, rechtsgängige Doppelhelix gebildet, die als B-Form bezeichnet wird. Doppelsträngige RNA hingegen tritt durch ihre $C3'$ -endo-Zuckerkonformation als rechtsgängige Helix in A-Form auf.^[327,328] In der Regel sind RNAs einzelsträngig und dadurch wesentlich flexibler, auch wenn sie eher selten vollständig entfaltet als lineare Strukturen vorliegen. Vielmehr bilden einzelsträngige Oligonukleotide (sowohl RNA als auch DNA) durch intramolekulare Wechselwirkungen vielfältige, thermodynamisch günstige Struktur motive aus, die regulatorische Funktionen und einen bedeutenden Einfluss auf Vorgänge wie Transkription und Translation haben. Neben einfachen Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen^[329,330] können auch komplexe und katalytisch aktive Tertiärstrukturen ausgebildet werden, die spezifische Protein-Oligonukleotid-Interaktionen erlauben. Hierzu zählen neben Aptameren^[6] auch Struktur motive wie Riboschalter^[331,332], G-Quadruplexe^[333,334], *transfer*-RNAs (tRNA)^[335] und katalytisch aktive Oligonukleotide wie DNAzyme^[336,337] oder Ribozyme^[338], um an dieser Stelle nur einige wichtige Vertreter zu nennen.

Riboschalter, auch als *Riboswitches* bezeichnet, kommen in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von *messenger*-RNA (mRNA) von Bakterien vor. Hierbei handelt es sich um genregulierende Struktur motive, die sowohl die Transkription als auch die Translation beeinflussen können. Riboschalter bestehen aus zwei allosterischen Regionen. Zum einen aus einer Aptamerdomäne, die hochspezifisch niedermolekulare Liganden (z.B. 2'dG) bindet und zusätzlich aus einem zweiten Sequenzbereich, der als Expressionsplattform bezeichnet wird.^[331,332,339] Durch die Bindung des Liganden wird eine Strukturänderung induziert, die entweder eine Aktivierung (AN-Schalter) oder eine Deaktivierung (AUS-Schalter) der Genexpression zur Folge hat. Dabei regulieren Riboschalter die Genexpression der eigenen mRNA. Handelt es sich um Translations-regulierende Riboschalter, wird durch die Ligandenbindung die Expressionsplattform so restrukturiert, dass die ribosomale Bindungsstelle (Shine-Delgarno-Sequenz) entweder blockiert oder freigegeben wird, was die Translation verhindert oder auslöst. Auf transkriptioneller Ebene führt die allosterische Umfaltung ebenfalls entweder zur Initiation (AN-Schalter) oder zur Termination (AUS-Schalter) der Transkription.^[331,332,339] In Abb. 28 wird die Funktionsweise eines deaktivierenden Riboschalters auf transkriptioneller Ebene schematisch repräsentiert.

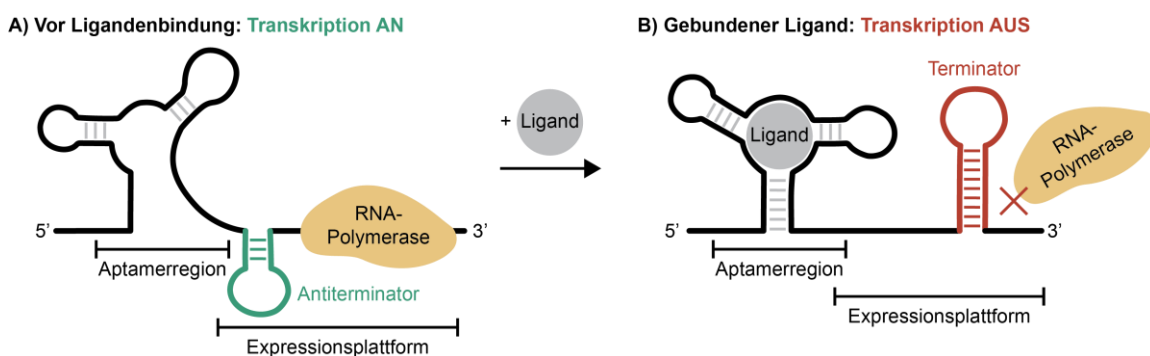


Abb. 28: Schematische Darstellung eines transkriptionsregulierenden Riboschalters. A) Zustand vor Binden des Liganden. Die RNA-Polymerase kann binden; die Transkription findet statt. B) Zustand mit gebundenem Liganden. Durch Ausbildung des Terminators dissoziiert die RNA-Polymerase, wodurch die Transkription terminiert wird (angelehnt an Kim *et al.*^[340]).

Der 2'-Desoxyguanosin-spezifische Riboschalter (2'dGsw) aus dem Bakterium *Mesoplasma florum* zählt zu den Purin-spezifischen Riboschaltern.^[340] Wie der Name bereits andeutet, bindet dieser Riboschalter selektiv 2'-Desoxyguanosin zur Regulierung der Genexpression. Im AN-Zustand findet die Transkription einer Ribonukleotid-Reduktase statt. Das Enzym setzt Guanosin (rG) zum entsprechenden DNA-Nukleotid (dG) um. Die steigende 2'dG-Konzentration führt zur Interaktion des Liganden mit der Aptamerregion des Riboschalters, woraufhin die Terminatorstruktur ausgebildet wird und die RNA-Polymerase dissoziiert (vgl. Abb. 28B). Es kommt zum Abbruch der Transkription.^[332,340]

Als weiteres Beispiel für regulatorische Oligonukleotide mit ausgeprägtem Strukturmotiv sollen an dieser Stelle tRNAs erläutert werden. tRNAs spielen eine zentrale Rolle während der Genexpression. Zunächst wird die genetische Information der DNA während der Transkription in mRNA „kopiert“ und anschließend während der Translation in funktionale Proteine übersetzt. Dabei transportieren tRNAs die Aminosäuren zu den Ribosomen, wo diese dann mit der wachsenden Proteinkette verknüpft werden.^[335,341] Die Struktur von tRNAs kann in fünf Regionen unterteilt werden. Von 5' nach 3'-Ende setzt sich die Struktur aus Akzeptorstamm, D-Arm, Anticodonstamm, variabler Schleife (nicht bei allen tRNAs vorzufinden) und TΨC-Arm zusammen. Insgesamt bilden sie die bekannte Kleeblatt-Sekundärstruktur aus (Abb. 29A). Durch Wechselwirkungen zwischen D- und TΨC-Arm bilden tRNAs eine L-förmige Tertiärstruktur mit Akzeptor- und Anticodon-Domäne aus (Abb. 29B). Die letzten drei Nukleotide sind bei allen tRNAs gleich (CCA). Über dieses 3'-terminale Basentriplett ist die jeweilige Aminosäuren gebunden, für die das Anticodon codiert. Das Anticodon selbst befindet sich in der Schleifenregion des Anticodonstammes (Positionen 34, 35 und 36).^[335,342,343] Die dreidimensionale Struktur wurde erstmals für die tRNA^{Phe} aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) publiziert.^[344]

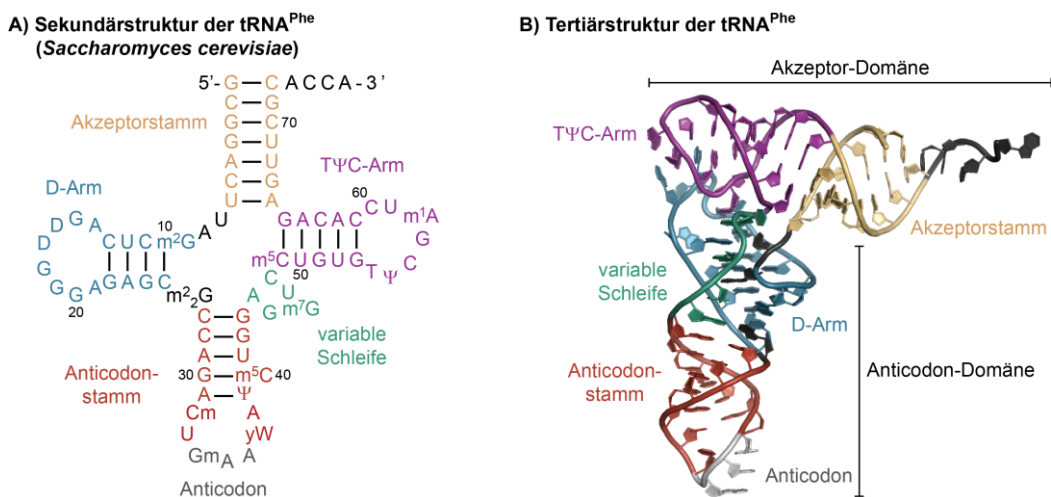


Abb. 29: Darstellung der tRNA^{Phe}. A) Sequenz und Sekundärstruktur. Die fünf Regionen, die die typische Kleeblattstruktur bilden, sind farblich hervorgehoben. B) Tertiärstruktur der tRNA^{Phe} mit Akzeptor- und Anticodon-Domäne (gleicher Farbcode wie in A). Die Struktur (PDB-ID: 1EHZ^[345]) wurde mit PyMOL^[346] dargestellt.

Obwohl tRNAs nur zwischen 76 und 93 Nukleobasen^[343] lange Oligonukleotide sind, sind sie die RNA-Spezies, die am stärksten modifiziert vorliegt. Das Primärtranskript besteht zunächst nur aus den vier Standardnukleotiden (G, C, A und U). Nach der Transkription beginnt eine Kaskade an enzymatischen Reaktionen, die die finale tRNA bilden. Insgesamt sind mindestens 93 post-transkriptionelle Modifikationen in Zusammenhang mit tRNAs bekannt. Die Modifikationen reichen

von einfachen Methylierungen bis hin zu komplexen Änderungen, die durch verschiedene enzymatische Reaktionen hervorgerufen werden. Im Schnitt sind etwa 12% der Nucleotide einer tRNA modifiziert.^[335,342] Der Grad der Modifizierung scheint vom Zelltyp und vom aktuellen Zellzyklus abhängig zu sein.^[347] So berichteten Brandmayr *et al.*, dass tRNAs aus Lebergewebe von Mäusen oder Schweinen mehr modifizierte Nucleoside aufweisen, als solche aus Lungen-, Herz- oder Nierengewebe.^[347] Besonders das erste Nucleotid des Anticodons (Position 34) liegt häufig modifiziert vor. Bildet das dritte Nucleotid des Anticodons (Position 36) zusätzlich ein nicht-ideales Watson-Crick-Franklin-Basenpaar (Wobble-Hybridisierung), kann eine tRNA mehrere Codons erkennen, weshalb die Entschlüsselung der insgesamt 61 Codons von weniger tRNAs abgedeckt werden kann.^[335] Während sich Modifikationen im Bereich der Anticodon-Stammschleife also auf die Codon-Anticodon-Interaktion und somit auf die Funktion der Dekodierung auswirken, beeinflussen post-transkriptionelle Modifikationen im D- und T ψ C-Arm die Flexibilität und Stabilität der tRNA durch die Ausbildung der Tertiärstruktur.^[335,342,343] In Abb. 30 sind einige prominente Modifikationen dargestellt, die sich in tRNA-Strukturen finden lassen.

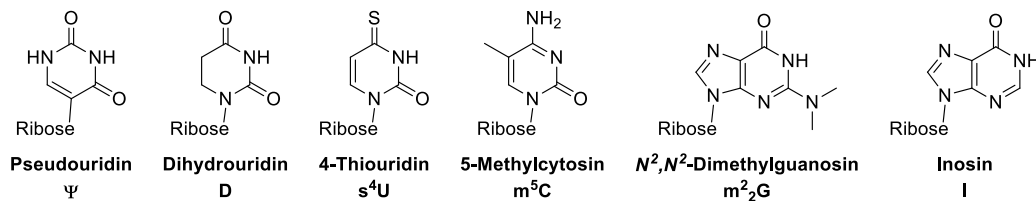


Abb. 30: Strukturen einiger ausgewählter Nucleobasen-Modifikationen, wie sie in tRNAs gefunden werden können.

Viele Struktur motive basieren auf einzelsträngigen RNAs, dennoch gibt es auch Struktur motive, die sowohl auf RNA- als auch auf DNA-Ebene gefunden werden können. Ein Beispiel hierfür sind besonders Guanosen-reiche Sequenzen, die dazu neigen Hoogsteen-Basenpaarungen^[348] auszubilden, wodurch alternative Sekundärstrukturen entstehen können. Diese Sekundärstrukturen werden als G-Quadruplexe (G4) bezeichnet.^[349] Dabei formieren vier Guanosine in Anwesenheit monovalenter Kationen (bevorzugt Na^+ oder K^+) eine planare G-Tetrade (Abb. 31A).^[350] Mehrere G-Tetraden können sich dann, begünstigt durch π - π -Interaktionen und Kation-Dipolwechselwirkungen, stapeln. Dieser Vorgang wird auch als *stacking* bezeichnet (Abb. 31B). Auf diese Weise entstehen G-Quadruplex-Struktur motive.^[333,334,351]

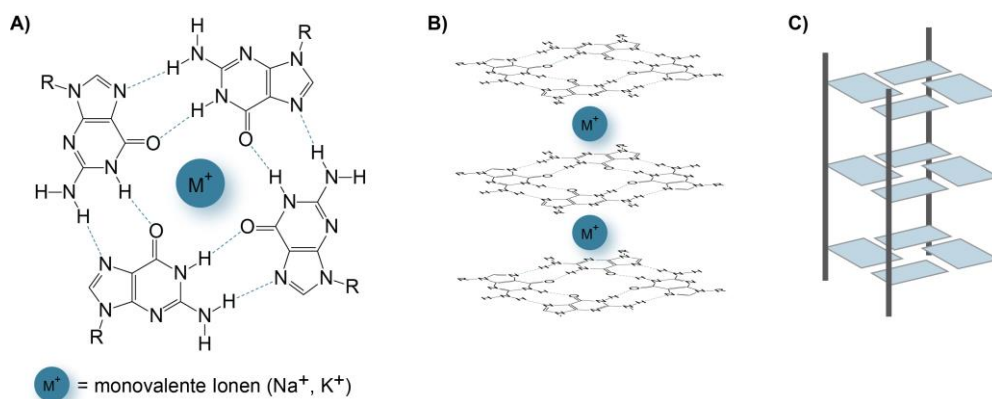


Abb. 31: A) Vier Guanosine bilden in Anwesenheit monovalenter Kationen eine G-Tetrade; B) G-Quadruplex aus drei G-Tetraden; C) Schematische Darstellung eines dreilagigen G-Quadruplexes.

G4 können einerseits intramolekular (unimolekular) ausgebildet werden oder aber intermolekular aus zwei oder vier G-reichen Oligonukleotiden aufgebaut sein (bi- bzw. tetramolekulare G4). Unimolekulare G4 lassen sich vereinfacht als $[G^1_x - L_m - G^2_x - L_n - G^3_x - L_o - G^4_x]$, mit $x = 3-5$ und $m/n/o = 1-7$, beschreiben.^[334] Mit L werden hier verbindende Nukleotide zwischen den G-reichen Abschnitten bezeichnet. Dabei kann sich die relative Ausrichtung der Stränge zueinander unterscheiden und die Faltung des Quadruplexes beeinflussen. Vielseitige Faltungsisomere sind das Resultat. Die Stränge können parallel oder antiparallel zueinander angeordnet sein, sowie Hybridkonformationen aufzeigen (Abb. 32A-C). Guanosen-reiche Abschnitte können bei der Faltung des G-Quadruplexes verschiedene Schleifen-Typen (engl. *loops*) ausbilden. Es wird zwischen lateralen (*edgewise loop*), propellerartigen (*double-chain-reversal loop*) und diagonalen Schleifen (*diagonal loop*) unterschieden (Abb. 32D).^[334,351,352]

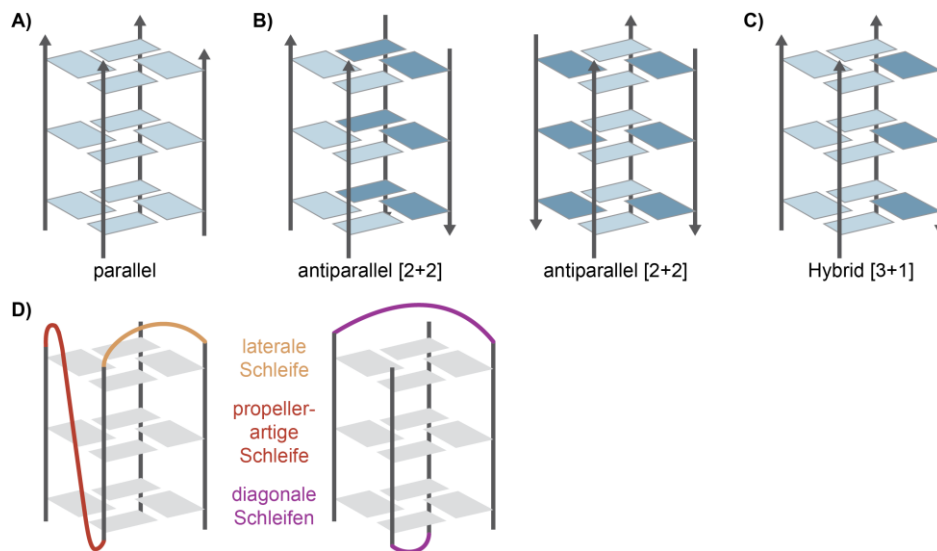


Abb. 32: Faltungstopologien von G-Quadruplexen. A-C) Dargestellt sind eine parallele, zwei antiparallele und eine Hybridanordnung. D) Mögliche Looporientierungen: laterale Schleife (gelb), propellerartige Schleife (rot), diagonale Schleife (lila).

Der strukturelle Polymorphismus wird zusätzlich durch mögliche *syn*- und *anti*-Konformationen der *N*-glykosidischen Bindung und weitere sequenzabhängige Eigenschaften erweitert. Einzelne „übersprungene“ Nukleotide, die zu Ausbuchtungen führen (engl. *bulges*) oder außergewöhnliche Schleifenanordnungen (*Snap-back* Motiv) ergänzen die Möglichkeiten. Außerdem können G-Quadruplexe auch ausgebildet werden, wenn einer G-Tetrade eine Guanosen-Einheit fehlt (vakante Stelle), da die verbliebene Triade stabil genug ist um die G4-Struktur aufrechtzuerhalten. Zusätzliche Guanosine können zu Verschiebungen in 3'- oder 5'-Richtung führen (engl. *G-register shift*). Durch einen weiteren vorhandenen G-reichen Abschnitt, kann es zum Austausch der Abschnitte kommen, die an der Faltung des G4 beteiligt sind. Der fünfte, zusätzliche G-reiche Abschnitt wird auch mit einem Ersatzreifen (engl. *spare-tire*) verglichen. Meistens handelt es sich um G4 bestehend aus drei G-Tetraden.^[353] Die genannten Struktur motive (Abb. 33) werden unter der Bezeichnung „nicht-kanonischer Polymorphismus“ zusammengefasst und erweitern die Definition der G-Quadruplexmotive.^[354,355]

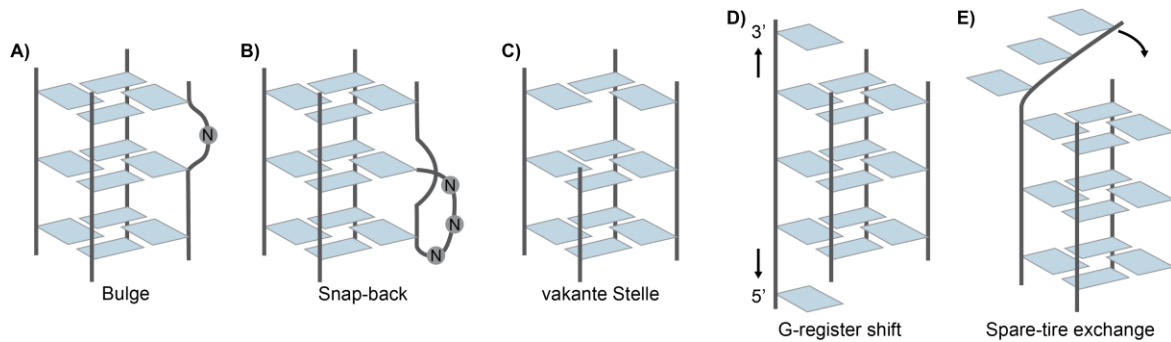


Abb. 33: Nicht-kanonischer Polymorphismus von G-Quadruplexstrukturen. Dargestellt sind A) Ausbuchtungen (*Bulges*) durch ein zusätzliches Nukleosid (N), das nicht an einer G-Tetrade beteiligt ist; B) Snap-back-Motiv, bei dem eine extra Schleife entsteht; C) Vakante Stelle, durch eine fehlende Guanosineinheit in der oberen Tetrade; D) Zusätzliche Guanosine können durch Verschiebung in 3'- oder 5'-Richtung Teil des G4 werden (*G-register shift*) und E) Ein zusätzlicher G-reicher Abschnitt kann einen Abschnitt im bestehenden G4 ersetzen (*spare-tire exchange*).

G-Quadruplexe werden in Zusammenhang mit verschiedenen biologisch relevanten zellulären Prozessen gebracht. Dazu gehören Replikations-^[356], Transkriptions-^[357] und Translationsprozesse^[358]. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle im Kontext der genomischen Instabilität^[359] und der Telomerstabilisierung^[360,361].^[334,352]

1.4 Strukturaufklärung von Oligonukleotiden

Das Wissen über die Zusammenhänge zwischen der dreidimensionalen Struktur und Funktion zahlreicher Oligonukleotide konnte seit der ersten Veröffentlichung der Röntgenbeugungsmuster von DNA-Fasern (Franklin und Gosling, 1953^[328]) und der daraus resultierend von Watson und Crick vorgestellten DNA-Doppelhelix^[326] erstaunlich erweitert werden. Neben der Analyse von Faserbeugungsmustern (Auflösung bis zu $\sim 2,5\text{\AA}$)^[362,363] eignen sich vor allem (Einzel-) Kristallanalysen und Untersuchungen *via* mikroskopischer Methoden zur detaillierten Strukturaufklärung von Oligonukleotiden. Der technische Fortschritt und die stetige Verbesserung der Untersuchungsmethoden erlaubt hohe Auflösungen auf atomarer Ebene bis zu $< 0,75\text{\AA}$.^[362,364] Somit können Interaktionen zwischen einzelnen Nukleotiden und beispielsweise Ausrichtungen von Phosphatgruppen dargestellt werden.^[362,364] Kristallographische Strukturaufklärungsmethoden setzen eine gleichmäßige Kristallisation voraus, die nicht immer möglich ist und nicht vollständig die native Struktur von Oligonukleotiden widerspiegelt.^[365,366] Weitere Methoden wie Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM, Auflösung $< 4\text{\AA}$)^[367-369] und Atomkraftmikroskopie (AFM, Auflösung im nm-Bereich)^[370-372] können zur Aufklärung der Faltung und Position von Oligonukleotiden in komplexer Umgebung genutzt werden. Techniken wie computerbasiertes *Molecular Modeling* und chemische bzw. biochemische Methoden ergänzen die Möglichkeiten.^[363]

Neben Röntgenstrukturanalysen stellt Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie eine der leistungsfähigsten Methoden zur Untersuchung von Struktur, Konformationsdynamiken oder Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotiden und anderen (Bio-) Molekülen in Lösung dar.^[373-375] Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können verschiedene Faltungsdynamiken auf einer weitreichenden Zeitskala (ps – d) analysiert werden. Verschiedene Methoden ermöglichen dabei die Untersuchung unterschiedlicher Dynamiken und Faltungsvorgänge. Neben langsam

ablaufenden Strukturfaltungen [$\mu\text{s} - \text{d}$] und Konformationsänderungen [$\text{s} - \text{d}$] können auch schnell ablaufende Molekülbewegungen wie Zucker-Repuckering [ns] sowie Vibrationen und Schwingungen [$\text{ps} - \text{ns}$] durch die Wahl geeigneter Methoden untersucht werden (Abb. 34).^[376,377]

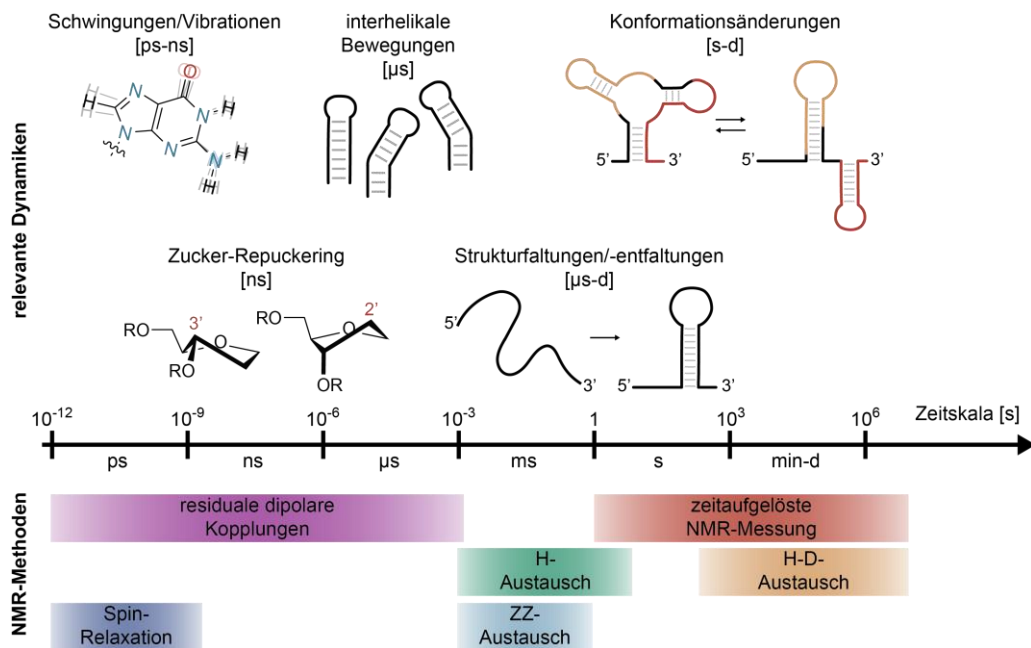


Abb. 34: Schematische Darstellung unterschiedlicher Struktur- und Faltungsdynamiken auf einer Zeitskala im Bereich von Pikosekunden bis hin zu Tagen (Abb. angelehnt an die Literatur^[376,377]). Neben ausgewählten relevanten Dynamiken sind NMR-Methoden gezeigt, die die entsprechenden Bereiche auf der Zeitskala abdecken.

Die vielfältigen Strategien und Möglichkeiten zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von Oligonukleotiden wurde in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[373–378] Da Oligonukleotide mit zunehmender Länge deutlich flexibler und im Wesentlichen lediglich aus vier unterschiedlichen Nukleotid-Bausteinen aufgebaut sind, ist nur eine sehr geringfügig unterscheidbare chemische Verschiebung detektierbar, was zu einer zunehmenden Überlappung der Signale führt. Das erschwert besonders die Analyse in ^1H -NMR-Experimenten und limitiert diese auf Oligonukleotide mit max. 50 nt.^[374,375] Durch die Einführung von ortsspezifischen Isotopen-Markierungen (^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , usw.) kann die derzeit messbare Gesamtlänge auf $\sim 150 - 200$ nt erweitert werden. Hinzu kommt, dass für NMR-Experimente Probenkonzentrationen von min. 50 μM erforderlich werden, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.^[375] Dieser Umstand erfordert effiziente Methoden zur Synthese der zu untersuchenden Oligonukleotide. In der Regel wird auch hierfür auf die chemische Festphasensynthese unter Verwendung Isotopen-markierter Phosphoramidite oder *in vitro* Transkription mit den entsprechenden Triphosphaten zurückgegriffen.

Um an dieser Stelle nur einige Beispiele für die umfangreichen Möglichkeiten der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie zu nennen, werden die im vorherigen Kapitel angesprochenen Strukturmotive hier wieder aufgegriffen. Helmling *et al.* untersuchten das genaue Zusammenspiel zwischen Ligandenbindung, Faltungszustand und Transkriptionsrate des 2'dG-spezifischen Riboschalters aus *Mesoplasma florum*. Diese Studien zeigten mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Experimenten, dass es eine Art Zeitfenster während der Transkription gibt, in dem die Aptamerdomäne des Riboschalters den Liganden (2'dG) binden kann. Bei fortschreitender Transkription nimmt die Bindungsaffinität jedoch ab und es kommt zur Konformationsänderung

gefolgt von einer Herabsenkung der Transkriptionsrate.^[280,379,380] Auch die Untersuchung von tRNAs^[381–383] und G-Quadruplexen^[334,373,384,385] mittels NMR-Spektroskopie bringt wichtige Erkenntnisse über Faltungszustände und Stabilitäten dieser. So verglichen Biedenbänder *et al.* kürzlich unmodifizierte tRNA^{fMet} mit modifizierter tRNA^{fMet}, um den lokalen und globalen Einfluss einzelner Modifikationen zu untersuchen. Sie konnten zeigen, dass die Modifikationen die lokalen Dynamiken beeinflussen und sich auf die Stabilität der Tertiärstruktur auswirken. Dabei gelang ihnen auch eine vollständige Zuordnung der NMR-Signale für die modifizierte Vollängen-tRNA.^[383] Des Weiteren stellt die NMR-Spektroskopie die wichtigste Methode bei der Aufklärung des umfangreichen G-Quadruplex-Polymorphismus auf atomarer Ebene dar.^[334,373] So konnten die zahlreichen Faltungsmuster ausführlich charakterisiert und die entsprechenden Faltungskinetiken unter verschiedenen Bedingungen gemessen werden.^[334,373,384,385]

Die durch Strukturaufklärung gewonnenen Erkenntnisse fördern generell das Verständnis für biologische Prozesse auf zellulärer Ebene und helfen die Forschung zu therapeutischen Oligonukleotiden zum Einsatz gegen mutationsbedingte (Erb-) Krankheiten oder onkologische Erkrankungen auf molekularer und atomarer Ebene voranzutreiben.

2 Motivation und Zielsetzung

Der Zugang zu hochgradig modifizierten Oligonukleotiden setzt effiziente und verlässliche Synthesemethoden voraus. Nur wenn Möglichkeiten zur Synthese biologisch relevanter Oligonukleotide gegeben sind, können neue Einblicke in die Genregulation gewonnen, Faltungsprozesse nachverfolgt und das Verständnis für strukturelle Prozesse erweitert werden. Der gezielte Einbau photolabiler Schutzgruppen und reversibler Photoschalter an genau definierten Positionen ermöglicht es, funktionale Oligonukleotide zielgerichtet zu (de-)aktivieren oder die Ausbildung von strukturellen Motiven vorübergehend zu unterbinden. Licht ist dabei ein nicht-invasives, gut lokalisier- und dosierbares Auslösesignal. Zusätzlich stellt es eine orthogonale Alternative zum Einsatz potenziell zellschädigender chemischer Aktivatoren dar. Mit Hilfe der chemischen Festphasensynthese können Oligonukleotide mit definierten Modifikationen effizient hergestellt werden. Seit Jahrzehnten ist die chemische Festphasensynthese daher ein bewährtes Mittel zur Darstellung von DNAs und RNAs, obwohl sie doch auch ihre Grenzen und Einschränkungen hat. Der größte Nachteil der Methode ist die Längenlimitierung der synthetisch zugänglichen Oligonukleotide. Je nach Grad der Modifizierung stellt besonders die Synthese von RNAs mit einer Länge von über 50 Nukleotiden eine Herausforderung dar.^[12,64,80–83] Enzymatische Methoden umgehen diese Einschränkung, ermöglichen zumeist aber nur einen statistisch verteilten Einbau von Modifikationen.

Die vorliegende Doktorarbeit vereint die Einsatzmöglichkeiten von lichtaktivierbaren Verbindungen mit der Entwicklung geeigneter Synthesemethoden zum effizienten Einbau photolabiler Schutzgruppen und Azobenzol-Photoschalter in DNA und RNA. Hauptziel der Arbeit war dabei die Weiterentwicklung einer chemo-enzymatischen Methode zur Synthese von positionsspezifisch-modifizierter RNA, die es ermöglicht, die Grenzen der chemischen Festphasensynthese zu überwinden. Inspiriert durch Arbeiten von Uhlenbeck *et al.* sollte der strategische Einsatz von Enzymen wie *T4* RNA Ligase 1, *Shrimp Alkaline Phosphatase* und *T4* RNA Ligase 2 zum chemo-enzymatischen positionsgenauen Einbau einzelner lichtadressierbarer Nukleosid-3',5'-Bisphosphate in RNA untersucht werden. Nach der kollaborativen Synthese der benötigten Bisphosphate und Etablierung der grundlegenden Reaktionsbedingungen sollten weitere Möglichkeiten der Methode erarbeitet werden. Dabei sollte zunächst geprüft werden, ob ein zweiter Einbau eines modifizierten Bisphosphates am 3'-Ende einer RNA in direkter Nachbarschaft erreicht werden kann. Mittels chemischer Festphasensynthese können mehrere Modifikationen in einer RNA-Sequenz vereint werden. Einige dieser Modifikationen haben eine Verbesserung der Stabilität der RNA gegenüber Exonukleasen zum Ziel, um in biologisch relevanten Systemen eingesetzt werden zu können. Ein chemo-enzymatischer Zugang zu Oligonukleotiden mit solchen Anpassungen wie Phosphorthioaten im Rückgrat oder Modifikationen der Ribose-Einheit ist wichtig, um die entwickelte Methode vielseitig einsetzen zu können. Deshalb sollte geprüft werden, inwieweit die verwendeten Enzyme eine Kombination aus Phosphat-, Ribose- und lichtaktivierbarer Modifikation tolerieren. Die 3'-Verlängerung von DNA/RNA-Mixmeren, Phosphorthioat- und 2'-OMe-modifizierten Oligonukleotiden sollte demnach untersucht werden.

Ein großer Vorteil der chemischen Festphasensynthese ist ihre automatisierte Anwendbarkeit, die eine zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte ermöglicht. Angelehnt an diesen Vorgang sollte eine Übertragbarkeit dieses Prinzips auf die im Zentrum dieser Arbeit stehende chemo-enzymatische RNA-Synthese getestet werden. Als feste Phase sollten magnetische Streptavidin

Beads eingesetzt werden. Diese Beads weisen eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin unter milden Bedingungen auf, weshalb sie besonders im Bereich der Biochemie häufig zur Immobilisierung und Isolation biotinylierter Substrate, Antikörper und Oligonukleotide eingesetzt werden. Die Beads lassen sich mit einem Magneten fixieren, sodass der zurückbleibende Überstand einfach und schnell entnommen werden kann. Durch die Weiterentwicklung der Methode und die Verwendung eines Festphasen-basierten Systems sollten Arbeitsschritte erleichtert und durch Wiederholung der enzymatischen Reaktionsschritte ein mehrfacher Einbau der lichtaktivierbaren Nukleosid-3',5'-Bisphosphate ermöglicht werden. Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob die drei enzymatischen Reaktionsschritte auch dann noch durchgeführt werden können, wenn das zu modifizierende RNA-Fragment über eine 5'-ständige Biotineinheit mit magnetischen Streptavidin Beads gebunden wurde. Außerdem sollte die Durchführbarkeit von Waschschrinen zur Einsparung zusätzlicher Aufreinigungsschritte erarbeitet werden. Ein wichtiges Ziel bei der Etablierung der vorgestellten Methode besteht darin, die Reaktionsbedingungen dahingehend anzupassen, dass nach der ersten Modifikation weitere Reaktionszyklen durchgeführt werden können. Insgesamt sollte so ein mehrfach modifiziertes tRNA-Derivat hergestellt werden, welches aufgrund seiner Länge mittels chemischer Festphasensynthese nur schwer zugänglich wäre. tRNAs stellen eine wichtige Gruppe biologisch relevanter RNAs dar, deren Synthese mit gezielten Modifikationen viel Aufwand bedeutet. Mit der Überwindung der Grenzen der chemischen Festphasensynthese sowie dem Erfassen der Limitierungen der chemo-enzymatischen Synthesemethode lassen sich die Hauptziele dieser Doktorarbeit zusammenfassen. Die angestrebte Synthese eines tRNA-Derivats sollte die Stärken enzymatischer Reaktionen vereinen und den Zugang zu längeren RNAs mit mehrfachen definiert platzierten Modifikationen eröffnen.

Zusätzlich sollten weitere Modifikationsmöglichkeiten basierend auf Ligationsreaktionen untersucht werden. Eine wellenlängenselektive Adressierbarkeit einer RNA kann durch den Einbau verschiedener photolabiler Schutzgruppen mit unterschiedlichen Absorptionsspektren erzielt werden. Interessant sind vor allem Schutzgruppen, deren Abspaltung mit rotverschobenen Wellenlängen möglich ist. Sie ermöglichen eine Abspaltung ohne schädliche UV-A-Strahlung und eine größere Eindringtiefe in biologisches Gewebe. Die Synthese und Ligation eines DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates erlaubt zum einen eine Abspaltung >400 nm und stellt zugleich eine Modifikation dar, die aus Stabilitätsgründen nicht effizient mittels chemischer Festphasensynthese eingebaut werden kann. Die Synthese einer NPE- und DEACM-geschützten RNA war ebenso ein angestrebtes Ziel wie die Synthese photospaltbarer Dinukleotide. Neben der Einführung einer photolabilen Schutzgruppe an der Nukleobase zur Störung der Watson-Crick-Franklin-Interaktion stellt die Einführung photospaltbarer Linker in das Zucker-Phosphatrückgrat eine interessante Modifizierungsstrategie dar. Sie erlauben eine photoinduzierte Spaltung des Phosphatrückgrates und somit eine Fragmentierung des Oligonukleotids. Angelehnt an Nukleosid-3',5'-Bisphosphate stellen 3',5'-phosphorylierte Dinukleotide die kleinstmögliche photospaltbar-verbrückte Einheit dar. Fraglich war, ob die Enzyme diese Art der Modifikation tolerieren, da sie über das Rückgrat mit dem Oligonukleotid interagieren. Bei einem erfolgreichen Einbau eines photospaltbaren Dinukleotids sollte eine anschließende enzymatische Zyklisierung untersucht werden, die eine milde Alternative zur chemischen kupferkatalysierten Click-Reaktion darstellt. Die Möglichkeiten, ein funktionales Oligonukleotid unter nahezu nativen Bedingungen zu zyklisieren und durch Belichtung irreversibel wieder zu linearisieren bietet Raum für Untersuchungen zur Struktur-Funktion-Abhängigkeit eines Oligonukleotids.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Doktorarbeit waren verschiedene kollaborative Projekte, für die lichtadressierbare DNA- und RNA-Proben mittels chemischer Festphasensynthese hergestellt werden sollten. Hierzu sollten die benötigten (enantiomerenrein) photolabil-geschützten und Azobenzol-verbrückten Phosphoramidite synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut werden. Die hergestellten Oligonukleotide sollten von Kollaborationspartner*innen in den Arbeitskreisen Schwalbe, Fürtig und Wachtveitl (Goethe-Universität Frankfurt) in NMR- und CD-spektroskopischen Experimenten untersucht werden, um Erkenntnisse über Faltungsvorgänge zu erhalten. Im Fokus kollaborativer Projekte sollte die Ausbildung von G-Quadruplexstrukturen sowie die Interaktion bistabiler RNAs mit dem RNA-Chaperon StpA stehen.

Im Zentrum aller Fragestellungen steht die Motivation der Entwicklung und Anwendung effizienter Synthesemethoden in Kombination mit der Zugänglichkeit lichtadressierbarer Oligonukleotide. Die so gewonnenen Einblicke in die Zusammenhänge aus Struktur und Funktion funktionaler RNAs ermöglichen das Verständnis zellulärer Prozesse und wichtiger Abläufe während der Genexpression.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Chemo-enzymatische Synthese lichtaktivierbarer RNA

Dieses Projekt ist bereits während meiner Masterarbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Sara Keyhani-Goldau (AK Schwalbe, Goethe-Universität Frankfurt) und Dr. Thomas Goldau (AK Heckel, Goethe-Universität Frankfurt) entstanden und wurde anschließend während meiner Promotion weiterverfolgt. Ergebnisse aus der kollaborativen Arbeit wurden zunächst in einer gemeinsamen Publikation im Jahr 2018 (Keyhani *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*^[294]) veröffentlicht. Hier gezeigte kollaborativ erarbeitete Daten sind als solche gekennzeichnet. Die Doktorarbeiten von Goldau und Keyhani-Goldau enthalten darüber hinaus weitere Details zu den kollaborativ durchgeführten enzymatischen Synthesen. Die Erkenntnisse aus weiteren eigenständigen Arbeiten wurden zu einem späteren Zeitpunkt in einer weiteren Publikation (Blümmler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*^[386]) zusammengefasst.

3.1.1 Die zugrunde liegende Methode und kollaborative Arbeiten

Die Methode, auf der dieses Projekt basiert, ist an Untersuchungen von Uhlenbeck *et al.* angelehnt, die zeigen konnten, dass die 3'-Verlängerung einer RNA mit einzelnen Nukleosid-3',5'-Bisphosphaten *via* Ligasen möglich ist.^[118–120] Im Rahmen dieses Projektes wurde der chemo-enzymatische Einbau photoadressierbarer Nukleosid-3',5'-Bisphosphate in RNA untersucht. Hierzu wurden im Rahmen meiner Masterarbeit und zu Beginn meiner Promotion gemeinsam mit Dr. Thomas Goldau NPE-geschützte Nukleosid-3',5'-Bisphosphate (**pN^{NPE}p**, N = A, C, G, U) sowie *para*- und *meta*-substituierte Azobenzol-C-Nukleosid-3',5'-Bisphosphate (**p(pAzo)p** und **p(mAzo)p**) angelehnt an Literaturvorschriften synthetisiert und charakterisiert (Abb. 35).

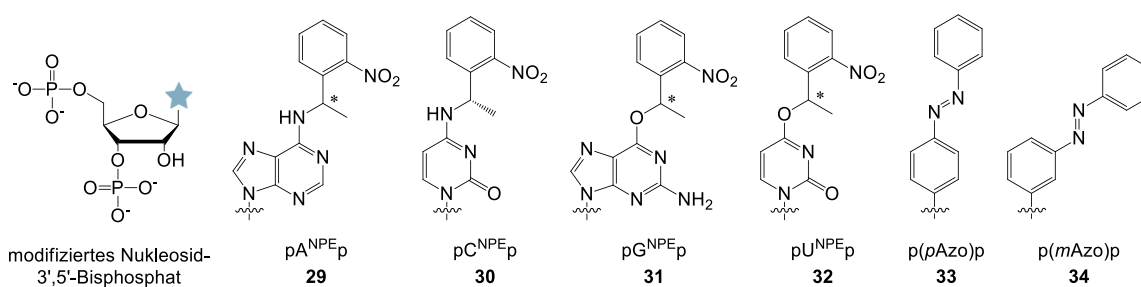


Abb. 35: Strukturen der NPE-geschützten (**pN^{NPE}p** mit N = A, C, G, U, **29-32**) und Azobenzol-C-modifizierten (**p(p/mAzo)p**, **33-34**) Nukleosid-3',5'-Bisphosphate.

Im Allgemeinen wurden bei den jeweiligen Synthesen die gleichen Zwischenstufen durchlaufen.^[294] Stellvertretend ist in Abb. 36 die Syntheseroute zum NPE-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphat **pU^{NPE}p** (**32**) dargestellt, die während dieser Doktorarbeit erfolgreich beendet werden konnte. Generell wurden die Hydroxygruppen der Ribose zunächst mit TBDMS geschützt. Im nächsten Schritt wurde die Carbonylfunktion an Position *O*⁴ mit 1,2,4-Triazol in Anlehnung an Arbeiten von Rublack *et al.*^[387] in Gegenwart von Phosphorylchlorid (POCl₃) und Triethylamin (Et₃N) aktiviert. Verbindung **37** konnte mit einer Ausbeute von 98% isoliert werden. Alternativ kann die Aktivierung einer Nukleobase auch durch Bildung einer Sulfonsäure mittels Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TIPBS-Cl) erfolgen. Diese Option wird meistens zur Modifizierung der exozyklischen Amine

(Position N^4 bei Cytidin oder Position N^6 bei Adenosin) angewendet, um die Reaktion mit dem Amino-Derivat der Schutzgruppe (z.B. NPE-NH₂) zu ermöglichen. Nach der Aktivierung erfolgt die Einführung der photolabilen Schutzgruppe. Bei Versuchen mit Sulfonsäure-aktiviertem Uridin konnte Dr. Thomas Goldau nur geringe Ausbeuten von 7% erzielen. Die Umsetzung des Triazol-aktivierten Derivats **37** mit NPE-OH in Gegenwart von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) führte mit 68% zu einer deutlich höheren Ausbeute des gewünschten Produktes **38**. Eine weitere Möglichkeit zur Einführung der PPG besteht darin, das TBDMS-geschützte Derivat **36** unter Mitsunobu-Bedingungen mit Triphenylphosphin (PPh₃), Diethylazodicarboxylat (DEAD) und dem Alkohol der Schutzgruppe (z.B. NPE-OH) umzusetzen. Diese Reaktion würde zwar einen Reaktionsschritt einsparen, führt aber zu hier unerwünschten und schlecht abtrennbaren N^3 -substituierten Nebenprodukten. Prinzipiell können N^3 -photolabil-geschützte Uridin-Derivate zur Anwendung in Betracht gezogen werden, da sie sich ebenfalls auf die Watson-Crick-Franklin-Basenpaarung auswirken und zudem unter Standard-Festphasenbedingungen in Oligonukleotide eingeführt werden können. Allerdings findet die Photolyse wesentlich langsamer statt.^[288] Um das O^4 -NPE-geschützte Uridin-3',5'-Bisphosphat zu erhalten, wurden die TBDMS-Schutzgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) abgespalten und Verbindung **39** mit Diphosphorylchlorid bei -12 °C umgesetzt. Die Reaktion findet ohne zusätzliches Lösungsmittel statt. Bei diesem Reaktionsschritt war darauf zu achten, dass die Neutralisation der stark sauren Reaktionslösung mit 1 M TEAB-Puffer vollständig bis zu einem pH-Wert von 7,5-7,0 durchgeführt wird. Bleibt die Reaktionslösung leicht sauer, lassen sich zyklische Nebenprodukte *via* Massenspektrometrie nachweisen. Dies deutet daraufhin, dass während der Reaktion ein zyklisches Zwischenprodukt gebildet wird, welches durch Zugabe des TEAB-Puffers hydrolysiert wird. Diese Reaktion resultierte nach finaler Aufreinigung mittels RP-HPLC in einem Isomergemisch aus 2',5' (40)- und 3',5'-pU^{NPE}p (**32**).

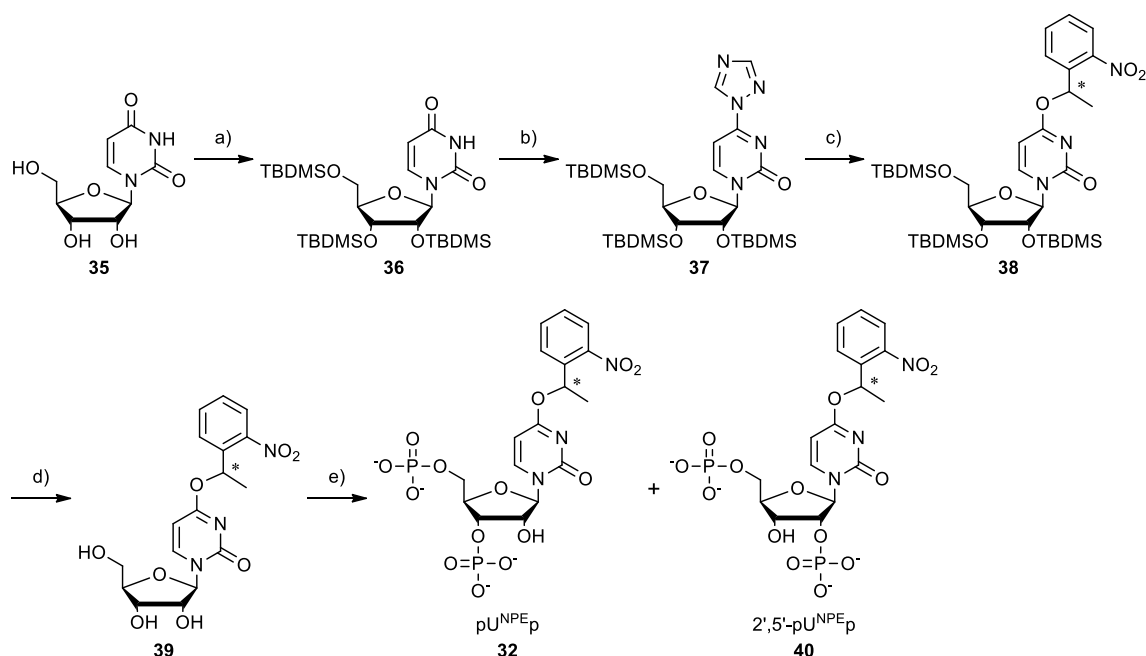


Abb. 36: Allgemeine Syntheseroute zum lichtaktivierbaren Nucleosid-3',5'-Bisphosphat am Beispiel von pU^{NPE}p. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, quantitativ; b) 1,2,4-Triazol, POCl₃, Et₃N, MeCN, 0 °C – RT, 98%; c) (R,S)-NPE-OH, DBU, MeCN, RT, 68%; d) TBAF, THF, RT, 83%; e) Diphosphorylchlorid, 1 M TEAB, -12 °C, 16%.

Die Synthesen von **pA^{NPE}p (29)**, **pC^{NPE}p (30)**, **pG^{NPE}p (31)**, **p(mAzo)p (33)** und **p(pAzo)p (34)** (siehe Masterarbeit Blümler 2017 & Doktorarbeit Goldau 2018) verliefen analog zu der hier beschriebenen Synthese des **pU^{NPE}p (32)**. Alle Synthesen wurden im kleinen Milligramm-Maßstab durchgeführt (5-50 mg) und lieferten ähnliche Ausbeuten.

Alle synthetisierten modifizierten Nucleosid-3',5'-Bisphosphate (**pN^{NPE}p / pAzop**) konnten anschließend erfolgreich in eine RNA-Testsequenz eingebaut werden. Hierzu wurden drei enzymatische Schritte durchlaufen, die die Grundlage der erarbeiteten chemo-enzymatischen Methode bilden (Abb. 37). Der erste Schritt besteht aus einer 3'-Verlängerung einer ersten RNA-Sequenz um ein modifiziertes Bisphosphat *via* *T4* RNA Ligase 1 (Rnl1). Im zweiten Schritt wird die 3'-terminale Phosphatgruppe durch Umsetzung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP) entfernt, um eine Akzeptor-RNA für den finalen Schritt zu generieren. Abschließend findet eine Splint-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2 (Rnl2) in Anwesenheit einer 5'-phosphorylierten Donor-RNA und eines komplementären DNA-Stranges (Splint) statt (Schritt 3). So wird aus der 3'-terminalen eine interne Modifikation mit definierter Position.

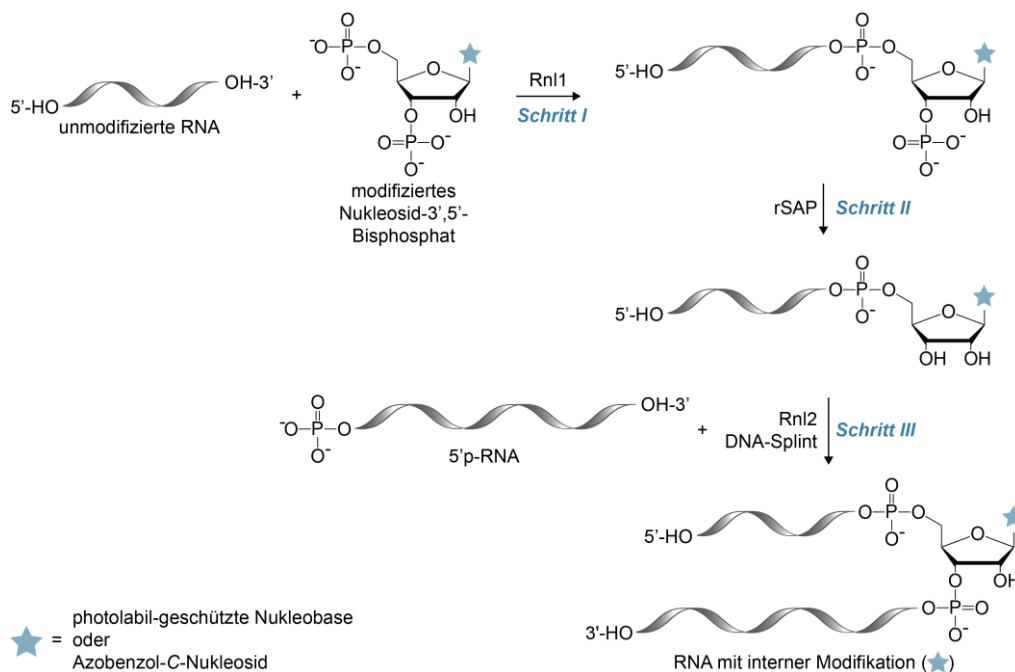


Abb. 37: Schematische Übersicht der chemo-enzymatischen RNA-Synthese. Es werden drei enzymatische Schritte durchlaufen: 3'-Verlängerung mit Rnl1, 3'-Dephosphorylierung mit rSAP und Splint-Ligation der endständig-modifizierten RNA mit einer 5'-p-Donor-RNA in Gegenwart eines DNA-Splints mit Rnl2.

Um die benötigten Reaktionsbedingungen und Verhältnisse von RNA zu pNp (RNA:pNp) zu ermitteln, wurden alle Bisphosphate in Zusammenarbeit mit Dr. Sara Keyhani-Goldau an das 3'-Ende einer 12 Nucleobasen langen Test-RNA (**12mer**; 5'-r[GGA UAG UGA UCC]-3') ligiert. Hierzu wurden Ligationsreaktion mit Rnl1 und ATP als Cofaktor durchgeführt und die Ansätze anschließend jeweils mittels RP-HPLC und denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (denat. PAGE) analysiert. Die Konzentration der RNA betrug bei diesen Untersuchungen jeweils 25 μ M, das Reaktionsvolumen lag bei 50 μ L. Bei einem Verhältnis von 1:4 bezogen auf **12mer:pNp** konnten gute bis sehr gute Ligationsausbeuten erzielt werden. Die beiden modifizierten Purin-3',5'-Bisphosphate zeigten durchschnittlich bessere Ligationsausbeuten als die beiden Pyrimidinderivate. **pA^{NPE}p** konnte mit 80% Ausbeute ligiert werden. Die Ausbeute für **pG^{NPE}p** lag bei

81%. Während die Ligation von $\text{pC}^{\text{NPE}}\text{p}$ noch zu 56% stattfand, betrug die Ausbeute von $\text{pU}^{\text{NPE}}\text{p}$ nur 48%. Auch die beiden Azobenzol-modifizierten 3',5'-Bisphosphate p(mAzo)p und p(pAzo)p konnten mit quantitativen Ausbeuten erfolgreich an das 3'-Ende des **12mers** ligiert werden. Die erzielten Ausbeuten der 3'-verlängernden Ligationsreaktionen sind mindestens mit zuvor publizierten Ausbeuten modifizierter 3',5'-Bisphosphate vergleichbar und können zum Teil sogar so effizient wie unmodifizierte Derivate ligiert werden.^[103,120,123,125] Es liegt somit keine nachweisbare Beeinträchtigung der Ligationsreaktion durch die NPE-Schutzgruppe vor. Für die 3'-Verlängerung mit *T4* RNA Ligase 1 werden sowohl die 3'- als auch die 5'-ständige Phosphatgruppe benötigt, damit das Enzym das entsprechende Bisphosphat als Substrat erkennt und umsetzt. Zusätzlich dient die 3'-terminale Phosphatgruppe als eine Art Stoppsignal, das eine unerwünschte mehrfache Verlängerung verhindert, da die Ligase nur 3'-Hydroxygruppen mit 5'-Phosphatgruppen verknüpfen kann. Somit kann unter Einsatz von 3',5'-Bisphosphaten lediglich eine Verlängerung um ein einzelnes Nukleotid erfolgen.^[115,118,119,121] Aus diesem Grund muss die 3'-ständige Phosphatgruppe vor der Splint-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2 entfernt werden. Hierzu wurde das Ligationsprodukt mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP) umgesetzt. Die 3'-Dephosphorylierungen verliefen quantitativ und lieferten die gewünschten Akzeptor-RNAs (**12mer-N^{NPE}** und **12mer-Azo**). Beide enzymatische Reaktionsschritte konnten mittels RP-HPLC und denat. PAGE analysiert werden (Abb. 38A). Alle Produkte konnten eindeutig massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die Kürze der verwendeten Testsequenz (**12mer**) stellte sich hierbei als Vorteil heraus. Die Auftrennung über RP-HPLC und auch Gelelektrophorese erfolgt nach Größe und Polarität. Bei einer kurzen RNA-Sequenz beeinflusst die Polarität der 3'-ständigen Phosphatgruppe die Retentionszeit, sodass eine Trennung der 3'-phosphorylierten Spezies von 3'-dephosphorylierten Derivaten erfolgen kann. Ein vergleichbarer Effekt kann bei der Einführung der unpolaren NPE-Gruppe beobachtet werden (mehr dazu in Abschnitt 3.1.2). Je länger die Oligonukleotidsequenz, desto vergleichsweise geringer ist der Polaritätsunterschied, wodurch eine Auftrennung erschwert wird.

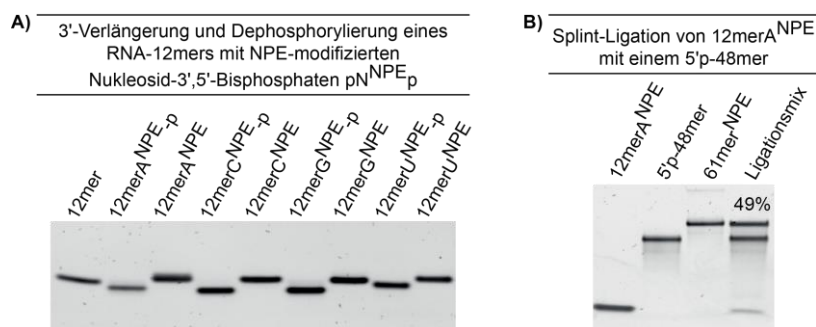


Abb. 38: 20% denat. PAA-Gele der chemo-enzymatischen Synthese NPE-modifizierter RNA. A) Gel der RP-HPLC-aufgereinigten 3'-terminal NPE-modifizierten Test-RNA jeweils nach 3'-Verlängerung (**12merN^{NPE}-p**) sowie nach 3'-Dephosphorylierung (**12merN^{NPE}**). B) Denat. PAGE der Splint-Ligation von **12merA^{NPE}** mit **5'p-48mer**. Neben den beiden Edukt-RNAs ist das RP-HPLC-aufgereinigte Ligationsprodukt **61mer^{NPE}** und der Ligationsmix aufgetragen. Die Polyacrylamidgele wurden von Sara Keyhani-Goldau aufgenommen (Abb. mit Erlaubnis modifiziert übernommen aus der Literatur^[294], © 2018, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA).

Im dritten enzymatischen Schritt wurden die 3'-terminal-modifizierten Akzeptor-RNAs in Splint-Ligationen mit *T4* RNA Ligase 2 mit einem 5'-phosphorylierten RNA-48mer (**5'p-48mer**; 5'-p-r[GGC GGG AGU UGG GCU AGG GAG GAA CAG CCU UUU CUA GGC UAA GGC CCA]-3'); hergestellt von Dr. Thomas Goldau) von Dr. Sara Keyhani-Goldau verknüpft (Abb. 38B am Beispiel von **12merA^{NPE}** + **5'p-48mer**). Der Ablauf der Ligationsreaktion, bestehend aus den Schritten Adenylierung des Enzyms (I), 5'-5'-Phosphoanhydridbindungsbildung (II) und Ausbildung der neuen

Phosphodiesterbindung (III), ist bereits in Abb. 5 zusammengefasst.^[112] Veröffentlichte Kristallstrukturen der Ligasen (Omari *et al.* für Rnl1^[111], PDB-ID 2HVS für Rnl2^[112] und PDB-ID 6DT1 für DNA Ligase^[113], Abb. 4) legen nahe, dass die Interaktion des Enzyms mit den Oligonukleotiden primär über das Zucker-Phosphatrückgrat verläuft. Somit sollte eine Splint-Ligation auch mit einer NPE-modifizierten Nukleobase möglich sein, da sich die NPE-Gruppe auf Watson-Crick-Franklin-Basenpaarseite befindet und dadurch keinen Einfluss auf das Zucker-Phosphatrückgrat hat. Die Splint-Ligationen wurden jeweils für 2 h durchgeführt. Der DNA-Splint wurde nach der Ligation mit *TURBO*TM DNase abgebaut. Anschließend wurden die Ligationsansätze erneut mittels RP-HPLC und denat. PAGE analysiert. In allen Fällen konnte ein modifiziertes **61mer**^{NPE} erhalten werden. Die Ausbeuten der Splint-Ligationen lagen für die Verküpfung des **12merA**^{NPE}-Fragments bei 49% (siehe Abb. 38B). Die Splint-Ligationen von **12merG**^{NPE} (46%) und **12merU**^{NPE} (47%) verliefen mit vergleichbaren Ausbeuten. Ein deutlicher Unterschied konnte für das Cytidin-Fragment **12merC**^{NPE} beobachtet werden. Hier betrug die Ausbeute der Splint-Ligation mit **5'p-48mer** lediglich 9%. Alle Ausbeuten wurden durch Vergleich der Bandenintensitäten mit *Image Lab*^[388] ermittelt. Auch die Splint-Ligationen der beiden Azobenzol-modifizierten RNA-Fragmente zeigte unterschiedliche Ausbeuten. Das Fragment mit *meta*-substituiertem Azobenzol am 3'-Ende **12mer-mAzo** konnte deutlich effizienter in der Splint-Ligation umgesetzt werden, als das *para*-substituierte Derivat **12mer-pAzo**. Die genauen Gründe hierfür wurden nicht untersucht. Es wurde vermutet, dass sterische Effekte zu diesen Unterschieden führen könnten. Eventuell wirkt sich das *meta*-substituierte Azobenzol stabilisierend auf die Duplexausbildung mit dem DNA-Splint aus und wird dadurch effizienter ligiert als das RNA-Fragment mit *para*-substituiertem Azobenzol. Dennoch unterstützen die Ligationsergebnisse die Interpretation der Interaktion zwischen Ligase und Oligonukleotiden über das Zucker-Phosphatrückgrat. Die Splint-Ligationen der Azobenzol-modifizierten RNAs verdeutlichen, dass fehlende Watson-Crick-Franklin-Wechselwirkungen ausgehend vom 3'-terminalen Nukleotid der Akzeptor-RNA nicht die Ligation mit einer Donor-RNA verhindern. Durch Optimierung der Ligationsbedingungen für die einzelnen Fragmente können die jeweiligen Ausbeuten eventuell verbessert werden. Hierauf wurde im Rahmen dieser Test-Reaktionen allerdings verzichtet.

Anschließend an die hier beschriebenen enzymatischen Testreaktionen konnten Dr. Thomas Goldau und Dr. Sara Keyhani-Goldau mit dieser Methode die 79 Nukleobasen umfassende Aptamerdomäne des 2'dG-spezifischen Riboschalters (dGsw) aus *Mesoplasma florum* mit einer gezielt platzierten NPE-Schutzgruppe modifizieren. Da dieses Experiment die Anwendungsmöglichkeiten darstellt und die Relevanz der chemo-enzymatischen Methode zur Synthese modifizierter RNA hervorhebt, wird hier kurz auf diese Ergebnisse eingegangen. Aus Kristallstrukturanalysen von Pikovskaya *et al.*^[389] geht hervor, dass die Wechselwirkung zwischen Ligand und Riboschalter auf Watson-Crick-Franklin-Interaktionen zwischen 2'dG und C61 (Abb. 39) des Riboschalters beruhen. Zusätzlich wurde dieser Riboschalter bereits ausführlich NMR-spektroskopisch im Arbeitskreis Schwalbe untersucht.^[280,379,380] Aus diesem Grund wurde an Position C61 eine photolabile NPE-Schutzgruppe chemo-enzymatisch in die Riboschaltersequenz eingeführt (dGsw^{79-NPE}). Im Folgenden konnte dann die lichtinduzierte Ligandenbindung mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden (Abb. 39). Zunächst blockiert die NPE-Schutzgruppe vollständig die Interaktion des Liganden mit C61 (kein Signal im ¹⁵N-¹H-NMR-Spektrum). Nach Abspaltung der NPE-Schutzgruppe durch Belichtung bei 355 nm konnte eine Interaktion des Liganden mit dem Riboschalter stattfinden und ein entsprechendes Signal im ¹⁵N-editierten ¹H-

NMR-Spektrum im Bereich der Iminprotonen beobachtet werden. Zusätzlich konnten nach Abspaltung der PPG weitere Strukturänderungen im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet werden.

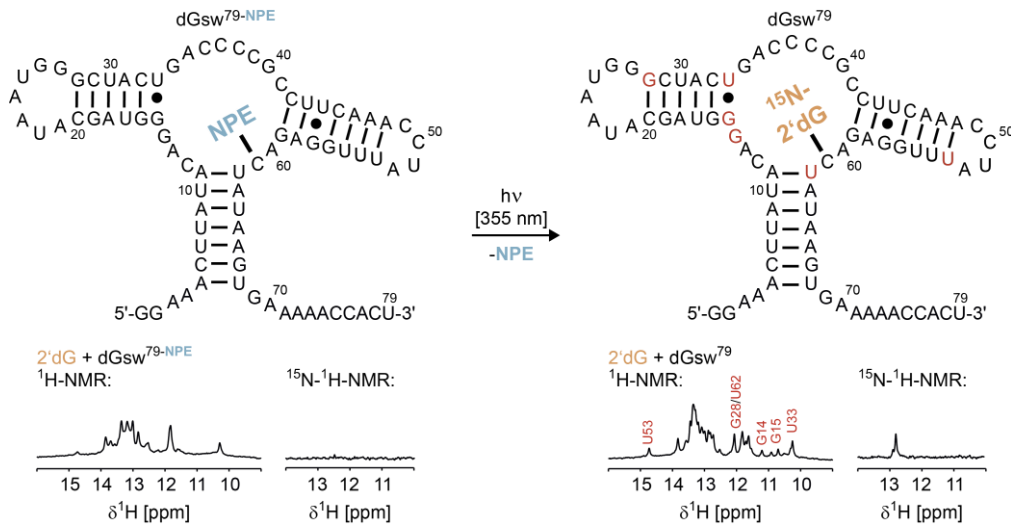


Abb. 39: Darstellung der Sekundärstruktur des 2'dG-spezifischen Riboschalters als NPE-geschützte Form vor Belichtung ($\text{dGsw}^{79\text{-NPE}}$, links) und mit gebundenem Liganden nach Belichtung (dGsw^{79} , rechts). Zusätzlich sind die entsprechenden ^1H - und ^{15}N - ^1H -NMR-Spektren abgebildet. Die NMR-Messungen wurden von Dr. Sara Keyhani-Goldau durchgeführt (Abb. mit Erlaubnis modifiziert übernommen aus der Literatur^[294], © 2018, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA).

3.1.2 Multipler Einbau NPE-modifizierter Adenosin-3',5'-Bisphosphate

Nach der erfolgreichen Synthese der lichtadressierbaren Nucleosid-3',5'-Bisphosphate, der Untersuchung der grundlegenden enzymatischen Reaktionsbedingungen und der NMR-Charakterisierung des NPE-modifizierten Riboschalters, sollten weitere Möglichkeiten der Methode im Rahmen dieser Promotion untersucht werden. Die kollaborativ erarbeiteten Ergebnisse konnten zeigen, dass durch die chemo-enzymatische Methode längere RNA-Sequenzen synthetisch zugänglich werden. Der große Vorteil der chemischen Festphasensynthese ist allerdings die Option des Einbaus mehrerer positionsspezifischer Modifikationen innerhalb einer Sequenz. Aus diesem Grund wurde während dieser Doktorarbeit ein enzymatischer Einbau mehrerer NPE-modifizierter Adenosin-3',5'-Bisphosphate ($\text{pA}^{\text{NPE}}\text{p}$, **29**) in direkter Nachbarschaft untersucht (Abb. 40).

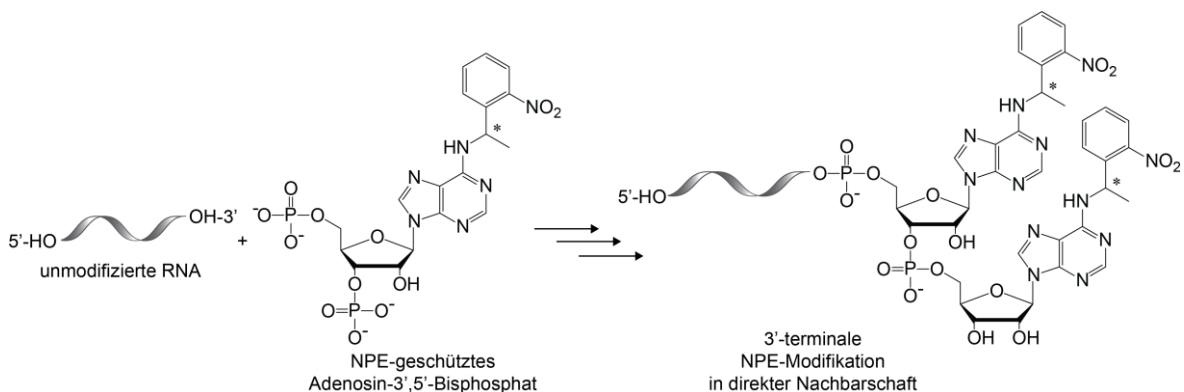


Abb. 40: Schematische Darstellung des multiplen Einbaus von $\text{pA}^{\text{NPE}}\text{p}$ in direkter Nachbarschaft. Aus einer unmodifizierten RNA (**12mer**) wird eine 14 Nucleobasen lange RNA mit zweifacher 3'-terminaler NPE-Modifikation (**12merA^{NPE}-A^{NPE}**).

Da $\text{pA}^{\text{NPE}}\text{p}$ in den vorangegangenen Testligationen eine solide Ausbeute bei der 3'-Verlängerung des RNA-**12mers** zeigte, wurde dieses Bisphosphat für den multiplen Einbau ausgewählt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde bei diesen Reaktionen auf die zuvor gewählten Reaktionsbedingungen zurückgegriffen. Die enzymatische 3'-Verlängerung fand im 50 μL -Maßstab mit 25 μM **12mer** und einem RNA: $\text{pA}^{\text{NPE}}\text{p}$ -Verhältnis von 1:4 statt. Um die Ligationsreaktion zu beenden, wurden die Reaktionsansätze für 15 min auf 65 °C erhitzt. Ein Aliquot der Ligationsreaktion wurde zur Bestimmung der Ausbeute des ersten enzymatischen Schrittes mittels RP-HPLC analysiert (99%). Die 3'-Dephosphorylierung wurde nach abkühlen der Ansätze auf 37 °C und Zugabe von rSAP direkt im Ligationspuffer durchgeführt. Hierbei konnten quantitative Ausbeuten erreicht werden. Nach der ersten 3'-Verlängerung und 3'-Dephosphorylierung wurde die resultierende 13 Nucleobasen lange RNA (**12merA^{NPE}**) zunächst mittels RP-HPLC aufgereinigt, bevor diese beiden enzymatischen Schritte wiederholt wurden. Die zweite 3'-Verlängerung und auch die zweite 3'-Dephosphorylierung fanden unter gleichen Bedingungen statt. Ausbeuten von 85% und 97% konnten hierbei erzielt werden. Erneut folgte eine RP-HPLC-Aufreinigung der resultierenden 14 Nucleobasen langen RNA (**12merA^{NPE}-A^{NPE}**). Wie bereits zuvor angemerkt, konnte auch beim mehrfachen Einbau von $\text{pA}^{\text{NPE}}\text{p}$ von der Kürze der Test-RNA profitiert werden. Im Vergleich zu den Test-Reaktionen zuvor, konnte auch bei mehrmaligem Einbau des Adenosin-3',5'-Bisphosphates eine Unterscheidung aller Produkte aufgrund unterschiedlicher Polaritäten im RP-HPLC-Chromatogramm beobachtet werden. Ein Vergleich der analytischen RP-HPLC-Spektren zeigt deutlich, dass alle Produkte der einzelnen Reaktionsschritte unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen (Abb. 41A). Bei der Einführung eines NPE-geschützten Nucleotids bewirkt der unpolare Charakter der NPE-Schutzgruppe eine deutliche Verschiebung der Retentionszeit (blaues und rotes Chromatogramm). Das einfach 3'-verlängerte Fragment wurde etwa 6 min später eluiert als das unmodifizierte 12mer. Die zweite 3'-Verlängerung resultierte in einer weiteren 3 minütigen Verzögerung. Auffällig hierbei ist, dass das Produkt **12merA^{NPE}-A^{NPE}-p** nach der zweiten 3'-Verlängerung als Doppelpeak auftritt. Beide Peaks konnten massenspektrometrisch dem gewünschten Produkt zugeordnet werden. Da für die Ligation das racemische Gemisch aus (*R,S*)-NPE-geschütztem Adenosin-3',5'-Bisphosphat verwendet wurde, wird die Auftrennung des Produktpeaks vermutlich durch isomere Effekte hervorgerufen. Auch die 3'-Dephosphorylierung führt zu einer Änderung der Polarität, die chromatographisch abgetrennt werden kann (lila und gelbes Chromatogramm). Die beiden dephosphorylierten RNAs werden jeweils etwa eine Minute früher eluiert als die Derivate mit 3'-terminaler Phosphatgruppe. Das zweifach NPE-geschützte 14mer mit endständiger 3'-Hydroxygruppe (**12merA^{NPE}-A^{NPE}**) kann als einzelner breiter Peak isoliert werden. Der Einbau und die Dephosphorylierung konnten sowohl mittels RP-HPLC als auch *via* denat. PAGE und Massenspektrometrie untersucht und eindeutig identifiziert werden. Die einzelnen Produkte zeigen auch bei denaturierender PAGE unterschiedliches Migrationsverhalten (Abb. 41B). Diese Auftrennung wird allerdings schwieriger, je länger das zu modifizierende Oligonucleotid ist, da die Polaritätsunterschiede im Verhältnis zur Masse des Oligonucleotids kleiner werden und dadurch weniger Einfluss auf das Retentions- bzw. Migrationsverhalten haben.

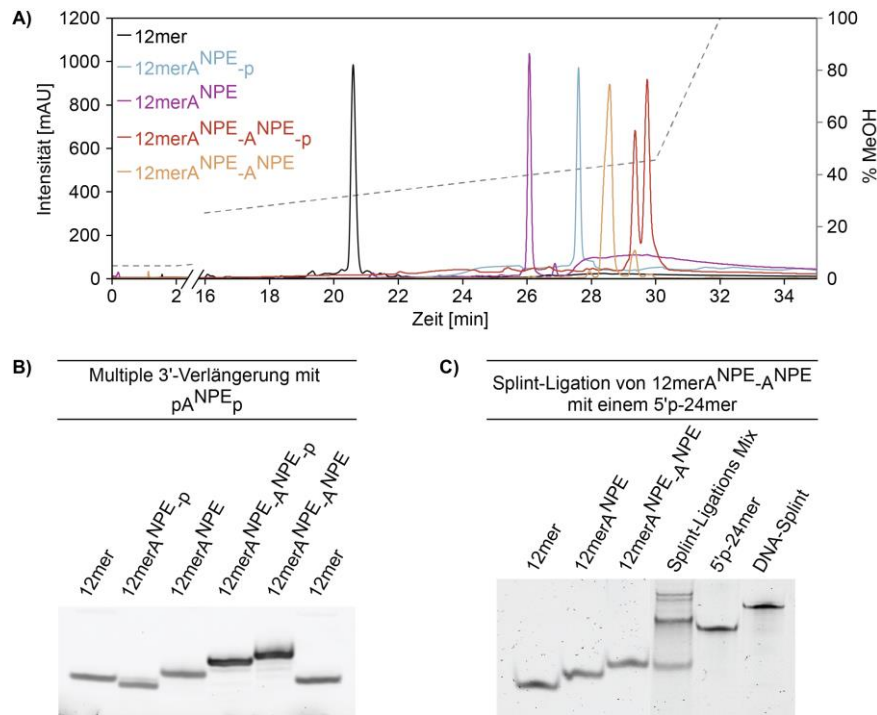


Abb. 41: Multipler Einbau von pA^{NPE} am 3'-Ende eines RNA-12mers. A) Überinandergelagerte RP-HPLC-Chromatogramme nach jedem enzymatischen Schritt. Die Trennbarkeit der einzelnen Spezies ist deutlich sichtbar (Detektion jeweils bei 254 nm; Elutionsbedingungen jeweils Säule 1, Gradient 1 bei 60 °C). B) 20% denat. PAGE der RP-HPLC-aufgereinigten RNA-Fragmente. C) 20% denat. PAGE der Fragmente sowie des Splint-Ligationsmix der zweifach-modifizierten RNA mit einem 5'p-24mer.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Einbau von NPE-modifizierten Adenosin-3',5'-Bisphosphaten in direkter Nachbarschaft möglich ist, sollte untersucht werden, ob eine Splint-Ligation mit zweifacher 3'-Modifikation ebenfalls umsetzbar ist. $12\text{merA}^{\text{NPE}}\text{-A}^{\text{NPE}}$ wurde mit einem 5'p-24mer (5'-p-r[GGC GGG AGU UGG GCU AGG GAG GAA]-3'; bezogen von *biomers.net GmbH*) in Gegenwart eines 38 Nucleobasen langen Vollängen-DNA-Splints (**38mer-DNA**; 5'-d[TTC CTC CCT AGC CCA ACT CCC GCC TT GGA TCA CTA TCC]-3') in einer Splint-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2 umgesetzt. Auch hier wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den zuvorigen Testligationen verwendet. Die Oligonukleotide wurden in einem Verhältnis von $12\text{merA}^{\text{NPE}}\text{-A}^{\text{NPE}}:5'\text{p-24mer}:38\text{mer-DNA}$ von 1:1:1 zueinander eingesetzt (jeweils 1 μM). Allerdings konnte nach 2 h Ligationszeit kaum Produkt *via* denat. PAGE nachgewiesen werden. Eine Verlängerung der Ligationszeit auf 6 h führte zu einer schwachen Produktbande (Abb. 41C). Während bei der Splint-Ligation mit einer einzelnen 3'-terminalen Modifikation nach 2 h Ligationszeit eine Ausbeute von 49% erreicht werden konnte, lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die zweifache Modifikation direkt an der Ligationsstelle zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Splint-Ligation führt. Vermutlich nimmt die Ligationsausbeute mit jeder weiteren endständigen Modifikation weiter ab. Prinzipiell ist der Einbau mehrerer Modifikationen in direkter Nachbarschaft zwar möglich, dennoch sollte je nach Syntheseziel abgewogen werden, in welchem Maßstab eine chemo-enzymatische Synthese in diesem Fall sinnvoll ist. Um die Ausbeute zu verbessern, können Optimierungen einzelner Parameter (Konzentration, Verhältnisse der Edukte zueinander, Ligationszeit, Zugabe von Detergenzien) vorgenommen werden. Da hier nur allgemein getestet werden sollte, ob benachbarte Modifikationen erzielt werden können, wurde auf zeitaufwendige Optimierungen verzichtet.

Parallel zu diesen Ergebnissen konnte Dr. Sara Keyhani-Goldau zeigen, dass eine 61 Nukleobasen lange RNA, die bereits mit Hilfe der chemo-enzymatischen Methode intern modifiziert wurde (61mer^{NPE}), ein zweites Mal mit **pC^{NPE}p** verlängert werden konnte. Eine zweite Splint-Ligation wurde in diesem Fall nicht durchgeführt.

3.1.3 Synthese eines DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates und erste Ligationstests

Der Einbau verschiedener photolabiler Schutzgruppen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima erlaubt eine wellenlängenselektive Abspaltung und damit sequentielle (Re-) Aktivierung eines Oligonukleotids. Um diese Möglichkeit zu schaffen, wurde ein DEACM-geschütztes Uridin-3',5'-Bisphosphat synthetisiert. Die DEACM-Schutzgruppe kann bathochrom-verschoben zu NPE-Schutzgruppen abgespalten werden. Somit kann zunächst eine selektive Entschützung des DEACM-geschützten Nukleotids und anschließend die Abspaltung einer NPE-Schutzgruppe erfolgen. Die Synthese eines DEACM-geschützten Uridin-Derivats ist auch dahingehend interessant, da die DEACM-Schutzgruppe unter den benötigten basischen Abspaltungsbedingungen nach einer chemischen Festphasensynthese, ähnlich wie eine NDBF-Schutzgruppe^[76,77] an Position *O*⁴ von Uridinen, zumindest teilweise hydrolysiert wird. Ein enzymatischer Einbau unter physiologischen Bedingungen eröffnet somit die Option Uridinbasen mit DEACM temporär zu modifizieren. Eine Übersicht über die einzelnen Syntheseschritte ist in Abb. 42 gegeben.

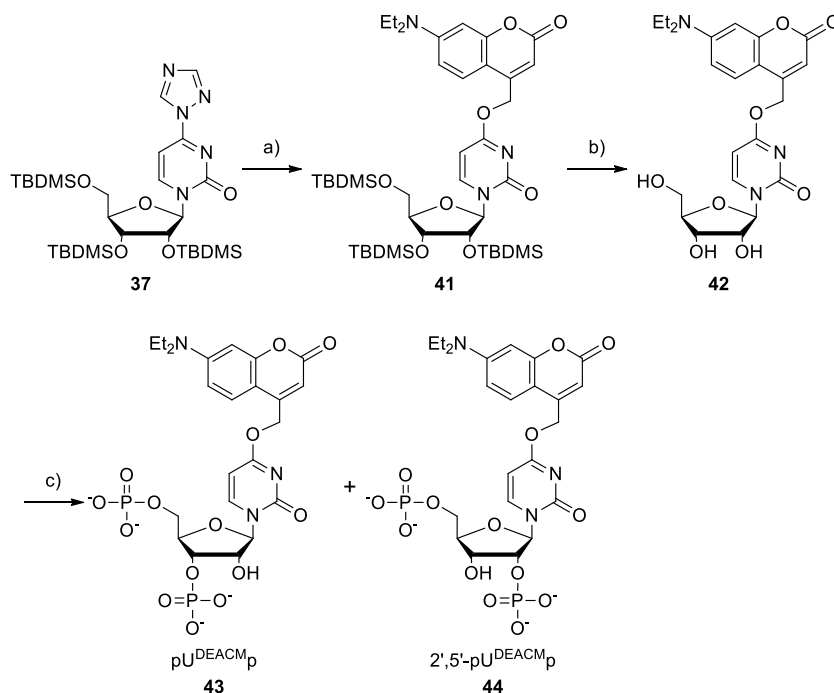


Abb. 42: Übersicht über die Synthese des DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates **pU^{DEACM}p**. a) DEACM-OH, DBU, MeCN, RT, 52%; b) TBAF, THF, RT, 87%; c) Diphosphorylchlorid, 1 M TEAB, -12 °C, Gemisch aus 2',5'- und 3',5'-pU^{DEACM}p.

Die Synthese fand analog zu den Synthesen der NPE-geschützten Bisphosphate ausgehend von Triazol-aktiviertem Uridin **37** statt. Die Einführung der photolabilen DEACM-Schutzgruppe erfolgte unter Lichtausschluss durch Umsetzung von **37** mit DEACM-OH (nach Literaturvorschrift^[390] hergestellt) und DBU mit 52%iger Ausbeute. Die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen des

DEACM-geschützten Uridin-Derivats **41** erfolgte mit TBAF. Verbindung **42** konnte mit 87% Ausbeute gewonnen werden. Im letzten Schritt wurde **42** mit Diphosphorylchlorid umgesetzt, um das gewünschte DEACM-geschützte Uridin-3',5'-Bisphosphat **43** zu erhalten. Bei dieser Reaktion wird auch das 2',5'-phosphorylierte Nebenprodukt **44** gebildet. Beim Neutralisieren der sauren Reaktionsmischung (pH-Wert 1,0) durch Zugabe von 1 M Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)-Puffer (pH-Wert 8,0) musste darauf geachtet werden, dass die Mischung gut gerührt wurde und der pH-Wert zwischenzeitlich nicht 8,5 überstieg, da es sonst zur teilweisen Hydrolyse der DEACM-Schutzgruppe kam. Das erhaltene Isomerengemisch wurde mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert. Hierbei konnte die Entstehung beider Derivate bestätigt werden.

Die Aufreinigung und Trennung des Isomerengemischs erwies sich als problematisch. Sowohl bei säulenchromatographischer Aufreinigung unter Umkehrphasen-Bedingungen mit entweder Acetonitril/Wasser oder Acetonitril/TEAB-Puffer als Eluenten spaltete sich die DEACM-Schutzgruppe zum Großteil ab. Zusätzlich musste darauf geachtet werden abgedunkelt zu arbeiten, da zu viel Umgebungslicht ebenfalls zur Abspaltung der DEACM-Gruppe führte. Auch eine Trennung der beiden Bisphosphat-Isomere konnte nicht erzielt werden. Das Rohprodukt wurde nach Neutralisation der Reaktionslösung in einem Vakuumkonzentrator eingengt und mehrmals mit RNase-freiem Wasser coevaporiert, um sämtliche Pufferreste zu entfernen. Da die T4 RNA Ligase 1 nur das 3',5'-phosphorylierte Isomer als Substrat^[118] erkennt, wurde eine Testligation durchgeführt. Hierzu wurde das zuvor für Testligationen verwendete RNA **12mer** am 3'-Ende mit dem synthetisierten **pU^{DEACM}p** verlängert. Die Ligationsreaktion wurde ebenfalls mit 25 μ M **12mer** und 100 μ M **pU^{DEACM}p** im 50 μ L-Maßstab durchgeführt. Die 3'-Verlängerung fand über Nacht bei 37 °C/300 rpm statt. Da sowohl die 3'-Extension mit über 95% als auch eine darauffolgende 3'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* quantitativ durchgeführt und massenspektrometrisch bestätigt werden konnten, wurde auf weitere Aufreinigungsversuche verzichtet und das dargestellte **pU^{DEACM}p** für weitere Untersuchungen verwendet (Abschnitt 3.2.2).

Die Analyse mittels RP-HPLC zeigte auch hier wieder, dass eine eindeutige Auftrennung aller RNA-Fragmente möglich ist. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass die Einführung des DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates am 3'-Ende des RNA **12mers** zu einer Verzögerung der Elution von nahezu 9 Minuten führte (im Vergleich dazu führte die Einführung von **pA^{NPE}p** zu einer Veränderung der Retentionszeit von etwa 6 min). Die 3'-Dephosphorylierung führte zu einer vergleichbaren Differenz von circa einer Minute. In Abb. 43 sind die RP-HPLC-Chromatogramme des unmodifizierten RNA **12mers**, der 3'-verlängerten RNA **12merU^{DEACM}-p** und der 3'-dephosphorylierten RNA **12merU^{DEACM}** übereinandergelegt.

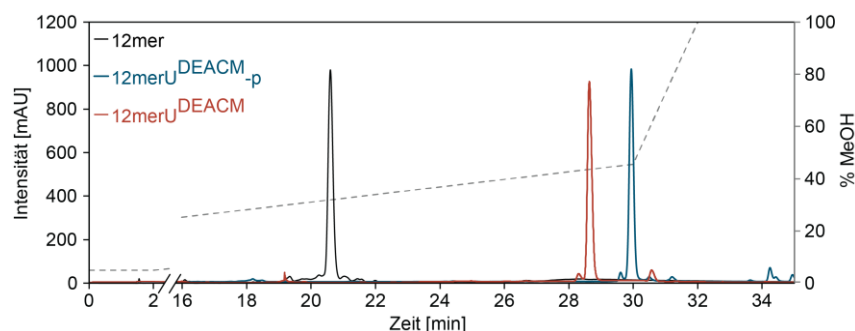


Abb. 43: RP-HPLC-Chromatogramme vor Ligation (**12mer**; schwarzes Chromatogramm), nach 3'-Verlängerung der unmodifizierten RNA mit **pU^{DEACM}p** via T4 RNA Ligase 1 (blaues Chromatogramm) und nach 3'-Dephosphorylierung (rotes Chromatogramm) (Detektion jeweils bei 254 nm; Elutionsbedingungen jeweils Säule 1, Gradient 1 bei 60 °C).

Die spektroskopischen Eigenschaften der Cumarin-Schutzgruppe können auch zur Aufreinigung bzw. zur Untersuchung der Ligationreaktion eingesetzt werden. Das bathochrom-verschobene Absorptionsmaximum kann beispielsweise während der HPLC-Aufreinigung selektiv detektiert und somit zur Unterscheidung von modifizierter und unmodifizierter RNA herangezogen werden. Zusätzlich weist die DEACM-Schutzgruppe im Gegensatz zur NPE-Schutzgruppe eine Fluoreszenz auf, die ebenfalls zur Analyse und Detektion genutzt werden kann. Darüber hinaus ist die DEACM-Schutzgruppe etwas größer als die NPE-Schutzgruppe, wodurch sie eine vergleichsweise größere sterische Beeinflussung hervorruft. Die positiven Ligationsergebnisse eröffnen die Möglichkeit weiterer Untersuchungen etwa mit Schutzgruppen, die erweiterte π -Systeme und daher ein noch weiter rotverschobenes Absorptionsspektrum aufweisen oder mit Fluorophoren. Der kritische enzymatische Reaktionsschritt ist hierbei die Splint-Ligation, da das Enzym weniger Toleranz gegenüber modifizierten Substraten aufweist und die Modifikation die Hybridisierung mit dem DNA-Splint behindern könnte, was wiederum die Ligationreaktion beeinträchtigt.

Für zukünftige Bisphosphat-Synthesen sollte eine alternative Syntheseroute in Betracht gezogen werden. Haas *et al.*^[391] publizierten im Jahr 2019 eine chemo-enzymatische Methode zur Synthese verschiedener mehrfach phosphorylierter Nucleotide (ppGpp, pppGpp, ...), die als *magic spot nucleotides* bezeichnet werden. Bei der von ihnen publizierten Methode findet die Phosphorylierung ebenfalls mit Diphosphorylchlorid statt. Nach Neutralisation mit 1 M Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)-Puffer findet eine regioselektive Hydrolyse mit RNase T2 statt, wodurch selektiv das 3',5'-phosphorylierte Nucleotid gebildet wird. Die Synthese wird für unmodifizierte Nucleotide im Gramm-Maßstab mit guten Ausbeuten (87% für pGp und 43% für pAp) beschrieben.^[391] Eine Übertragung dieser Methode auf modifizierte Nucleoside würde neben einem größeren Synthesemaßstab auch die Unterdrückung unerwünschter 2',5'-Nebenprodukte ermöglichen. Mit reinen 3',5'-phosphorylierten Nucleotiden könnten die Ligationausbeuten eventuell verbessert oder Ligationzeiten verringert werden.

3.1.4 Enzymatische Modifikation von DNA/RNA-Mixmeren

Vollständig unmodifizierte exogene RNA weist wenig Resistenz gegenüber Nucleasen auf. Um RNAs für biologisch relevante Anwendungen oder gar therapeutische Zwecke einsetzen zu können, wird auf verschiedene Modifikationsstrategien zurückgegriffen, die sich positiv auf die Stabilität synthetischer Oligonucleotide auswirken sollen (siehe Abschnitt 1.1).^[2,9,13] Aus diesem Grund wurden in Anlehnung an sogenannte Gapmere zwei DNA/RNA-Mixmere synthetisiert. Bei Gapmeren handelt es sich um kurze Antisense-Oligonucleotide aus DNA-Abschnitten, die durch 2'-O-Methyl-RNA, 2'-Fluoro-RNA oder LNA-Nucleotide flankiert werden und eine erhöhte Nucleasestabilität besitzen.^[2] Gapmere weisen üblicherweise ein Phosphorthioatrückgrat auf, weshalb zwei identische Sequenzen, einmal mit Phosphodiester- und einmal mit vollständig modifiziertem Thioatrückgrat, per chemischer Festphasensynthese hergestellt wurden. Mit Hilfe der beiden einfachen DNA/RNA-Sequenzen sollte untersucht werden, ob die chemo-enzymatische Einführung NPE-modifizierter Nucleosid-3',5'-Bisphosphate trotz unterschiedlicher Zucker-Bausteine innerhalb eines Oligonucleotids und Modifikation der Phosphateinheit möglich ist. Da aus vorangegangenen Publikationen bekannt war, dass die T4 RNA Ligase 1 eine Akzeptor-RNA erst ab einer Mindestlänge von drei Nucleotiden als Substrat akzeptiert, wurde darauf geachtet, dass das 3'-Ende der Sequenz aus drei RNA-Nucleotiden besteht.^[119–121] Außerdem stellte sich die Länge

des zuvor für Testligationen verwendeten **12mers** als vorteilhaft für analytische Zwecke heraus, weshalb auch hier auf 12 Nucleobasen lange Sequenzen gesetzt wurde.

Unter Berücksichtigung aller genannten Anforderungen wurden 12 Nucleobasen lange DNA/RNA-Mixmere, bestehend aus acht 5'-terminalen Desoxycytidinen und vier 3'-endständigen Cytidinen, synthetisiert (**DNA/RNA**; 5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC]-3'). Ein Mixmer wurde unter Standardbedingungen mit nativen Phosphodiesterbindungen synthetisiert (**DNA/RNA (Phos)**). Bei der Synthese des analogen Thioat-Mixmers (**DNA/RNA (Thio)**) wurde während der Festphasensynthese frisch angesetzte 0,02 M 5-Amino-1,2,4-dithiazol-3-thion (Xanthanhydrid, XHD)-Lösung in MeCN/Pyridin (9:1) zur Oxidation verwendet, um ein Phosphorthioatrückgrat zu erhalten. Nach den chemischen Festphasensynthesen, Abspaltung der Oligonukleotide und RP-HPLC-Aufreinigung (für Details siehe Abschnitt 4.2.1) fand eine enzymatische 3'-Verlängerung mit einem NPE-geschützten Cytidin-3',5'-Bisphosphat **pC^{NPE}p (30)** unter Verwendung von Rnl1 statt. Die Ligationsreaktionen wurden jeweils mit einer Oligonukleotidkonzentration von 30 μM im 100 μL -Maßstab durchgeführt. Das Verhältnis von **DNA/RNA:pC^{NPE}p** wurde auf 1:3 angepasst, da mit diesem Verhältnis bessere Ausbeuten erzielt werden konnten. Durch die Verknüpfung der 3'-Hydroxygruppe der Mixmere mit der 5'-Phosphatgruppe des **pC^{NPE}p** entsteht bei der Ligation unabhängig vom Rückgrat des Mixmers eine native Phosphodiesterbindung. Die Ligationsreaktionen wurden mittels RP-HPLC analysiert und aufgereinigt (Abb. 44). Besonders der Ligationsansatz des Phosphorthioat-Mixmers **DNA/RNA (Thio)** zeigte im HPLC-Chromatogramm verbreiterte und schlecht trennbare Peaks (Abb. 44B).

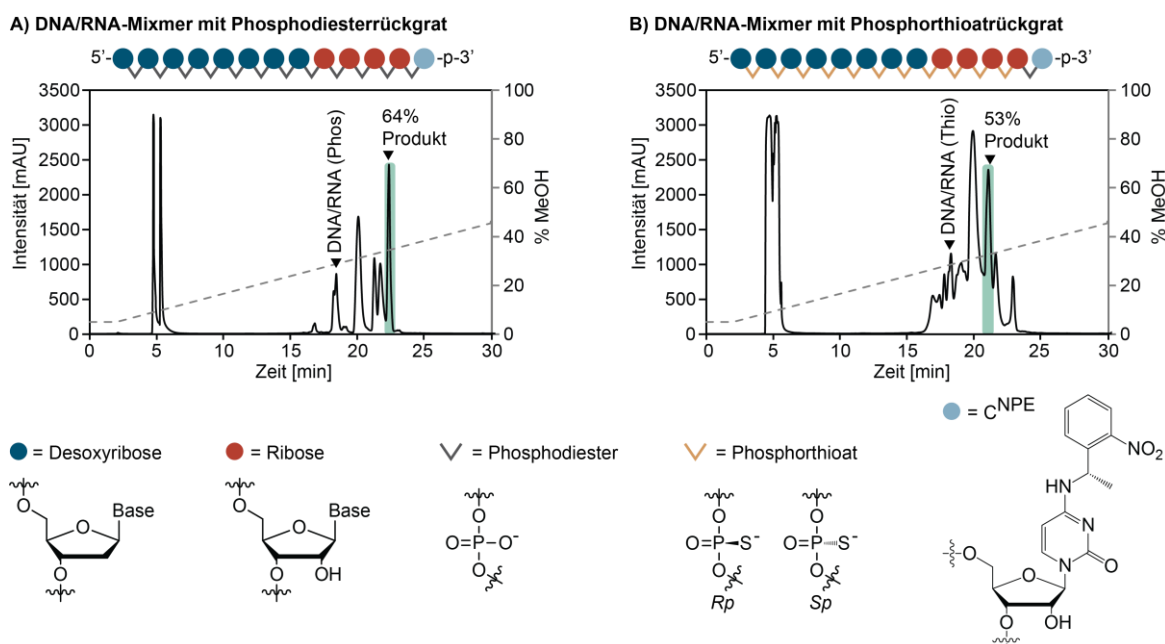


Abb. 44: Isolierung der Ligationsprodukte nach enzymatischer 3'-Verlängerung. A) RP-HPLC-Chromatogramm des Phosphodiester-DNA/RNA-Mixmers nach 3'-Verlängerung. B) RP-HPLC-Chromatogramm des Phosphorthioat-DNA/RNA-Mixmers nach 3'-Verlängerung. Edukt- und Produktpeaks sind jeweils markiert (Aufreinigungsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH als Eluenten bei 60 °C).

Bereits während der Aufreinigung der beiden Oligonukleotide nach der chemischen Festphasensynthese konnte eine Peakverbreiterung im Falle des thiolierten Mixmers im Vergleich zum Mixmer mit Phosphodiesterrückgrat beobachtet werden. Dies kann auf Diastereomere (*Rp* und *Sp*) zurückgeführt werden, die durch die Sulfurierung des Rückgrates entstehen. Die Aufreinigung

der Ligationsansätze fand mit 400 mM Hexafluorisopropanol (HFIP)-Puffer (pH 8,0) und Methanol statt (Säule 1, Gradient 1, Abschnitt 4.1 unter „*Reversed-Phase HPLC und Anionenaustauschchromatographie*“). Elutionen bei Raumtemperatur zeigten breite und stark überlagerte Peaks, was eine Isolierung des Ligationsproduktes mit Thioatrückgrat unter diesen Bedingungen nicht zuließ. Der verwendete HFIP-Puffer beinhaltet einen geringen Anteil an Triethylamin (Et_3N , 16,3 mM), welches in Form von Triethylammonium-Kationen mit den negativ geladenen Phosphateinheiten des Oligonukleotids wechselwirkt. Durch den Einsatz eines Triethylammoniumacetat (TEAA)- oder Trimethylammoniumacetat (TMAA)-Puffers könnte eine bessere Interaktion der Ionenpaarungsreagenzien mit dem Oligonukleotid und daraus resultierend eine optimierte Auftrennung der Peaks ermöglicht werden.^[392,393] Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit sämtlichen Analysen dieses Projekts wurde dennoch mit HFIP/MeOH als Elutionsgemisch gearbeitet. Eine Verbesserung der Peakauftrennung konnte durch Elution bei 60 °C erzielt werden. In beiden Fällen konnten die Produktpeaks isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Ligationsausbeuten lagen für **DNA/RNA-C^{NPE}-p (Phos)** bei 64%, die Ausbeute für **DNA/RNA-C^{NPE}-p (Thio)** bei 53%.

Die anschließende Dephosphorylierung verlief für beide chimären Fragmente quantitativ und konnte ebenfalls massenspektrometrisch bestätigt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Enzyme RNA Ligase 1 und auch *Shrimp Alkaline Phosphatase* die Kombination sowohl aus Rückgratmodifikationen als auch die NPE-Modifikation auf Watson-Crick-Franklin-Seite tolerieren. Der letzte enzymatische Schritt stellt somit die entscheidende Hürde dar. Splint-Ligationen sind dafür bekannt, stark sequenzabhängig zu sein. Auch die verwendete RNA Ligase 2 ist selektiver gegenüber akzeptierter Substrate.^[112,139] Für die anschließende Splint-Ligation mit Rnl2 wurde eine 5'-phosphorylierte Donor-RNA (**5'p-RNA2**; 5'-p-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA]-3') mit nativem Phosphodiesterückgrat per Festphasensynthese hergestellt. Die RP-HPLC-aufgereinigten 3'-dephosphorylierten Fragmente **DNA/RNA-C^{NPE} (Phos)** und **DNA/RNA-C^{NPE} (Thio)** wurden jeweils in Anwesenheit von **5'p-RNA2** und des DNA-Splints im RNA Ligase 2 Ligationspuffer für 2 min auf 80 °C erhitzt und innerhalb von etwa 5 min auf 37 °C abgekühlt (Verhältnis Mixmer:5'p-RNA: Splint = 1:1:1, jeweils 8 μM). Bei diesem Annealingschritt sollte eine gute Hybridisierung der RNA-Fragmente mit dem DNA-Splint ermöglicht werden, um die Ligationsstelle möglichst gut zu koordinieren. Nach 3 h Ligation bei 37 °C und Abbau des DNA-Splints mit *TURBOTM DNase* wurden die Ligationsansätze mittels denat. PAGE untersucht (Abb. 45).

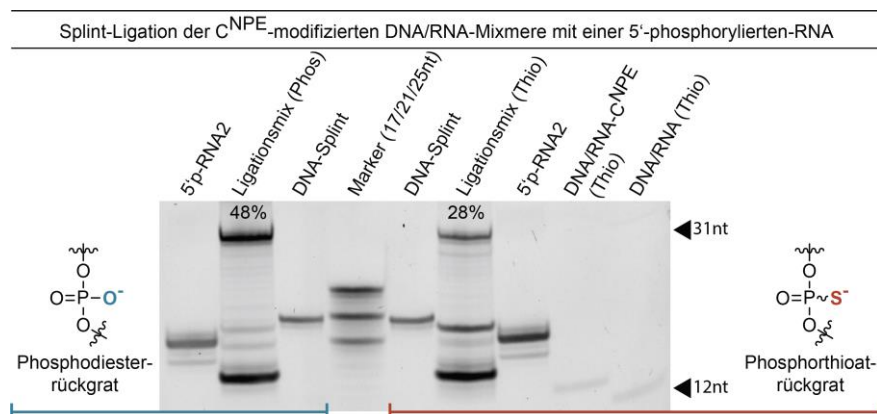


Abb. 45: Chemo-enzymatischer Einbau von **pC^{NPE}p** in DNA/RNA-Mixmere mit Phosphodiesterückgrat (linke Seite) und Phosphorthioatrückgrat (rechte Seite) im Vergleich. 20% denat. PAGE der Edukte und der Ligationsansätze. Die Ausbeuten wurden durch Vergleich der Bandenintensitäten mit *Image Lab*^[388] ermittelt.

Die Ligationsausbeute unterscheidet sich sichtbar. Im Falle des Mixmers mit Phosphodiesterückgrat konnten immerhin 48% Ligationsprodukt erreicht werden, wohingegen bei der Splint-Ligation mit thioliertem Mixmer nur 28% des verknüpften Produktes erzielt werden konnten. Da alle Parameter konstant gehalten wurden und sich lediglich die Phosphateinheiten der beiden modifizierten DNA/RNA-Fragmente unterschieden, ist der Unterschied der Ausbeuten auf die Thioat-Modifikation zurückzuführen. Es wurde versucht die Splint-Ligation bei niedrigerer Temperatur (25 °C statt 37 °C) durchzuführen um die Hybridisierungseffekte der Fragmente mit dem passenden DNA-Splint zu verstärken. Diese Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse.

Im Gegensatz zur chemischen Synthese von Phosphorthioaten, bei der Diastereomere gebildet werden, entsteht bei der enzymatischen Synthese bevorzugt die *Rp*-konfigurierte Internukleosidbindung. Beim Einbau von Phosphorthioaten in RNA mittels Desoxyribozymen (DNAzymen) oder Polymerasen wird beispielsweise davon berichtet, dass *Sp*-konfigurierte Nukleosid- α -thiotriphosphate (*Sp*-GTP⁵) vom Enzym unter Inversion umgesetzt werden, wodurch dann die *Rp*-Konfiguration im Rückgrat entsteht.^[22,96,394,395] Bisher gibt es wenige Untersuchungen dazu, wie stark sich der Einfluss der Thioat-Diastereomere chemisch synthetisierter Oligonukleotide auf Ligationsreaktionen auswirkt. Es wird allerdings von reduzierten Ligaseaktivitäten berichtet.^[396] Ob die verminderten Ausbeuten der Ligationsreaktionen mit **DNA/RNA (Thio)** durch Diastereomere herbeigeführt werden oder auch bei isomerenreinen Oligonukleotiden in diesem Maße auftreten, stand nicht im Fokus dieser Arbeit und wurde daher an dieser Stelle nicht untersucht. Die Möglichkeit sollte bei weiteren Ligationsreaktionen chemisch synthetisierter Phosphorthioat-RNA in Betracht gezogen werden. Zusätzlich sollte der Einfluss unterschiedlicher Zuckerkonformationen nicht außer Acht gelassen werden. Es ist bereits bekannt, dass die Konformation der Ribose durch 2'-Substitution beeinflusst wird. Unsubstituierte Desoxyribosen (2'-H) liegen in C2'-endo-Konformation vor. Im Gegensatz dazu treten die Ribosen (2'-OH) der RNA in C3'-endo-Konformation auf. RNA Ligase 2 benötigt zur Interaktion mit der Nukleinsäure eine terminale C3'-endo-Konformation.^[133] Diese sollte durch das gezielte Design der Mixmer-Sequenz (vier native Nukleoside plus ein zusätzliches, NPE-modifiziertes Nukleosid am 3'-Ende der Akzeptor-RNA) zwar vorliegen. Ein Einfluss der 5'-ständigen DNA-Bausteine ist hier aber nicht auszuschließen.

Insgesamt konnte bei diesen Versuchen mit chimären Oligonukleotiden gezeigt werden, dass sich die chemo-enzymatische Synthesemethode nicht nur zur Modifikation nativer RNA eignet. Die Aussicht diese Methode zur Synthese von Mixmeren und Phosphorthioat-modifizierten Oligonukleotiden einzusetzen, erweitert potentielle Anwendungsgebiete enorm und sollte daher weiter untersucht werden.

3.1.5 Enzymatische Modifikation von 2'-O-Methyl-RNA

Neben Phosphorthioaten und der Kombination verschiedener Zucker-Bausteine im Zucker-Phosphatrückgrat zählen Modifikationen der 2'-O-Position zu den häufigsten Anpassungen zur Stabilisierung von RNA gegenüber Nukleasen. Besonders beliebt ist die Verwendung von 2'-O-Methyl-RNA, auch als Methoxy-RNA bezeichnet (2'OMe).^[5,14,16] Im vorangegangenen Kapitel konnte erfolgreich gezeigt werden, dass DNA/RNA-Mixmere und Phosphorthioat-Modifikationen von allen verwendeten Enzymen akzeptiert werden und eine chemo-enzymatische Einführung eines photolabil-geschützten Nukleosids möglich ist. Daraufhin wurde versucht die Methode auf 2'OMe-

RNA zu übertragen. Hierzu wurde die enzymatische 3'-Verlängerung einer 25 Nucleobasen langen vollständig 2'-O-Methyl-substituierten RNA (**2'OMe-25mer**; 5'-OH-2'OMe-r[AGC UUG AGA UAA GUC CGA CGA UCC U]-3', hergestellt von Janik Kaufmann, AK Heckel) untersucht. Auch in diesem Fall wurde das NPE-modifizierte Bisphosphat **pC^{NPE}p** verwendet. Nach 3 h Ligationszeit wurde der 50 μ L große Ligationsansatz (50 μ M **2'OMe-25mer**, 150 μ M **pC^{NPE}p**) mittels 20% denat. PAGE und RP-HPLC analysiert (Abb. 46).

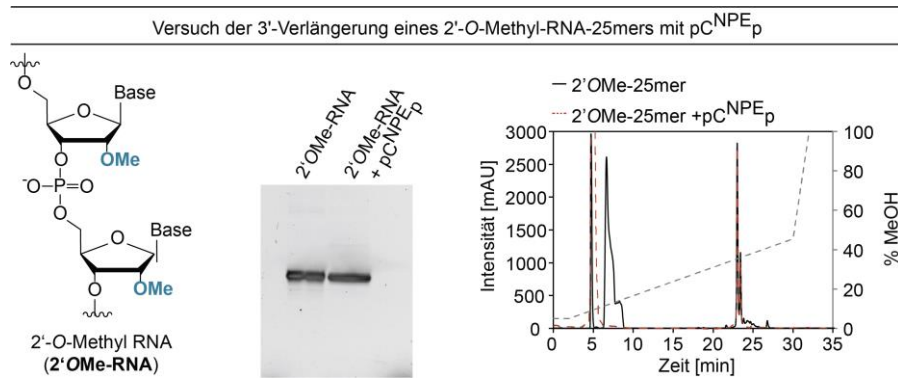


Abb. 46: Chemo-enzymatische 3'-Verlängerung einer 2'OMe-RNA. Gezeigt ist eine strukturelle Darstellung des Zucker-Phosphatrückgrates von Methoxy-RNA sowie das aufgenommene Gelfoto nach denat. Gelelektrophorese und übereinandergelegte RP-HPLC-Chromatogramme der Edukt-RNA (schwarze durchgezogene Linie) und des Ligationsansatzes (rote gestrichelte Linie) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). Beide Analysen zeigten keine Verlängerung des Start-Oligonucleotids.

In Abb. 46 sind die Ergebnisse der Analysen zusammengefasst. Es konnte weder per denat. PAGE noch per RP-HPLC eine Umsetzung des Produktes nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Peaks im Bereich von 5-10 min im RP-HPLC-Chromatogramm sind auf im Ligationsansatz enthaltenes ATP zurückzuführen. Auch die massenspektrometrische Analyse der isolierten HPLC-Peaks bestätigten diese Ergebnisse. Es konnte lediglich das nicht-verlängerte Start-Oligonucleotid **2'OMe-25mer** nachgewiesen werden.

Wie bereits in den Abschnitten 1.1.2 und 3.1.4 angesprochen, wird durch 2'-O-Modifikation die Konformation der Ribose beeinflusst, was sich wiederum auf die Aktivität von Enzymen auswirkt. Da allerdings sowohl 2'-OH- als auch 2'OMe-Ribosen in C3'-endo-Konformation vorliegen, spielen im Zusammenhang mit Ligationsreaktionen eher elektronen-donierende oder sterische Effekte eine Rolle. Umfangreiche Untersuchungen der Interaktion zwischen T4 RNA Ligase 1 und 2'OMe-RNA beispielsweise mittels Kristallstrukturanalysen gibt es bisher nicht. Untersuchungen zu Ligationsreaktionen von 2'OMe-RNA mit Rnl1 sind selten, berichten aber über herabgesetzte Ligaseaktivitäten und geringere Ausbeuten im Vergleich zu Ligationen mit 2'-OH-RNA.^[397] Falls eine 3'-Verlängerung durch Ligation und eine anschließende Dephosphorylierung mit rSAP erzielt werden kann, sollte auch eine Splint-Ligation mit T4 RNA Ligase 2 möglich sein. In Arbeiten von Nandakumar *et al.*^[133] wird die Umsetzung von 2'-OH-RNA im Vergleich mit 2'-OMe-RNA als vergleichbar bezeichnet (2'-OH = 2'-OMe > 2'-F > 2'-NH₂ für den Umsatz mit Rnl2). Eventuell wirkt sich die Koordination der Ligationsstelle durch Hybridisierung mit einem DNA-Splint bei Ligationen mit Rnl2 positiv auf die Verknüpfung der Fragmente aus. Alternativ sollte bei zukünftigen Versuchen über den Einsatz von alternativen Ligasen, beispielsweise T4 DNA Ligase, nachgedacht werden.

Die chemo-enzymatische Modifizierung von 2'OMe-RNA wurde lediglich an einer Testsequenz untersucht. Da Ligationsreaktionen stark sequenzabhängig sind, sollten weitere Untersuchungen

unter verschiedenen Bedingungen erfolgen, um auszuschließen, dass es sich hier nicht um einen Einzelfall handelt. Es sollte nicht pauschal davon ausgegangen werden, dass eine Anwendung der chemo-enzymatischen Methode auf 2'OMe-RNA unmöglich ist.

3.1.6 Zusammenfassung der Erkenntnisse

Neben der chemischen Festphasensynthese bieten enzymatische Methoden vielfältige alternative Optionen zur Synthese modifizierter Oligonukleotide. Zunächst konnte in kollaborativen Arbeiten ein Set lichtadressierbarer Nukleosid-3',5'-Bisphosphate (**pA^{NPE}p**, **pC^{NPE}p**, **pG^{NPE}p**, **pU^{NPE}p**, **p(pAzo)p** und **p(mAzo)p**) synthetisiert und erfolgreich chemo-enzymatisch in eine Testsequenz eingebaut werden. Bei der entwickelten Methode werden drei enzymatische Schritte durchlaufen: eine 3'-Verlängerung mit *T4* RNA Ligase 1, eine 3'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* und eine Splint-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2. Alle Enzyme akzeptierten dabei die modifizierten Bisphosphate mit guten bis sehr guten Ausbeuten. Besonders Rnl1 und rSAP zeigten eine hohe Toleranz gegenüber der lichtadressierbaren Nukleosid-3',5'-Bisphosphate und einen guten Umsatz dieser. Im Vergleich dazu erwies sich die Splint-Ligation mit Rnl2 als sehr sequenzabhängig. Die Ausbeuten variierten vom einstelligen Prozentbereich bis hin zu moderaten 50%. Zur Verbesserung dieser Ausbeuten sollten weitere Ligationsbedingungen untersucht werden. Mit der Synthese und NMR-spektroskopischen Untersuchung der NPE-geschützten Aptamerdomäne des 2'dGsw konnte Dr. Sara Keyhani-Goldau eine erste relevante Anwendungsmöglichkeit der Methode aufzeigen.

Aufbauend darauf konnte das Potential der entwickelten Methode in weiteren Untersuchungen dargestellt werden. Der mehrfache Einbau eines NPE-modifizierten Adenosin-3',5'-Bisphosphates in direkter Nachbarschaft wurde gezeigt. Während die zweite 3'-Verlängerung mit Rnl1 mit 85% gute Ergebnisse zeigte, wurde die Ausbeute der Splint-Ligation mit zwei 3'-terminalen NPE-Modifikationen stark herabgesetzt. Da literaturbekannt ist, dass die letzten drei Nukleotide^[121] einen Einfluss auf die Ligationseffizienz haben, ist davon auszugehen, dass jede weitere benachbarte 3'-Modifikation die Splint-Ligation erschwert. Zusätzlich wurde versucht RNAs mit therapeutisch interessanten Modifikationen, wie 2'OMe oder Phosphorthioaten chemo-enzymatisch zu modifizieren. Auch wenn die enzymatische 3'-Verlängerung von 2'OMe-RNA bisher nicht erreicht werden konnte, werden Oligonukleotide mit Rückgratmodifikationen zur Stabilisierung gegen Nukleasen durch DNA/RNA-Mixmere zugänglich. Die verwendeten Enzyme akzeptierten neben der NPE-Modifikation an Watson-Crick-Franklin-Basenpaarseite auch unterschiedliche Ribosebausteine sowie Phosphorthioat-Modifikationen im Rückgrat. Auffällig bei der Untersuchung der DNA/RNA-Mixmere waren die abweichenden Ausbeuten der einzelnen enzymatischen Reaktionsschritte. Die Modifikation des DNA/RNA-Mixmers mit Phosphorthioatrückgrat zeigte bei den Ligationsreaktionen geringere Ausbeuten als die Modifikation des Mixmers mit nativen Phosphodiesterückgrat (64% vs. 53% für die 3'-Verlängerung und 48% vs. 28% für die Splint-Ligation). Durch die Einführung der Phosphorthioate entstehen zusätzliche Diastereomere, was eventuell nicht von den verwendeten Enzymen toleriert wird.^[22,96] Es bleibt zu klären, ob die Ligationsreaktionen effizienter ablaufen, wenn ein diastereomerenreines Phosphorthioatrückgrat vorliegt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch festgestellt, dass eine Reduzierung des Anteils an Nukleosid-3',5'-Bisphosphat auf ein Verhältnis von 1:3 (RNA:pNp) zu höheren Ligationsausbeuten bei kürzeren Reaktionszeiten führt. Zusätzlich sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, inwieweit eine Modifikation von

2'OMe-RNA durch Optimierung der Reaktionsbedingungen oder Anpassen der Sequenz erreicht werden kann. Darüber hinaus könnten durch die Darstellung und Umsetzung 2'-photolabil-geschützter oder LNA-basierter Nukleosid-3',5'-Bisphosphate weitere interessante Aspekte in Zusammenhang von Struktur, Stabilität und Funktion von RNAs untersucht werden.

Zusätzlich konnte das Set lichtadressierbarer 3',5'-Bisphosphate um ein DEACM-geschütztes Uridin-Derivat $\text{pU}^{\text{DEACM}}\text{p}$ erweitert werden. Die Synthese verlief mit guten Ausbeuten, wohingegen Aufreinigungsversuche der finalen Verbindung mit der hydrolytischen Abspaltung der DEACM-Schutzgruppe konkurrierten. An dieser Stelle wurde die Selektivität der RNA Ligase ausgenutzt, die nur das 3',5'-phosphorylierte Bisphosphat als Substrat akzeptiert. In Testreaktionen konnte das synthetisierte DEACM-geschützte Uridin-Derivat mit sehr guten Ausbeuten ligiert werden. Da die DEACM-Schutzgruppe auf Uridinbasen während der ammoniakalischen Abspaltung nach chemischer Festphasensynthese zumindest teilweise hydrolysiert wird, bietet das chemo-enzymatische Syntheseverfahren somit Zugang zu positionsspezifischen Modifikationen dieser Art. Hierdurch wird die Synthese einer bathochrom-verschoben aktivierbaren ($> 400 \text{ nm}$) oder in Kombination mit eingebauten NPE-Schutzgruppen einer wellenlängenselektiv adressierbaren RNA ermöglicht. Mit der Synthese weiterer photolabil-modifizierter Nukleosid-3',5'-Bisphosphate könnten weitere Bereiche des UV/vis-Spektrums abgedeckt werden. Grünlicht-aktivierbare Bisphosphate könnten beispielsweise in Pflanzen oder rotlicht-aktivierbare Bisphosphate in biologischem Gewebe angewendet werden. Mit solchen Bisphosphaten werden außerdem RNAs zugänglich, die mehrfach wellenlängenselektiv angesprochen werden können.

Die vielversprechenden Ergebnisse der präsentierten Arbeiten dienen als Grundlage weiterer Untersuchungen.

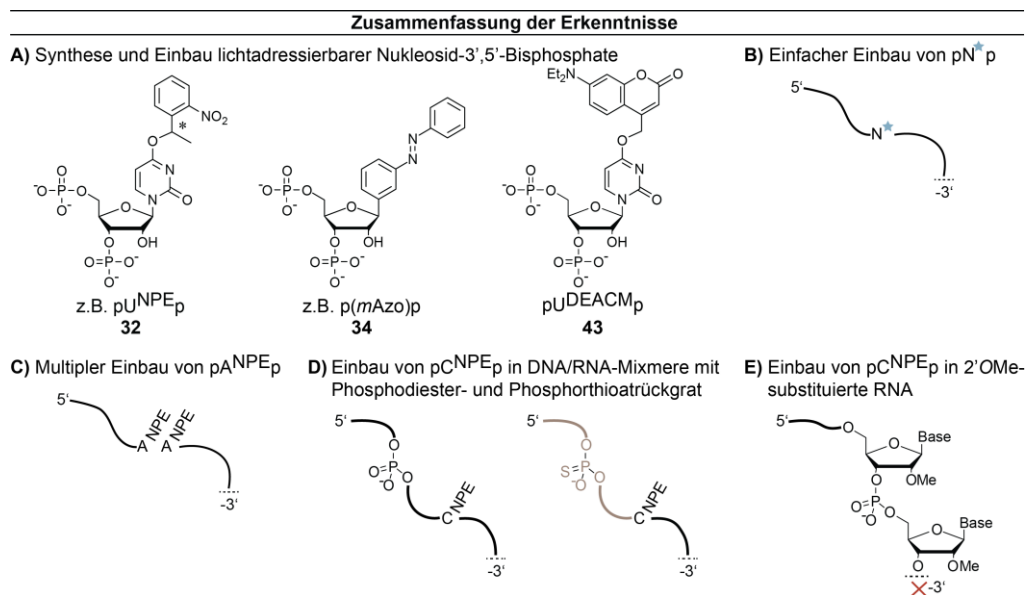


Abb. 47: Zusammenfassung der Erkenntnisse und Übersicht über Möglichkeiten zur Einführung lichtadressierbarer Modifikationen in RNA mittels der vorgestellten chemo-enzymatischen Synthesemethode.

3.2 Festphasen-basierte chemo-enzymatische RNA-Synthese

Das umfangreichste Projekt dieser Doktorarbeit baut auf den Arbeiten des ersten Teilprojektes auf und nutzt die gewonnenen Erkenntnisse zur Weiterentwicklung der chemo-enzymatischen RNA-Synthese. Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden eigenständig erarbeitet und zusammen mit Teilergebnissen aus dem vorherigen Abschnitt in einer weiteren Publikation (Blümmler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*^[386]) zusammengefasst.

Basierend auf den zuvor erarbeiteten Ergebnissen wurde in diesem Teilprojekt weiterhin versucht, Anwendungsgebiete und auch Grenzen der chemo-enzymatischen RNA-Synthese zu erfassen. Im Fokus standen dabei Untersuchungen zur Einsatzfähigkeit der Methode in einem Festphasen-basierten Prozess angelehnt an die chemische Festphasensynthese. Der große Vorteil der chemischen Festphasensynthese ist ihre Automatisierbarkeit, die durch Bindung des synthetisierten Oligonukleotids an Festphasenmaterial ermöglicht wird. Dadurch können Reagenzien im Überschuss eingesetzt, Waschschriffe durchgeführt und mehrere Reaktionszyklen durchlaufen werden. Dieses Prinzip sollte auf die chemo-enzymatische RNA-Synthese übertragen und ein Verfahren entwickelt werden, welches die Handhabung erleichtert, einfache Wasch- und Aufreinigungsschritte ermöglicht und eine Wiederholung der enzymatischen Schritte erlaubt. Ziel war es, die Methode so weiterzuentwickeln, dass ein multipler Einbau lichtadressierbarer 3',5'-Bisphosphate an definierten Positionen erlangt werden kann und längere RNAs jenseits der Möglichkeiten der chemischen Festphasensynthese zugänglich werden.

3.2.1 Synthese 5'-terminal biotinylierter RNA zur Interaktion mit Streptavidin Beads

Als feste Phase wurden magnetische Streptavidin Beads gewählt (siehe Kapitel 1.1.3). Diese superparamagnetischen Nanopartikel sind mit dem Protein Streptavidin verbunden, welches eine nicht-kovalente Bindung mit Biotin erlaubt. Die Biotin/Streptavidin-Interaktion ist hochselektiv, mit einer K_D von 10^{-15} M sehr stark und gegenüber vieler Bedingungen stabil.^[160,161] Die Beads können mit Hilfe eines Magneten innerhalb weniger Sekunden einfach an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert werden (Abb. 48).

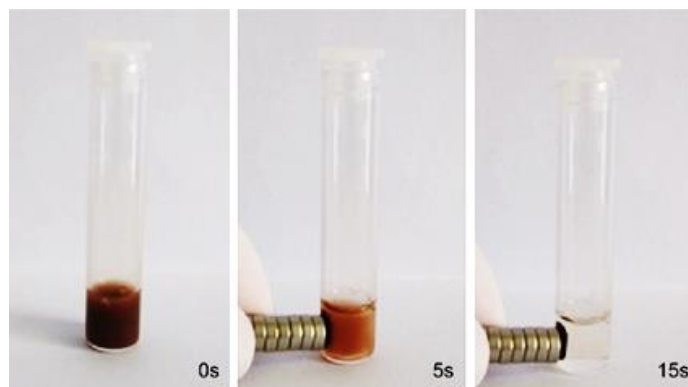


Abb. 48: Fixieren der Beads mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes. 0 s: Suspension der magnetischen Streptavidin Beads in wässriger Pufferlösung ohne Einfluss des Magneten. 5 s: Bereits nach 5 s akkumulieren die Beads durch die Anziehungskraft des Magneten an der Gefäßwand. 15 s: Vollständig an der Gefäßwand fixierte Beads und klarer Überstand.

Oligonukleotide, die mit einer Biotineinheit verbunden sind, können mit Hilfe magnetischer Streptavidin Beads fixiert werden.^[162,391,392] Der Vorgang des Fixierens und Resuspendierens konnte mehrfach wiederholt werden, was eine gute Grundlage zur Durchführung mehrerer aufeinanderfolgender enzymatischer Reaktionen darstellt. An dieser Stelle bieten sich vereinfachte Waschschritte zwischen den einzelnen Reaktionen und ein Pufferaustausch unter Zuhilfenahme der magnetischen Beads an (Abb. 49). Nach jeder Reaktion werden die Beads mit gebundener RNA mit einem Magnet an der Gefäßwand fixiert und der Überstand aus Puffer und überschüssigen/nicht umgesetzten Edukten entfernt. Es folgt ein Waschschritt und das Resuspendieren der Beads in neuem Puffer. Nach Zugabe der weiteren benötigten Reaktionspartner und Cofaktoren sowie des gewünschten Enzyms erfolgt die Inkubation im Thermoschüttler. Um den nächsten Reaktionsschritt durchzuführen, werden die Beads erneut fixiert und das Vorgehen solange wiederholt, bis die gewünschte Gesamtsequenz erreicht ist.

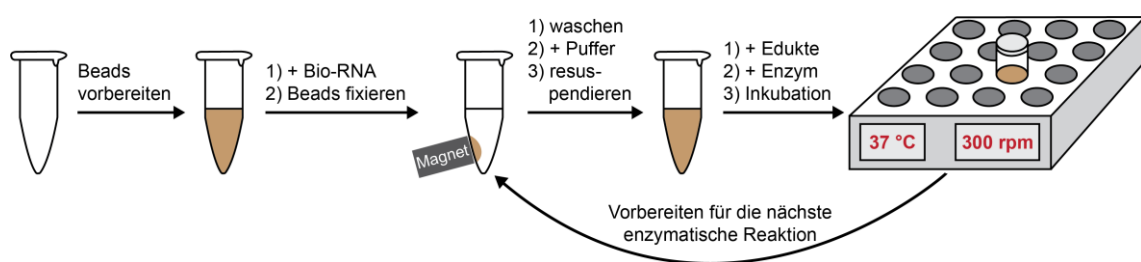


Abb. 49: Schematische Darstellung des Arbeitsflusses der Festphasen-basierten chemo-enzymatischen RNA-Synthese.

Da die RNA-Synthese bei der entwickelten chemo-enzymatischen Methode von 5' → 3'-Richtung abläuft, muss die Biotineinheit zur Interaktion mit Streptavidin mit dem 5'-Ende des ersten RNA-Fragments verbunden werden. Ist das erste RNA-Fragment über eine 5'-terminale Biotineinheit mit den Streptavidin Beads gebunden, können die enzymatischen Reaktionsschritte durchgeführt werden. Zur Biotinylierung des ersten RNA-Fragmentes gibt es, wie bereits in Abschnitt 1.1.3 angesprochen, verschiedene Strategien.

Die Einführung eines kovalent-verknüpften Biotins ebenso wie die Synthese einer analogen RNA-Sequenz mit photolabilem Linker zwischen RNA und Biotin erfolgte mittels chemischer Festphasensynthese. Unter Verwendung des entsprechenden Phosphoramidits **45** konnte die Synthese einer 10 Nukleobasen langen RNA (**Bio-RNA1**, 5'-Bio-r[GGC UAC GUA G]-3', Abb. 50A) und einer 34 Nukleobasen langen RNA (**Bio-34mer**, 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC U]-3') mit dauerhaft biotinyliertem 5'-Ende unter UltraMILD-Bedingungen mit guten Ausbeuten durchgeführt werden. Zur Synthese der RNA mit photolabiler Biotineinheit wurde zunächst Phosphoramidit **46** verwendet. Die Kupplung des Sonderamidits verlief allerdings trotz verlängerter Kupplungszeit (15 min statt 12 min) mit sehr schlechter Ausbeute, sodass auf eine alternative Synthesestrategie mit einem zusätzlichen Kupplungsschritt zurückgegriffen wurde. Hierbei wurde erst ein photolabiler NPP-Linker **47** mit dem 5'-Ende der 10 Nukleobasen langen **RNA1** verknüpft, bevor im nächsten Kupplungsschritt die Biotineinheit **48** angehängen wurde. Es wurde bewusst ein biotinyliertes Phosphoramidit mit Triethylglykol (TEG)-Linker gewählt, um durch mehr Abstand und Flexibilität sterische Hinderung zu reduzieren. Mit dieser Strategie konnte die gewünschte photolabil biotinylierte RNA erfolgreich synthetisiert werden (**Bio-PC-RNA1**, 5'-Bio-PC-r[GGC UAC GUA G]-3', Abb. 50B).

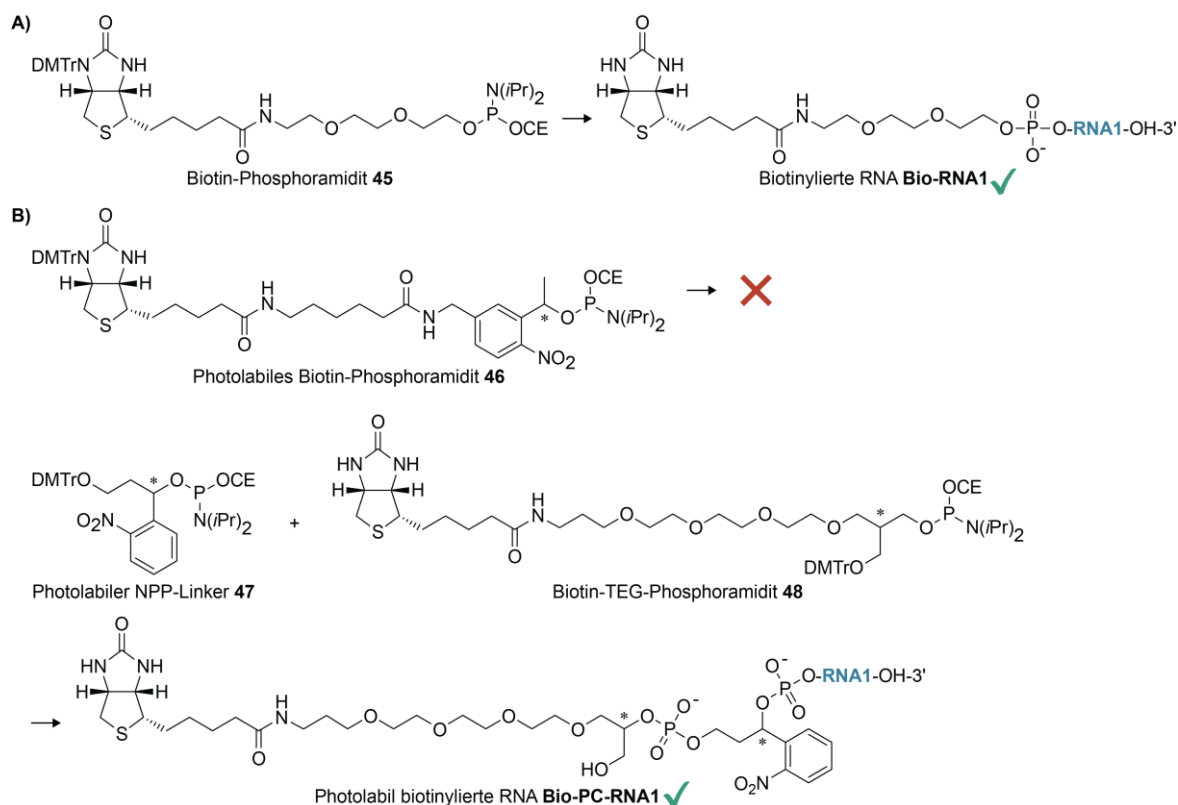


Abb. 50: Zur Synthese biotinylierter RNA-Fragmente verwendete Phosphoramidite. A) Biotin-Phosphoramidit zur Synthese einer dauerhaft biotinylierten RNA. B) Verwendete Sonderamidite zur Synthese der photolabil biotinylierten RNA **Bio-PC-RNA1**.

Ein weiteres 34 Nucleobasen langes RNA-Fragment mit photolabiler Biotineinheit konnte durch postsynthetisches NHS-Labeling dargestellt werden. NHS-Ester werden üblicherweise zur Einführung von Fluorophoren, Quenchern oder anderen funktionalen Gruppen eingesetzt. Labeling-Reaktionen erfolgen durch Umsetzung des NHS-Esters mit einer Aminogruppe unter basischen Bedingungen. Aus diesem Grund wurde eine 5'-terminale Aminogruppe mittels chemischer Festphasensynthese eingeführt, die nach Isolierung des Oligonukleotids mit PC-Biotin-NHS-Ester **49** (Abb. 51) umgesetzt wurde.

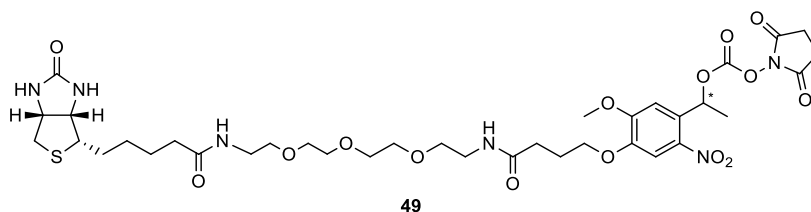


Abb. 51: Photolabiler Biotin-NHS-Ester zum postsynthetischen RNA-Labeling.

Hierzu wurde das Oligonukleotid in Borax-Puffer (pH 8,4) gelöst und für 4 min auf 80 °C erhitzt. NHS-Ester **49** wurde in DMF gelöst (14 mM-Lösung) und im 20x Überschuss zu der gelösten RNA hinzugegeben. NHS-Labeling-Reaktionen sind stark pH-abhängig. Ist die Reaktionslösung zu sauer, liegt die Aminogruppe in der protonierten Form vor, wodurch eine Umsetzung mit dem Ester verhindert wird. Allerdings ist sowohl die unmodifizierte RNA als auch der NHS-Ester im Basischen hydrolyseempfindlich, weshalb die Reaktionslösung nur für 2 h bei 37 °C inkubiert wurde. Die Ausbeute von **Bio-PC-34mer** (5'-Bio-PC-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC

U]-3') lag nach RP-HPLC-Aufreinigung bei 23%. Höhere Ausbeuten können eventuell durch Erhöhung der Reaktionstemperatur, Verlängerung der Reaktionszeit oder einen größeren Überschuss an NHS-Ester erreicht werden. Allerdings ist dadurch auch mit verstärktem RNA-Abbau zu rechnen.

Um eine alternative Abspaltungsmöglichkeit unter milden Bedingungen untersuchen zu können, sollten zwei Initiatornukleoside synthetisiert werden, welche eine fluoridlabile Verbindung zu einem Biotin-Rest aufweisen und enzymatisch durch Transkription am 5'-Ende einer RNA eingebaut werden. Die Verwendung von fluoridlabilen Phosphoramiditen ist in Kombination mit einer chemischen RNA-Synthese nicht problemlos möglich, da die Schutzgruppen der 2'-Hydroxygruppen ebenfalls fluoridlabil sind. Bei der Entschützung des synthetisierten RNA-Fragmentes würde die Silylbindung am 5'-Ende zum Biotin hin ebenfalls abgespalten werden. Um eine enzymatische Einführung selektiv am 5'-Ende zu gewährleisten, weisen die geplanten Initiatornukleoside keine Triphosphateinheit auf. Angelehnt an Arbeiten von Schneider *et al.*^[398], die einen fluoridlabilen Linker für Kupfer-freie Click-Reaktionen synthetisierten, und an Arbeiten von Fang *et al.*^[169,170], die fluoridlabile biotinylierte Linker mit der 5'-Hydroxygruppe eines Thymidin-Phosphoramidits verknüpften, wurde die Synthese zweier Initiatornukleoside **50** und **51** geplant (Abb. 52). Die funktionalen Reste werden hierbei jeweils direkt mit der 5'-Hydroxygruppe verbunden. Schlatte *et al.* konnten bereits zeigen, dass direkt mit dem 5'-Ende eines Nukleosids verbundene funktionale Gruppen mittels Transkriptionsreaktionen in RNAs eingeführt werden können, wenn sie im Überschuss vorliegen.^[86]

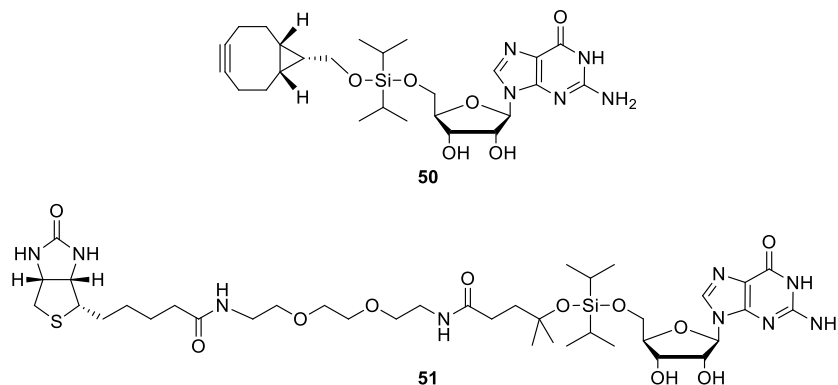


Abb. 52: Strukturelle Darstellung der zwei geplanten Initiatornukleoside mit fluoridlabiler 5'-Modifikation: labiler Cyclooctinrest zum Einsatz in Cu-freien Click-Reaktionen (**50**) und labile Biotineinheit (**51**).

Da die Transkriptionsreaktion mit *T7* RNA Polymerase geplant wurde, stand bei der Syntheseplanung die Modifizierung von Guanosinnukleosiden im Fokus, um den Einbau der modifizierten Initiatornukleoside zu begünstigen. Die Polymerase bevorzugt zwei aufeinanderfolgende Purinnukleotide (besonders GG) als Transkriptionsstart.^[86,95,101,102] Darüber hinaus weist *T7* RNA Polymerase eine hohe Transkriptionsrate (> 230 nt/s)^[399] und eine gute Toleranz gegenüber modifizierter Nukleoside auf.^[87,95,100] Zunächst sollte Verbindung **50** zum Einsatz in Kupfer-freien Click-Reaktionen synthetisiert werden (angelehnt an Schneider *et al.*^[398]). Das Initiatornukleosid kann in drei bewusst gewählte Untereinheiten aufgeteilt werden. Zum einen das Guanosin, das für einen guten Transkriptionsstart gewählt wurde. Als zweite Einheit gibt es ein fluoridlabiles Diisopropylsilan, welches über die 5'-Position der Ribose verbunden ist, zur finalen Abspaltung. Die dritte Einheit bildet ein Bicyclononin-Rest, der sich zum Einsatz in einer Kupfer-freien Click-Reaktion eignet. Diese Art der Click-Reaktionen wird auch als „Spannungs-geförderte“

Alkin-Azid-Cycloaddition (*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*, SPAAC) bezeichnet, da die Triebkraft der Reaktion die Öffnung und Reaktion des unter Spannung stehenden Cyclooctinrings ist.^[400,401] Großer Vorteil dieser Art der Click-Reaktion ist ihr Ablauf in wässrigen Medien ohne zusätzliche zelltoxische Katalysatoren oder Stabilisatoren. Daher sind SPAAC-Reaktionen sehr interessant für biologische Anwendungen.^[402–404] Nach Transkription sollte das Cyclooctin mit einem Biotin-Azid durch eine SPAAC verbunden werden. Das gewählte Cyclooctin stellte die kleinste stabile Cycloalkin-Verbindung dar, um eine Interaktion mit der Polymerase nicht durch sterische Effekte zu behindern. In Abb. 53 ist die SPAAC Click-Reaktion schematisch dargestellt und weitere häufig verwendete Alkin-Derivate zusammengefasst.

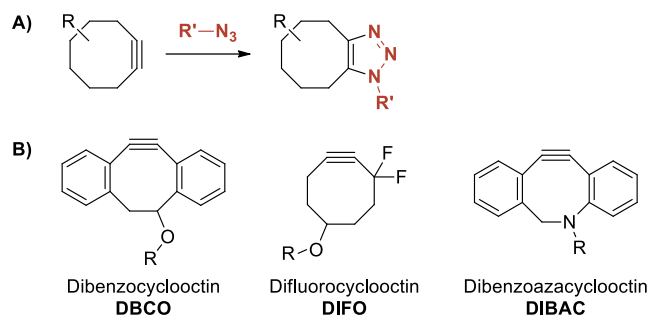


Abb. 53: Kupfer-freie SPAAC. A) Schematische Darstellung der Spannungs-geförderten Alkin-Azid-Cycloaddition. B) Häufig in SPAAC-Reaktionen eingesetzte Cyclooctin-Derivate.

Die Darstellung des fluoridlabilen Initiatornucleosids **Octin-Si-G (50)** kann auf verschiedenen Synthesewegen erreicht werden. Einerseits kann eine *in situ*-Umsetzung von Guanosin **52** mit Dichlordiisopropylsilan und (1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-yl-methanol (Octin-Alkohol, **53**) erfolgen (Abb. 54). Die Alternative ist eine vierstufige Schutzgruppen-basierte Syntheseroute (Abb. 56).

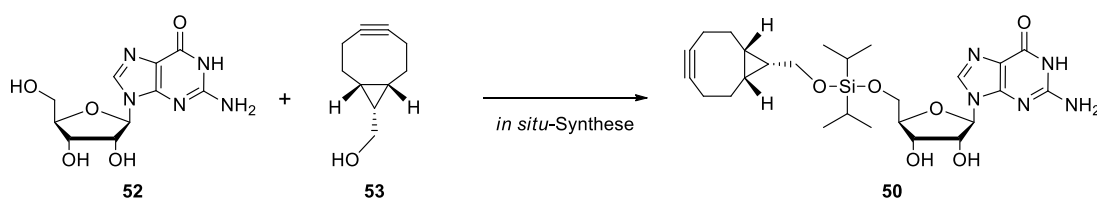


Abb. 54: *In situ*-Synthese des Initiatornucleosids **50** zum Einsatz in Kupfer-freien Click-Reaktionen. *In situ*-Synthese: Dichlordiisopropylsilan, (1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-yl-methanol, DMAP, Et₃N, DMF, -10 °C, 8%.

Der synthetisch schnellste Zugang zu Verbindung **50** ist die *in situ*-Synthese. Hierbei wurde Guanosin **52** zunächst mehrmals mit Pyridin coevaporiert, um Kristallwasser zu entfernen und die Löslichkeit des Guanosins in DMF zu erhöhen. Die benötigte Menge Guanosin wurde anschließend in DMF gelöst und auf -10 °C gekühlt. In einem Schlenkrohr wurde Dichlordiisopropylsilan ebenfalls in DMF vorgelegt und auch auf -10 °C gekühlt. Dem Dichlordiisopropylsilan wurde unter Luftausschluss ein Gemisch aus DMF, Octin-Alkohol, DMAP und Et₃N hinzugefügt. Nach 20 min konnte *via* Dünnschichtchromatographie neben der Bildung der einfach substituierten Silan-Spezies auch die Bildung unerwünschter Dimere (siehe Abb. 55 Verbindung **57**) beobachtet werden. Deshalb wurde das Reaktionsgemisch trotz verbliebenem Edukt (**53**) zu der Guanosin-Suspension hinzugegeben. Das finale Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt, wobei es sich auf Raumtemperatur erwärmte. Mit dieser *in situ*-Strategie konnte das fluoridlabile Initiatornucleosid **Octin-Si-G (50)** mit einer Ausbeute von 8% hergestellt werden. Die geringe Ausbeute ist durch eine

Reihe an Nebenreaktionen bedingt. Die Bildung möglicher Nebenprodukte ist in Abb. 55 zusammengefasst.

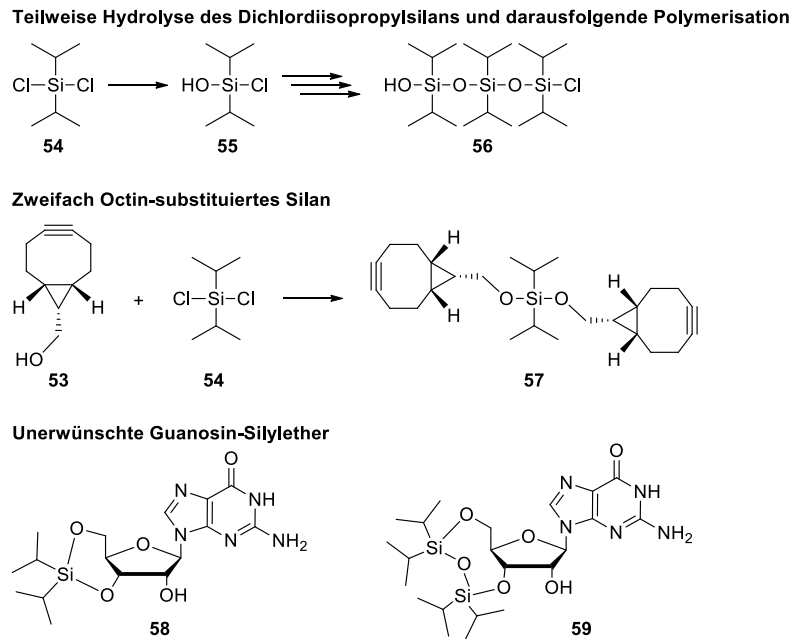


Abb. 55: Bildung möglicher Nebenprodukte bei der *in situ*-Synthese des fluoridlabilen Octin-substituierten Initiatornucleosids. Neben Polymerisationsreaktionen des Silans kann es zur Bildung unerwünschter Dimere und zyklischer Silylether kommen.

Bei der gesamten Synthese musste streng auf Luft- und Wasserausschluss geachtet werden, um die Hydrolyse des verwendeten Silans (**55**) und daraus resultierende unerwünschte Polymerisationsreaktionen (**56**) zu vermeiden. Das Gemisch aus Dichlordiisopropylsilan und Octin-Alkohol **53** wurde nach 20 minütigem Rühren bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter strengem Luftausschluss zu dem vorgelösten Guanosin hinzugegeben. Die Reihenfolge der Zugabe der Edukte stellte sich als entscheidend heraus. Wurde das Dichlordiisopropylsilan **54** zu langsam zu dem verwendeten Octin-Alkohol gegeben, konnte die Bildung zweifach Octin-substituierter Silans (**57**) beobachtet werden. Die Bildung dieser Dimere konnte unterbunden werden, indem die Reaktionstemperatur auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesenkt und das Silan **54** anstelle des Alkohols **53** vorgelegt wurde. Weitere unerwünschte Nebenprodukte konnten beobachtet werden, wenn das Dichlordiisopropylsilan zuerst zu Guanosin **52** hinzugefügt wurde. Hierbei bildeten sich neben Dimeren (analog zu denen des Octin-Alkohols) auch 5'-, 2'- und 3'-Silylether und zusätzlich 5',3'-zyklische Silylether (**58**). Die intramolekulare Zyklisierungsreaktion mit **54** kann als Alternative zur bekannten Markiewicz-Schutzgruppenstrategie (**59**)^[405,406] verwendet werden.

Um die Anzahl an möglichen Nebenprodukten zu reduzieren wurde auf eine Schutzgruppenbasierte Synthesestrategie zurückgegriffen (Abb. 56). Zusätzlich sollte dadurch die Ausbeute gesteigert werden, da es besonders durch die Bildung von Edukt-Dimeren zu großen Ausbeuteverlusten kam. Die vierstufige Synthese baute auf gängige Reaktionen auf, die zusätzlich in einem größeren Maßstab (g statt mg) durchgeführt wurden.

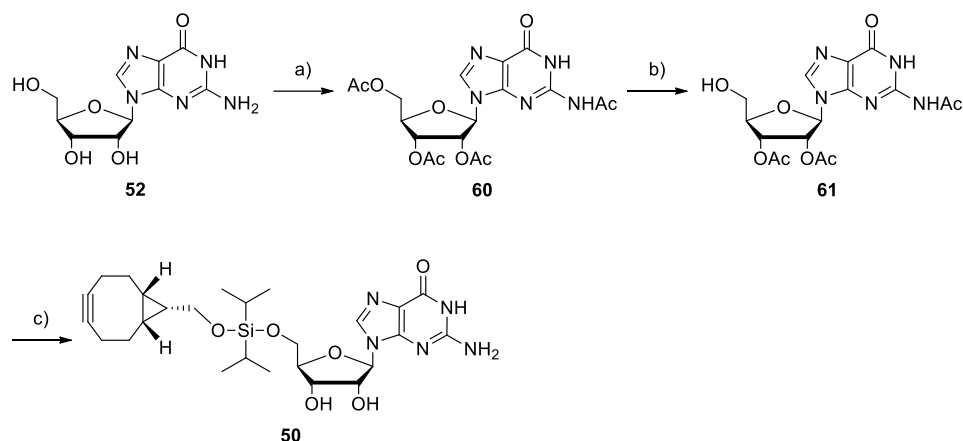


Abb. 56: Schutzgruppen-basierte Strategie zur Synthese des Initiatornucleosids **50** zum Einsatz in Kupfer-freien Click-Reaktionen. a) Ac_2O , DMAP, Pyridin, Reflux, 93%; b) I_2 , MeOH, 68 °C, 32%; c1) Dichlordiisopropylsilan, (1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-yl-methanol, DMAP, Et_3N , DMF, -10 °C – RT, Rohprodukt; c2) NH_4OH , RT, NaOAc-Fällung, 21%.

Die erste Stufe war die Acetylierung aller funktionalen Gruppen des Guanosins. Verbindung **60** konnte mit 93% Ausbeute synthetisiert werden. Im zweiten Schritt wurde unter Zugabe von 1% Iod in Methanol (w/v) die primäre Hydroxygruppe an 5'-Position deacetyliert. Die Reaktion wurde in Anlehnung an Arbeiten von Ren *et al.* durchgeführt, die auch einen möglichen Mechanismus der Reaktion präsentieren.^[407] Da die Reaktion ohne Zugabe von Säure und auch in Gegenwart einer Base durchgeführt werden kann, handelt es sich nicht um eine säurekatalysierte Abspaltung. Ren *et al.* schlagen zunächst eine Komplexbildung der Iodspezies über den Sauerstoff des primären Acetats, gefolgt von einem nukleophilen Angriff des Methanols vor (Abb. 57). Sie vermuten eine Selektion der Deacetylierung aufgrund von sterischer Hinderung.^[407] Verbindung **61** konnte mit 32% Ausbeute gewonnen werden.

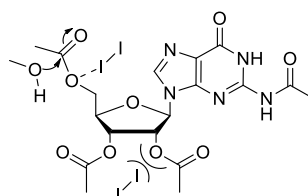


Abb. 57: Vorgeschlagener Mechanismus der selektiven 5'-Deacetylierung nach Ren *et al.*^[407]

Verbindung **61** konnte auch erreicht werden, indem zuerst eine Acetylierung der exozyklischen Aminogruppe TBDMS-geschützten Guanosins stattfand. Nach TBDMS-Abspaltung wurde zunächst die 5'-Position trityliert (5'-O-DMTr), danach alle verbleibenden funktionalen Gruppen acetyliert und abschließend die Tritylschutzgruppe säurekatalysiert abgespalten. Durch die in Abb. 56 präsentierte Syntheseroute konnten mehrere Reaktionsschritte und damit verbundene zusätzliche Aufreinigungsschritte eingespart werden. Die finale Umsetzung zum Initiatornucleosid **50** erfolgte analog zu der vorgestellten *in situ*-Synthese. Dank der Acetylschutzgruppen konnte die Verknüpfung des Octinrestes nur über die freie 5'-Hydroxygruppe erfolgen. Das acetylierte **Octin-Si-G**-Rohprodukt wurde direkt mit NH_4OH versetzt, um die Acetylschutzgruppen abzuspalten und anschließend mit NaOAc gefällt. Das Initiatornucleosid **50** konnte so mit 21% Ausbeute hergestellt werden. Um das synthetisierte Initiatornucleosid **Octin-Si-G (50)** am 5'-Ende einer RNA einzubauen, wurden erste Transkriptionsversuche mit T7 RNA Polymerase unternommen. Hierbei wurde das synthetisierte Initiatornucleosid **Octin-Si-G** im 10x Überschuss (bezogen auf die verwendeten

unmodifizierten NTPs) eingesetzt. Zusätzlich dazu wurde die Stabilität der Verbindung in wässrigem Ligationspuffer untersucht. Leider ließ sich bei diesen Versuchen bereits nach 2-4 h die hydrolytische Spaltung des Silylethers NMR-spektroskopisch und mittels Massenspektrometrie feststellen. Unter diesen Bedingungen eignete sich Initiatornukleosid **50** nicht zum Einsatz in einer Festphasen-basierten chemo-enzymatischen RNA-Synthese, da sich die verschiedenen Reaktionsschritte schnell zu mehreren Stunden Reaktionszeit aufsummieren, während denen die Verknüpfung zum Biotin-Rest stabil sein muss.

Das zweite geplante Initiatornukleosid **51** mit fluoridlabiler Biotineinheit wurde von Fang *et al.* als Phosphoramidit synthetisiert und aufgrund der tertiären Verknüpfung des Biotin-Restes zum Silylether in wässrigen Medien als hydrolysestabil beschrieben.^[169] Die Syntheseroute, angelehnt an die Literatur^[169] (Abb. 58) startete mit der Umsetzung von Lävulinsäure **62** zum Dimethyl-Lakton **63**. Hierbei wurde Lävulinsäure zunächst in einer Grignard-Reaktion mit Methylmagnesiumbromid umgesetzt, um eine weitere Methylgruppe einzuführen. Anschließend fand durch Zugabe von Essigsäure eine intramolekulare Veresterung und somit eine Ringschlussreaktion statt. Lakton **63** wurde mit einer Ausbeute von 50% gebildet. Im nächsten Schritt griff eine Aminogruppe des 2,2'-(Ethyldioxy)bis(ethylamins) nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Laktons **63** an. Infolgedessen kam es zur Ausbildung einer Amidbindung und zur Ringöffnung. Die Reaktion fand unter Zugabe von Wasser statt. Fang *et al.* berichteten, dass bei einer wasserfreien Reaktion ausschließlich das zweifach substituierte Nebenprodukt geformt wird.^[169] Dieses Nebenprodukt konnte im Rahmen dieser Arbeit nur zu einem sehr geringen Anteil (< 5%) beobachtet und im Laufe der Aufreinigung gut vom Hauptprodukt abgetrennt werden. Aminoalkohol **64** konnte mit einer Ausbeute von 65% isoliert werden. Die Einführung der Biotineinheit erfolgte durch Aktivierung von Biotin mit Isobutylchloroformiat und anschließender Umsetzung mit Aminoalkohol **64**. Die Isolierung des Biotin-Alkohols **65** stellte eine Herausforderung dar. Aufgrund der hohen Hydrophilie der Verbindung erwies sich eine Abtrennung von Verunreinigungen als erschwert. Mit Hilfe verschiedener Waschschriffe mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln und einer anschließenden automatisierten säulenchromatographischen Aufreinigung unter Umkehrphasenbedingungen konnte Biotin-Alkohol **65** mit 36% Ausbeute sauber isoliert werden.

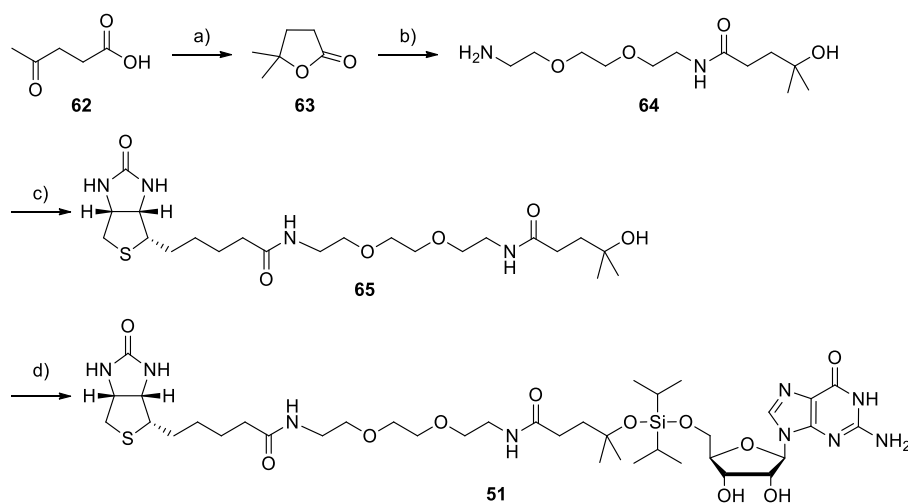


Abb. 58: Syntheseroute zum fluoridlabilen Initiatornukleosid **51** mit 5'-ständiger Biotineinheit. a) MeMgBr, THF, -78 °C bis 50 °C, AcOH, RT, 50%; b) 2,2'-(Ethyldioxy)bis(ethylamin), H₂O, 90 °C, 65%; c) Isobutylchloroformiat, DIPEA, DMF, 0 °C, Verbindung **64**, DMAP, DMF, 0 °C, 36%; d) Dichlordiisopropylsilan, DIPEA, Imidazol, Guanosin, DMF, -60 °C bis RT, Rohprodukt.

Alternativ könnte, wie in der Publikation von Fang *et al.*, eine basenlabile Schutzgruppe an Position N^2 des Biotins eingeführt werden, wodurch die Lipophilie der Verbindung erhöht und damit die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln vergrößert werden würde. Der entscheidende Reaktionsschritt war die Verknüpfung der Biotineinheit über Dichlorodiisopropylsilan mit Guanosin. Dieser Reaktionsschritt wurde in Gegenwart verschiedener Basen (Imidazol, Et_3N , DIPEA), bei verschiedenen Reaktionstemperaturen ($-60\text{ }^\circ\text{C}$, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, Raumtemperatur, $45\text{ }^\circ\text{C}$) und mit unterschiedlichen Reaktionszeiten (2 h bis über Nacht) durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde dabei jeweils mittels qualitativer Dünnschichtchromatographie beobachtet. Die besten Ergebnisse konnten unter Verwendung von Imidazol und DIPEA bei niedrigen Temperaturen und kurzen Reaktionszeiten ($< 5\text{ h}$) erzielt werden. Auch bei dieser Synthese wurde auf die Reihenfolge der Eduktzugabe geachtet. Analog zu der *in situ*-Synthese des Octin-Initiatornukleosids **50** wurde auch bei der Synthese von Verbindung **51** zunächst Biotin-Alkohol **65** mit Dichloridiisopropylsilan **54** umgesetzt, bevor Guanosin **52** zur Reaktionslösung hinzugefügt wurde. Auffällig war hierbei, dass sich anders als bei der Umsetzung des primären Octin-Alkohols **53** mit Dichloridiisopropylsilan **54** bei der Umsetzung des tertiären Biotin-Alkohols **65** weniger unerwünschte Dimere bildeten. Dennoch konnte die gewünschte Zielverbindung, Initiatornukleosid **51**, nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit sauber isoliert werden. Ein NMR des Rohprodukts zeigt, dass die Zielverbindung entsteht. Allerdings konnten bei Aufreinigungsversuchen lediglich die Edukte reisoliert werden. Vermutlich findet auch bei diesem Initiatornukleosid eine hydrolytische Spaltung der Silyletherbindung statt.

Da eine stabile Verknüpfung mit der Biotineinheit essentiell für die Verwendung in einer chemoenzymatischen RNA-Synthese ist, wurde im weiteren Verlauf des Projekts auf die Synthese zusätzlicher Initiatornukleoside verzichtet und auf die Synthese biotinylierter RNA mittels chemischer Festphasensynthese zurückgegriffen. Die einfache und zuverlässlich reproduzierbare Einführung des Biotins am 5'-Ende einer RNA mittels chemischer Festphasensynthese stellte hier ganz klar einen großen Vorteil dar. Zur Bindung der biotinylierten RNA wurden die magnetischen Streptavidin Beads nach Herstellerangaben (*New England Biolabs*) gewaschen und in Bindepuffer resuspendiert (Details siehe Abschnitt 4.3.2). Die benötigte Menge an Beads richtete sich dabei nach der verwendeten Menge an biotinylierter RNA. Die Beads haben laut Herstellerangaben eine Bindekapazität von $> 500\text{ pmol/mg}$ einzelsträngiger 25 nt langer Oligonukleotide. Diese Angabe diente als Grundlage bei der Berechnung der zu verwendenden Menge. Da die Länge des immobilisierten Oligonukleotids einen Einfluss auf die Bindekapazität hat, wurde stets darauf geachtet, dass die Beads im leichten Überschuss eingesetzt wurden. Nach Zugabe von **Bio-RNA1** zu der Suspension wurde die Suspension etwa 15-20 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}/300\text{ rpm}$ inkubiert. Zur Durchführung der enzymatischen 3'-Verlängerung wurden die Beads mit gebundener RNA mit Hilfe eines Magneten fixiert, der überschüssige Bindepuffer entnommen, nachgewaschen und abschließend im benötigten Volumen an Wasser resuspendiert. Das erfolgreiche Binden der biotinylierten RNA konnte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) der entnommenen Überstände kontrolliert werden. Die gewünschte enzymatische Reaktion wurde nach Zugabe aller weiteren benötigten Komponenten (Puffer, Cofaktor, Edukte, Enzym) durchgeführt. Sowohl die Bindung der dauerhaft biotinylierten RNA **Bio-RNA1** als auch die Interaktion der photolabil biotinylierten RNA **Bio-PC-RNA1** konnte erzielt werden.

3.2.2 Festphasen-basierte chemo-enzymatische Synthese eines tRNA-Derivats

Die 5'-terminale Einführung einer Biotineinheit zur Interaktion mit magnetischen Streptavidin Beads legt den Grundstein zu einer Festphasen-basierten chemo-enzymatischen RNA-Synthese. Im Fokus dieser Untersuchungen stand vor allem die Entwicklung der Methode dahingehend, bisher mittels chemischer Festphasensynthese zugängliche Maximallängen zu überwinden. Mit Hilfe der chemischen Festphasensynthese sind RNAs mit bis zu etwa 70-100 Nukleotiden^[12,64,80–83] synthetisierbar. Besonders durch den Einbau von Modifikationen wird diese Maximallänge jedoch schnell drastisch herabgesetzt. Die Modifizierung biologisch interessanter RNAs, wie beispielsweise tRNAs, stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurde die chemo-enzymatische Modifikation einer 77 Nukleobasen langen RNA-Sequenz, angelehnt an die Sequenz der tRNA^{Met}, angestrebt. Es wurde auf die von Cory und Marcker publizierte Sequenz^[408] zurückgegriffen, wobei alle modifizierten Nukleotide, wie Dihydrouridin oder 2'OMe-Guanosin, durch unmodifizierte Standardnukleotide ersetzt wurden. Die gewählte Sequenz weist am 5'-Ende zweiaufeinanderfolgende Guanosine auf. Somit könnten modifizierte Nucleoside mittels Transkription am 5'-Ende der Sequenz eingeführt werden. Mit Hilfe der entwickelten chemo-enzymatischen Methode sollten lichtadressierbare Nucleosid-3',5'-Bisphosphate an vier Positionen innerhalb von Stammregionen eingebaut werden. Dadurch ergaben sich fünf RNA-Fragmente (**RNA1-RNA5**), die durch die Wiederholung der enzymatischen Reaktionsschritte modifiziert und miteinander verknüpft werden sollten. Die Sequenz, die Platzierungen der Modifikationen und die daraus resultierenden RNA-Fragmente sind in Abb. 59 dargestellt. Bei den gewählten Nucleosid-3',5'-Bisphosphaten handelte es sich entweder um die entsprechenden NPE-geschützten Nucleoside, die gemäß Watson-Crick-Franklin-Basenpaarung komplementär sind oder um *meta*-substituierte Azobenzol-C-Nucleoside. Somit entstand entweder eine Gesamtsequenz mit vier internen photolabilen NPE-Modifikationen oder eine Sequenz mit vier photoschaltbaren Azobenzol-Modifikationen.

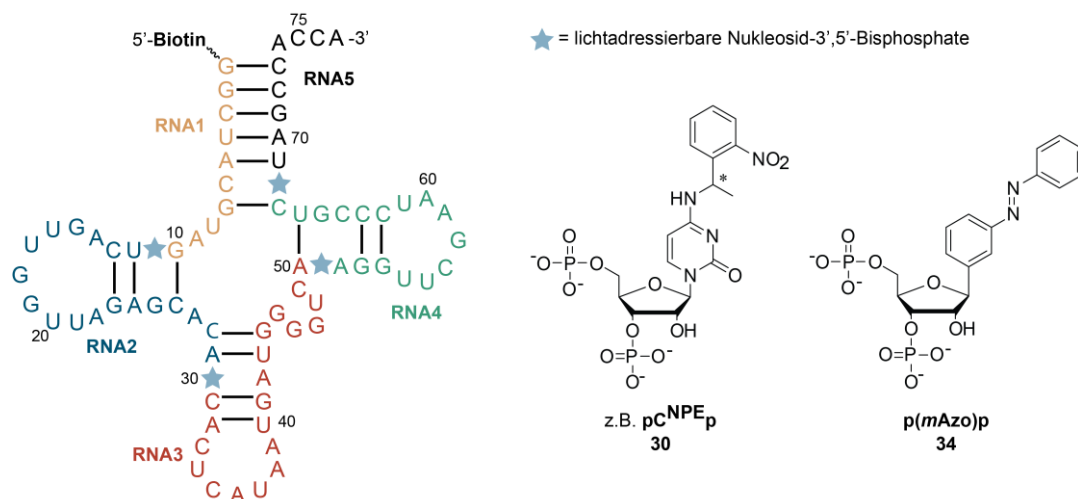


Abb. 59: Darstellung der zu modifizierenden Sequenz angelehnt an die Sequenz der tRNA^{Met} nach Cory *et al.*^[408]. Die einzelnen RNA-Fragmente (**RNA1-5**) sind farblich markiert. Positionen, die mit lichtadressierbaren Nucleosid-3',5'-Bisphosphaten wie mit **pC^{NPE}p** und **p(mAzo)p** modifiziert werden sollten, sind mit blauen Sternen gekennzeichnet.

Da sich die beiden in Abschnitt 3.2.1 synthetisierten Initiatornucleoside als instabil in wässrigen Medien erwiesen und eine photolabil-verknüpfte Biotineinheit nicht mit dem Einbau photolabil-

geschützter Nukleosid-3',5'-Bisphosphate kompatibel ist (bei der Abspaltung der Biotineinheit würden auch die eingeführten NPE-Schutzgruppen mitabgespalten werden), wurde aus Stabilitätsgründen hauptsächlich mit dem dauerhaft biotinylierten RNA-Fragment **Bio-RNA1** (Abb. 59 gelbe Sequenz, 5'-Bio-r[GGC UAC GUA G]-3') gearbeitet. Nachdem das erste RNA-Fragment erfolgreich mit der benötigten 5'-terminalen Biotineinheit und in ausreichender Menge mittels chemischer Festphasensynthese synthetisiert und anschließend isoliert werden konnte, wurde dessen Einsatz in der chemo-enzymatischen RNA-Synthese untersucht. Zunächst wurde getestet, ob die zuvor etablierten enzymatischen Reaktionsschritte auch dann durchführbar sind, wenn das erste RNA-Fragment an magnetischen Streptavidin Beads immobilisiert ist. Nur wenn die Enzyme die neue Reaktionsumgebung akzeptieren und dennoch effizient arbeiten, können die magnetischen Beads als feste Phase eingesetzt werden. (Chemo-) Enzymatische Synthesemethoden stehen bei der Modifikation von Oligonukleotiden immer zu einem gewissen Grad in Konkurrenz mit der chemischen Festphasensynthese. Deshalb musste die Handhabung der untersuchten Methode einfach und zugleich so effizient wie möglich sein.

3.2.2.1 Vergleich der enzymatischen Reaktionen in Lösung und gebunden an Streptavidin Beads

Die erste und gleichzeitig wichtigste Fragestellung im Zusammenhang mit einer Festphasen-basierten Durchführung der enzymatischen Reaktionen bezog sich darauf, wie sich die Verwendung der Streptavidin Beads auf die Ausbeuten und Reaktionsbedingungen auswirkte. Der erste Reaktionsschritt, die enzymatische 3'-Verlängerung einer RNA um ein modifiziertes Nukleosid-3',5'-Bisphosphat mit *T4* RNA Ligase 1, wurde unter gleichen Bedingungen in Lösung und mit Streptavidin-gebundener RNA durchgeführt. Bei diesen ersten Tests wurde die biotinylierte 10 Nukleobasen lange Sequenz **Bio-RNA1** zum einen mit **pC^{NPE}p** und des Weiteren mit **p(mAzo)p** am 3'-Ende verlängert. Die Ligationsreaktionen fanden im 50 µL Maßstab mit jeweils 25 µM **Bio-RNA1** und 100 µM **pNp** statt. Damit sind die Reaktionsbedingungen vergleichbar zu vorherigen^[294]. Ligierte wurde jeweils für 5 h bei 37 °C/300 rpm mit *T4* RNA Ligase 1. Anschließend wurden die Ansätze mittels denat. PAGE analysiert (Abb. 60B). Bereits bei diesen ersten Analysen konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen einer Reaktionsführung in Lösung (ohne Beads) und einer Bead-gebundenen 3'-Verlängerung festgestellt werden. Diese positiven Ergebnisse konnten auch bei einer folgenden Aufreinigung mittels RP-HPLC bestätigt werden. Bei der Bead-gebundenen 3'-Verlängerung von **Bio-RNA1** mit **pC^{NPE}p** konnte eine sehr gute Ausbeute von 91% erreicht werden. Auch die Verlängerung von **Bio-RNA1** mit **p(mAzo)p** lag mit 93% im oberen Bereich (Abb. 60C). Im Vergleich mit den durchgeführten Kontroll-Ligationen in Lösung stehen die Ausbeuten der Festphasen-basierten Reaktionsführung in nichts nach. Auch bei diesen Reaktionen konnten in weiteren Versuchen durch Anpassen des Verhältnisses an RNA:pNp auf 1:3 die Reaktionszeiten verkürzt werden. Alle Produkte wurden ebenfalls massenspektrometrisch bestätigt.

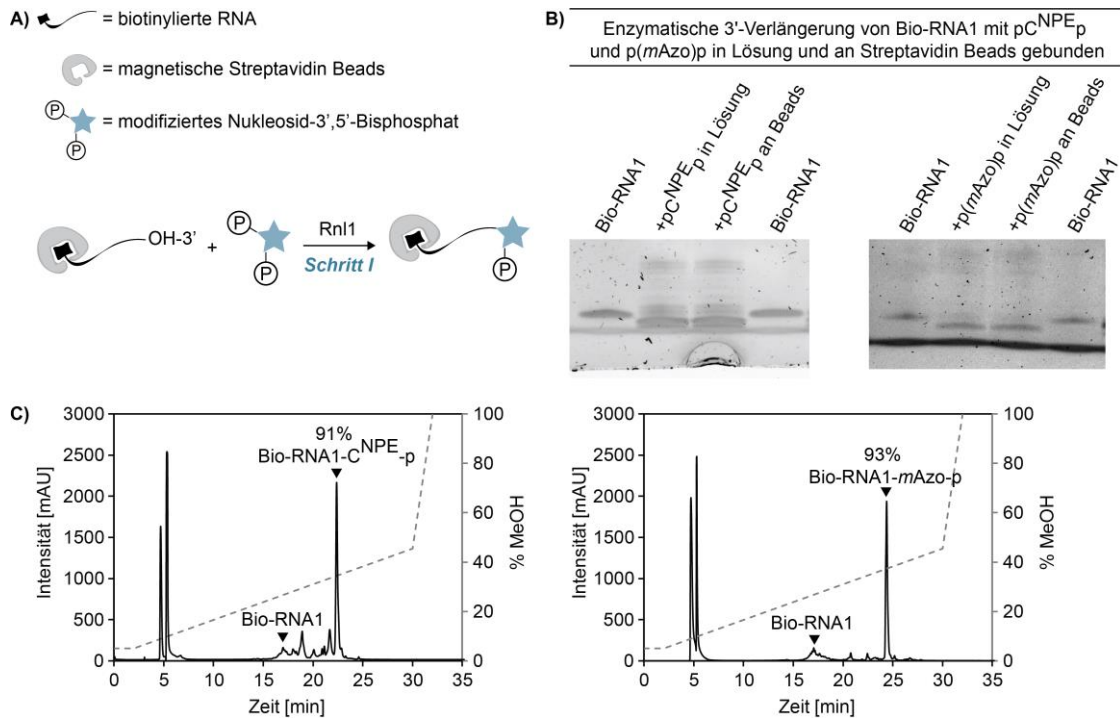


Abb. 60: Vergleich der enzymatischen 3'-Verlängerung in Lösung und an Streptavidin Beads gebunden. A) Schematische Darstellung des ersten Reaktionsschritts mit Bead-gebundener RNA. B) Analyse der 3'-Verlängerung von **Bio-RNA1** mit $pC^{NPE}p$ (links) und $p(mAzo)p$ (rechts) in Lösung und an Beads gebunden mittels 20% denat. PAGE. C) RP-HPLC-Chromatogramme der Festphasen-basierten 3'-Verlängerungen mit $pC^{NPE}p$ (links) und $p(mAzo)p$ (rechts) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C).

Neben der 10 Nucleobasen langen Sequenz **Bio-RNA1** konnte auch die Sequenz mit photolabiler Biotineinheit **Bio-PC-RNA1** und das dauerhaft biotinylierte 34mer **Bio-34mer** erfolgreich mit $p(mAzo)p$ in Bead-gebundenen Ligationen mit *T4* RNA Ligase 1 am 3'-Ende verlängert werden. Zusätzlich zu **Bio-RNA1-C^{NPE}-p** und **Bio-RNA1-mAzo-p** konnten **Bio-PC-RNA1-mAzo-p** (89%) und **Bio-34mer-mAzo-p** (65%) mit guten bis sehr guten Ausbeuten chemo-enzymatisch synthetisiert werden. Somit waren unterschiedlich lange RNAs und unterschiedlich verknüpfte Biotineinheiten durch Streptavidin-gebundene Reaktionen zugänglich. Die Anwesenheit der magnetischen Beads führte zu keiner Beeinträchtigung der Ligationen mit Rnl1.

Auch der zweite enzymatische Reaktionsschritt, die 3'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* wurde parallel zu Reaktionen in Lösung auch an Streptavidin Beads gebunden durchgeführt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die 3'-verlängerten RNA-Fragmente zunächst mittels RP-HPLC aufgereinigt. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum bei 4 °C entfernt wurde, wurde die 3'-Dephosphorylierung unter analogen Bedingungen durchgeführt. Ein Ansatz wurde erneut in Lösung dephosphoryliert. Für einen weiteren Ansatz wurde die biotinylierte und 3'-modifizierte RNA an frisch vorbereitete Streptavidin Beads gebunden (Kontrolle der Biotin/Streptavidin-Interaktion durch Messung der OD_{260}). Die Dephosphorylierungen wurden mit 25 μ M RNA mit 10% (v/v) rSAP in 1x *Cut Smart Puffer* für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Die Analyse fand erneut *via* denat. PAGE statt (Abb. 61B). Wie bereits bei vorherigen Versuchen beobachtet werden konnte, konnten auch hier aufgrund der Kürze der modifizierten Sequenz phosphorylierte RNA-Fragmente von dephosphorylierten Spezies unterschieden und chromatographisch abgetrennt werden (Abb. 61C). Erneut konnten keine wesentlichen Unterschiede der Ausbeuten nach Reaktion in Lösung und an Beads gebunden erkannt werden. Beide Reaktionen zeigten quantitative Dephosphorylierung der 3'-modifizierten RNA. Damit konnte gezeigt werden, dass

auch der zweite enzymatische Schritt den Bedingungen eines Festphasen-basierten Reaktionsansatzes standhält.

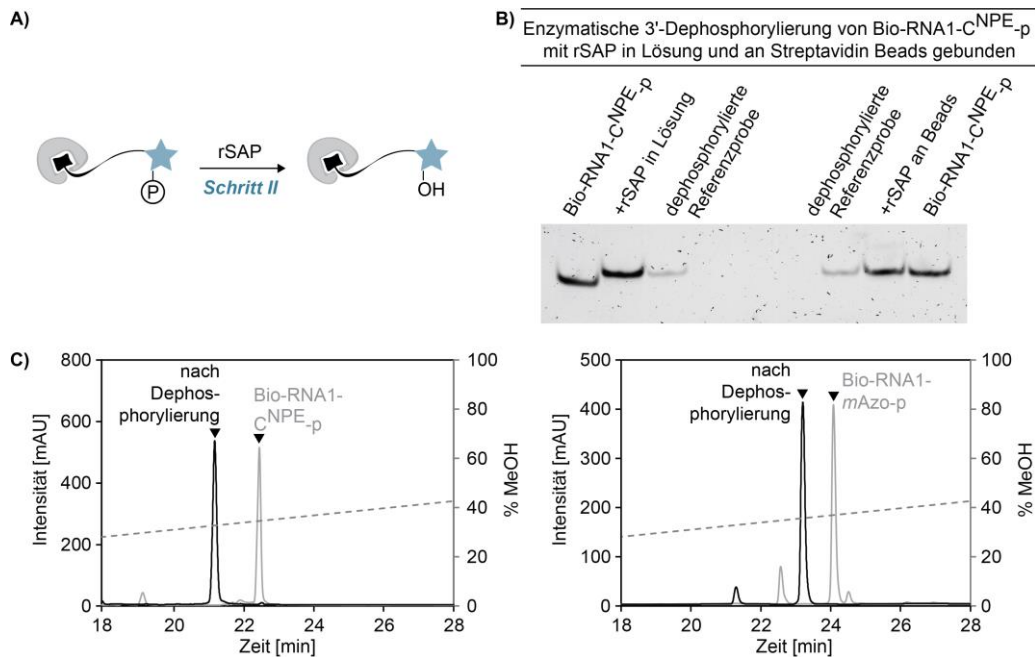


Abb. 61: Vergleich der enzymatischen 3'-Dephosphorylierung mit rSAP in Lösung und an Streptavidin Beads gebunden. A) Schematische Darstellung des zweiten enzymatischen Schritts mit Bead-gebundener 3'-modifizierter RNA. B) 20% denat. PAGE der 3'-Dephosphorylierung von **Bio-RNA1-CNPE-p** in Lösung (links) und mit immobilisierter RNA (rechts). C) Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach Bead-gebundener 3'-Dephosphorylierungen von **Bio-RNA1-CNPE-p** (links) und **Bio-RNA1-mAzo-p** (rechts) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C).

Um alle Reaktionsschritte der entwickelten chemo-enzymatischen Synthesemethode in Gegenwart der magnetischen Streptavidin Beads zu untersuchen, wurde auch die finale Splint-Ligation des modifizierten RNA-Fragments mit einer weiteren RNA-Sequenz getestet. Die Splint-Ligation stellte sich in vorangegangenen Versuchen als der anspruchsvollste und kritischste Reaktionsschritt heraus. Ausbeuten erwiesen sich als stark Fragment- und Bedingungs-abhängig, weshalb besonders bei dieser letzten enzymatischen Reaktion fraglich war, ob die *T4* RNA Ligase 2 die Streptavidin-Umgebung akzeptiert und annehmbare Ausbeuten erreicht werden können. Als Donor-RNA wurde ein 5'-phosphoryliertes RNA-18mer (**5'p-RNA2**, 5'-p-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA]-3') verwendet, welches dem zweiten Fragment des tRNA-Derivats (blaue Sequenz Abb. 59) entspricht. Die Splint-Ligation wurde in Anwesenheit eines 24 Nukleobasen langen komplementären DNA-Splints (**DNA1**, 5'-d[TCT AAC CAA CTG ATC TAC GTA GCC]-3') durchgeführt. Um mögliche Unterschiede der Ligationsreaktion mit den Streptavidin Beads in Verbindung bringen zu können, wurde bei diesen ersten grundlegenden Untersuchungen erneut mit RP-HPLC-aufgereinigten RNA-Fragmenten und frisch vorbereiteten Streptavidin Beads gearbeitet. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, indem das 3'-terminal modifizierte Akzeptorfragment an die Beads gebunden und in einem Teil des benötigten Ligationspuffers resuspendiert wurde. Daneben wurde das zweite RNA-Fragment **5'p-RNA2** zunächst mit **DNA1** im restlichen Ligationspuffer zusammengegeben, für 4 min auf 80 °C erhitzt und innerhalb von etwa 5-10 min auf 37 °C abgekühlt. Durch dieses Vorgehen sollten mögliche Unterstrukturen der beiden Oligonukleotide denaturiert und eine ideale Hybridisierung ermöglicht werden. Nach dem Abkühlen auf 37 °C wurden die vorkoordinierten Fragmente zu der Suspension der Streptavidin-gebundenen RNA hinzugegeben und Rnl2 hinzupipettiert. Die Splint-Ligationen wurden mit jeweils 4 µM **Bio-RNA1-C^{NPE}**, **5'p-RNA2** und **DNA1** (Verhältnis Akzeptor-

RNA:Donor-RNA:Splint = 1:1:1) in 1x DNA Ligase Puffer durchgeführt. Zur Ligation wurden beide Ansätze (1x in Lösung und 1x an Beads) mit 5% Rnl2 (v/v) für 3 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert und vor dem DNase-Verdau *via* denat. PAGE analysiert (Abb. 62B). Die Ausbeuten wurden durch Vergleich der Bandenintensitäten mit *Image Lab*^[388] ermittelt. In Lösung betrug die Ausbeute der Ligationsreaktion 81%. Bei der Festphasen-basierten Splint-Ligation lag die Ausbeute bei sehr guten 78%. Um den zeitlichen Verlauf der Splint-Ligationen beurteilen zu können, wurden weitere Ansätze unter identischen Bedingungen ligiert, jeweils nach 30, 60, 120 und 240 min Aliquote entnommen und diese anschließend ebenfalls vor DNase-Verdau *via* denat. PAGE analysiert (Abb. 62C).

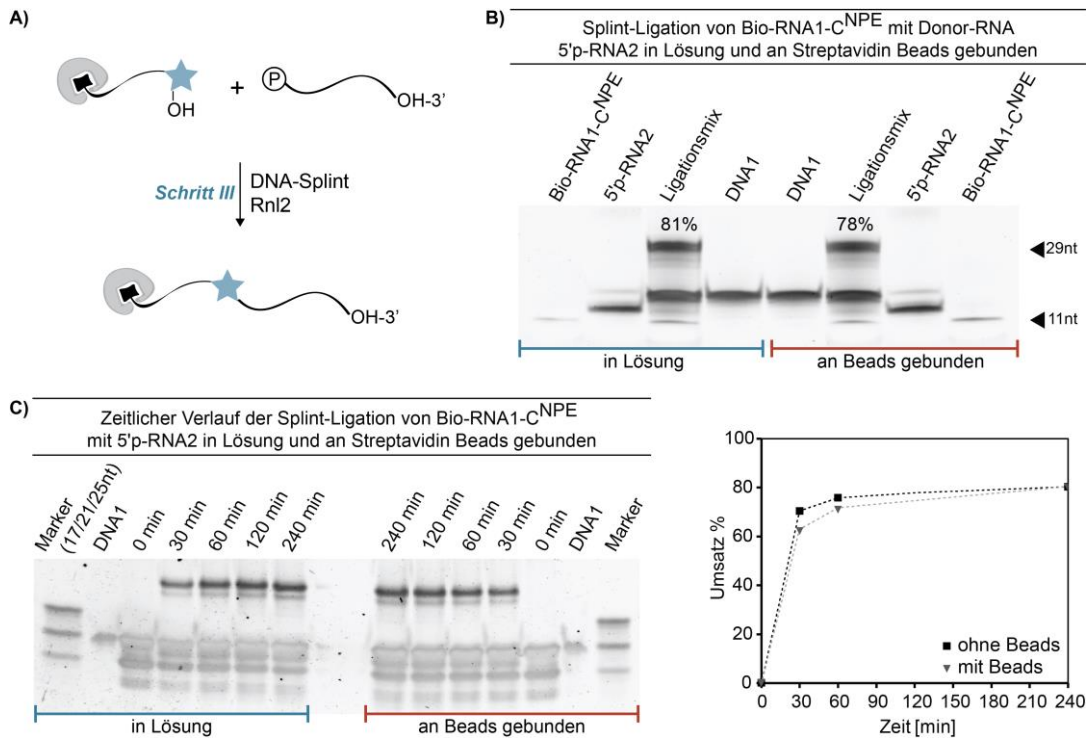


Abb. 62: Vergleich der Splint-Ligation der modifizierten Akzeptor-RNA **Bio-RNA1-C^{NPE}** mit der 5'-phosphorylierten Donor-RNA **5'-p-RNA2** in Lösung und an Streptavidin Beads gebunden. A) Schematische Darstellung des Festphasen-basierten dritten enzymatischen Schritts. B) 20% denat. PAGE der Splint-Ligation von **Bio-RNA1-C^{NPE}** mit **5'-p-RNA2** in Lösung (links) und mit immobilisierter RNA (rechts). C) Vergleich des zeitlichen Ligationsverlaufs in Lösung (links) und Bead-gebunden (rechts).

Im Allgemeinen zeigten Splint-Ligationen ohne Vorkoordination der Fragmente durch gemeinsames Aufheizen und langsames Abkühlen auf Reaktionstemperatur etwas reduzierte Ausbeuten. Außerdem zeigten sich Unterschiede im Umsatz je nach verwendetem Ligationspuffer. Unter Verwendung von DNA Ligase Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5) wurden bessere Ergebnisse erzielt als mit dem laut Hersteller empfohlenen RNA Ligase 2 Puffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) und Zugabe von 1 mM ATP. Die höhere MgCl₂-Konzentration wirkt sich eventuell positiv auf die Koordination der Ligationstelle während der Interaktion mit dem Enzym aus. Insgesamt zeigten somit alle enzymatische Reaktionen hervorragende Ausbeuten und keine bemerkenswerten Beeinträchtigungen durch die Immobilisierung der RNA mit Hilfe der verwendeten magnetischen Streptavidin Beads. Auch die weniger tolerante *T4* RNA Ligase 2 ligierte in einer Festphasen-basierten Splint-Ligation mit vergleichbaren Ausbeuten zu einer Reaktionsführung in Lösung.

Diese Erkenntnisse legten die wichtige Grundlage, um die chemo-enzymatischen Reaktionsschritte wiederholt in einem Festphasen-basierten Verfahren zu durchlaufen. Daneben sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, in wie fern mit Hilfe der magnetischen Beads Waschschrte durchgeführt werden können, um zeitaufwendige Aufreinigungen mittels RP-HPLC oder Fällung der RNA nach den einzelnen Reaktionen einsparen zu können. Zudem konnetn durch die Verwendung einer festen Phase Edukte und Enzyme im Überschuss eingesetzt werden, wodurch Reaktionszeiten optimiert wurden.

3.2.2.2 Linearer Reaktionsverlauf zur enzymatischen Synthese des tRNA-Derivats

Nachdem Streptavidin-gebundene RNA sowohl am 3'-Ende erfolgreich chemo-enzymatisch modifiziert als auch in einer darauffolgenden Splint-Ligation mit Rnl2 umgesetzt werden konnte, wurde die Synthese der tRNA-angelehnten Sequenz verfolgt. Um die Vollängensequenz mit vier internen lichtaktivierbaren Modifikationen zu erhalten, mussten die drei enzymatischen Schritte insgesamt viermal wiederholt werden. In Abb. 63 ist der lineare Syntheseverlauf schematisch dargestellt. Linear bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die einzelnen enzymatischen Reaktionsschritte nacheinander durchgeführt werden, bis die gewünschte Zielsequenz erreicht ist.

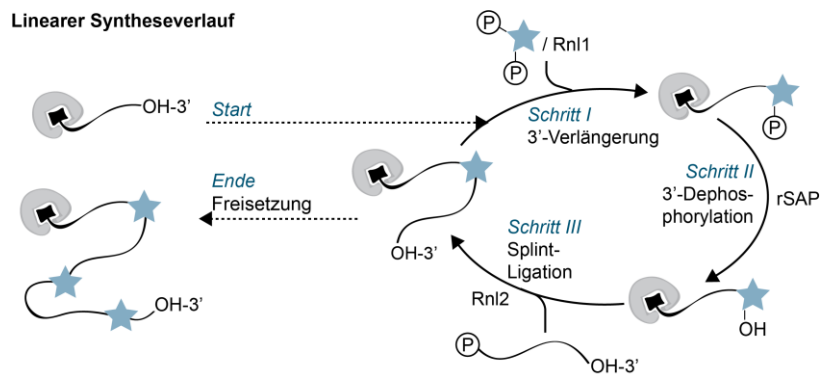


Abb. 63: Schematische Darstellung des linearen Syntheseverlaufs. Nach Immobilisierung des ersten RNA-Fragments über eine Biotin/Streptavidin-Interaktion werden die enzymatischen Reaktionsschritte solange nacheinander durchgeführt, bis die modifizierte Gesamtsequenz erreicht ist.

Die Festphasen-basierte Synthese des tRNA-Derivats startete mit der Immobilisierung des biotinylierten ersten RNA-Fragments **Bio-RNA1** mit Hilfe der magnetischen Streptavidin Beads. Es folgte die erste 3'-Verlängerung entweder mit **pC^{NPE}p** oder analog mit **p(mAzo)p**. Die guten Ausbeuten des ersten enzymatischen Reaktionsschrittes, der Verlängerung des biotinylierten Start-Fragments **Bio-RNA1** mit *T4* RNA Ligase 1, von mindestens 93% konnten bis zu Ansatzgrößen von 250 μ L (50 μ M RNA \cong 12,5 nmol RNA) reproduziert werden. Bei Versuchen das Reaktionsvolumen oder die Konzentration der RNA noch weiter zu erhöhen war eine Abnahme der Ausbeute zu beobachten. Des Weiteren zeigten die Ligationen der Nucleosid-Bisphosphate unterschiedliche Ausbeuten bei der Verlängerung unterschiedlicher RNAs, was erneut auf eine Sequenzabhängigkeit hindeutet (mehr dazu in Abschnitt 3.2.2.3). Ein weiterer Nebeneffekt zu großer Ansätze wurde durch die benötigte Menge magnetischer Streptavidin Beads hervorgerufen. Um eine vollständige Immobilisierung zu erreichen und zu gewährleisten, wurde eine vergleichsweise größere Menge magnetischer Beads benötigt. Besonders bei Reaktionen mit längeren Reaktionszeiten (> 4 h) in Volumina > 500 μ L konnte beobachtet werden, dass sich die Beads teilweise absetzten und somit

keine homogene Suspension mehr bestand. In diesen Fällen wurde das Reaktionsgemisch zwischenzeitlich durch vorsichtiges auf- und abpipettieren resuspendiert. Zur Herstellung größerer Mengen modifizierter RNA, beispielsweise für NMR-Experimente, sollten demnach mehrere kleine Ansätze umgesetzt und am Ende vereint werden. Zusätzlich mussten die Ligationsbedingungen für jedes Fragment und jedes verwendete Aliquot Nukleosid-3',5'-Bisphosphat getestet und optimiert werden.

Der erste Reaktionsschritt wurde durch einen Waschschrift beendet. Generell wurden diese Waschschrift auch dazu genutzt, um durch Messung der OD_{260} zu überprüfen, dass das biotinylierte Oligonukleotid nach wie vor an Beads gebunden vorliegt. Nach Fixierung der Beads an der Wand des Reaktionsgefäßes mit Hilfe eines Magneten, wurde der Überstand bestehend aus Puffer, verbliebenem Edukt und Rn1 entnommen, die Beads mit Bindepuffer gewaschen und in *Cut Smart Puffer* resuspendiert. Die zweite enzymatische Reaktion, die 3'-Dephosphorylierung mit rSAP wurde ohne weitere Aufreinigung der RNA durchgeführt. Auch die quantitativen Ausbeuten der 3'-Dephosphorylierung konnten weiterhin ohne Probleme erzielt werden. Wie bereits in Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 festgestellt, konnte auch bei den biotinylierten Fragmenten von der Kürze der Sequenz profitiert und eine Auftrennung aller Spezies mittels RP-HPLC erzielt werden. Neben einer Separation der 3'-phosphorylierten und der 3'-dephosphorylierten Spezies mit NPE-Modifikation konnten auch die jeweils belichteten (entschützten) RNAs eindeutig abgetrennt und identifiziert werden (Abb. 64). Zur Belichtung wurden jeweils 500 pmol NPE-geschützte **Bio-RNA1-C^{NPE}-p/-OH** 10 min mit 365 nm (500 mA) bestrahlt und anschließend *via* RP-HPLC und massenspektrometrisch analysiert. Die Einführung des NPE-geschützten Nukleotids am 3'-Ende von **Bio-RNA1** führt zu einer verzögerten Elution von über 4 min (blaues Chromatogramm) im Vergleich zur unmodifizierten Start-Sequenz (schwarzes Chromatogramm). Die Retentionszeiten des dephosphorylierten und der Derivate nach NPE-Abspaltung liegen gut separiert voneinander dazwischen.

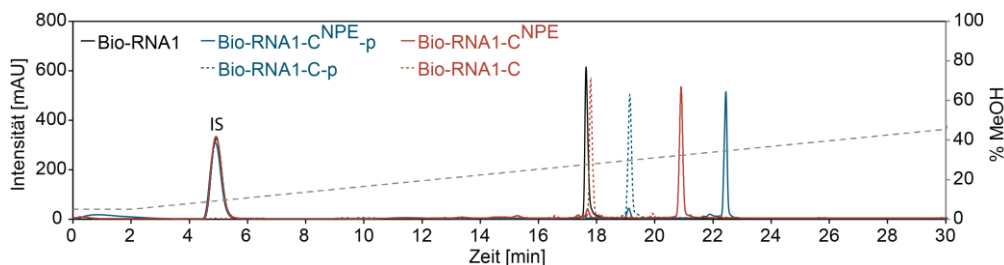


Abb. 64: Vergleich analytischer RP-HPLC-Chromatogramme nach 3'-Verlängerung, 3'-Dephosphorylierung und Belichtung. Uridin wurde als interner Standard (IS, Peak nach 5 min) verwendet. Verglichen wurden die Spektren der unmodifizierten RNA **Bio-RNA1** (schwarzes Spektrum), nach 3'-Verlängerung unbelichtet (**Bio-RNA1-C^{NPE}-p**, blaues Spektrum) und belichtet (**Bio-RNA1-C-p**, gestrichelte blaue Linie) sowie nach 3'-Dephosphorylierung unbelichtet (**Bio-RNA1-C^{NPE}**, rotes Spektrum) und belichtet (**Bio-RNA1-C**, gestrichelte rote Linie). Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C.

Um die besten Bedingungen für die Splint-Ligation von **Bio-RNA1-C^{NPE}** und **Bio-RNA1-mAzo** mit dem zweiten RNA-Fragment **5'p-RNA2** zu erzielen, wurden nach einem weiteren Waschschrift und Pufferaustausch verschiedene Bedingungen getestet. Zunächst wurden die Reaktionszeiten der NPE-Splint-Ligation mit denen der Azo-Splint-Ligation unter den zuvor gewählten Bedingungen verglichen. Hierzu wurden die jeweiligen Ligationsansätze nach 1 h Ligationszeit mittels denat. PAGE analysiert. Bei den beiden ersten enzymatischen Reaktionsschritten konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den photolabil-geschützten und den Azobenzol-modifizierten Derivaten beobachtet werden. Im Falle der Splint-Ligation zeichnete sich eine langsamere Umsetzung des 3'-

Azobenzol-modifizierten RNA-Fragments ab (Abb. 65A). Nach 1 h Ligationszeit konnten im Falle der NPE-Splint-Ligation lediglich 30% verbliebenes Edukt **Bio-RNA1-C^{NPE}** nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu waren 68% des Azobenzol-Fragmentes noch nicht umgesetzt. Durch Verlängerung der Ligationszeit des Ansatzes mit **Bio-RNA1-mAzo** (3,5 h Splint-Ligation statt 2,0 h) konnten auch bei den Splint-Ligationen vergleichbare Ausbeuten zum NPE-Ansatz erreicht werden. Außerdem wurden verschiedene Verhältnisse von Donor-, Akzeptor-RNA und DNA-Splint zueinander geprüft und zusätzlich Ansätze in RNA Ligase 2 Puffer und DNA Ligase Puffer durchgeführt, um zu überprüfen, ob der zuvor bereits verwendete DNA Ligase Puffer wirklich die besten Ergebnisse lieferte. Die in Abb. 65B stellvertretend gezeigten Testreaktionen wurden aufgrund der langsameren Umsetzung mit **Bio-RNA1-mAzo** bei 37 °C durchgeführt. Die besten Ergebnisse konnten nach 3,5 h Ligationszeit mit einem 1:1:1-Verhältnis von **Bio-RNA1-mAzo:5'p-RNA2:DNA1** in DNA-Ligase Puffer bei 37 °C/300 rpm festgestellt werden. Alle nachfolgend durchgeführten Splint-Ligationen von **Bio-RNA1-C^{NPE}** oder analog dazu **Bio-RNA1-mAzo** mit dem zweiten Donor-Fragment **5'p-RNA2** wurden daher unter diesen Bedingungen durchgeführt. Lediglich die Ligationszeiten wurden zwischen den Ansätzen mit NPE und Azobenzol variiert, sodass in beiden Fällen Ausbeuten von 83% erreicht werden konnten. Somit lagen die Gesamtausbeuten nach diesen ersten drei enzymatischen Reaktionen bei 76%.

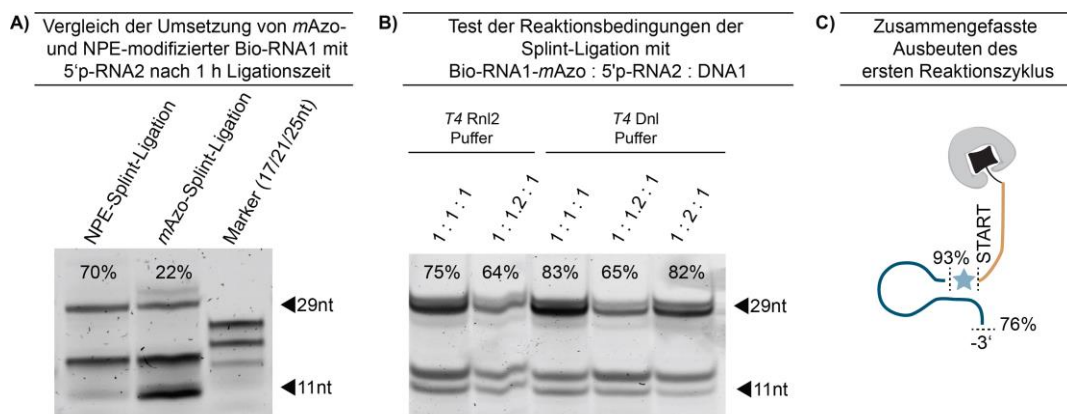


Abb. 65: Analyse verschiedener Reaktionsbedingungen der Splint-Ligationen mit Rnl2. A) Vergleich der Ligationszeiten für die Reaktion des NPE-geschützten RNA-Fragments mit **5'p-RNA2** und analog dazu der Azobenzol-modifizierten Akzeptor-RNA. B) Analyse verschiedener Oligonukleotid-Verhältnisse zueinander und Puffer mittels 20% denat. PAGE. C) Zusammengefasste Ausbeuten des ersten Synthesesyklus.

Der Einsatz der magnetischen Streptavidin Beads in Kombination mit der chemo-enzymatischen Synthese erwies sich während des ersten Reaktionszyklus als großer Vorteil. Zeitaufwendige Aufreinigungsschritte mittels RP-HPLC oder Fällung der RNAs nach jedem Reaktionsschritt konnten Dank durchgeführter Waschschrte und dem Bead-basierten Pufferaustausch eingespart werden. Die Beads konnten bei diesem Vorgehen mehrmals fixiert und resuspendiert werden. Zusätzlich konnte kein ungewolltes Abspalten des biotinylierten RNA-Fragments beobachtet werden. Durch Wiederholung der Reaktionen sollte eine zweite positionsspezifische Modifikation eingeführt werden. Nachdem die erste Modifikation durch eine Splint-Ligation intern in die nun 29 Nukleobasen lange RNA eingebaut werden konnte, sollte Position 30 durch eine zweite 3'-Verlängerung modifiziert werden. Hierzu fand nach der Splint-Ligation ein Waschschrte und Pufferaustausch und ein anschließender DNase-Verdau statt. Der zweite Reaktionszyklus wurde durch eine zweite 3'-Verlängerung mit *T4* RNA Ligase 1 begonnen. Diesmal wurde entweder NPE-geschütztes Uridin in Form eines Nukleosid-3',5'-Bisphosphates (**pU^{NPE}p**) oder erneut **p(mAzo)p**

umgesetzt. Die Reaktionen wurden analog zu den ersten Ligationsreaktionen mit Rn1 durchgeführt. Die Analyse dieses Reaktionsschrittes zeigte sowohl mit dem NPE- als auch mit dem Azobenzol-modifizierten Bisphosphat wenig Umsatz und eine schwierige Abtrennung des Produktes vom Ausgangsmaterial. Die geringen Ligationsausbeuten konnten auch durch längere Reaktionszeiten, Änderung des Verhältnisses von **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2:pNp**, zusätzliches ATP oder den Einsatz von mehr Äquivalenten an Ligase nicht verbessert werden. In Abb. 66 sind 20% denat. PAGEs abgebildet, die die geringen Umsätze von **pU^{NPE}p** und **p(mAzo)p** im zweiten Syntheszyklus zeigen. Die geringen Ausbeuten führten auch zu einem starken Einbruch der Gesamtausbeute auf 17% für das NPE-modifizierte 30mer bzw. auf 22% für das photoschaltbare Azobenzol-30mer.

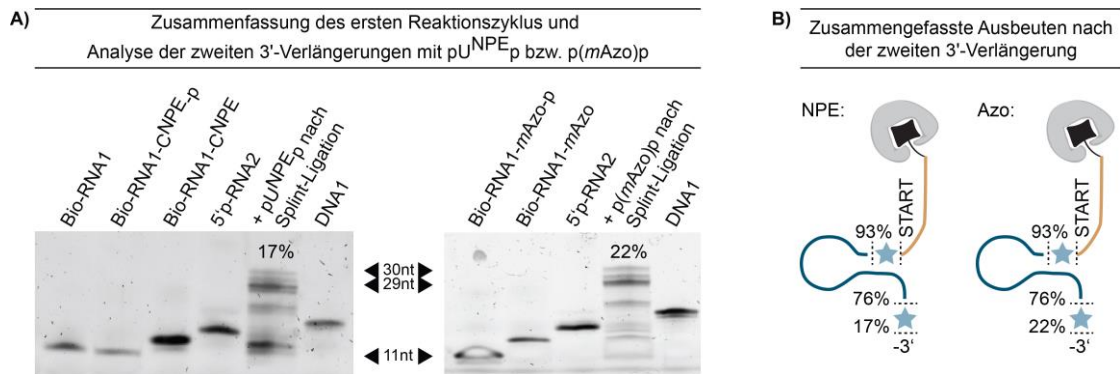


Abb. 66: Analyse nach zweiter 3'-Verlängerung. A) Denat. PAGEs zur Analyse der NPE- und Azobenzol-Modifikationen. Das linke Gel zeigt NPE-modifizierte RNAs, das Gel rechts fasst den Azobenzol-Einbau zusammen. In beiden Fällen ist nur eine schwache Ausbeute nach der zweiten 3'-Verlängerung zuerkennen (Ausbeuten durch Vergleich der Bandenintensitäten mit *Image Lab*^[388] bestimmt) B) Zusammenfassung der Gesamtausbeuten.

Die geringen Ausbeuten bereits an diesem frühen Punkt der Synthese erforderten eine alternative Herangehensweise an die Synthese des modifizierten 77mers. Ein weiteres Verfolgen der linearen Synthesestrategie machte bei zwei weiteren geplanten 3'-Verlängerungen und insgesamt noch drei ausstehenden Splint-Ligationen wenig Sinn. Um das gewünschte modifizierte Volllängenprodukt zu erhalten wurde deshalb an einer konvergenten Synthesestrategie gearbeitet, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

3.2.2.3 Konvergenter Reaktionsverlauf zur enzymatischen Synthese des tRNA-Derivats

Der lineare Syntheseverlauf zeigte bereits bei der zweiten 3'-Verlängerung mit **pU^{NPE}p** und ebenso mit **p(mAzo)p** deutlich verminderte Ausbeuten und zusätzlich eine schwierige Abtrennung der einzelnen Zwischenprodukte. Aus diesem Grund wurde eine alternative Synthesestrategie untersucht. Dabei wurde auf den bisherigen Erkenntnissen aufgebaut. Anpassungen, wie die Reduzierung des RNA:pNp-Verhältnisses auf 1:3, der Einsatz von 5-10% (v/v) Enzym zur Reduzierung der Reaktionszeiten und vor allem die Verwendung der Streptavidin Beads als feste Phase, wurden beibehalten. Neben der Aufsummierung der Reaktionszeiten war vor allem die starke Abhängigkeit der Gesamtausbeute von den Ausbeuten der einzelnen enzymatischen Reaktionen ein Schwachpunkt des linearen Vorgehens. Diese Punkte sollten durch ein konvergentes Verfahren umgangen werden. Konvergent bedeutet hier, dass zunächst alle benötigten RNA-

Fragmente am 3'-Ende mit Hilfe von Rnl1 modifiziert und darauffolgend in Festphasen-gebundenen Splint-Ligationen zu der finalen Gesamtsequenz verknüpft werden (Abb. 67).

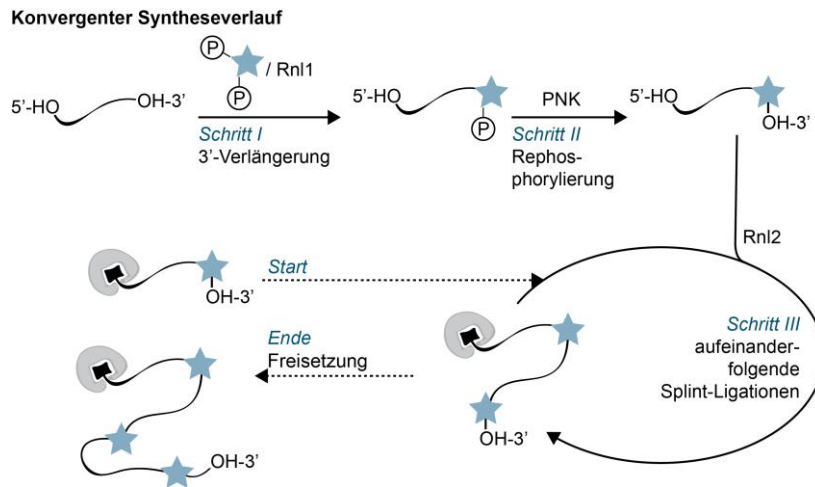


Abb. 67: Schematische Darstellung des konvergenten Syntheseverlaufs. Die einzelnen RNA-Fragmente werden zunächst in Lösung am 3'-Ende modifiziert und durch Umsetzung mit PNK rephosphoryliert. Nach Immobilisierung des ersten RNA-Fragments über eine Biotin/Streptavidin-Interaktion wird die Gesamtsequenz durch aufeinanderfolgende Splint-Ligationen hergestellt.

Im Grunde blieben die drei etablierten enzymatischen Reaktionsschritte bestehen. Allerdings wurden zunächst alle RNA-Fragmente in Lösung durch Ligation der modifizierten Nukleosid-3',5'-Bisphosphate am 3'-Ende verlängert. Die Reaktionen in Lösung konnten hierbei alle parallel in separaten Reaktionsgefäßen ablaufen. Somit ergab sich bereits an diesem frühen Punkt der Synthese ein großer zeitlicher Vorteil, da sich die Reaktionszeiten der 3'-Verlängerungen nicht, wie im linearen Verlauf, aufsummieren. Die verwendeten RNA-Fragmente wurden schnell und kostengünstig mittels chemischer Festphasensynthese ohne 5'-Phosphatgruppe hergestellt (siehe Abschnitt 4.2), um Nebenreaktionen wie Zyklisierungen oder Polymerisationen bei Ligationen mit Rnl1 zu verhindern. Alternativ könnten die Sequenzen kommerziell erworben oder ebenso durch Transkription in ausreichenden Mengen hergestellt und in diesem Verfahren verwendet werden. Alle NPE- und Azobenzol-modifizierten Bisphosphate konnten in guten Ausbeuten mit den einzelnen unmodifizierten RNA-Fragmenten umgesetzt werden (Abb. 68). Während die Ausbeuten der NPE- und Azobenzol-Verlängerungen jeweils ähnlich ausfielen, fallen deutlichere Unterschiede je nach verlängertem Fragment auf. Auch hier zeigt sich erneut eine Sequenzabhängigkeit der Ligrationsreaktionen. Die RNA-Fragmente **RNA2** (18mer), **RNA3** (20mer) und **RNA4** (16mer) unterscheiden sich nur um einzelne Basen in ihrer Länge. Bei der Wahl der zu modifizierenden Positionen und damit der „Schnittpunkte“ innerhalb der Gesamtsequenz wurde darauf geachtet, dass die resultierenden Fragmente möglichst keine oder nur geringfügig Sekundärstrukturen ausbilden (Berechnung über *mfold*^[409]). Besonders das 5'- und das 3'-Ende sollten nicht durch Ausbildung intramolekularer Hybridisierung blockiert werden. **RNA2** zeigte bei der Verlängerung mit **pU^{NPE}p** gute Ausbeuten von 87% und bei der Verlängerung mit **p(mAzo)p** von 82%. Auch **RNA4** konnte mit soliden Ausbeuten umgesetzt werden (72% für **pG^{NPE}p**; 77% für **p(mAzo)p**). Beide Reaktionen mit **RNA3** weisen dagegen geringere Ausbeuten von 42% (+ **pC^{NPE}p**) und 36% (+ **p(mAzo)p**) auf. Für diese Reaktionen wurden die gleichen Nukleosid-3',5'-Bisphosphate verwendet, die auch zur Verlängerung der biotinylierten RNA **Bio-RNA1** dienten. Da beim Umsatz mit **Bio-RNA1** reproduzierbar sehr gute Ausbeuten (> 90%) erreicht wurden, kann die geringe Umsetzung mit **RNA3** nicht auf die verwendeten Bisphosphate zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der Reaktion

mit Rnl1 konnten auch nicht verbessert werden, wenn **RNA3** vor der Reaktion zur Denaturierung auf 80 °C erhitzt, das Verhältnis von RNA:pNp, der ATP-Anteil oder die Ligationszeit (bis zu 16 h) variiert wurde. In dieser Situation zeigte sich ein weiterer Vorteil des konvergenten Vorgehens: die schwächeren Ausbeuten einzelner Ligationsreaktionen (z.B. von **RNA3-X-p**, mit X = N^{NPE} oder *mAzo*) beeinflussen nicht die Gesamtausbeute. Die modifizierten RNAs konnten gut über RP-HPLC und massenspektrometrisch analysiert werden, wodurch der Einbau an den 3'-Enden gewährleistet und der Reaktionsverlauf kontrolliert wurde.

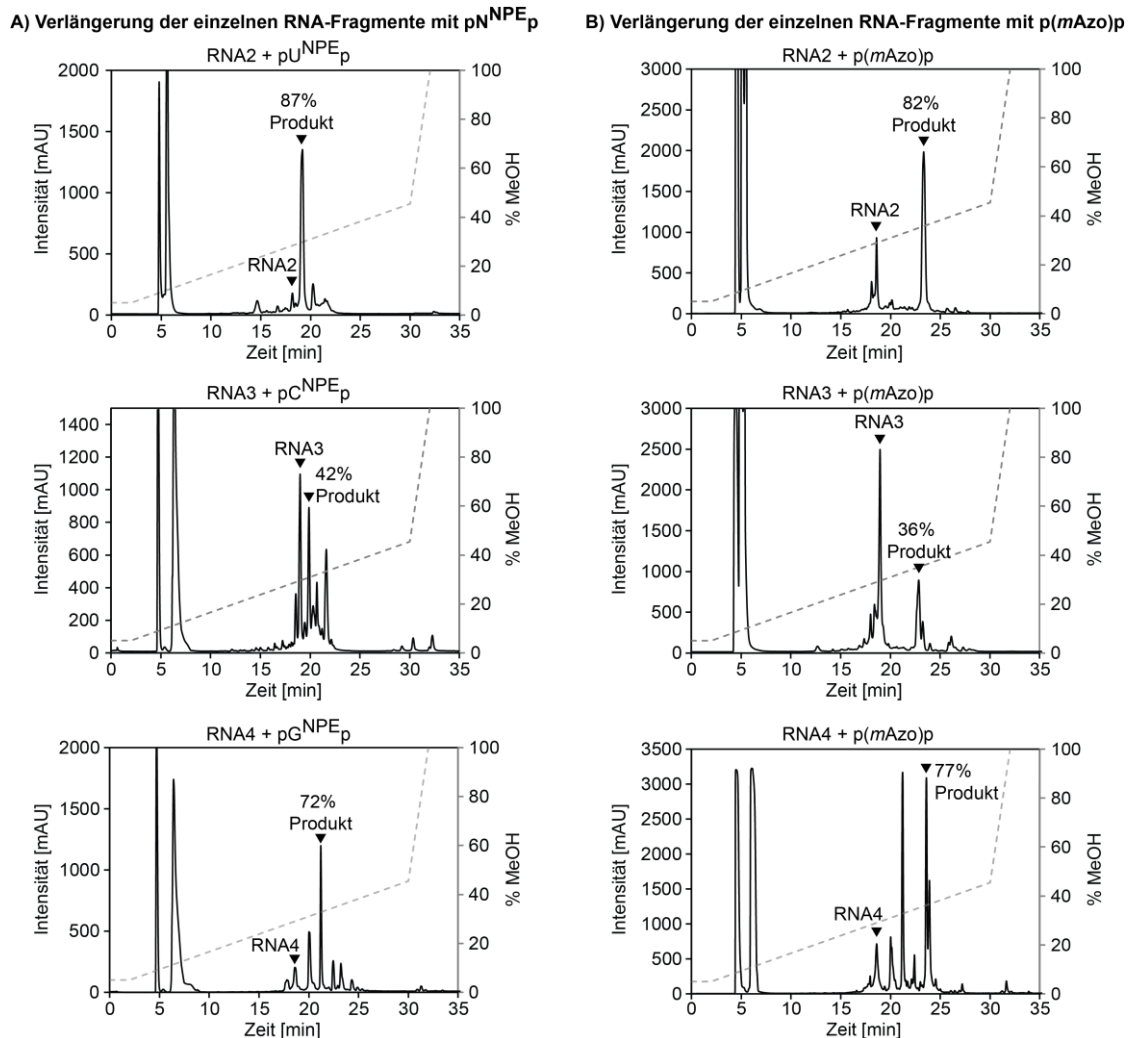


Abb. 68: Analyse und Aufreinigung der enzymatischen 3'-Verlängerungen der einzelnen RNA-Fragmente mittels RP-HPLC. A) Verlängerung der RNAs mit NPE-modifizierten Nucleosid-3',5'-Bisphosphaten. B) Verlängerung der RNAs mit **p(mAzo)p**. Edukte und Produkte sind jeweils gekennzeichnet. Die Elutionsbedingung war in allen Fällen Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C.

Eine weitere Anpassung, die im Zusammenhang mit einem konvergenten Syntheseverlauf gemacht wurde, war die Verwendung von *T4* Polynukleotidkinase (PNK) zur 3'/5'-Rephosphorylierung der Fragmente. Dieser Reaktionsschritt vereint die 3'-Dephosphorylierung und 5'-Phosphorylierung in einem und ersetzt die zuvor durchgeführte 3'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase*. Somit wurden die 3'-modifizierten RNAs in Donor-RNAs zum Einsatz in den folgenden Splint-Ligationen umgewandelt. Da sich die eingesetzten Edukte nicht in ihrer Länge oder Polarität von den rephosphorylierten Produkten unterscheiden, musste sichergestellt werden, dass die Umsetzung mit PNK quantitativ abläuft. Anfänglich wurde deshalb zunächst die 3'-Dephosphorylierung mit rSAP und erst in einem weiteren Schritt die 5'-Phosphorylierung mit PNK angestrebt. Bei allen modifizierten RNA-Fragmenten konnte bei diese beiden enzymatischen

Reaktionen jeweils ein vollständiger Umsatz erzielt werden. Die Reaktionszeit der 5'-Phosphorylierung wurde anhand der Reaktion von **RNA2-U^{NPE}** mit PNK ermittelt. Die Phosphorylierungsreaktion wurde mit 50 μ M RNA und 10% (v/v) PNK im 500 μ L-Maßstab nach Standardprotokollen des Herstellers (*NEB*) bei 37 °C durchgeführt. Nach 30, 60 und 120 min wurde ein Aliquot entnommen und mittels denat. PAGE analysiert. Bereits nach 30 min konnte ein vollständiger Umsatz zu **5'-p-RNA2-U^{NPE}** beobachtet werden (Abb. 69B).

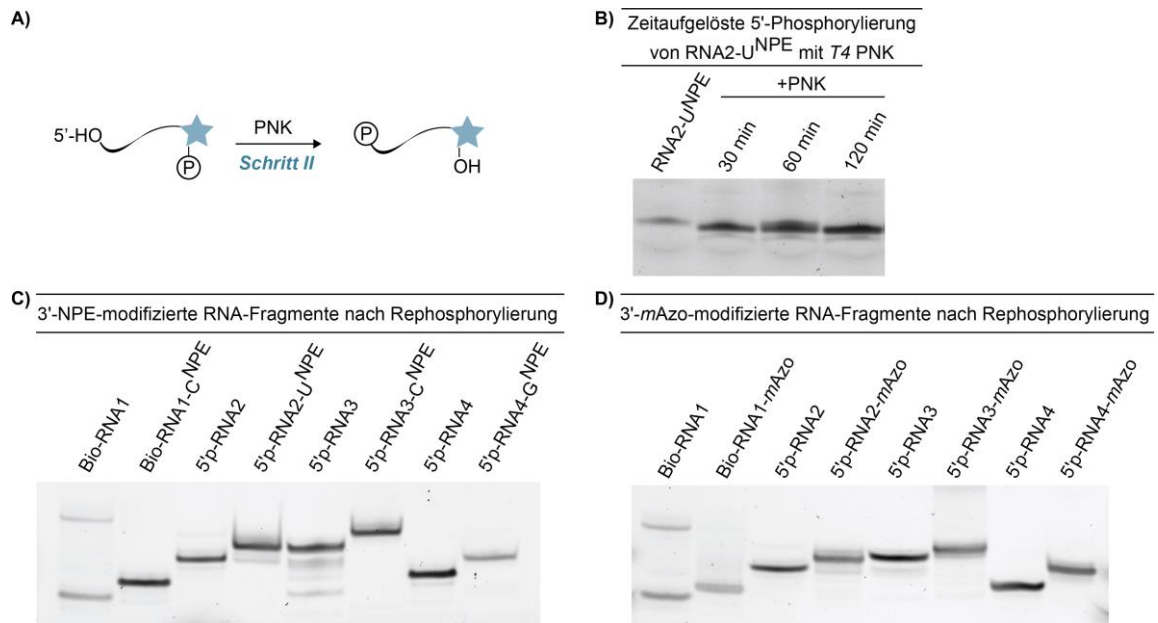


Abb. 69: 3'/5'-Rephosphorylierung mit PNK. A) Schematische Darstellung der Rephosphorylierungsreaktion. B) 20% denat. PAGE der zeitaufgelösten 5'-Phosphorylierung von **RNA2-U^{NPE}** mit PNK. C) Denat. PAGE nach enzymatischer 3'-Verlängerung mit Rnl1 und anschließender Rephosphorylierung der einzelnen NPE-modifizierten RNA-Fragmente mit PNK. D) Denat. PAGE nach enzymatischer 3'-Verlängerung und anschließender Rephosphorylierung der mAzo-modifizierten RNA-Fragmente.

Im weiteren Verlauf wurde auf die 3'-Dephosphorylierung mit rSAP verzichtet und nach erfolgter 3'-Verlängerung mit pNp und Rnl1 direkt mit PNK rephosphoryliert. Um einen vollständigen Ablauf dieser Reaktion sicherzustellen, wurden Reaktionsansätze mit PNK jeweils 2 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert, auch wenn die vorherigen Ergebnisse bereits nach 30 min eine vollständige Reaktion gezeigt hatten. In Abb. 69C und Abb. 69D sind 20% denat. Polyacrylamidgele der RNA-Fragmente nach 3'-Verlängerung, anschließender Rephosphorylierung und Aufreinigung mittels RP-HPLC abgebildet. Dank der Kürze der untersuchten Fragmente führte die Verlängerung um ein einzelnes Nucleotid auch hier in allen Fällen zu einem sichtbaren Unterschied im Migrationsverhalten.

Die hergestellten lichtadressierbaren RNAs wurden anschließend in Festphasen-basierten Splint-Ligationsreaktionen nacheinander verknüpft. Dabei wurde jeweils ein DNA-Splint (**DNA1-DNA4**) verwendet, der zu mindestens 10 Basen der Donor- und der Akzeptor-RNA komplementär ist (Abb. 70). Ist der Splint zu kurz, findet aufgrund einer geringen Schmelztemperatur T_m bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C keine ausreichende Hybridisierung mit den entsprechenden RNA-Fragmenten statt, wodurch die Interaktion mit der RNA Ligase gestört wird. In den ersten Ligationsversuchen (3.1.1) wurde stets ein DNA-Splint verwendet, der an der Ligationstelle ein Thymidin aufweist, da diese Nucleobase einen geringeren sterischen Anspruch als beispielsweise Guanin aufweist und somit genügend Raum für die NPE-Gruppe auf Watson-Crick-Franklin-Seite lässt. Daher wurden die ersten beiden DNA-Splints ebenfalls mit einem Thymidin an der Ligationstelle synthetisiert. Die Splints **DNA3** und **DNA4** besitzen an der Ligationstelle die

korrekten Nukleobasen, die entsprechend der Watson-Crick-Franklin-Basenpaarung komplementär zu den NPE-modifizierten Nukleosiden sind.

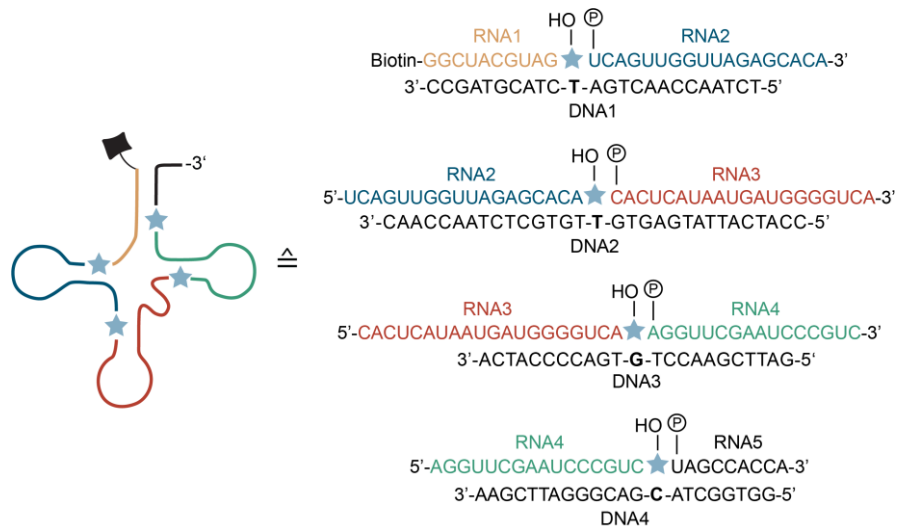


Abb. 70: Fragmentierung der RNA, Positionen der Modifikationen und entsprechende DNA-Splints.

Alle Splints wurden ohne Änderung auch bei den Splint-Ligationen der Azobenzol-modifizierten RNA-Fragmente verwendet. Alternativ könnte auch über die Verwendung von DNA-Splints mit abasischen Stellen an der Position der Azobenzol-Modifikation nachgedacht werden. Dadurch könnte eine bessere Hybridisierung der Ligationstelle durch Reduzierung der Störung durch die photoschaltbaren Isomere erreicht werden. Aus Arbeiten von Romaniuk *et al.* und auch Chauleau *et al.* geht hervor, dass die endständigen Nukleotide an der Ligationstelle die Ligationsgeschwindigkeit beeinflussen.^[121,410] Chauleau *et al.* untersuchten zusätzlich den Einfluss von Fehlbasenpaarungen auf die Ligationseffizienz. Dabei konnten sie zeigen, dass die Ligationsgeschwindigkeit durch überhängende und fehlgepaarte Sequenzen verlangsamt wird. Bei der Ligation der modifizierten Akzeptor-RNA **Bio-RNA1-X** und einer modifizierten Donor-RNA **5'p-RNA2-X** konnten keine wesentlichen Beeinträchtigungen beobachtet werden. Im Vergleich zu Ligationen in Abschnitt 3.2.2.2 wurden hier zwei endständig-modifizierte RNA-Fragmente miteinander verknüpft. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob ein Herabsenken der Reaktionstemperatur eventuell eine bessere Hybridisierung zum komplementären Splint herbeiführt und bessere Ausbeuten erzielt werden können (Abb. 71).

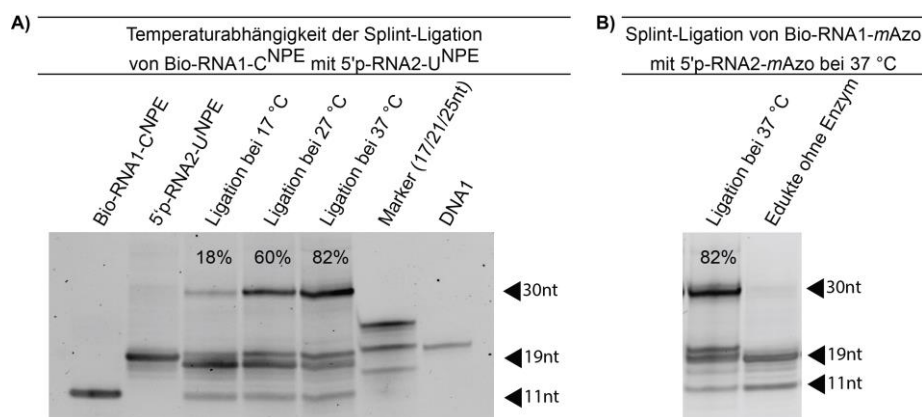


Abb. 71: Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der ersten Splint-Ligationen. A) Ligation NPE-modifizierter RNAs bei 17 °C, 27 °C und 37 °C. B) Ligation *mAzo*-modifizierter RNAs bei 37 °C.

Die Splint-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2 von **Bio-RNA1-C^{NPE}** und **5'p-RNA2-U^{NPE}** wurde daher bei 17 °C, 27 °C und 37 °C unter gleichen Bedingungen untersucht. Auch bei diesen Versuchen wurde die Donor-RNA mit dem DNA-Splint vorkoordiniert und zu Streptavidin-gebundener Akzeptor-RNA gegeben (finales Verhältnis 1:1:1). Nach 3 stündiger Ligation wurden die Ausbeuten verglichen. Bei einer Ligationstemperatur von 37 °C konnte der beste Umsatz festgestellt werden. Auch bei niedrigeren Temperaturen wurde Produkt gebildet, allerdings deutlich langsamer. Die Ergebnisse können auf die Aktivität der Ligase zurückgeführt werden, die bei 37 °C höher ist, als bei niedrigeren Temperaturen. Da bei 37 °C die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, die zudem mit denen vorheriger Ligationen vergleichbar sind, wurde die Splint-Ligation von **RNA1** und **RNA2** nicht weiter optimiert. Für Ligationsansätze mit *mAzo*-Modifikation konnten analoge Ergebnisse erzielt werden. Nach einem Waschschriff und DNase-Verdau mit *TURBOTM DNase* wurde ein Aliquot der ersten Splint-Ligationen durch Erhitzen der Suspension für 10 min auf 80 °C von den Beads gelöst und mittels RP-HPLC aufgetrennt. Dabei konnte in beiden Fällen das Ligationsprodukt isoliert werden. Während das NPE-modifizierte 30mer **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** als ein Peak nach etwa 22 min eluiert wurde, konnte das Azobenzol-modifizierte Produkt **Bio-RNA1az-RNA2az** bei Aufreinigung mit Gradient 4 in zwei Peaks nachgewiesen werden (Abb. 72).

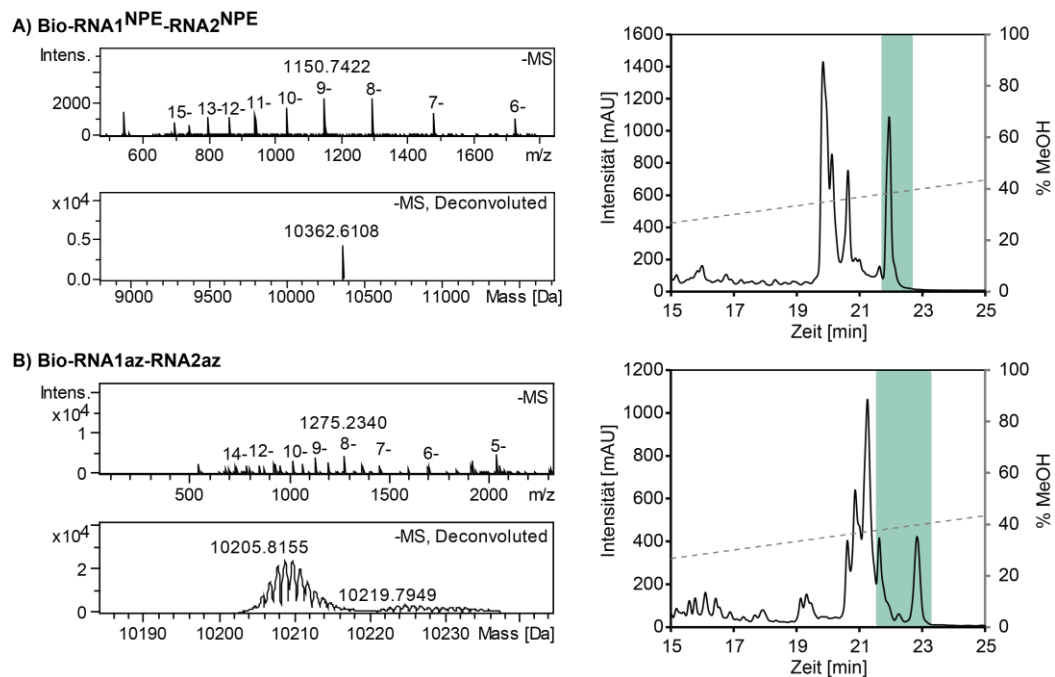


Abb. 72: Massenspektrometrische Analyse der Ligationsprodukte nach RP-HPLC-Aufreinigung der ersten Bead-gebundenen Splint-Ligation. A) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutes (unten) Massenspektrum von **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** (berechnete Masse = 10361,5) und Chromatogramm der RP-HPLC-Aufreinigung. B) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutes (unten) Massenspektrum von **Bio-RNA1az-RNA2az** (berechnete Masse = 10204,5) und Chromatogramm der RP-HPLC-Aufreinigung (Elutionsbedingung jeweils Säule 1, Gradient 4 mit HFIP/MeOH bei 60 °C).

Die restlichen Beads mit gebundener **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** wurden gewaschen und für die zweite (von insgesamt vier) Splint-Ligation resuspendiert. Das allgemeine Vorgehen bestehend aus Vorkoordination der Fragmente, Durchführung von Waschschriffen und Pufferaustausch unter Zuhilfenahme der magnetischen Beads blieb bei allen weiteren Splint-Ligationen erhalten. Auch Donor-RNA **5'p-RNA3-C^{NPE}** (rotes Fragment in Abb. 70) wurde mit dem komplementären Splint **DNA2** durch aufheizen und kontrolliertes abkühlen vorkoordiniert, bevor sie zu der Suspension aus Beads und Akzeptor-RNA hinzugegeben wurde. Die Splint-Ligation dieser Fragmente mit Rnl2 zeigte durchschnittlich sehr geringe Ausbeuten. Bereits die 3'-Verlängerung von **RNA3** wies im Vergleich

mit der Verlängerung der restlichen Fragmente deutlich geringere Ausbeuten auf. Eine Vorkoordinierung der Donor-RNA zusammen mit dem Splint war bei dieser Reaktion unerlässlich. Zur weiteren Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde das Verhältnis von **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE} : 5'p-RNA3-C^{NPE} : DNA2** auf 1,2,1 angepasst, wodurch für diesen Ligationsschritt eine maximale Ausbeute von 12% erreicht werden konnte. Die Ausbeuten für die Splint-Ligation mit *m*Azo-modifizierten Fragmenten war mit 13% nur geringfügig höher. Änderungen der Ligationszeit, der Oligonukleotid- oder ATP-Konzentration sowie der Reaktionstemperatur konnten diese Ergebnisse nicht verbessern. Trotz dieser sehr geringen Ausbeute wurde eine dritte Splint-Ligation von **Bio-RNA1-3^{NPE}** mit **5'p-RNA4-G^{NPE}** (grünes Fragment in Abb. 70) angestrebt. Auch für die dritte Splint-Ligation konnten mit einem Verhältnis von Donor : Akzeptor : Splint von 1 : 1,2 : 2 die besten Ergebnisse erlangt werden. Leider zeigte auch die dritte Splint-Ligation nur moderate Ausbeuten von 46%. Da die geringen Ausbeuten der Splint-Ligationen zu minimalsten Gesamtausbeuten führen, war eine weiteres Verfolgen dieser Strategie nicht ratsam (Abb. 73).

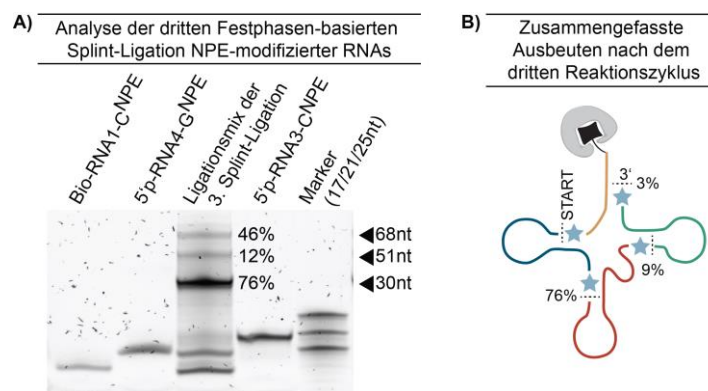


Abb. 73: A) 20% denat. PAGE nach der dritten Festphasen-gebundenen Splint-Ligation NPE-modifizierter RNAs. RNA3 und RNA 4 dienen als interne Referenz-RNAs. Zur Bestimmung der schrittweisen Ausbeuten wurden die Bandenintensitäten der Produkte zueinander ins Verhältnis gesetzt. B) Zusammenfassung der Gesamtausbeute nach drei durchlaufenen Reaktionszyklen.

Im direkten Vergleich mit der linear-verlaufenden Synthesestrategie konnten dennoch einige Fortschritte erzielt werden. Besonders die Reaktionszeiten konnten durch das konvergente Vorgehen drastisch reduziert werden. Außerdem war eine eindeutigere Analyse der Reaktionen möglich. Der Einbau der 3'-ständigen Modifikationen konnte aufgrund der relativ kurzen Fragmente eindeutig bestätigt werden. Die Aufreinigung nach einer Splint-Ligation profitierte von den deutlichen Längenunterschieden der Edukt-Fragmente zur modifizierten Produkt-RNA. Die Abtrennung einzelner Nukleotide ist ab einer gewissen Länge der RNA nicht mehr möglich, wohingegen Oligonukleotide mit mehreren Nukleotiden Unterschied noch voneinander getrennt werden können. Da die Ausbeuten der Splint-Ligationen als Nadelöhr zur Synthese eines Vollängenproduktes angesehen werden können, mussten hierfür die besten Reaktionsbedingungen gefunden werden. Um die Synthese der gewünschten Gesamtsequenz dennoch zu erreichen, wurde das dritte RNA-Fragment mittels chemischer Festphasensynthese um das vierte Fragment verlängert. Somit reduzierte sich die Anzahl an nötigen Splint-Ligationen um einen Reaktionsschritt. Außerdem wurde dadurch genau das Fragment verändert, dass bei allen enzymatischen Reaktionen die schlechtesten Ausbeuten zeigt. Da eine Sequenzabhängigkeit der Ligasen bekannt ist, war damit zu rechnen, dass durch die Verlängerung von RNA 3 zu **RNA3^{NPE}-RNA4** bzw. **RNA3az-RNA4** auch die Splint-Ligation beeinflusst wird. Die interne NPE-/Azobenzol-Modifikation wurde bei diesem kombinierten Fragment während der chemischen Synthese

eingebaut. Die resultierenden 37 Nukleobasen langen RNAs konnten ebenfalls chemo-enzymatisch mit Nucleosid-3',5'-Bisphosphaten am 3'-Ende verlängert und rephosphoryliert werden. Die Ausbeuten der 3'-Verlängerung lagen mit 69% für **RNA3^{NPE}-RNA4^{NPE}** und 78% für **RNA3_{az}-RNA4_{az}** deutlich höher als die der Verlängerung des kürzeren Fragments **RNA3**. Nachdem die ersten beiden Fragmente wie bereits zuvor beschrieben in einer Splint-Ligation verknüpft werden konnten, wurde darauffolgend eine zweite Splint-Ligation durchgeführt. Dabei wurde **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** mit **5'p-RNA3^{NPE}-RNA4^{NPE}** unter den für **RNA3-C^{NPE}** erarbeiteten Bedingungen verbunden (Verhältnis Akzeptor : Donor : DNA = 1 : 1,2 : 1; finales Volumen 50 µL, 37 °C). Dabei konnten bereits nach 2 h gesteigerte Ausbeuten beobachtet werden. Nach 3 h Ligationszeit konnte keine weitere Produktbildung beobachtet werden. Die Reaktion wurde durch einen Waschschrift beendet und der DNA-Splint verdaut. Die finale Splint-Ligation mit **5'p-RNA5** wurde im Anschluss unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Ein Unterschied in dieser finalen Ligation war die herabgesetzte Reaktionstemperatur. Das letzte RNA-Fragment **5'p-RNA5** ist lediglich 9 Nukleobasen lang. Somit besteht die Gefahr, dass das Fragment bei einer Temperatur von 37 °C nicht vollständig mit dem DNA-Splint hybridisiert vorliegt. Diesem Problem sollte durch Herabsenken der Reaktionstemperatur auf 27 °C entgegengewirkt werden. Wie bereits in Abb. 71 gezeigt werden konnte, verringert sich dadurch auch die Aktivität des Enzyms. Deshalb wurde die Ligationszeit auf 4 h verlängert. Nach 4 h Ligationszeit wurde die Reaktion erneut durch einen Waschschrift beendet und der Splint verdaut (Abb. 74). Die Splint-Ligationen wurden mittels denat. PAGE analysiert.

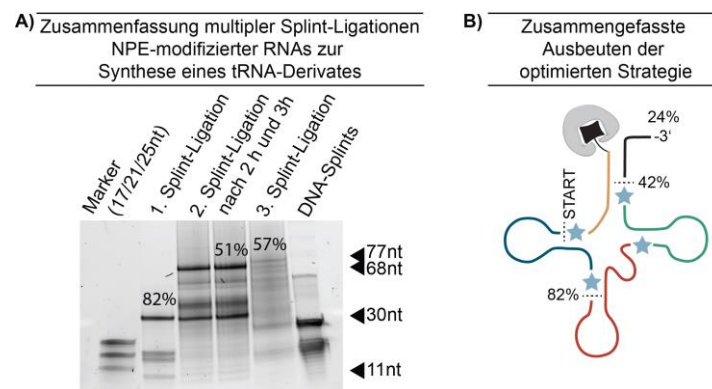


Abb. 74: Multiple enzymatische Reaktionen zur Synthese eines tRNA-Derivats. A) Analyse der Splint-Ligationsreaktionen mittels denat. PAGE. Zur Bestimmung der schrittweisen Ausbeuten wurden die Bandenintensitäten der Produkte mit *Image Lab*^[388] zueinander ins Verhältnis gesetzt. B) Zusammenfassung der Gesamtausbeuten.

Bei Betrachtung der gelelektrophoretischen Analyse der Ligationsansätze fällt auf, dass mit zunehmender Gesamtlänge vermehrt Unterbanden auftreten. Die Ausbeuten um etwa 50% sind zwar höher als bei der vorherigen Strategie, liegen aber dennoch nur in einem moderaten Bereich. Besonders bei längeren RNAs bilden sich intramolekulare Sekundärstrukturen aus. Diese können auch den Zugang des Enzyms zur Ligationstelle behindern oder gar blockieren. Hier spielt der Einsatz eines komplementären DNA-Splints eine wichtige Rolle. Erste Ligationen von RNA-Fragmenten in Gegenwart eines DNA-Splints zur Einführung einer positionsgenauen Modifikation wurde von Moore *et al.* 1992 durchgeführt.^[411] Der Splint bringt nicht nur die zu verknüpfenden Enden in räumliche Nähe, sondern bricht durch Ausbildung einer Duplexstruktur mit den beiden RNA-Fragmenten mögliche Sekundärstrukturen auf und erleichtert dadurch den Zugang der Ligase zu der Ligationstelle.^[96] Eine Verknüpfung zweier RNA-Fragmente ist prinzipiell auch ohne Splint möglich, führt allerdings zu unerwünschten zyklischen oder polymerisierten Nebenprodukten.^[138,412,413] Eine weitere Möglichkeit die erzielten Ausbeuten zu steigern wäre die

Verwendung eines deutlich längeren DNA-Splints. Zusätzlich sollte stets bedacht werden, dass unterschiedliche Sequenzen unterschiedlich gut in Ligationsreaktionen umgesetzt werden. Neben den endständigen Nukleotiden spielt auch die Gesamtsequenz eine wichtige Rolle.^[121,410,414] Uhlenbeck *et al.* berichteten bereits 1978, dass Uridin-reiche Akzeptorsequenzen schlechter umgesetzt werden.^[119] Es bietet sich an, eine Optimierung der Reaktionsbedingungen zunächst mit unmodifizierten RNAs zu unternehmen, da diese viel Probenmaterial benötigen. Eine Verbesserung der Ligationsausbeuten könnte auch durch Additive wie PEG oder Tween-20, DMSO, Formamid oder Glycerin unterstützt werden.^[415] Trotz durchschnittlicher Ausbeuten liegt die Gesamtausbeute des Vollständigproduktes bei 24%. Daran wird besonders deutlich, wie viel Einfluss einzelne Reaktionen auf das Gesamtergebnis haben.

Nach weiteren Waschschritten wurden die Beads mit dem gebundenen modifizierten 77mer in 100 μ L RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 min auf 75 °C erhitzt. Dadurch wurde die Biotin/Streptavidin-Interaktion gelöst. Das freigesetzte tRNA-Derivat konnte anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt und weiter analysiert werden. Zunächst wurde eine Aufreinigung unter Elutionsbedingungen untersucht, die sich bei der Isolation des modifizierten 30mers nach der ersten Splint-Ligation bewährt hatte (Abb. 75A).

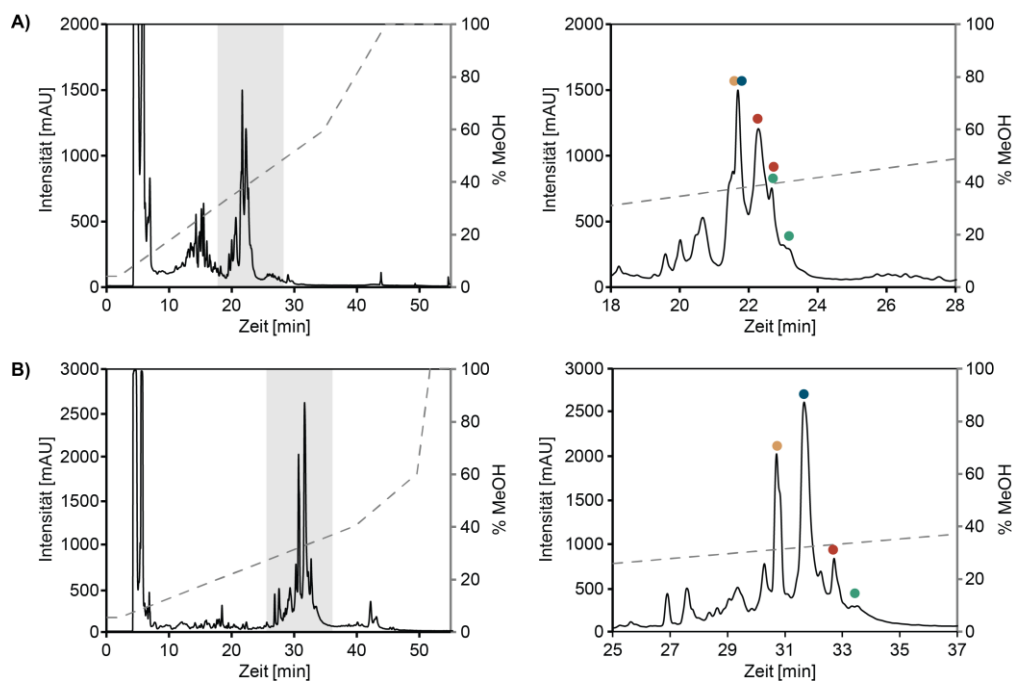


Abb. 75: Untersuchte RP-HPLC-Aufreinigung des finalen NPE-modifizierten 77 Nucleobasen langen RNA-Konstruktes. A) Vollständiges Chromatogramm und relevanter Ausschnitt der Aufreinigung mit Säule 1, Gradient 4 (HFIP/MeOH; 60 °C). B) Vollständiges Chromatogramm und relevanter Ausschnitt der Aufreinigung mit Säule 1 und dem angepassten Gradient 5 (HFIP/MeOH; 60 °C). (● = Bio-RNA1^{NPE}, ● = Bio-RNA1-2^{NPE}, ● = Bio-RNA1-4^{NPE}, ● = Bio-RNA1-5^{NPE})

Bei diesen Elutionsbedingungen steigt der Methanolanteil innerhalb von 35 min auf 60% an. Wie zu sehen ist, können die einzelnen biotinylierten Fragmente so nicht voneinander getrennt werden. Mit dem verwendeten Lösungsmittelgemisch HFIP/MeOH mit einem geringen Anteil an Et₃N als Ionenpaarungsreagenz konnten in allen vorangegangenen Aufreinigungen gute Ergebnisse erzielt werden. Eine bessere Aufspaltung der modifizierten RNAs konnte durch Anpassen des Gradienten detektiert werden. Der in Abb. 75B verwendete Elutionsgradient (Gradient 5) steigt mit 40% Methanol in 40 min wesentlich langsamer an, wodurch sich die Komponenten etwas besser voneinander trennen ließen. Allerdings konnten bei dieser Auftrennung auch Verunreinigungen

festgestellt werden. Diese konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Vermutlich handelt es sich dabei um Enzym- und Oligonukleotidreste, wie Abbaufragmente aus DNase-Verdau. Diese Verunreinigungen konnten bei einer Auftrennung mit Gradient 4 (Abb. 75A) nicht beobachtet werden. Hier werden sie im Bereich von 10-20 min von den RNA-Fragmenten abgetrennt und früher eluiert.

Nach weiteren Anpassungen und Trennversuchen konnte mit Gradient 6 eine zufriedenstellende Isolation des Volllängenproduktes erreicht werden (Abb. 76A). Bei diesem Gradienten steigt der Methanolanteil zunächst innerhalb von 2 min steil auf 20% an, bevor er nach 40 min bei 40% angelangt. Durch den steilen Anstieg zu Beginn sollte eine erste Abtrennung von Verunreinigungen erreicht werden, bevor sich die RNA-Fragmente im weiteren Verlauf langsam auftrennen können. Hier wurde erneut von der Verwendung der magnetischen Beads als feste Phase profitiert, da durch Waschschritte ein Großteil möglicher Verunreinigungen bereits vor der finalen Aufreinigung abgetrennt werden konnte. Die isolierten Peaks wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht.

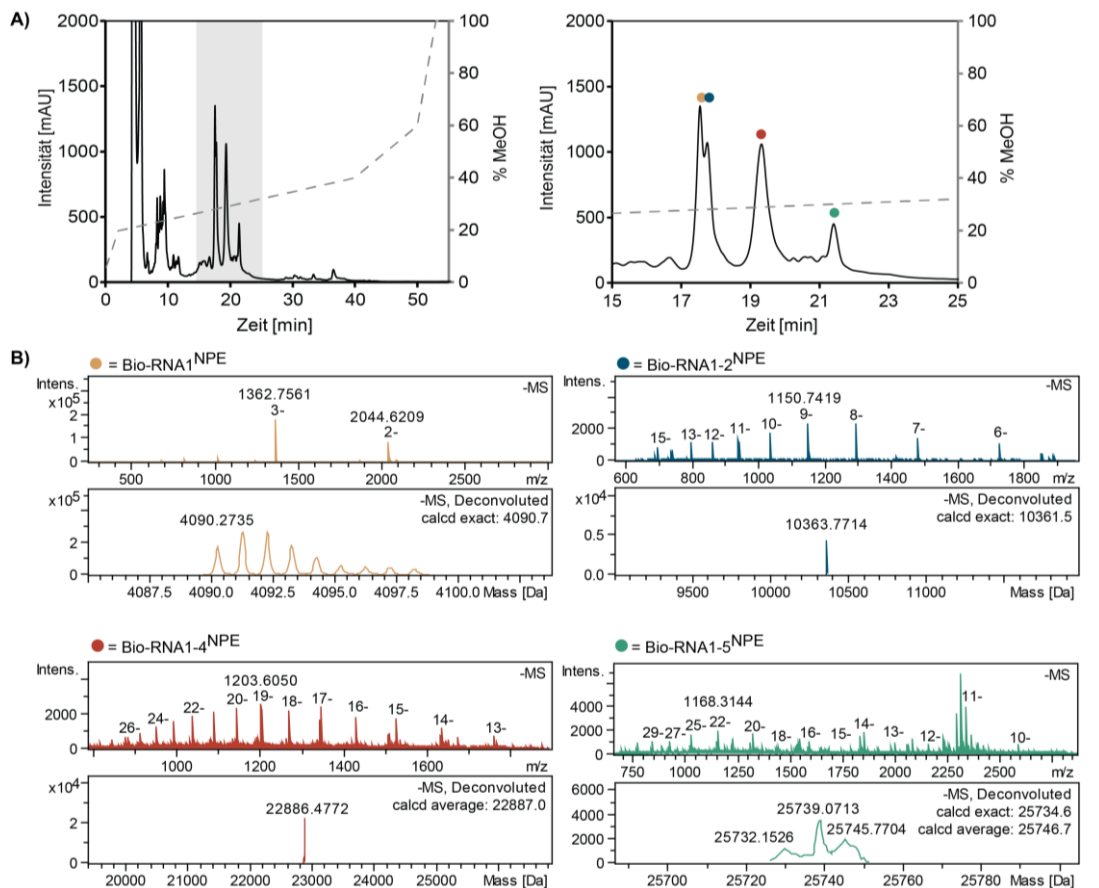


Abb. 76: Finale RP-HPLC-Aufreinigung der NPE-modifizierten Volllängensequenz. A) Vollständiges Chromatogramm und relevanter Ausschnitt der Aufreinigung mit Säule 1, Gradient 6 (HFIP/MeOH; 60 °C). B) Massenspektrometrische Analyse der isolierten RNA-Fragmente. Das gewünschte Produkt wurde nach 21 min eluiert.

Per massenspektrometrischer Analyse konnten die verschiedenen biotinylierten RNA-Fragmente zugeordnet und identifiziert werden. An dieser Stelle zeigte sich, dass diese Methode besonders bei dem 77 Nucleobasen Volllängenprodukt an ihre Grenzen kommt. Während die Massenspektren der kurzen Fragmente **Bio-RNA1^{NPE}** und auch noch **Bio-RNA1-2^{NPE}** mit 25 pmol RNA problemlos gemessen werden konnten, wurde für die Analytik der längeren Fragmente mehr Material benötigt.

Zusätzlich konnten ab einer gewissen Länge nur noch durchschnittliche Massen (*average MS*) gemessen werden. Die Messung des 68mers **Bio-RNA1-4^{NPE}** erfolgte mit 150 pmol. Da durch die Optimierung der HPLC-Aufreinigung viel Probenmaterial benötigt wurde, wurde zur ESI-Messung des Volllängenproduktes **Bio-RNA1-5^{NPE}** mit Rene Zangl (AK Morgner, Goethe-Universität Frankfurt) eine direkte Injektion der Probe versucht. Bei dieser Methode kann im Vergleich mit weniger Material gearbeitet werden. Leider konnte bei diesen Messungen in RNase-freiem Wasser sowie in HFIP/MeOH kein Produktsignal detektiert werden. Die restliche Probe (~400 pmol) wurde daher, wie alle Proben zuvor, an einem *Bruker micrOTOF-QII* Gerät mit vorgeschalteter RP-HPLC (Säule: *XBridge Peptide BEH C18*, 2,1x250 mm, 300 Å, 3,5 µm) im Negativmodus vermessen. Durch die vorgeschaltete HPLC-Säule fand ein weiterer Aufreinigungsschritt statt. Dies erforderte allerdings auch mehr Probenmaterial als direkte Injektionen. Das dekonvolutierte Massenspektrum zeigte sowohl die durchschnittliche, als auch die exakte Masse des Volllängenproduktes an. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis könnte durch Einsatz von mehr Probenmaterial, welches nach allen Versuchen nicht in ausreichender Menge vorhanden war, verbessert werden. Dennoch konnte das 77mer und auch die vier eingebauten NPE-Schutzgruppen bestätigt werden.

Bei der Synthese längerer modifizierter RNAs (> 77nt) sollten alternative Analysemethoden, wie Sequenzierung oder durch Fragmentierung, zum Nachweis des Produktes zum Einsatz kommen. Insgesamt stellte somit nicht nur die Synthese, sondern auch die Analytik längerer modifizierter RNAs eine Herausforderung dar. Die Kombination beider Methoden, der chemischen Festphasensynthese und der chemo-enzymatischen Synthese, bot die Möglichkeit mögliche Probleme zu umgehen, indem die Stärken der jeweiligen Methode ausgenutzt wurden. Während kurze Fragmente in hoher Ausbeute und Reinheit schnell und kostengünstig chemisch hergestellt werden können, bietet die chemo-enzymatische Methode Zugang zu längeren positionsspezifisch-modifizierten RNAs. Zur Herstellung größerer Mengen modifizierter RNA (beispielsweise für NMR-Messungen) sollten bevorzugt viele Reaktionsansätze mit niedrigerer Konzentration umgesetzt und nach Abschluss der Synthese vereint werden. Der Einsatz magnetischer Beads als feste Phase erleichtert und verkürzt einzelne Arbeitsschritte. Die Beads sind darüber hinaus robust gegenüber einem weiten Bereich an Reaktionsbedingungen. Wurde das biotinylierte Produkt freigesetzt, konnten sie sogar nach einigen Waschschritten mit Lagerungspuffer wiederverwendet werden.

Neben einem konvergenten Syntheseverlauf und der Kombination aus chemischen und enzymatischen Methoden, besteht eine weitere interessante Option zur Verbesserung der chemo-enzymatischen Synthese durch den Einsatz einer alternativen Ligase. Tanaka *et al.* präsentierten 2011 die RtcB Ligase aus *E. coli*, die an Reparaturmechanismen beteiligt ist und 3'-phosphorylierte Enden mit 5'-Hydroxygruppen in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen und GTP als Cofaktor verknüpft.^[139,140,416] Damit arbeitet diese Ligase in die entgegengesetzte Richtung im Vergleich zu den verwendeten T4 RNA Ligasen 1 und 2. Der Einsatz der RtcB Ligase würde die chemo-enzymatische RNA-Synthese in zwei Punkten vereinfachen: 1.) nur zuvor enzymatisch verlängerte RNA-Fragmente weisen eine 3'-terminale Phosphatgruppe auf, die mit RtcB Ligase umgesetzt werden kann. Somit können keine unerwünschten unmodifizierten Nebenprodukte entstehen; 2.) der Ablauf der chemo-enzymatischen Syntheseroute würde sich um einen Reaktionsschritt (die 3'-Dephosphorylierung mit rSAP) verkürzen und eine Phosphorylierung des zweiten zu verknüpfenden RNA-Fragmentes wird überflüssig. Leider konnte in Testligationen kein Umsatz des 3'-lichtaktivierbaren RNA-Fragments **Bio-RNA1-C^{NPE}-p** mit **5'OH-RNA2** durch RtcB Ligase erreicht werden. Weitere Untersuchungen mit dieser Ligase wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht

verfolgt, sollten aber in Zukunft zur weiteren Optimierung der chemo-enzymatischen RNA-Synthese in Betracht gezogen werden.

3.2.1 Synthese einer RNA mit Azobenzol- und NPE-Modifikation

Neben einheitlich NPE- oder Azobenzol-modifizierten RNAs wurde auch getestet, ob beide Arten lichtadressierbarer Modifikationen chemo-enzymatisch in einer Sequenz vereint werden können. Sequenzen, die sowohl photolabile NPE-Schutzgruppen als auch photoschaltbare Azobenzol-C-Nukleoside beinhalten, könnten für Untersuchungen funktionaler RNAs interessant sein. Allerdings sollte bei der Planung der Experimente bedacht werden, dass eine lichtinduzierte *trans/cis*-Isomerisierung des Azobenzols bei etwa 350 nm zu einer Abspaltung der NPE-Schutzgruppen führt. Doppelt modifizierte RNAs könnten dennoch beispielsweise so konzipiert werden, dass zunächst eine Interaktion mit einer komplementären Sequenz durch photolabile Schutzgruppen blockiert wird. Nach Abspaltung der NPEs und der daraus resultierenden Hybridisierung der modifizierten RNA mit einer Zielsequenz könnte die Interaktion durch Isomerisierung des Azobenzols reversibel reguliert werden.

Für die doppelte Modifizierung wurde eine Festphasen-gebundene Splint-Ligation mit **Bio-RNA1-*mAzo*** (8 μ M) und **5'p-RNA2-U^{NPE}** (16 μ M) in Gegenwart von **DNA1** (8 μ M) mit Rnl2 durchgeführt. Eine Analyse des Splint-Ligationsansatzes zeigte einen Umsatz der Edukte von 73% an. Damit lag die Ligationsausbeute leicht unter denen der rein photoschaltbaren oder photolabil geschützten Splint-Ligationen (siehe Abschnitt 3.2.2.3). Nach 4 h Ligationszeit und einem Abbau des DNA-Splints konnte der Reaktionsansatz mittels RP-HPLC aufgereinigt und das zweifach-modifizierte Produkt **Bio-RNA1-*mAzo*-RNA2-U^{NPE}** isoliert werden. Der Einbau der photolabilen Schutzgruppe und des Photoschalters konnte auch massenspektrometrisch bestätigt werden (Abb. 77).

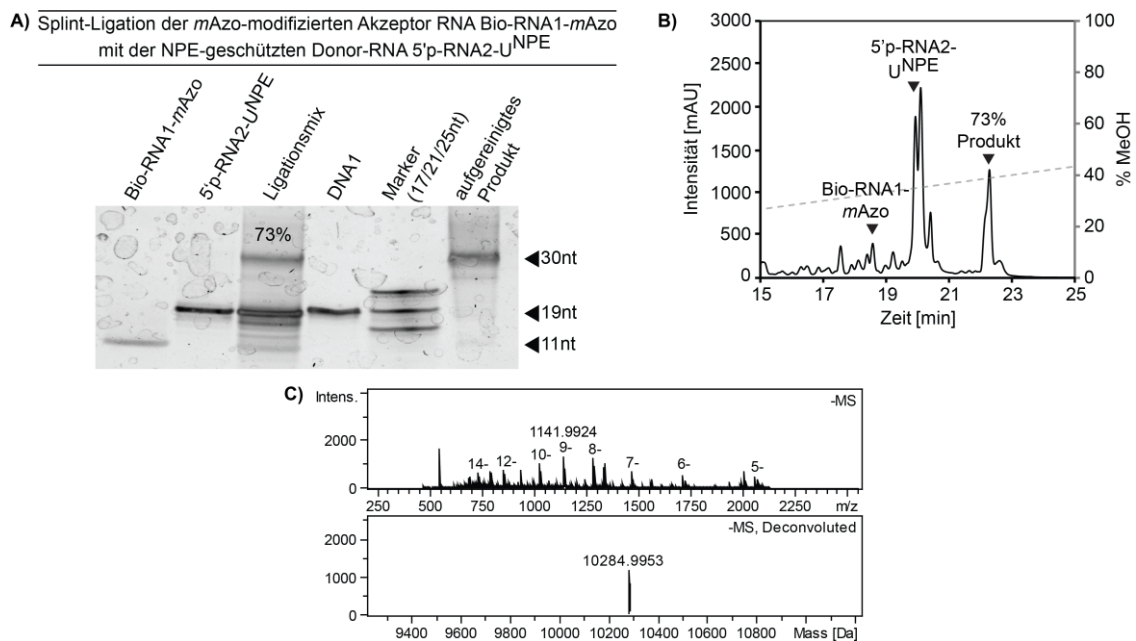


Abb. 77: Splint-Ligation der Azobenzol-modifizierten RNA **Bio-RNA1-*mAzo*** mit **5'p-RNA2-U^{NPE}**. A) Denat. PAGE der Splint-Ligation. B) Relevanter Ausschnitt des RP-HPLC-Chromatogramms der Aufreinigung des Splint-Ligationsansatzes (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 4 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). C) Fragmentiertes (oben) und deconvolutes (unten) Massenspektrum von **Bio-RNA1-*mAzo*-RNA2-U^{NPE}** (berechnete Masse = 10283,5).

3.2.2 Synthese einer wellenlängenselektiv adressierbaren RNA

Das in Kapitel 3.1.3 synthetisierte **pU^{DEACM}p 43** wurde verwendet, um die Festphasen-basierte chemo-enzymatische Synthese einer wellenlängenselektiv ansprechbaren RNA zu zeigen. Hierzu wurde **RNA2** im ersten Schritt mit **43** unter Verwendung von *T4* RNA Ligase 1 am 3'-Ende verlängert. Angelehnt an die Verlängerungen mit **pN^{NPE}p** wurde ein **RNA:pU^{DEACM}p**-Verhältnis von 1:3 gewählt. Die Ligationsreaktionen wurden in mehreren Ansätzen im 100 µL-Maßstab (50 µM **RNA2**) für 3 h in Lösung durchgeführt. Dabei konnte das Produkt zu 91% erhalten werden (Abb. 78A). Nach RP-HPLC-Aufreinigung wurde das Lösungsmittel mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators bei 4 °C entfernt und das Ligationsprodukt mit *T4* PNK rephosphoryliert. In diesem Schritt wird die Phosphatgruppe am 3'-Ende der DEACM-modifizierten **RNA2-U^{DEACM}-p** abgespalten und gleichzeitig das 5'-Ende phosphoryliert. In einer anschließenden Bead-gebundenen Splint-Ligation wurde das zuvor bereits verwendete **Bio-RNA1-C^{NPE}** mit dem hergestellten **5'-p-RNA2-U^{DEACM}** in Gegenwart des DNA-Splints **DNA1** (Verhältnis 1:1:1, jeweils 8 µM Oligo) verbunden. Die Reaktionslösung wurde mit Rn12 für 3.5 h bei 37 °C in DNA Ligase Puffer inkubiert. Nach DNase-Verdau wurde das Reaktionsgemisch mittels denat. PAGE analysiert (Abb. 78B). Die Bildung des Produktes konnte zu 49% gezeigt werden. Um Belichtungstests und die selektive Abspaltung der beiden photolabilen Schutzgruppen zu untersuchen, wurden überschüssige Reagenzien durch einen Waschschrift entfernt, bevor das Ligationsprodukt durch Erhitzen der Beads gelöst und RP-HPLC-aufgereinigt wurde.

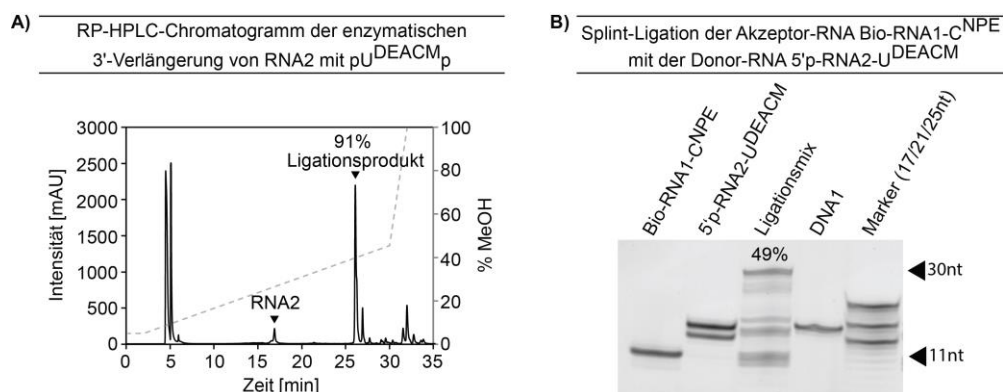


Abb. 78: Einbau einer DEACM-Schutzgruppe und Kombination mit einer NPE-modifizierten RNA. A) RP-HPLC-Chromatogramm der 3'-Verlängerung von **RNA2** mit **pU^{DEACM}p**. (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C) B) 20% denat. PAGE der Splint-Ligation von **Bio-RNA1-C^{NPE}** mit **5'-p-RNA2-U^{DEACM}**.

Nach HPLC-Aufreinigung konnte das zweifach photolabil-geschützte RNA-30mer **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{DEACM}** massenspektrometrisch identifiziert und so der Einbau beider Schutzgruppen bestätigt werden. Es folgten Belichtungen, um die selektive Abspaltung der DEACM- und der NPE-Schutzgruppe zu zeigen. Für eine wellenlängenselektive Freisetzung ist es entscheidend, dass sich die Absorptionsspektren der verwendeten Schutzgruppen möglichst nicht überschneiden, um eine sequentielle (Re-) Aktivierung zu erreichen. Da die DEACM-Schutzgruppe bathochrom-verschoben zur NPE-Schutzgruppe und zudem deutlich labiler ist, wurde sie zuerst photolytisiert, bevor die NPE-Schutzgruppe abgespalten wurde. Belichtungsexperimente fanden mit HPLC-aufgereinigtem Ligationsprodukt (blaues Chromatogramm, Abb. 79) in einer 100 µL Küvette statt. Hierbei wurde die zweifach photolabil-geschützte RNA (5 µM, 100 µL) zunächst für 3 min bei 455 nm (500 mA) belichtet. Es resultierte das nun nur noch NPE-geschützte RNA-30mer (rotes Chromatogramm), welches ebenfalls durch Massenspektrometrie bestätigt werden konnte. Die Abspaltung der DEACM-Schutzgruppe kann als selektiv beurteilt werden, da nach dieser Belichtung kein vollständig

entschütztes Nebenprodukt detektiert werden konnte. Die zweite Belichtung zur Abspaltung der NPE-Schutzgruppe fand bei 365 nm (700 mA, 10 min) statt und konnte ebenfalls massenspektrometrisch bestätigt werden.

In Tabelle 2 sind die (modifizierten) Sequenzen sowie die berechneten und die gemessenen Massen zusammengefasst. Die in Abb. 79 abgebildeten Massenspektren und RP-HPLC-Chromatogramme belegen die selektive Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen. Jede Abspaltung führt zu einer Änderung der Retentionszeit, was eine Separation der einzelnen Fragmente erlaubt.

Tabelle 2: Bezeichnung, Sequenzen sowie berechnete und gemessene Massen der NPE- und DEACM-geschützten RNA-Proben vor und nach Belichtung.

Oligo	Sequenz 5'→3'	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
Bio-RNA1 ^{NPE} -RNA2 ^{DEACM}	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC ^{NPEU} CAG UUG GUU AGA GCA CAU ^{DEACM}]-OH-3'	10441,6	10443,0
Bio-RNA1 ^{NPE} -RNA2	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC ^{NPEU} CAG UUG GUU AGA GCA CAU]-OH-3'	10212,5	10212,7
Bio-RNA1-RNA2	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU]-OH-3'	10063,4	10063,8

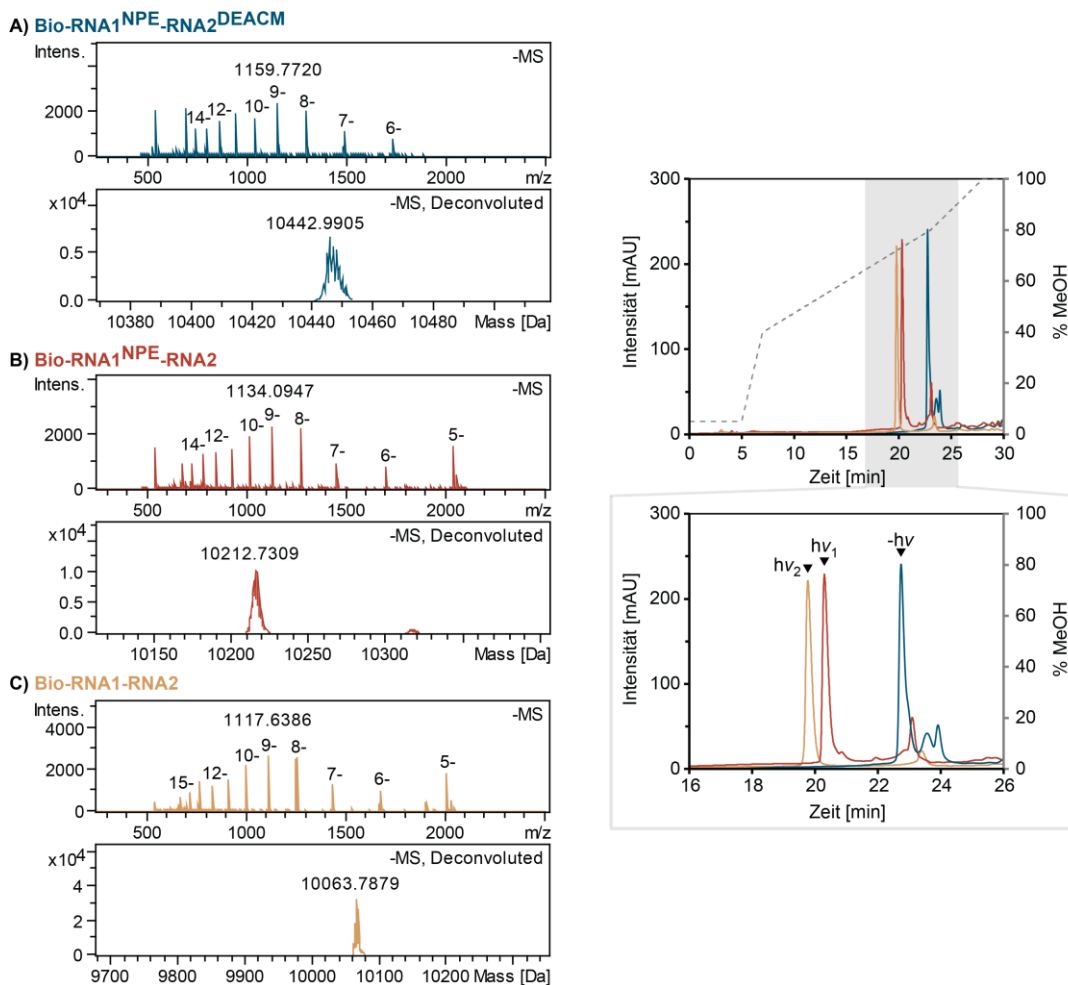


Abb. 79: Massenspektrometrische Analyse des DEACM- und NPE-geschützten 30mers vor Belichtung (A, -hv, berechnete Masse = 10441,6) sowie nach Abspaltung der DEACM-Schutzgruppe (B, hv₁, berechnete Masse = 10212,5) und einer zweiten Bestrahlung zur Photolyse der NPE-Funktion (C, hv₂, berechnete Masse = 10063,4). Rechts: Übereinandergelagerte RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach Belichtung.

Der Einsatz zweier photolabil-geschützter Nucleosid-3',5'-Bisphosphate in Kombination mit einer chemo-enzymatischen RNA-Synthese eröffnet den Zugang zu längeren funktionalen RNAs, die durch geschickte Platzierung der photolabilen Schutzgruppen zumindest zweistufig irreversibel adressiert werden können. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Schutzgruppen entwickelt und untersucht, die inzwischen weite Bereiche des UV/vis-Spektrums abdecken. Durch die Synthese weiterer photolabiler Bisphosphate könnten deutlich komplexere RNAs und deren Funktionen untersucht werden. Zusätzlich verdeutlicht der Einbau des DEACM-geschützten Uridin-Bisphosphates, dass durch den chemo-enzymatischen Syntheseansatz Modifikationen zugänglich werden, deren Einbau durch eine chemische Festphasensynthese verwehrt bleibt.

3.2.3 Ligation eines Dinucleotids mit photospaltbarem Rückgrat

Der chemo-enzymatische Einbau lichtadressierbarer Nucleosid-3',5'-Bisphosphate konnte umfangreich gezeigt werden. Die bisher präsentierten modifizierten RNAs waren alle durch die Positionierung der photolabilen Schutzgruppe an der Nucleobase auf Watson-Crick-Franklin-Basenpaarseite modifiziert. Diese Art der Modifikation ermöglicht eine lichtadressierbare Regulierung der Hybridisierung mit komplementären Oligonucleotiden oder eine Beeinflussung der Ausbildung intramolekularer Sekundärstrukturen. Eine andere Art der Positionierung photolabiler Schutzgruppen ist deren Einbau in das Zucker-Phosphatrückgrat. An dieser Stelle eingebaut, kann ein lichtinduzierter Strangbruch herbeigeführt werden. In der Literatur finden sich einige Beispiele, wie die Struktur und Funktion durch solche Strangbrüche beeinflusst werden kann.^[233,304,308,417] Bisher war nicht bekannt, ob die verwendeten Enzyme photolabile Schutzgruppen innerhalb des Rückgrates von RNAs akzeptieren. Die Interaktion der Ligasen mit Oligonucleotiden findet über das Rückgrat statt (siehe Kristallstrukturen in Abb. 4). Daher war es fraglich, ob eine Modifikation in diesem für das Enzym wichtigen Bereich toleriert wird.

Die kleinste mögliche Einheit, die über einen photolabilen Linker im Zucker-Phosphatrückgrat verknüpft werden kann, ist ein Dinucleotid. Angelehnt an Nucleosid-3',5'-Bisphosphate wurde ein 3',5'-phosphoryliertes Dinucleotid mit photospaltbarem NPP-Linker zwischen den beiden Nucleotiden synthetisiert. Die Synthese dieser photospaltbaren Einheit wurde unter Verwendung der entsprechenden Phosphoramidite mittels chemischer Festphasensynthese durchgeführt. Dabei wurden auch die beiden terminalen Phosphatgruppen eingeführt.

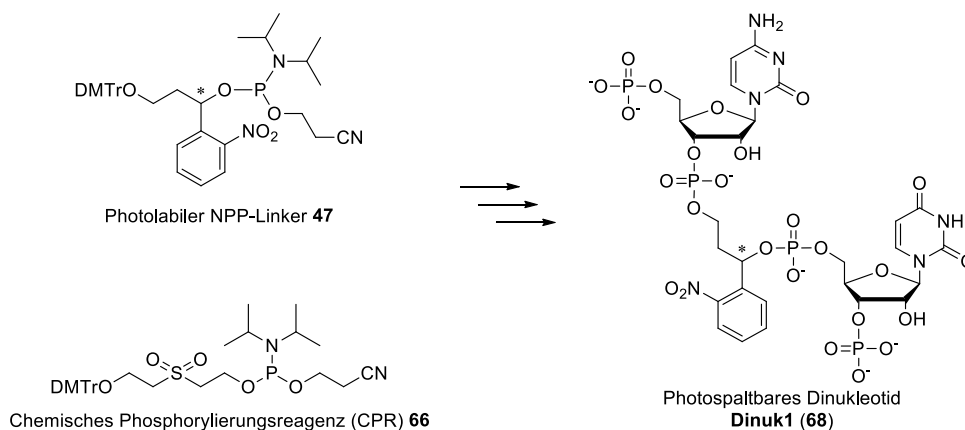


Abb. 80: Strukturen der verwendeten Phosphoramidite zur Synthese des photospaltbaren Dinucleotids **68**.

Bei den beiden verbrückten Nukleotiden handelt es sich um Position 11 (C) und 12 (U) der Sequenz des tRNA-Derivats. Somit konnte für Ligationstests das erste RNA-Fragment **Bio-RNA1** beibehalten werden. Das in der chemischen Festphasensynthese eingesetzte Phosphorylierungsreagenz konnte unter UltraMILD-Bedingungen verwendet werden. Da die Sulfonylethylbindungen im Laufe der ammoniakalischen Abspaltung zusammen mit den exozyklischen Schutzgruppen gespalten werden, konnte ein günstiges DNA-CPG verwendet werden. Nach erfolgter Abspaltung, konnte das Dinukleotid unter Standardbedingungen mittels RP-HPLC aufgereinigt werden. Auf eine Aufreinigung *via* Ionenaustauschchromatographie wurde aufgrund des geringen Molekulargewichtes (< 1000 Da) des Dinukleotids verzichtet, um Materialverlust bei der Aufreinigung und Entsalzung nach Verwendung des Hochsalzpuffers zu vermeiden. Längere Oligonukleotide wurden nach IA-Chromatographie durch Verwendung von Zentrifugenfiltern (1000 bzw. 3000 MWCO) gewaschen und so entsalzt. Durch seine geringe Größe wäre das hergestellte Dinukleotid ebenfalls durch die Membran gespült worden. Bei Verwendung einer kleinporigeren Membran hätte der Vorgang des Entsalzens einen höheren zeitlichen Aufwand als eine RP-HPLC-Aufreinigung bedeutet. Die Identität und Reinheit von **Dinuk1** konnte nach RP-HPLC-Aufreinigung massenspektrometrisch bestätigt werden. Anschließend wurde die Streptavidin-gebundene 3'-Verlängerung von **Bio-RNA1** um das photospaltbare **Dinuk1** analog zu den bisherigen Reaktionen mit *T4* RNA Ligase 1 untersucht. Hierzu wurde das erste RNA-Fragment (25 µM) an magnetischen Streptavidin Beads immobilisiert und in RNA Ligase 1 Puffer resuspendiert. Das hergestellte **Dinuk1** wurde im dreifachen Überschuss (75 µM) hinzugefügt. Finale Reaktionsvolumina betragen 50 µL. Zur Ligation wurden auch bei diesen Versuchen 5% (v/v) *T4* RNA Ligase 1 eingesetzt und die Ansätze für 4 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Nach einem Waschschrift und Pufferaustausch wurde ein Aliquot dieser Reaktion mittels RP-HPLC analysiert und das 3'-verlängerte Produkt analysiert. Die Ligationsreaktion zeigte Ausbeuten von 69%. Damit konnte gezeigt werden, dass Rnl1 3',5'-phosphorylierte Dinukleotide auch dann als Substrate akzeptiert, wenn diese im Zucker-Phosphatrückgrat modifiziert wurden. Auch die verwendete *Shrimp Alkaline Phosphatase* toleriert die Modifikation. Ähnlich zu den 3'-Dephosphorylierungen der Nukleobasen-modifizierten RNAs konnte hier nach 3 stündiger Reaktion eine 98%ige Abspaltung der 3'-endständigen Phosphatgruppe erreicht werden.

Der entscheidende Schritt um die terminale Modifikation in eine nutzbare interne Strangbruchstelle zu verwandeln, war auch hier die Splint-Ligation mit *T4* RNA Ligase 2. Hierzu wurde **Bio-RNA1-Dinuk1** mit **5'p-RNA2** in Gegenwart von **DNA1** und Rnl2 in einer Streptavidin-gebundenen Splint-Ligation umgesetzt. Auch wenn durch das zweite Nukleotid des photospaltbaren Dinukleotids im Vergleich zu den vorherigen Splint-Ligationen ein zusätzliches Nukleotid eingeführt wurde, wodurch eine Fehlstelle bei der Hybridisierung mit dem verwendeten DNA-Splint **DNA1** entstanden ist. Um dennoch eine gute Hybridisierung zu erzielen, wurde die Ligationstemperatur auf 25 °C gesenkt und die Inkubationszeit auf 6 h erhöht. So konnte ein sehr guter Umsatz des modifizierten Fragments beobachtet werden. Die Ausbeute für **Bio-RNA1-Dinuk1-RNA2** lag mit 81% im oberen Bereich. Sie ist mit der Ausbeute der Splint-Ligation des terminal Nukleobasen-geschütztem RNA-Fragments nahezu identisch. Dies bestätigt, dass die beiden RNA-Fragmente 1 und 2 prinzipiell gut von der Ligase akzeptiert werden, was ideale Voraussetzungen für die Modifikation dieser beiden Fragmente zu sein scheint. Das Ligationsprodukt konnte isoliert und der Einbau der Rückgratmodifikation massenspektrometrisch bestätigt werden Abb. 81.

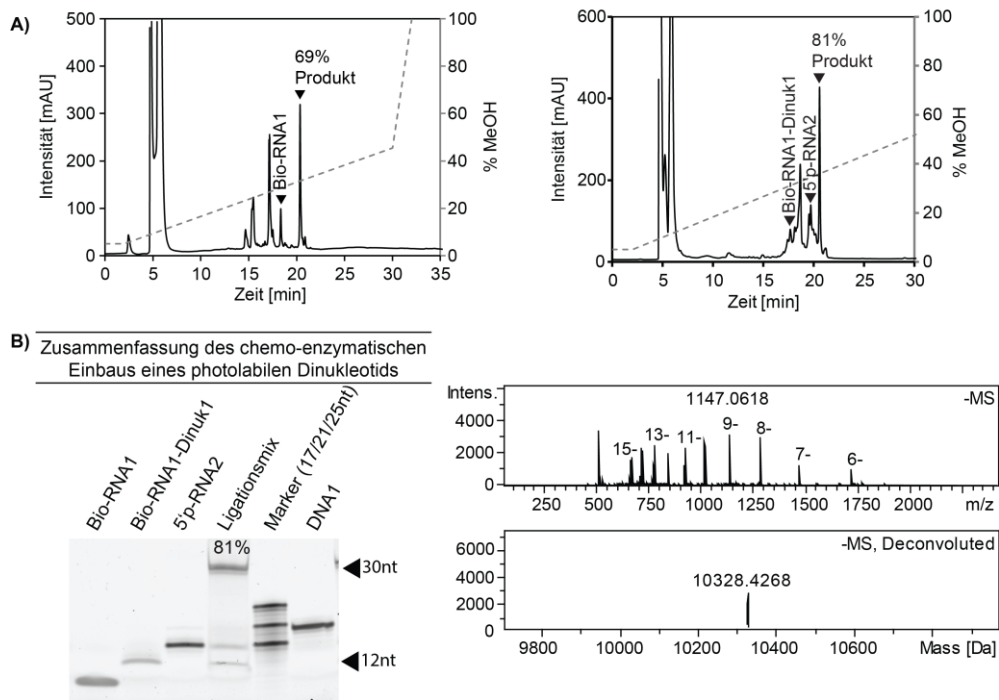


Abb. 81: Zusammenfassung des chemo-enzymatischen Einbaus eines Dinucleotids mit photolabilem NPP-Linker im Rückgrat. A) RP-HPLC-Chromatogramme nach 3'-Verlängerung (links, Säule 1, Gradient 1) und Splint-Ligation von **Bio-RNA1-Dinuk1** mit **5'-p-RNA2** (rechts, Säule 1, Gradient 4). B) 20% denat. PAGE der Splint-Ligation des Rückgrat-modifizierten Fragments sowie massenspektrometrische Analyse des Ligationsproduktes (berechnete Masse = 10327,4).

Mit dem Einbau des photospaltbaren Linkers in das Zucker-Phosphatrückgrat des 30mers konnte die chemo-enzymatische Methode um eine wichtige Strategie erweitert werden. Zusätzlich verdeutlicht der Einbau nochmals die Toleranz der verwendeten Enzyme. Der Einbau photolabiler Rückgratmodifikationen sollte an weiteren Sequenzen und ebenso mit weiteren Modifikationen untersucht werden. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob sterisch anspruchsvollere Veränderungen des Rückgrates in dieser geringen Distanz zur Ligationsstelle die Interaktion mit dem Enzym stören. Die entwickelte Methode wird hierdurch noch vielseitiger einsetzbar. Durch Abspaltung photolabiler Schutzgruppen auf Watson-Crick-Franklin-Basenparseite kann eine Hybridisierung mit einem komplementären Gegenstrang ermöglicht werden. Im Gegensatz dazu, kann die Spaltung eines photolabil-modifizierten Rückgrates die Dissoziation oder Verdrängung der kürzeren Fragmente herbeiführen, wodurch der komplementäre Gegenstrang freigegeben wird. Da beide Strategien chemo-enzymatisch umsetzbar sind, kann die Methode ein noch breiteres Anwendungsgebiet bedienen.

3.2.4 Chemo-enzymatische Zyklisierung photospaltbarer RNA

Dieses Teilprojekt baut auf den Erkenntnissen des vorherigen Abschnitts auf und zeigt, wie chemo-enzymatisch eingeführte photospaltbare Dinucleotide in funktionale Oligonucleotide eingebracht werden können. Oliver Pereira synthetisierte im Rahmen seiner von mir betreuten Masterarbeit weitere photospaltbare Dinucleotide und untersuchte deren chemo-enzymatischen Einbau in RNAs. Besonders die Synthese zyklischer RNA mit photospaltbarem Rückgrat-Linker stand dabei im Fokus.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 erläutert, stellen zyklische RNAs eine ganz eigene Klasse relevanter Oligonukleotide dar. Aufgrund ihrer Struktur besitzen sie eine höhere Resistenz^[138,182] gegenüber Nukleasen und (bei geeigneter Größe) eine geringere Interaktionsfähigkeit^[196,205] mit komplementären Sequenzen. In der betreuten Masterarbeit sollte daher untersucht werden, ob RNAs nach 3'-Verlängerung um photospaltbare Dinukleotide anschließend mit *T4* RNA Ligase 1 zyklisiert werden können. Nach Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge würde der Linker gespalten und die RNA relinearisiert und reaktiviert werden. Nachdem Seyfried *et al.* 2017 erfolgreich die kupferkatalysierte DNA-Zyklisierung über photolabil-geschützte Nucleobasen^[196] zeigen konnten, stellt ein enzymatisches Vorgehen zur Zyklisierung Rückgrat-modifizierter RNA eine alternative Synthesestrategie zyklischer Oligonukleotide dar, die eine effiziente AN/AUS-Regulierung erlauben. Eine alternative wirksame Unterdrückung der Hybridisierung mit einer Zielsequenz kann auch durch den Einbau mehrerer photolabiler Schutzgruppen erreicht werden. Allerdings erfordert die vollständige Abspaltung zur Freisetzung dann häufig längere Belichtungszeiten und höhere Strahlungsintensitäten, wodurch die zeitliche Auflösung eingeschränkt und ein biologisches System geschädigt werden kann. Durch Zyklisierung des Oligonukleotids wird die benötigte Anzahl an PPGs auf ein Minimum reduziert. Zusätzlich bietet eine enzymatische Durchführung Zugang zu zyklischen RNAs unter nativen Bedingungen. Die Verwendung von zellschädigenden Reagenzien, wie Kupferspezies oder deren Stabilisatoren, kann umgangen und ein Abbau von RNA reduziert werden. Angelehnt an Arbeiten von Wu *et al.*^[187] sollte ein photolabiler Linker mit Hilfe von Enzymen in das Rückgrat einer 20 Nucleobasen langen RNA eingebaut werden, die anschließend durch Ligation zyklisiert werden sollte. Wu *et al.* konnten den chemischen Einbau des NPP-Linkers in eine funktionale zyklische *antisense*-RNA zeigen. Es gelang ihnen, die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (*Green Fluorescent Protein*, GFP) durch Bestrahlung des Linkers und damit Linearisierung des Oligonukleotids zu unterdrücken (Abb. 82).^[187] Die zu modifizierende Sequenz und die gewählten Schnittstellen, die für die hier gezeigten Untersuchungen gewählt wurden, entsprechen der publizierten Sequenz PS1 aus Wu *et al.*.

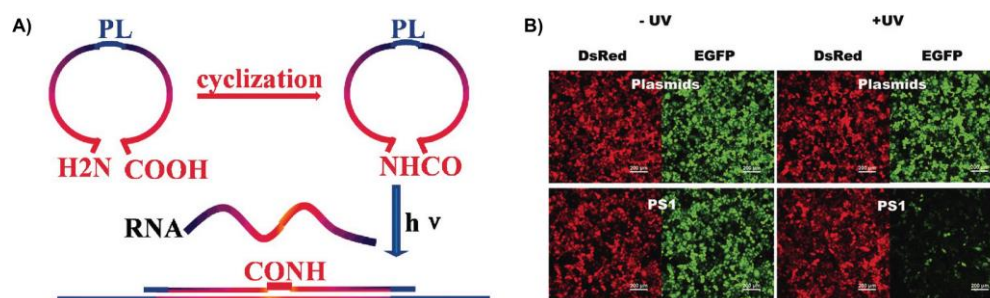


Abb. 82: Zyklisierung photospaltbarer RNA nach Wu *et al.*. A) Prinzip der Modifikation und Zyklisierung. B) Auswirkung des modifizierten Oligonukleotids auf die GFP-Expression vor Belichtung (links, zyklische RNA) und nach Belichtung (rechts, lineare RNA). DsRed wurde als zellinterner Standard verwendet. Das linearisierte Oligonukleotid PS1 reduziert die GFP-Expression. Aufnahmen der Plasmide dienen als Referenz. Nachdruck mit Erlaubnis^[187] (© 2012, Die Autoren, veröffentlicht über *Oxford University Press*)

Zunächst wurden analog zu dem bereits vorgestellten **Dinuk1** zwei weitere photospaltbare Dinukleotide synthetisiert. Dabei enthielt eines einen NPP-Linker (**Dinku2**, 69, 5'-p-r[C(NPP-Linker)C]-p-3') und das zweite einen DEACM-Linker (**Dinuk3**, 71, 5'-p-r[C(DEACM-Linker)G]-p-3') (Abb. 83). Der verwendete NPP-Linker wurde über *LGC Link* bezogen. Zur Synthese des DEACM-Linkers wurde das direkte Vorläufermolekül freundlicherweise von Robin Klimek (AK Heckel, Goethe-Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Nach der Umsetzung zum finalen Phosphoramidit nach Literaturvorschrift^[308,418], konnten beide Linker unter UltraMILD-

Bedingungen analog zu dem in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Vorgehen in zwei Dinukleotide eingebaut werden. Die Phosphorylierung des 3'- und des 5'-Endes erfolgte erneut während der chemischen Festphasensynthese unter Verwendung von CPR **66**.

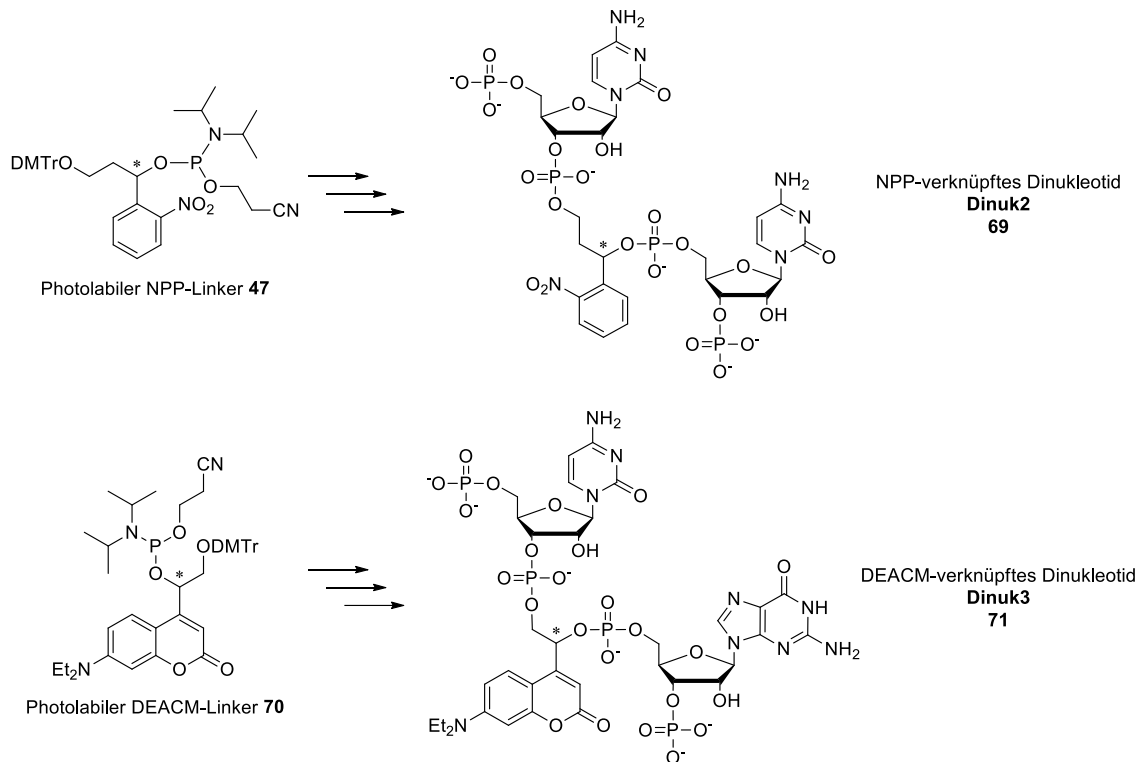


Abb. 83: Strukturen der verwendeten photolabilen Phosphoramidite und der hergestellten Dinukleotide. **Dinuk2** ist durch einen NPP-Linker im Rückgrat verknüpft. **Dinuk3** wurde mit einem DEACM-Linker synthetisiert.

Bei der zu modifizierenden RNA handelte es sich um ein 20mer. Dieses wurde zunächst unmodifiziert als native (Kontroll-) Sequenz (**nat-20mer**, 5'-r[CUC CUC GCC CUU GCU CAC CG]-3') synthetisiert, aufgereinigt und charakterisiert. Nach enzymatischer Phosphorylierung des 5'-Endes mit PNK folgten erste Zyklisierungsversuche der nativen Sequenz durch *T4* RNA Ligase 1 angelehnt an Literaturvorschriften^[412]. Die Zyklisierung erfolgte in kleinen Maßstäben (50 μ L, 5 μ M RNA) bei 17 $^{\circ}$ C, um polymerisierte Nebenprodukte zu vermeiden. Die herabgesetzte Reaktionstemperatur verringert die Aktivität des Enzyms, begünstigt aber in Kombination mit der eingesetzten niedrigen RNA-Konzentration die intramolekulare Reaktion des 5'-Phosphats mit der 3'-ständigen Hydroxygruppe. Die Umsetzung des linearen **nat-20mer** zu einer zyklischen RNA **circ-20mer** konnte sowohl über denat. PAGE, als auch über RP-HPLC und Massenspektrometrie bestätigt werden. Zyklisierungsansätze mit zusätzlichen 10% (v/v) DMSO zeigten im Vergleich zu Ansätzen ohne DMSO-Zusatz bessere Ausbeuten von 38-97%. Unerwünschte Nebenprodukte konnten unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet werden. Das lineare Edukt zeigte sowohl bei der chromatographischen Aufreinigung als auch bei der gelelektrophoretischen Analyse ein langsames Elutions-/Migrationsverhalten als die kompaktere zyklische RNA. Hierdurch konnte eine gute Separation von Eduktes und Produkt erreicht werden (Abb. 84).

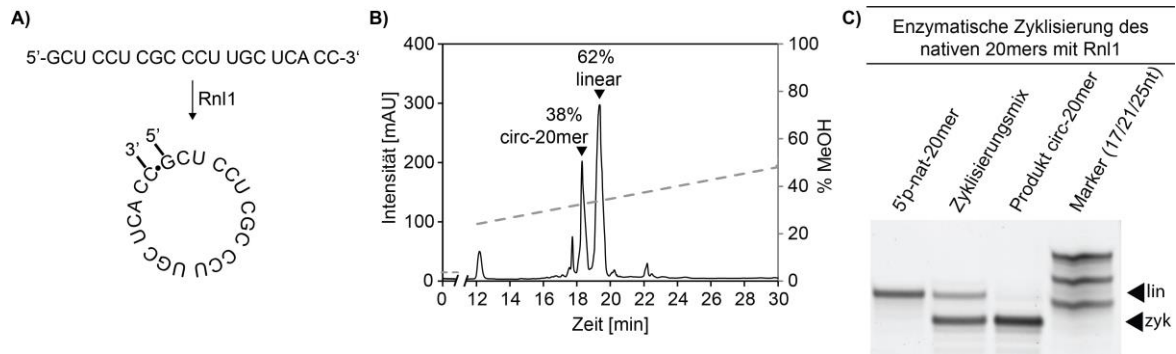


Abb. 84: Enzymatische RNA-Zyklisierung mit Rnl1. A) Schematische Darstellung der linearen und zyklischen Sequenz. B) Exemplarisches RP-HPLC-Chromatogramm der Auftrennung der linearen und zyklischen RNA (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C) und C) Denat. PAGE der Zyklisierungsreaktion mit Rnl1 (HPLC und PAGE von Oliver Pereira durchgeführt).

In der massenspektrometrischen Analyse war eine Unterscheidung der beiden Spezies ebenfalls möglich, da sich die Masse des zyklischen Produktes um eine OH-Gruppe (-18 Da) unterscheidet. Aufgrund der Kürze der untersuchten Sequenz ist diese Massendifferenz gut nachweisbar. Ein weiterer Nachweis des Produktes wäre durch Zugabe von Exonukleasen denkbar, da die zyklische RNA stabil gegenüber diesen sein sollte, was in einem RNase-Assay verdeutlicht werden kann. Da Enzym-Assays allerdings einiges an zeitaufwendiger Optimierung und noch dazu ausreichend Probenmaterial beanspruchen und diese Fragestellung nicht im Fokus der Masterarbeit stand, wurde an dieser Stelle auf diesen zusätzlichen Nachweis verzichtet. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die unmodifizierte RNA unter den gewählten Bedingungen reproduzierbar zyklisierbar war, wurde untersucht, ob diese Ergebnisse auch erzielt werden können, nachdem das 3'-Ende chemo-enzymatisch um ein photosplaltbares Dinukleotid erweitert wurde.

Die chemo-enzymatische 3'-Verlängerung einer RNA um ein NPP-verknüpftes Dinukleotid konnte bereits zuvor (siehe Abschnitt 3.2.3) gezeigt werden. Auf diesen Erkenntnisse aufbauend, wurde versucht **nat-20mer** zunächst um **Dinuk2** zu erweitern. Oliver Pereira setzte das 20mer im optimierten Verhältnis von 1:3 mit dem NPP-Dinukleotid um und konnte nach 4 h Ligation Ausbeuten von 88% verzeichnen. Des Weiteren konnte auch der 3'-terminale Einbau des DEACM-Dinukleotids **Dinuk3** (95%) umgesetzt werden (Abb. 85). Somit konnte nicht nur die Verlängerung einer weiteren Sequenz und die Akzeptanz eines zweiten NPP-Dinukleotids gezeigt, sondern auch der Einbau einer geringfügig sterisch anspruchsvolleren DEACM-Rückgratmodifikation nachgewiesen werden. Zusätzlich besteht dadurch auch für geplante Strangbruchexperimente eine Möglichkeit der bathochrom-verschobenen Anregung und wellenlängenselektiven Spaltung von RNAs.

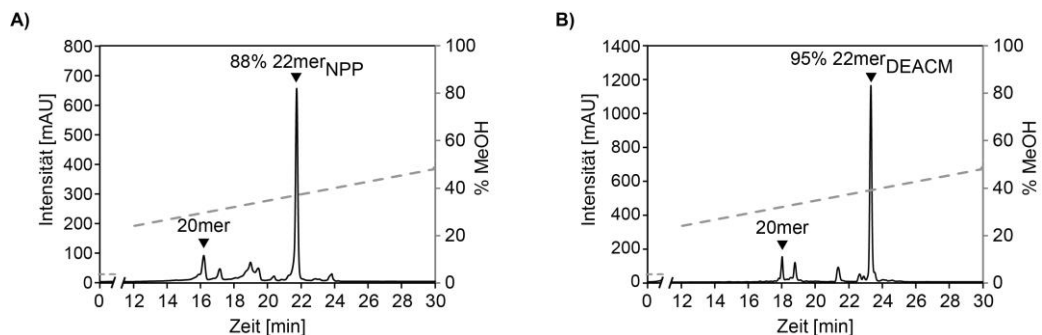


Abb. 85: Enzymatische 3'-Verlängerung des 20mers um ein NPP-spaltbares (links) und um ein DEACM-spaltbares Dinukleotid (rechts) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C).

Nach erfolgter 3'-Verlängerung wurde auch bei diesen Versuch eine 3'/5'-Rephosphorylierung mit *T4* Polynukleotidkinase durchgeführt. Bei Versuchen **22mer_{NPP}** und **22mer_{DEACM}** unter gleichen Bedingungen wie zuvor mit *T4* RNA Ligase 1 zu zyklisieren, konnte leider nur wenig bis gar kein Umsatz zu zyklischen Produkten beobachtet werden. Eine Reduktion der RNA-Konzentration auf 3 μ M und ein Anheben der Reaktionstemperatur auf 37 °C führte schließlich zu der gewünschten Umsetzung. Die Ausbeuten konnten noch weiter gesteigert werden, in dem die Ligase nach 1 h Rephosphorylierung zu diesem Reaktionsansatz hinzugegeben wurde, ohne vorher die Kinase durch Erhitzen zu deaktivieren. So wurde sichergestellt, dass die Zyklisierungsreaktion nicht durch eine unvollständige 5'-Phosphorylierung eingeschränkt war. Die Zyklisierung der NPP-Sequenz zeigte nach Anpassung der Bedingungen Umsätze von bis zu 80%. Eine Isolierung des zyklischen NPP 22mers **circ-22mer_{NPP}** war ohne weitere Optimierungen unter den zuvor verwendeten Bedingungen möglich. Im Gegensatz dazu führten die Anpassungen der Reaktionsbedingungen zu keiner bemerkenswerten Verbesserung der DEACM-Zyklisierung. Aufreinigungen mittels RP-HPLC zeigten magere Ausbeuten im einstelligen Bereich. Da Analysen des Zyklisierungsansatzes mit DEACM-modifizierter RNA per denat. PAGE deutlich stärkeren Umsatz zu einer Spezies mit dem Migrationsverhalten einer zyklischen RNA zeigten, wurde vermutet, dass das Produkt **circ-22mer_{DEACM}** instabil unter den gewählten Aufreinigungsbedingungen war und in einer Hydrolyse der DEACM-Verbindung resultierte. Bei weiteren Versuchen der Optimierung stellten sich die Ergebnisse der Zyklisierungsreaktion als schlecht reproduzierbar heraus. Eine Isolation des zyklischen Produktes **circ-22mer_{DEACM}** konnte nicht erreicht werden.

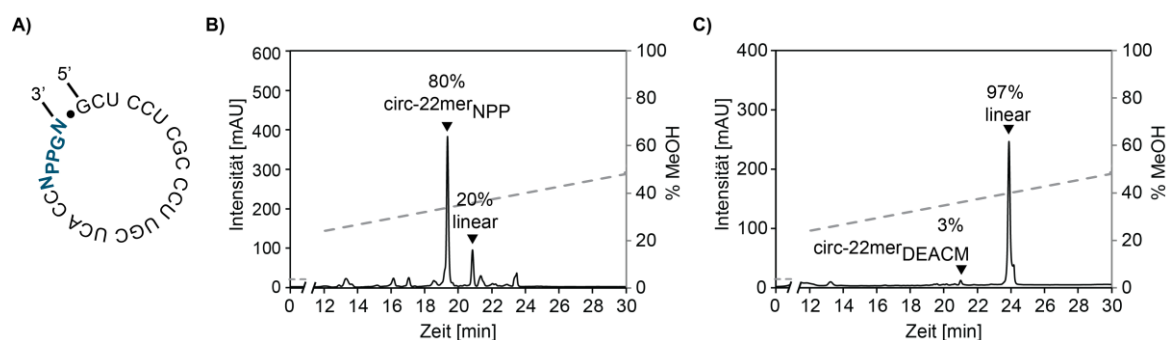


Abb. 86: Auftrennung der enzymatischen Zyklisierungen. A) Schematische Darstellung der photolabilen zyklischen Sequenz (N_{PPGN} = **Dinuk2** bzw. **Dinuk3**) B und C) RP-HPLC-Chromatogramme der NPP- (B) und DEACM- (C) modifizierten zyklischen 22mere (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C).

Eine erste Anwendung des isolierten und charakterisierten zyklischen NPP-Derivats **circ-22mer_{NPP}** wurde durch Fluoreszenzstudien mit einem *Molecular Beacon* getestet. Bei *Molecular Beacons* handelt es sich um Haarnadelstrukturen, die am 3'- und am 5'-Ende ein Fluorophor-Quencher-Paar tragen.^[419] Sie sind so konzipiert, dass sie ohne komplementäre Zielsequenz in einer geschlossenen Form vorliegen, sodass die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe des Quenchers ausgelöscht wird. Bei Hybridisierung mit einer Zielsequenz öffnet sich die Stammstruktur und die Fluoreszenz wird detektierbar. Deshalb werden *Molecular Beacons* als Hybridisierungssonden eingesetzt. Wu *et al.* konnten in ihrer Publikation zeigen, dass ihre RNA nach erfolgter chemischer Zyklisierung nur gering mit der Schleifensequenz eines *Molecular Beacons* interagieren kann. Durch Belichtung bei 365 nm konnte der NPP-Linker gespalten, die RNA relinearisiert und ein Fluoreszenzanstieg durch Interaktion mit dem *Molecular Beacon* detektiert werden.^[187] Da der von Wu *et al.* verwendete *Molecular Beacon* lediglich einen fünffachen Anstieg der Fluoreszenz erzielen konnte und obendrein eine Hintergrundfluoreszenz aufwies, wurde nicht mit diesem Konstrukt gearbeitet. Stattdessen wurde, unterstützt durch *mfold*-Berechnungen^[409] der freien Energie ΔG , ein eigener *Molecular Beacon* designed und per chemischer Festphasensynthese hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die berechnete Stabilität der Stamm-Schleifen-Struktur nicht durch zu starke

Hybridisierung der Stammregion zu stabil war, da sonst keine Öffnung in Anwesenheit einer Zielsequenz stattfinden kann. Andererseits durfte die Ausbildung der Stamm-Schleifen-Struktur nicht zu labil sein, da sonst bereits ohne Anwesenheit einer Zielsequenz eine Hintergrundfluoreszenz detektiert werden kann. Am 3'-Ende wurde ein Cyanin-5 (Cy5)-Fluorophor mit einem Emissionsmaximum von 670 nm eingeführt und mit dem 5'-Ende ein BBQ-650-Quencher unter UltraMILD-Bedingungen verknüpft (Abb. 87). Nach Abspaltung und Aufreinigung konnte die Identität des synthetisierten *Molecular Beacons* massenspektrometrisch bestätigt werden.

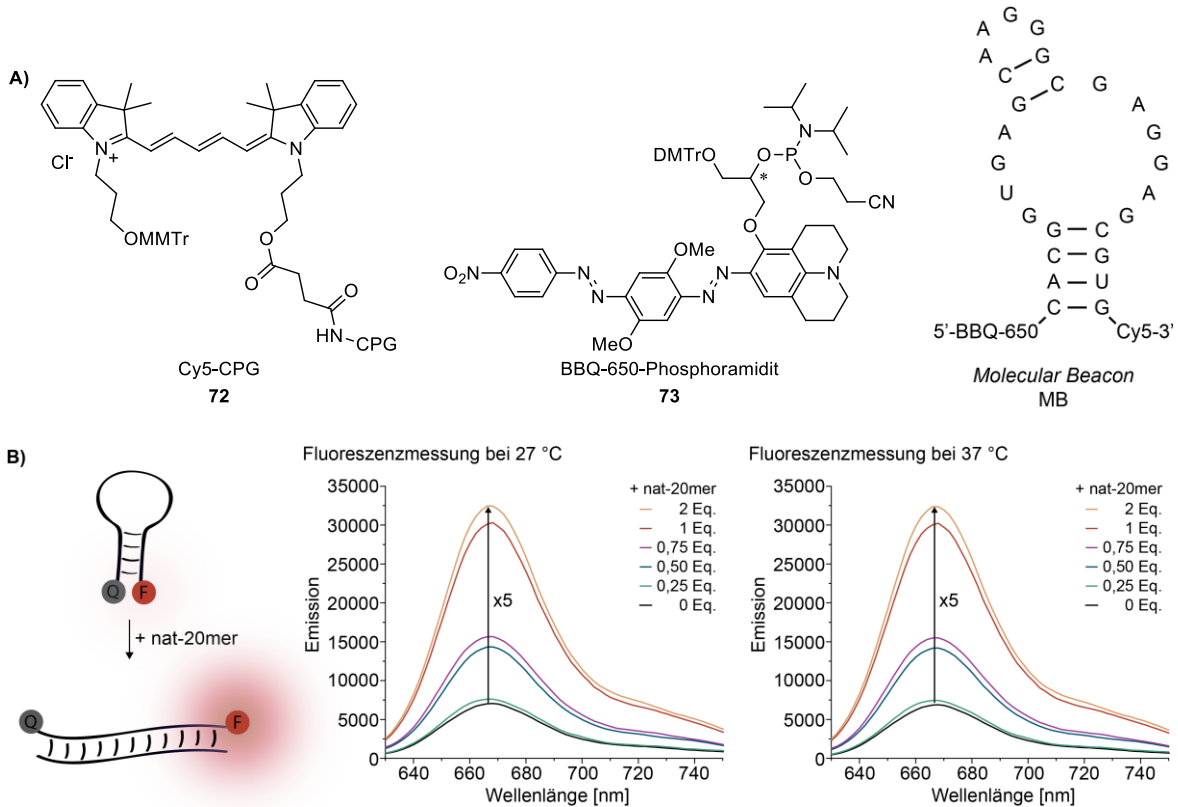


Abb. 87: Design und Anwendbarkeit des verwendeten *Molecular Beacons*. A) Strukturen des verwendeten Cy5-CPGs und BBQ-650-Phosphoramidits sowie berechnete Sekundärstruktur des *Molecular Beacons*. B) Fluoreszenzmessung des *Molecular Beacons* bei Zugabe der komplementären unmodifizierten Kontrollsequenz **nat-20mer** (0 – 2 Eq.) bei 27 °C und 37 °C. Es ist lediglich ein maximal 5x Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten

Zunächst wurde der *Beacon* (50 pmol, 100 μ L) ohne Zugabe der zyklischen RNA in 1x PBS-Puffer im Bereich der Fluorophoremission (630-750 nm) bei 27 °C und 37 °C vermessen. Es konnte kein Unterschied der Messungen bei unterschiedlicher Temperatur festgestellt werden, was für eine gewisse Temperaturstabilität des *Beacons* sprach. Dabei zeigte sich in beiden Fällen bereits ein gewisser Anteil an Hintergrundfluoreszenz. Durch Zugabe von bis zu 100 pmol (2 eq.) der linearen Kontrollsequenz **nat-20mer** konnte ein etwa fünffacher Fluoreszenzanstieg detektiert werden. Dies deutete auf eine gewissen Tauglichkeit des *Beacons* hin, auch wenn keine idealen Bedingungen vorlagen (Abb. 87). Da es sich hier lediglich um erste Versuche zum Nachweis der Photolysierbarkeit des zyklischen NPP-verbrückten 22mers handelte und Optimierungen im Design der Hybridisierungssonde zeitaufwendig sind, wurde der *Molecular Beacon* dennoch verwendet. Bei den Messungen in Kombination mit der photolabilen zyklischen RNA **circ-22mer_{NPP}** (50 pmol, 100 μ L, Verhältnis *Beacon*:RNA = 1:1) konnte bereits vor Belichtung ein nahezu maximaler Fluoreszenzanstieg beobachtet werden (blauer Graph, Abb. 88B). Da es sich um das aufgereinigte und massenspektrometrisch-bestätigte zyklische Produkt handelte und eine NPP-Gruppe unter den

gewählten Arbeitsbedingungen stabil sein sollte, wurde davon ausgegangen, dass keine unbeabsichtigte Linearisierung des Oligonukleotids stattgefunden hatte. Da die Messung der Hintergrundfluoreszenz bereits eine gewisse Fluoreszenz aufzeigte (schwarzer Graph, Abb. 88B), kann man darauf schließen, dass der *Beacon* nicht optimal war und eine, bis zu einem gewissen Grad labile Stammstruktur aufwies. Die Schleifenregion interagierte wahrscheinlich bereits mit der zyklischen Sequenz, wodurch es zu diesem Fluoreszenzanstieg kam. Da die detektierte Fluoreszenz bereits vor Belichtung nahezu dem zuvor gemessenen Maximalwert entsprach, konnte demnach nach Belichtung nur noch ein sehr geringer Fluoreszenzanstieg beobachtet werden (Abb. 88).

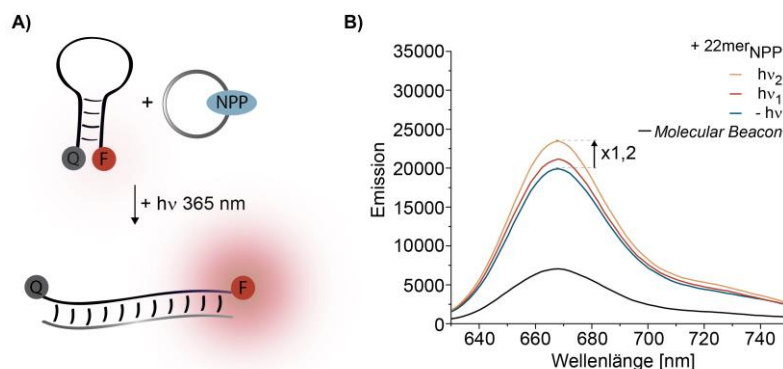


Abb. 88: Untersuchung der Lichtaktivierbarkeit von **circ-22mer_{NPP}** in Gegenwart eines *Molecular Beacons*. A) Schematische Darstellung der Interaktion der Modifizierten RNA vor und nach Belichten. B) Fluoreszenzmessung des *Molecular Beacons* bei Zugabe NPP-modifizierten zyklischen 22mers **circ-22mer_{NPP}** bei 37 °C. Bereits vor Belichtung (blauer Graph) des zyklischen Derivats fand eine fast vollständige Hybridisierung mit dem *Molecular Beacon* statt. Nach Belichtung 1 ($h\nu_1$, 365 nm, 10 min, 2 mW, roter Graph) und nach Belichtung 2 ($h\nu_2$, 365 nm, 2 min, 20 mW, gelber Graph) konnte jeweils nur ein geringer Fluoreszenzanstieg detektiert werden. Die Messungen wurden von Oliver Pereira im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

Parallel zu diesen Versuchen wurde auch der Einbau beider Dinukleotide in eine Zielsequenz untersucht. Dafür wurde die Sequenz des verwendeten **nat-20mers** in zwei Fragmente unterteilt. Ein 8 Nukleobasen langes Fragment sollte mit **Dinuk2**, das zweite Fragment (ebenfalls ein 8mer) mit **Dinuk3** verlängert werden. Die Ligationsreaktionen wurden von Oliver Pereira analog zu den Verlängerungen von **nat-20mer** umgesetzt. Beide Fragmente konnten erfolgreich mit 51% (NPP) bzw. 70% (DEACM) hergestellt und isoliert werden. Die Verknüpfung der beiden modifizierten 10mere zu einer zweifach photospaltbaren Gesamtsequenz konnte allerdings auch nach zahlreichen Optimierungen nicht erreicht werden. Somit stellte erneut die Splint-Ligation den limitierenden Schritt dar. Die Synthese einer wellenlängenselektiv adressierbaren funktionalen RNA bietet eine Reihe an interessanten Einsatzmöglichkeiten. Die beiden photolabilen Schutzgruppen würde beispielsweise die Untersuchung zweistufiger Prozesse erlauben. Eine erste Belichtung aktiviert dabei die Hybridisierung mit einer komplementären Zielsequenz durch Re-Linearisierung der RNA. Eine zweite Bestrahlung führt zu einer Fragmentierung und begünstigt dadurch die Verdrängung und Dissoziation, wodurch die Zielsequenz wieder freigegeben wird. In Kombination mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden könnte dieser Vorgang durch Anstieg und Abnahme der Fluoreszenz nachverfolgt werden (Abb. 89A). Alternativ könnten dynamische Prozesse, wie die GFP-Expression reguliert werden. Im zyklischen Zustand kann die RNA nicht mit der Promoterregion interagieren, wodurch diese für die Polymerase zugänglich ist und die GFP-Expression stattfindet. Nach erster Bestrahlung blockiert die lineare RNA diese Region durch Hybridisierung, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Nach Fragmentierung und

Verdrängung wird die Promoterregion wieder freigegeben und eine erneute GFP-Fluoreszenz kann detektiert werden (Abb. 89B).

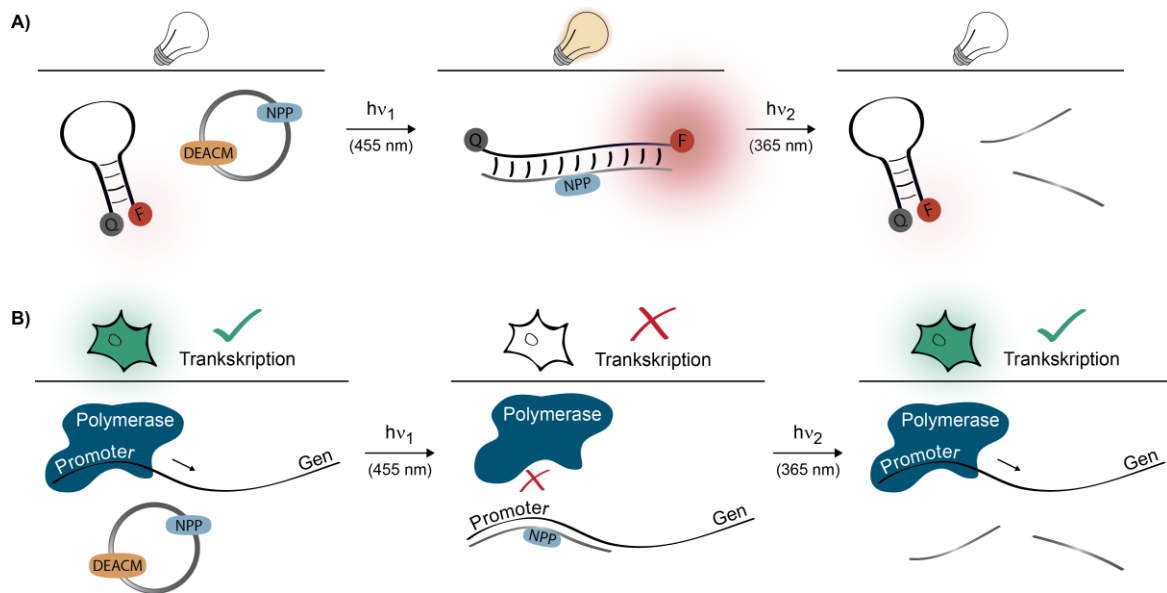


Abb. 89: Schematische Darstellung möglicher Anwendungen zweifach photospaltbarer zyklischer RNAs. A) Untersuchung der Interaktion mit einer Fluorophor-markierten Zielsequenz: nach erster Belichtung kann eine Hybridisierung stattfinden. Eine zweite Belichtung führt zu einer Verdrängung der Fragmente und Abnahme der Fluoreszenz. B) Regulierung der GFP-Expression: Nach Belichtung blockiert die lineare RNA die Promotorregion. es kommt zu einer Unterdrückung der GFP-Expression (Fluoreszenz nimmt ab). Durch Verdrängung der Fragmente nach zweiter Belichtung steigt die Expressionsrate und damit auch die Fluoreszenz wieder an.

Insgesamt bietet die rein enzymatische Synthese kleiner photolabil-modifizierter zyklischer RNAs, wie *antisense*- oder Aptamersequenzen, viele Einsatzmöglichkeiten. Die Zyklisierung ohne den Einsatz zellschädigender Zusätze stellt einen vielversprechenden Ansatz als Grundlage weiterer Untersuchungen dar.

3.2.5 Optionales Capping und 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie

Neben einem einfachen Pufferaustausch und eingesparten Aufreinigungsschritten bieten die magnetischen Beads weitere Optionen zur Verbesserung des enzymatischen Syntheszyklus an. Da bei den 3'-Verlängerungen kein quantitativer Umsatz erreicht werden konnte, besteht die Gefahr fehlerhafte Gesamtsequenzen zu erhalten. Bei der chemischen Festphasensynthese wird eine Verlängerung nicht reagierter Edukte durch Acetylierung in einem Cappingschritt unterbunden. Angelehnt daran wurde auch bei der chemo-enzymatischen Synthese ein Cappingschritt angedacht. Nach erfolgter 3'-Verlängerung weisen die Produkt-RNAs eine 3'-Phosphatgruppe auf. Diese Phosphatgruppe verhindert einerseits die multiple Ligation weiterer Nukleosid-3',5'-Bisphosphate mit Rnl1. Andererseits agiert sie als eine Art Schutzgruppe während der Oxidation mit Natriumperodat (NaIO_4). Nicht-reagierte Fragmente besitzen nach wie vor eine unmodifizierte 3'-terminale Riboseeinheit mit 2',3'-Diol. Dieses Diol kann durch Zugabe von NaIO_4 oxidiert werden, wodurch die Riboseeinheit nicht-ligierter Fragmente in ein 2',3'-Dialdehyd umgesetzt und für den weiteren Syntheszyklus unzugänglich wird (Abb. 90).

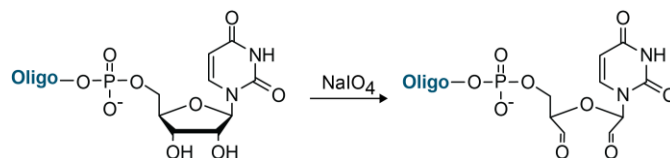


Abb. 90: Optionales NaIO_4 -Capping. Das 2',3'-Diol kann durch Zugabe von NaIO_4 oxidiert und für weitere enzymatische Reaktionen unzugänglich werden.

Angelehnt an Literaturbeispiele^[31,378,420] wurde ein NaIO_4 -Capping untersucht. Als Vorbereitung wurden nach erfolgter Ligationsschritt mehrere Waschschrte durchgeführt, um alle ATP- und DTT-Reste zu entfernen, die die Periodatoxidation stören würden. Die Oxidationsreaktionen wurden in abgedunkelten Reaktionsgefäßen umgesetzt, um eine lichtinduzierte Zersetzung des Periodats zu vermeiden. Insgesamt wurde auf möglichst milde Reaktionsbedingungen und kurze Inkubationszeiten geachtet, um einen Abbau der RNA unter zu basischen Bedingungen und eine Schädigung der Streptavidin Beads zu vermeiden. In einem zu sauren Milieu könnte zusätzlich die Carbamatbindung zur Biotineinheit gespalten werden. Nach der 3'-Verlängerung wurden mindestens drei Waschschrte durchgeführt und die Streptavidin Beads mit gebundener RNA in ultrareinem ddH_2O resuspendiert. $10 \mu\text{M}$ biotinylierte RNA wurden unter Lichtausschluss mit 15 mM NaIO_4 für 15 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden erneut mehrere Waschschrte durchgeführt. In Testreaktionen konnten nach erfolgtem Periodatcapping keine unerwünschten Nebenreaktionen beobachtet werden. Allerdings wurden bei massenspektrometrischen Untersuchungen RNA-Natrium-Addukte detektiert, die auch nach fünf Waschschrten nicht vollständig unterbunden werden konnten. Je mehr Reaktionszyklen durchlaufen werden und je länger die zu modifizierende RNA ist, desto mehr ist mit diesen Addukten zu rechnen, da die Natriumkationen mit dem negativ-geladenen Phosphatrückgrat interagieren, wodurch ein Entfernen immer schwieriger wird. Dennoch bietet ein NaIO_4 -Capping die Möglichkeit Fehlsequenzen zu vermeiden. Eine weitere interessante Option ist eine 3'-Modifikation der RNA durch Morpholino-Chemie.

Als besonders interessante Modifikationen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende von Oligonukleotiden haben sich Fluorophore und Quencher herausgestellt. Durch die Einführung von Fluorophoren können Oligonukleotide beispielsweise in Zellen auch in geringen Konzentrationen lokalisiert und detektiert werden.^[421] Eine Fluorophor-Markierung von RNA durch kupferkatalysierte Click-Reaktion nach chemo-enzymatischem Einbau eines Alkin-modifizierten Uridin-3',5'-Bisphosphates konnte bereits erfolgreich von Dojahn *et al.* gezeigt werden.^[103] Außerdem ist ein Einbau mittels chemischer Festphasensynthese oder durch post-synthetisches NHS-Labeling möglich.^[422] Zusätzlich wird in der Literatur auch zahlreich von Markierungsstrategien durch Bildung eines Morpholino-Derivats berichtet.^[34,420,423] Angelehnt an Arbeiten von Tarasenko *et al.* wurde versucht, eine Streptavidin-gebundene RNA zunächst mit NaIO_4 zu oxidieren und anschließend mit einem Rhodamin-Derivat umzusetzen.^[420] Auch bei diesen Reaktionen wurde auf möglichst milde Reaktionsbedingungen geachtet, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Das verwendete Rhodamin-Derivat wurde freundlicherweise von Rebekka Weber (AK Heckel, Goethe-Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Reaktion wurde mit einem biotinylierten RNA-34mer durchgeführt.

Als erstes wurde ein NaIO_4 -Capping mit **Bio-34mer** gebunden an Streptavidin Beads unter Lichtausschluss für 15 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Parallel dazu wurde das Rhodamin-Derivat in

einem weiteren Reaktionsgefäß in einer 9:1 Mischung aus H₂O/MeOH gelöst und mit Borsäure versetzt. Nach 15 min wurde ein Teil der Rhodamin/Borsäure-Mischung zu der Suspension der Capping-Reaktion hinzugegeben und durch Zugabe von Et₃N ein pH-Wert von 8,5 eingestellt. Dieser Schritt musste zügig aber dennoch vorsichtig durchgeführt werden. Eine zu langsame Zugabe der Base führte zu einer teilweisen Abspaltung der Biotineinheit. Wurde durch zu schnelles Zufügen des Et₃N der pH-Wert überschritten, führte dies zur Hydrolyse der RNA. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde der lilafarbenen Reaktionslösung gelöstes NaBH₃CN (in NaOH) zugesetzt. Nach 45 min wurde die Reaktion durch Waschschrte beendet. Bei der Kontrolle der Optischen Dichte des entnommenen Überstands und der Waschlösungen konnte neben überschüssigem Rhodamin auch gelöste RNA festgestellt werden. Die Beads wurden solange nachgewaschen, bis die Waschlösung nahezu farblos war. Die Beads selbst waren auch danach dunkellila verfärbt, was darauf hindeutete, dass entweder die gebundene RNA mit dem Fluorophor interagierte oder das Rhodamin eine Interaktion mit den Streptavidin Beads selbst eingegangen war. Dennoch wurde die verbliebene RNA durch Erhitzen von den Beads gelöst. Eine erste Aufreinigung fand durch Größenausschlusschromatographie über eine NAP-Säule (NAP-25, Elution mit H₂O/MeOH 9:1, *GE Healthcare*) statt, bevor eine weitere Aufreinigung über RP-HPLC und eine Analyse *via* Massenspektrometrie erfolgte (Abb. 91). Die entnommene Lösung wies bereits vor HPLC-Aufreinigung eine lila Verfärbung auf, die auch nach RP-HPLC-Aufreinigung deutlich sichtbar war. Die massenspektrometrische Analyse zeigte neben der Produktmasse [M+Na⁺] auch zahlreiche Addukte (u.a. +Na⁺) auf, die trotz mehrerer Aufreinigungsschritte nicht abgetrennt werden konnten.

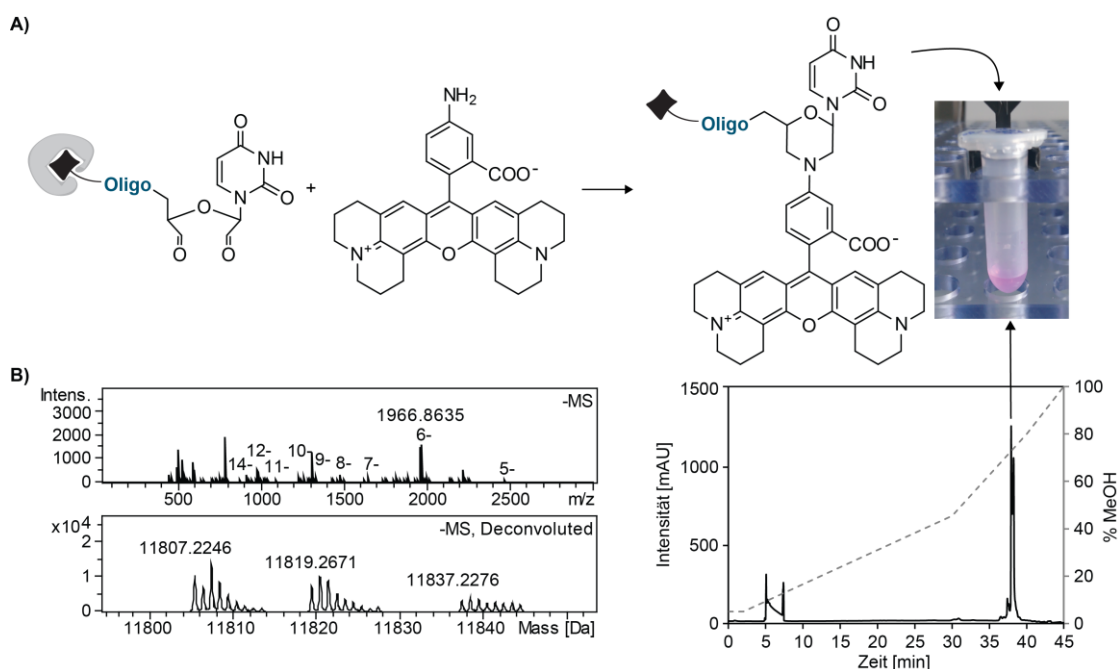


Abb. 91: 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie. A) Schematische Darstellung der 3'-Modifikation von **Bio-34mer** mit einem Rhodamin-Derivat nach Periodat-Capping. B) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutes (unten) Massenspektrum nach 3'-Modifikation (berechnete Masse [M+Na⁺] = 11807,5) sowie das aufgenommene RP-HPLC-Chromatogramm (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 verlängert mit HFIP/MeOH bei 60 °C).

Prinzipiell ist eine 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie nach erfolgter Periodat-Oxidation möglich. Allerdings zeigte sich während des Reaktionsverlaufes auch die Abspaltung von den Streptavidin Beads und ein Abbau der RNA, sodass nur ein geringer Anteil an Produkt isoliert werden konnte. Da es sich hier lediglich um Testversuche handelte, wurden im Rahmen dieser

Doktorarbeit keine Optimierungen der Reaktionsbedingungen unternommen. Bei zukünftigen Versuchen sollte versucht werden, ob die Reaktion auch unter milderer Bedingungen und in kürzeren Reaktionszeiten durchgeführt werden kann, um vor allem den Abbau der RNA zu verhindern.

3.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser vielfältigen Untersuchungen konnten zahlreiche Erkenntnisse über die Möglichkeiten und auch Grenzen der chemo-enzymatischen RNA-Synthese gewonnen werden. Nachdem bereits im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, dass diese Methode interessante Optionen zur Modifikation forschungsrelevanter RNAs bietet, konnten hier weitere Strategien erarbeitet werden, die facettenreiche Anwendungsmöglichkeiten eröffnen.

Ein Hauptaugenmerk wurde auf die Einführung eines Streptavidin-basierten Festphasensystems gelegt. Hierdurch sollten Arbeitsschritte erleichtert und reduziert sowie die mehrfache Modifikation eines 77 Nukleobasen langen tRNA-Derivats ermöglicht werden. Ein erster entscheidender Schritt in einer Festphasen-basierten chemo-enzymatischen RNA-Synthese war die Durchführung der enzymatischen Reaktionsschritte, nachdem das erste biotinylierte RNA-Fragment an magnetischen Streptavidin Beads immobilisiert wurde. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die zuvor etablierten chemo-enzymatischen Reaktionsschritte zur Synthese lichtaktivierbarer RNA auch in Kombination mit magnetischen Streptavidin Beads als feste Phase ohne wesentliche Komplikationen durchgeführt werden können. Zusätzlich konnten zeitaufwendige Aufreinigungsschritte *via* RP-HPLC oder Fällung der RNA eingespart werden. Es wurden verschiedene Strategien zur Synthese der 77 Nukleobasen langen Zielsequenz untersucht. Dabei erwies sich eine lineare Reaktionsführung nur dann als sinnvoll, wenn nur wenige enzymatische Reaktionen mit sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden müssen. Eine Verringerung der Syntheszeit einhergehend mit besser kontrollierbaren Reaktionen und Ausbeuten, konnte durch die Erarbeitung einer konvergenten Synthesestrategie erzielt werden. Bei diesem Vorgehen sind die Gesamtausbeuten nur von den Ausbeuten der einzelnen Splint-Ligationen abhängig, die sich im Verlauf dieser Untersuchungen immer wieder als Nadelöhr zu einem erfolgreichen Syntheseverlauf herausstellten. Durch einige Optimierungen (Reduzierung von RNA:pNp auf 1:3, Einsatz der Enzyme im Überschuss für kürzere Reaktionszeiten, Vorhybridisierung der Donor-RNA mit dem DNA-Splint, höherer Anteil an $MgCl_2$ und DTT) konnten mehrere lichtadressierbar-modifizierte RNAs zu der gewünschten 77 Nukleobasen langen Zielsequenz verknüpft werden. Da die Ausbeuten der Splint-Ligationen stark sequenzabhängig und nicht vorhersagbar waren, erforderte jede Ligation gewisse Anpassungen. Es ist sinnvoll die Stärken der chemischen Festphasensynthese (die Synthese kurzer modifizierter RNAs in ausreichender Menge) mit den Möglichkeiten der chemo-enzymatischen Methode zu kombinieren, um bestmögliche Gesamtergebnisse zu erhalten.

Neben der Einführung eines Festphasen-basierten Systems konnte die vielseitige Einsetzbarkeit der untersuchten chemo-enzymatischen RNA-Synthese in weiteren Versuchen gezeigt werden. So ist nicht nur die Kombination der verschiedenen lichtaktivierbaren Modifikationen möglich. Es konnte auch der Festphasen-basierte Einbau des labileren DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates in Kombination mit einer NPE-modifizierten RNA-Sequenz gezeigt werden. Anschließend

Belichtungsexperimente bei 455 nm und 365 nm zeigten die orthogonale Abspaltung der beiden Schutzgruppen und somit die zweistufige Freisetzung der RNA. Durch die Ligation von photolabil-verknüpften Dinukleotiden mit NPP- und DEACM-Linkern im Zucker-Phosphatrückgrat wurde eine weitere Schutzstrategie auf enzymatische Weise zugänglich. Durch den Einbau dieser Bausteine wird ein positionsspezifischer lichtinduzierter Strangbruch möglich. Abgerundet wird die vielversprechende Spannweite der etablierten Methode durch die Kombination aus Einführung lichtadressierbarer Bausteine und enzymatischer RNA-Zyklisierung. Dies ermöglicht auf der einen Seite die vorübergehende Störung der Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz und andererseits eine Freisetzung eines funktionalen Oligonukleotids nach Spaltung des Rückgrates und dissoziieren der Fragmente. Zusätzlich konnte in ersten Versuchen eine Natriumperiodat-Oxidation als optionaler Cappingschritt gezeigt und zur weiteren Modifikation des 3'-Endes durch Einführung eines Rhodamins genutzt werden.

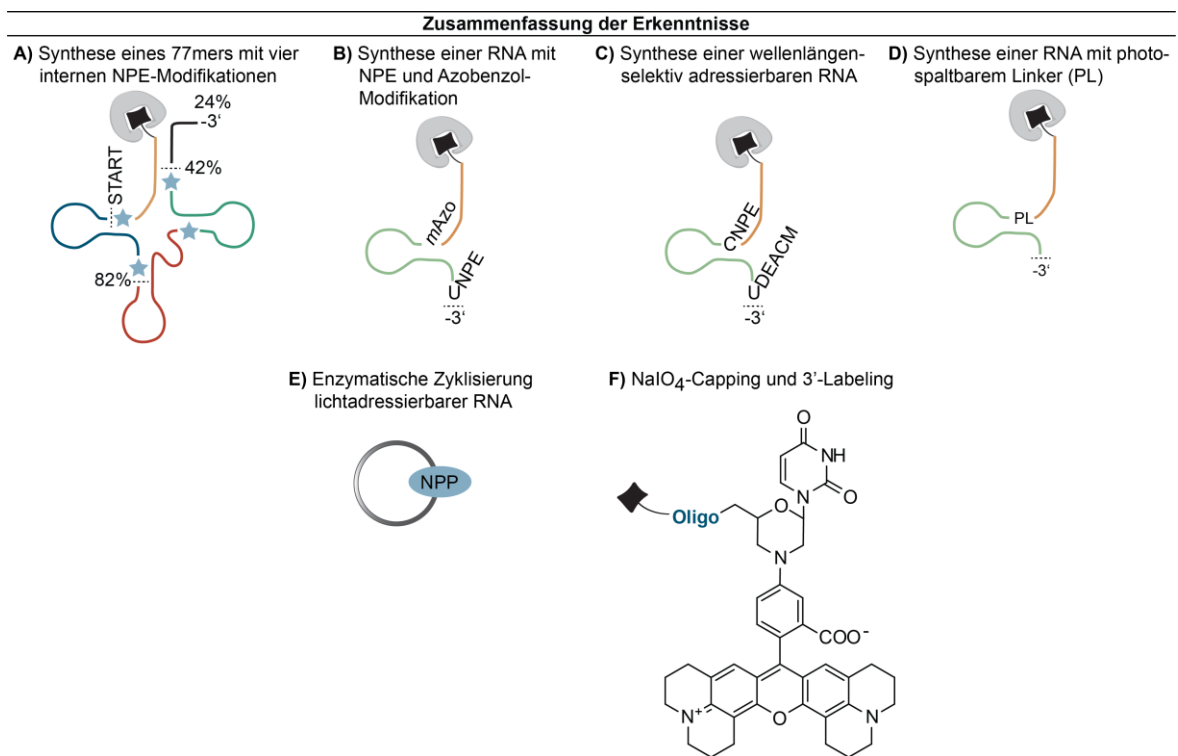


Abb. 92: Zusammenfassung der Erkenntnisse und Übersicht der Modifikationsmöglichkeiten mittels Festphasen-basierter chemo-enzymatischer RNA-Synthese.

Auch wenn die verwendeten Enzyme viele der untersuchten Modifikationsmöglichkeiten tolerierten und die chemo-enzymatische RNA-Synthese umfangreich anwendbar ist, so sind im direkten Vergleich mit der chemischen Festphasensynthese nur geringe Mengen modifizierter RNA zugänglich. Größere Mengen, wie sie beispielsweise für NMR-Untersuchungen benötigt werden, sind nur schwer erreichbar. In Zukunft sollte daher untersucht werden, in wie weit die eingeführte Streptavidin-Festphase in einem (halb-) automatisierten Prozess eingesetzt werden kann. Eine Automatisierung einzelner Schritte, wie der Fixierung der Beads, des Pufferaustauschs oder der Waschschrte, würde den Durchsatz der Reaktionen erhöhen und Arbeitszeiten verringern. Da eine Vergrößerung der Reaktionsansätze in den meisten Fällen mit einer Reduzierung der Ligationsausbeuten einherging, könnten mit Hilfe eines automatisierten Prozesses dennoch die

gewünschten Mengen dargestellt werden. Zusätzlich sollten weitere Untersuchungen der Splint-Ligationen erfolgen, um die durch sie verursachten Limitierungen besser einschätzen und umgehen zu können. Zur Synthese kurzer modifizierter RNAs wird die chemische Festphasensynthese nach wie vor die Methode der Wahl sein. Die chemo-enzymatische RNA-Synthese ermöglicht jedoch die Darstellung positionsspezifisch modifizierter längerer (>70nt) RNAs. Damit wird die Untersuchung biologisch relevanten RNAs ermöglicht, die unter chemischen Bedingungen nicht zugänglich sind.

3.3 Lichtregulierbare Oligonukleotide zur Strukturaufklärung mittels NMR und CD Spektroskopie

In diesem Abschnitt wird auf verschiedene Kollaborationsprojekte eingegangen, an denen im Laufe dieser Doktorarbeit mitgearbeitet wurde. Für diese Projekte wurden jeweils photolabil-geschützte beziehungsweise Azobenzol-verbrückte Oligonukleotide synthetisiert und charakterisiert. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden zum Teil in verschiedenen Publikationen veröffentlicht.^[424–426] Alle benötigten Oligonukleotide wurden mittels chemischer Festphasensynthese hergestellt. Die dazu verwendeten lichtadressierbaren Sonderamidite wurden zuvor eigenständig synthetisiert. Ein Großteil dieser Syntheserouten ist bereits literaturbekannt. Auf die zugrundeliegende Literatur wird an den entsprechenden Stellen jeweils verwiesen. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden von Kollaborationspartnern in NMR- oder CD-Experimenten zur Strukturaufklärung untersucht. Nachfolgend soll auf die Synthese der lichtadressierbaren Phosphoramidite und Oligonukleotide eingegangen werden.

3.3.1 NPE-geschützte DNA zur Untersuchung der G-Quadruplexfaltung innerhalb der cMYC-Promoterregion

Für eine Kollaboration mit Dr. Tassilo Grün (AK Schwalbe, Goethe-Universität Frankfurt) wurden im Laufe der Doktorarbeit immer wieder photolabil-geschützte DNA G-Quadruplex-Sequenzen per chemischer Festphasensynthese hergestellt. Hierfür wurde zunächst das gewünschte enantiomerenreine (*R*)-NPE-geschützte Guanodin-Phosphoramidit **80** ausgehend von kommerziell erhältlichem Guanodin synthetisiert. Nach Abschluss der DNA-Synthese, Isolierung und Charakterisierung der dG^{*R*-NPE}-modifizierten Oligonukleotide wurden umfangreiche NMR-Messungen von Dr. Tassilo Grün durchgeführt. Im Fokus dieser Messungen stand die Aufklärung des Faltungsverhaltens der Guanodin-reichen cMYC-Promotorregion. Die Ergebnisse dieser Kollaboration wurden in zwei Publikationen veröffentlicht.^[424,425]

3.3.1.1 Synthese des NPE-geschützten Phosphoramidits und DNA-Synthesen

Um die Faltung der DNA-Sequenzen und damit die Ausbildung der G-Quadruplexstrukturen NMR-spektroskopisch beobachten zu können, sollten die geplanten Sequenzen durch geschickt platzierte NPE-Schutzgruppen zunächst an der Faltung der Sekundärstruktur gehindert werden. Die Detektion von möglichen unsauberen NMR-Signalen aufgrund von unterschiedlichen Diastereomeren sollte durch den Einsatz eines enantiomerenreinen (*R*)-NPE-Desoxyguanodin-Phosphoramidits unterbunden werden. Zudem sollte auf zuvor erarbeitete Erkenntnisse aufgebaut werden, die ebenfalls durch die Untersuchung enantiomerenrein geschützter DNA erarbeitet werden konnten.^[384] Die gewählte Synthesestrategie basiert auf dem Einsatz bewährter Schutzgruppen, wie sie häufig zur Synthese modifizierter (lichtaktivierbarer) Phosphoramidite angewendet werden. Im Allgemeinen war die zugrundeliegende Syntheseroute literaturbekannt.^[287,384,427] Alle Reaktionsschritte sind in Abb. 93 zusammengefasst.

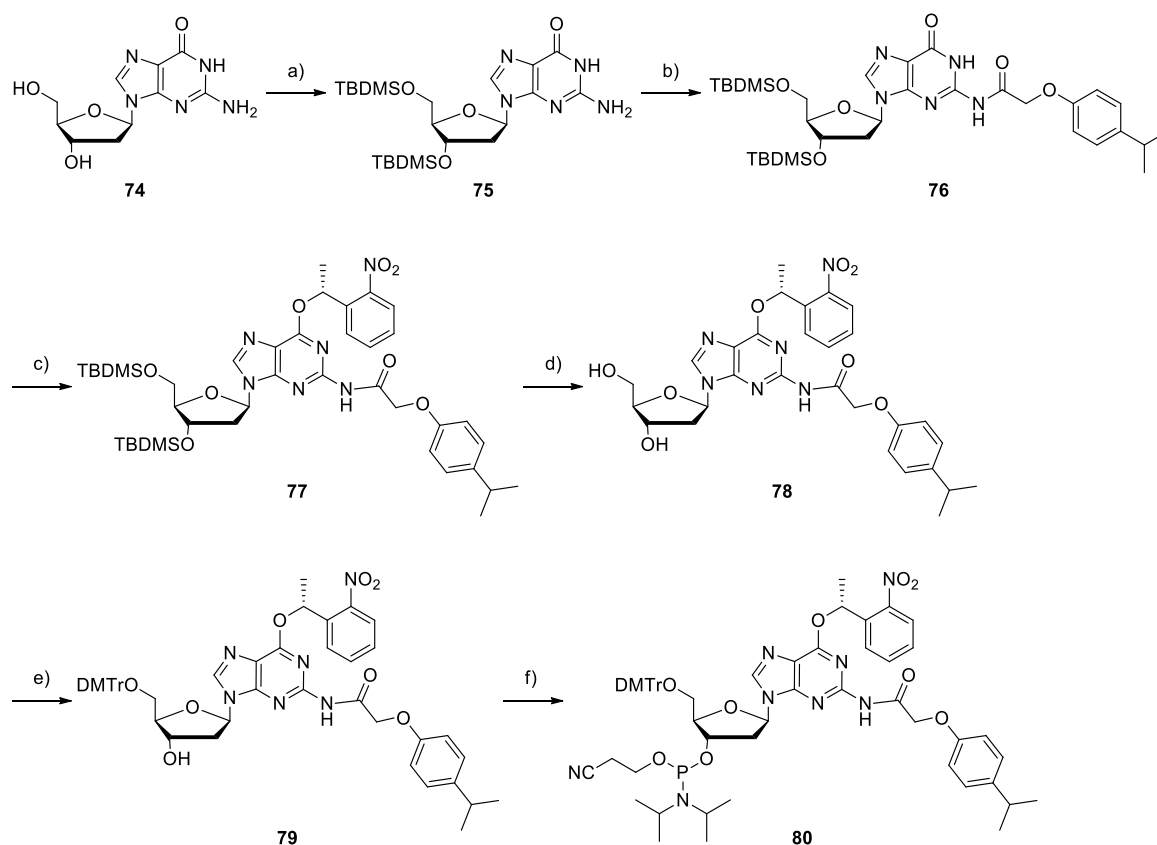


Abb. 93: Übersicht der Synthese des *R*-NPE-geschützten Desoxyguanosin-Phosphoramidits **80**. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, quantitativ; b) *i*PrPac-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 63%; c) (*S*)-NPE, PPh₃, DEAD, THF, 0 °C – RT, 55%; d) TBAF, AcOH, THF, RT, 93%; e) DMTr-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 91%; f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 68%.

Die Synthese startete ausgehend von unmodifiziertem, kommerziell erhältlichem Guanosin **74**, welches im ersten Schritt angelehnt an Potier *et al.*^[427] mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) in Gegenwart von Imidazol umgesetzt wurde. Die TBDMS-Schätzung der 5'- und 3'-ständigen Hydroxygruppe verlief bei Raumtemperatur mit quantitativer Ausbeute. Nach wässriger Aufarbeitung, entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck sowie trocknen des Rohproduktes im Hochvakuum konnte das erhaltene Produkt **75** ohne weiteren Aufreinigungsschritt weiter umgesetzt werden. Es folgte die Schätzung der exozyklischen Aminogruppe der Nukleobase (*N*²-Position). Hierzu wurde Verbindung **75** mit Isopropylphenoxyacetylchlorid (*i*PrPac-Cl) in Pyridin umgesetzt. Die eingeführte *i*PrPac-Schutzgruppe ist zwar sterisch anspruchsvoller als beispielsweise eine Acetyl- oder eine DMF-Schutzgruppe, dafür ist sie unter UltraMILD-Bedingungen im Rahmen der Aufarbeitung der DNA-Synthese abspaltbar. Alternativ könnte auch eine *tert*-Butylphenoxyacetyl (*tac*)-Schutzgruppe verwendet werden, die ebenfalls unter milden Bedingungen abgespalten werden kann. Bei der Einführung der Schutzgruppe war es wichtig, dass die TBDMS-geschützte Ausgangsverbindung **75** zuvor gut getrocknet wurde, da Ethanol- oder Wasserreste zu einer Hydrolyse des *i*PrPac- bzw. *tac*-Säurechlorids und damit zu verminderten Ausbeuten führen. Bei dieser Reaktion konnte Verbindung **76** mit einer Ausbeute von 63% erhalten werden. Im dritten Schritt erfolgte die Einführung der photolabilen NPE-Schutzgruppe. Damit ein enantiomerenrein geschütztes Guanosin-Derivat hergestellt werden kann, wurde zunächst das racemische Gemisch aus (*R*)- und (*S*)-1-(2-Nitrophenyl)ethanol (*(R,S)*-NPE) *via* präparativer HPLC aufgetrennt. Durch die Verwendung einer Säule mit chiraler stationärer Phase und isokratischer Flussrate konnten mehrere hundert

Milligramm reines *R*- und *S*-NPE gewonnen werden (Säule: *CHIRALPAK*[®] IA, 5 μ m, 20x250 mm von *Chiralcel*, Elution mit nHex/EtOH 9:1, 10 mL/min). Hierbei wurden alle 10 min 100 mg des racemischen Gemischs gelöst in EtOH injiziert. So ergab sich das in Abb. 94 gezeigte Elutionsmuster. Der erste Peak konnte in früheren Arbeitskreis-internen Arbeiten von Dean-Paulos Klötzner dem *R*-konfigurierten NPE-Alkohol zugeordnet werden. Der jeweils spätere, zweite Peak entspricht dem *S*-Isomer.

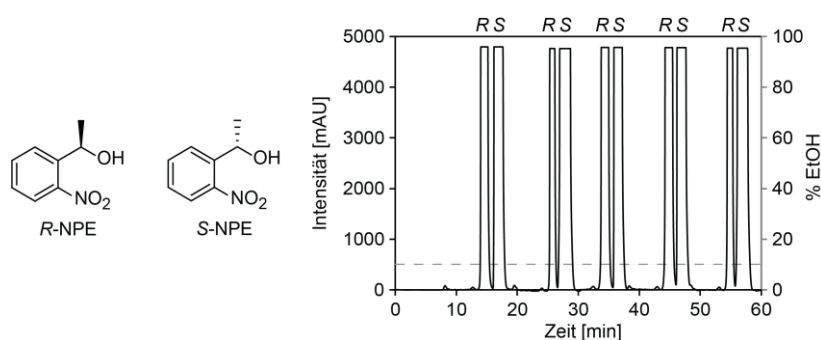


Abb. 94: Isomerentrennung des racemischen *R,S*-NPE-Alkohols. Elutionsbedingung: Säule 4 mit nHex/EtOH 9:1 isokratisch bei RT. Pro Injektion wurden 100 mg *rac*-NPE aufgetrennt.

Nach Trennung der beiden Isomere erfolgte die Umsetzung von Verbindung **76** mit der isolierten *S*-konfigurierten Schutzgruppe, Triphenylphosphin (PPh_3) und Diethylazodicarboxylat (DEAD) in einer Mitsunobu-Reaktion.^[428,429] Da die Reaktion unter Inversion abläuft, resultierte hieraus das gewünschte *R*-NPE-geschützte Desoxyguanosin-Derivat **77** (55%). Die Abspaltung der TBDSM-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe von 1 M Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) und Essigsäure bei Raumtemperatur. Die Ausbeuten dieser Reaktion lagen nach säulenchromatographischer Aufreinigung von **78** bei sehr guten 93%. Im vorletzten Reaktionsschritt wurde die 5'-*O*-Position mit einer DMTr-Schutzgruppe versehen (91% Ausbeute). Abschließend folgte die Umsetzung des DMTr-geschützten Derivats **79** zum finalen *R*-NPE-geschützten dG-Phosphoramidit **80** mit 68% Ausbeute. Die finale säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit analysereinen Lösungsmitteln, um eine Oxidation des Phosphoramidits zu vermeiden. Bevor das hergestellte photolabil-modifizierte Amidit in DNA-Synthesen eingesetzt wurde, wurde es mindestens 24 h im Hochvakuum getrocknet, um letzte Lösungsmittel- und Triethylaminreste zu entfernen.

Im Fokus dieser Kollaboration stand ein Guanosen-reicher DNA-Abschnitt aus der cMYC-Promoterregion (Vollängensequenz = 22mer). Das cMYC-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor, der an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt ist und bei vielen Tumorerkrankungen stark überexprimiert nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wird das cMYC-Gen auch als Protoonkogen bezeichnet.^[334,352,354,384] G-reiche Sequenzabschnitte neigen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie in diesem Fall zur Bildung von G-Quadruplex-Strukturen (G4). Allerdings liegen G-Quadruplexe im biologischen Umfeld nicht starr vor, sondern durchlaufen ständige (Um-) Faltungsprozesse. Diese beeinflussen zelluläre Abläufe wie Transkriptionsvorgänge und Proteininteraktionen und sind daher von großem Interesse für die Forschung. Fehlerhafte Faltungen und dadurch gestörte Vorgänge auf Ebene der Genexpression werden mit Tumorerkrankungen und Erbkrankheiten in Verbindung gebracht. Die cMYC-Region ist zusätzlich interessant, da sie nicht nur vier Guanosen-reiche Abschnitte aufweist, die zur Ausbildung des G4 führen. Sie umfasst zusätzliche G-Einheiten, die zu einem Austausch der Abschnitte führen können, die an der Quadruplexbildung beteiligt sind. Dieser Vorgang wird in der

Literatur auch, angelehnt an einen zusätzlich mitgeführten Ersatzreifen, der unter Umständen zum Einsatz kommen kann, als *Spare-Tire Exchange* bezeichnet.^[430] Insgesamt wird so der Polymorphismus der G-Quadruplex-Ausbildung erweitert.

Um das Wissen über ablaufende Faltungsvorgänge und damit verbundene Faltungskinetiken des cMYC-G4 zu erweitern, wurden mehrere photolabil-modifizierte DNA-Sequenzen synthetisiert. Zu DNA-Synthesen wurde jeweils eine 0,11 M Lösung des dG^{NPE}-Phosphoramidits in absolutem Acetonitril frisch angesetzt. Die DNA-Synthesen selbst fanden unter UltraMILD-Bedingungen statt, um eine ungewollte Abspaltung der NPE-Einheit während der Aufreinigung der DNA zu vermeiden (Details zur Synthese unter Abschnitt 4.2.3). Die beiden Sequenzen **short-2345** und **wt-1245(caged)** wurden zunächst DMTr-on synthetisiert. Nach der Synthese und Abspaltung der Cyanoethyl- und exozyklischen Schutzgruppen erfolgte ein erster Aufreinigungsschritt über RP-HPLC. Anschließend wurde die DMTr-Schutzgruppe durch 20-minütige Inkubation der DNA mit 80% Essigsäure bei Raumtemperatur abgespalten und erneut mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die unpolare DMTr-Schutzgruppe dient bei der ersten Aufreinigung zur besseren Abtrennung des Vollängenproduktes von Abbruchsequenzen. Allerdings führt jede RP-HPLC-Aufreinigung zu Verlusten der Ausbeute, da die Rückgewinnung der injizierten Probe nicht quantitativ ist. Der Einbau der verwendeten photolabilen NPE-Schutzgruppen führte zu einer vergleichbaren Verschiebung der Retentionszeit wie eine 5'-terminale DMTr-Schutzgruppe, weshalb bei allen weiteren Sequenzen die DMTr-Abspaltung während der chemischen Festphasensynthese durchgeführt wurde. Nach Abspaltung der Cyanoethyl- sowie der exozyklischen Schutzgruppen folgte direkt die HPLC-Aufreinigung. Diese wurde bei 60 °C durchgeführt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Bei einer Aufreinigung bei Raumtemperatur konnten zusätzliche / unsaubere Peaks beobachtet werden, die durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen hervorgerufen wurden. Eine Elution bei 60 °C verhindert diese Sekundärstrukturen und ermöglicht die Detektion eindeutiger, gut trennbarer Peaks. Da es mit den verwendeten Elutionsbedingungen (Säule 2, Gradient 2 oder Säule 3, Gradient 3, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/MeOH-Puffer, pH 8,0 bei 60 °C) gelang auch ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte Abbruchsequenzen (vor allem n-1) sauber vom Produkt abzutrennen, wurde die Anzahl an HPLC-Aufreinigungen auf ein Minimum reduziert. Dieses Vorgehen konnte die Ausbeuteverluste deutlich verringern. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde, wurden alle DNAs über NAP-Säulen eluiert und mehrmals mit ddH₂O coevaporiert, um alle Pufferrückstände zu entfernen. Insgesamt wurden neun photolabil-modifizierte DNA-Sequenzen in NMR-Mengen (min. 300 nmol) synthetisiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Bezeichnung, Sequenzen sowie Positionierung der photolabilen Schutzgruppen (X = dG^{R-NPE}) der modifizierten DNAs zur Untersuchung der *Spare-Tire*-Strukturisomere.

Oligo	Abschnitt:	1	2	3	4	5							
wt-12345	5'-d[T	GGG	A	GGG	TT	GXG	A	GXG	T	GXG	T] -3'
stab.-1234	5'-d[T	GGG	A	GGG	TT	GXG	A	GXG	T	TTT	T] -3'
stab.-1245	5'-d[T	GGG	A	GXG	TT	TTT	A	GXG	T	GXG	T] -3'
stab.-2345	5'-d[T	TTT	A	GGG	TT	GXG	A	GXG	T	GXG	T] -3'
wt-1245(caged)	5'-d[T	GGG	A	GGG	TT	GXG	A	GGG	T	GGG	T] -3'
wt-1234(caged)	5'-d[T	GGG	A	GGG	TT	GGG	A	GGG	T	GXG	T] -3'
short-1234	5'-d[T	GGG	A	GXG	TT	GXG	A	GXG	T] -3'
short-2345	5'-d[A	GGG	TT	GXG	A	GXG	T	GXG	T] -3'
extra(caged)	5'-d[A	GGG	TG	GXG	A	GXG	T	GXG	T] -3'

Durch die Einführung der NPE-Schutzgruppen innerhalb der verschiedenen Guanosinabschnitte sollte ein ungefalteter Zustand der G-Quadruplex-Sequenzen herbeigeführt werden. Nach Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen kann dann die Ausbildung der G4-Struktur erfolgen. Bei sechs dieser DNAs handelte es sich um den 22 Nukleobasen langen Volllängenabschnitt des cMYC-G4, der sich aus fünf G-reichen Abschnitten zusammensetzt. Zusätzlich wurden drei verkürzte Sequenzen hergestellt, die entweder am 3'-Ende (**short-1234**) oder am 5'-Ende (**short-2345** und **extra(caged)**) um einen G-Abschnitt verkürzt waren. Durch mutierte Abschnitte (Austausch von G zu T) wurden unterschiedliche *Spare-Tire*-Isomere hergestellt (**stab.-1234**, **stab.-1245** und **stab.2345**), die nur in ein ausgewähltes, stabilisiertes Isomer falten können. Die Identität und Reinheit aller Sequenzen konnte mittels analytischer RP-HPLC sowie massenspektrometrisch bestätigt werden.

Zusätzlich sollten im Rahmen dieser Kollaboration zwei weitere photolabil-geschützte cMYC-Sequenzen für eine Studie der Arbeitsgruppe um Anthony Mittermaier (McGill University, Montreal) hergestellt werden, die neben NPE-Modifikationen auch Inosin-Mutationen an definierten Positionen beinhalten (Tabelle 4). Die synthetische Herstellung dieser Sequenzen entspricht dem zuvor beschriebenen Vorgehen. Auch diese DNAs konnten massenspektrometrisch identifiziert werden.

Tabelle 4: Bezeichnung, Sequenzen sowie Positionierung der photolabilen Schutzgruppen (X = dG^{R-NPE}) und Inosin-Mutationen (I = Inosin).

Oligo	Abschnitt:	1	2	3	4						
cMYC-PU22-33	5'-d[TGA	GGG	T	GXG	IA	GXG	T	GGX	IAA]-3'
cMYC-PU22-wt	5'-d[TGA	GGG	T	GGX	GA	GXG	T	GGX	GAA]-3'

Die hergestellten modifizierten DNA-Sequenzen wurden an Dr. Tassilo Grün (AK Schwalbe) übergeben, der die lichtinduzierte Faltung der G-Quadruplexeinheit NMR-spektroskopisch untersuchte. Die gewonnenen Erkenntnisse werden nachfolgend kurz zusammengefasst. Weitere Details und Ergebnisse können den erschienenen Publikationen^[424,425] sowie der Doktorarbeit von Dr. Tassilo Grün entnommen werden, auf die an dieser Stelle verwiesen sei.

3.3.1.2 NMR-Messungen und Erkenntnisse

Die Hauptkonformation der Wildtypsequenz (**wt-12345**, unmodifiziert), die zu > 80% NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden kann, bildet dabei das 2345-Isomer (*major*). Die *Spare-Tire*-Isomere 1234 und 1245 werden nur zu einem geringeren Anteil gebildet (*minor*) (Abb. 95).

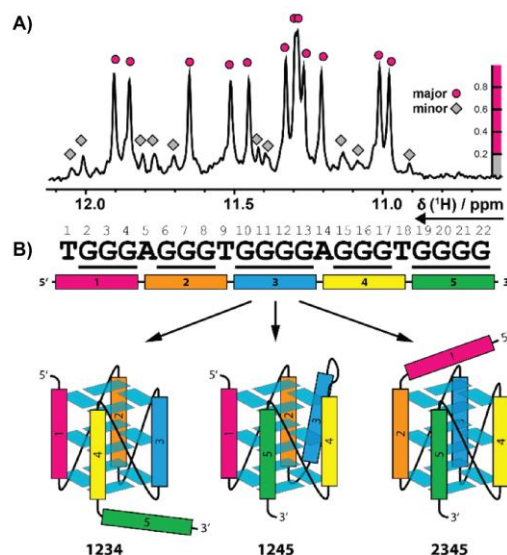


Abb. 95: Ausbildung von Konformationsisomeren der cMYC-22-Wildtypsequenz. A) ¹H-NMR-Spektrum der Iminoprotonen-Region der Wildtypsequenz. Die Ausbildung einer Hauptkonformation ist deutlich zu erkennen. B) Schematische Darstellung der *Spare-Tire*-Isomere. Nachdruck mit Erlaubnis^[425] (© 2021, Die Autoren, veröffentlicht durch die American Chemical Society, Abb. von Dr. T. Grün)

Die Einführung der photolabilen Schutzgruppen resultierte in einem ungefalteten Zustand der 22 Nucleobasen langen cMYC-Sequenz, der auch in Gegenwart von K⁺-Ionen stabil war. Dieser ungefaltete Zustand konnte NMR-spektroskopisch belegt werden. Die lichtinduzierte Faltung nach Bestrahlung bei 355 nm (4 s, 4 W) wurde anschließend in zeitaufgelösten NMR-Experimenten auf atomarer Ebene verfolgt. Die Experimente wurden bei gleichbleibender Temperatur und konstanter K⁺-Konzentration (5 mM) durchgeführt. Es konnte ein deutlicher Unterschied der Faltungskinetiken festgestellt werden. Das Hauptisomer **stab.-2345** bildet deutlich schneller die G4-Struktur aus, als die beiden Nebenkongformationen **stab.-1234** und **stab.-1245** (Abb. 96). Alle Kinetiken weisen zunächst eine schnelle erste Faltungsphase und eine langsamere zweite Faltungsphase auf. Das stabilisierte Hauptisomer **stab.-2345** ($k_1 = 461 \pm 22 \text{ h}^{-1}$ und $k_2 = 22 \pm 8 \text{ h}^{-1}$) zeigt sogar eine schnellere Ausbildung der G-Quadruplexstruktur als die Wildtypsequenz **wt-12345** ($k_1 = 348 \pm 13 \text{ h}^{-1}$ und $k_2 = 16 \pm 1 \text{ h}^{-1}$) auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die G-T-Mutation des ersten Abschnittes lediglich die Faltung des Hauptisomers möglich ist und diese nicht durch konkurrierende alternative Isomere verlangsamt wird. Die Kinetiken der beiden Nebenkongformationen **stab.-1234** ($k_1 = 110 \pm 16 \text{ h}^{-1}$ und $k_2 = 17 \pm 13 \text{ h}^{-1}$) und **stab.-1245** ($k_1 = 119 \pm 18 \text{ h}^{-1}$ und $k_2 = 35 \pm 5 \text{ h}^{-1}$) sind untereinander vergleichbar. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Faltungswege hin. Insgesamt wurden neben den stabilisierten Isomeren auch verkürzte 18 Nucleobasen lange modifizierte DNA-Sequenzen untersucht, bei denen der erste bzw. der fünfte Guanodin-reiche Abschnitt entfernt wurde. Dadurch waren keine T-Mutationen zur Stabilisierung der Hauptkongformation und des 1234-Isomers nötig. Die Kinetik-Messungen dieser beiden Konstrukte bestätigten die vorherigen Ergebnisse. Auch hier konnte eine schnellere Faltung des Hauptisomers im Vergleich zu der alternativen *Spare-Tire*-Kongformation detektiert werden.

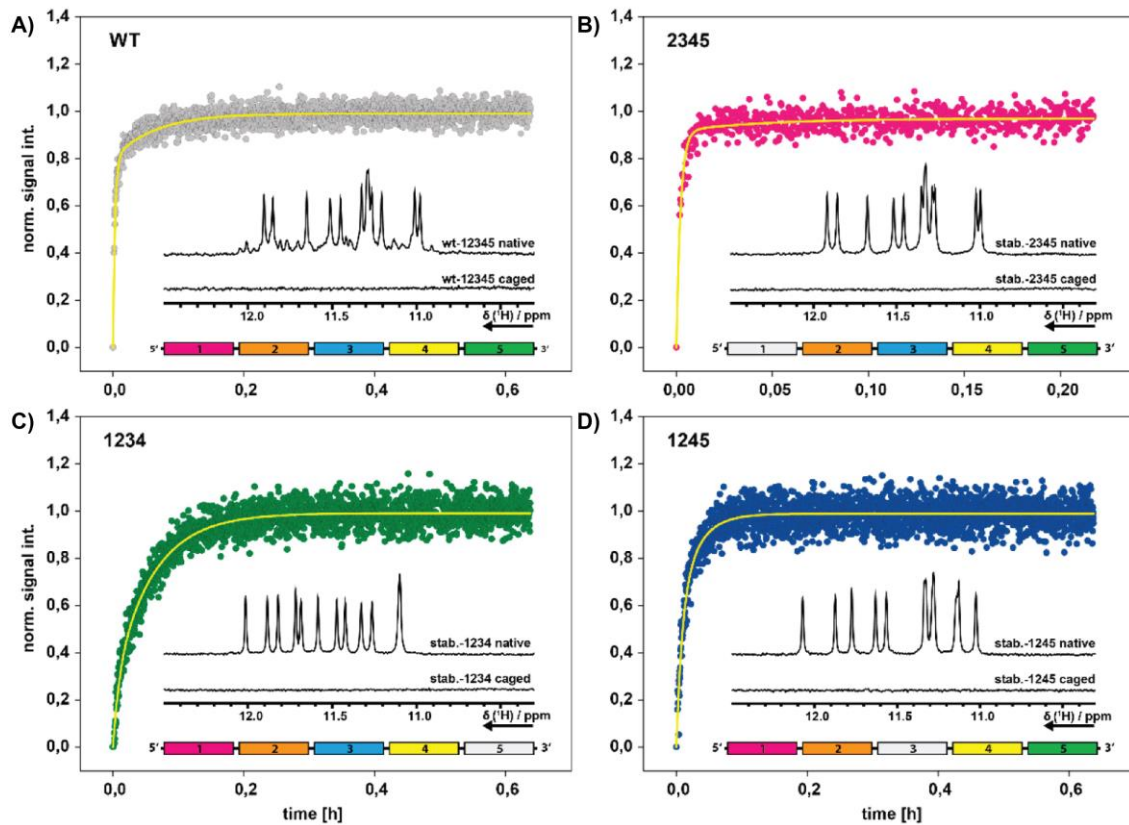


Abb. 96: Kinetiken der G4-Spare-Tire-Isomere basierend auf Daten der zeitaufgelösten NMR-Studien (100 μM DNA, 5 mM K^+ , 298 K). Dargestellt sind jeweils ^1H -NMR-Spektren der Iminoprotone-Region vor (untere Spektren) und nach Belichtung (obere Spektren). Zusätzlich sind die Kinetiken nach biexponentieller nichtlinearer Regression der lichtinduzierten Faltung des Wildtyps (A, grau), der stabilisierten Hauptkonformation **stab.-2345** (B, rosa) und der stabilisierten Nebenkongformationen **stab.-1234** (C, grün) und **stab.-1245** (D, blau) dargestellt. Nachdruck mit Erlaubnis^[425] (© 2021, Die Autoren, veröffentlicht durch die American Chemical Society, Abb. von Dr. T. Grün)

Die NMR-spektroskopischen Experimente der photolabil-geschützten DNA-Sequenzen von Dr. T. Grün konnten eine vielfältige Faltungs- und Konformationslandschaft des cMYC-G-Quadruplexes nachweisen.

3.3.2 NPE-geschützte bistabile RNA zur Untersuchung der Interaktion des RNA-Chaperons StpA

Zur Untersuchung bistabiler RNAs und deren Interaktion mit dem RNA-Chaperon StpA wurden photolabil-geschützte RNAs *via* chemischer Festphasensynthese hergestellt und charakterisiert. Neben dem benötigten (S)-NPE-geschützten Guanodin-Phosphoramidit **86** wurde auch versucht ein DEACM-geschütztes Uridin-Phosphoramidit **92** darzustellen und unter UltraMILD-Bedingungen in ein RNA-Konstrukt einzubauen. Die NPE-modifizierten Sequenzen wurden von Katharina Hohmann (AK Fürtig, Goethe-Universität Frankfurt) anschließend NMR-spektroskopisch untersucht. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind Teil einer Publikation.^[426]

3.3.2.1 Synthese der photolabil-geschützten Phosphoramidite und RNA-Synthesen

Das für die Synthese der photolabil-geschützten RNA benötigte Guanodin-Phosphoramidit **rG^{S-NPE}** (**86**) wurde nach Literaturvorschrift hergestellt. Auch für diese Kollaboration wurde das Phosphoramidit enantiomerenrein photolabil-modifiziert ((*S*)-NPE), um im Folgenden eine saubere NMR-spektroskopische Charakterisierung der RNA zu ermöglichen. Alle Reaktionsschritte sind in Abb. 97 zusammengefasst.

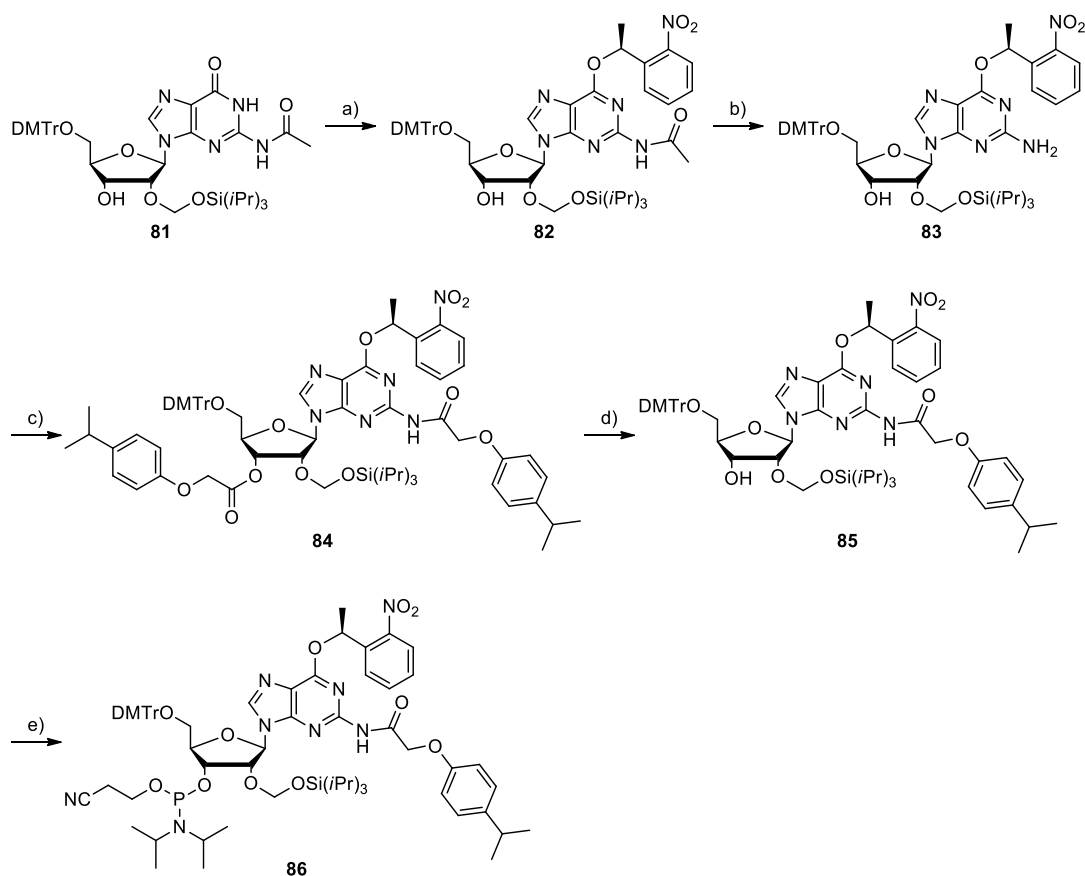


Abb. 97: Übersicht der Synthese des *S*-NPE-geschützten Guanodin-Phosphoramidits **86**. a) (*R*)-NPE, PPh₃, DIAD, THF, RT, 76%; b) 12 M MeNH₂ in H₂O, THF, RT, 93% c) *i*PrPac-Cl, DMAP, Pyridin, 0 °C – RT, 91%; d) NH₃/MeOH/THF 1:1:1 (v/v/v), RT, 83%; e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 73%.

Die Synthese startete ausgehend von Verbindung **81**, die kommerziell erworben wurde (*ChemGenes*). Hierbei war es wichtig, dass es sich bei der exozyklischen Schutzgruppe an Position N² um eine Acetylschutzgruppe handelte. Größere Schutzgruppen, wie die später eingeführte *i*PrPac- oder eine tac-Schutzgruppe sind in Kombination mit den vorhandenen 5'-*O*-DMTr- und 3'-*O*-TOM-Schutzgruppen sterisch zu anspruchsvoll, wodurch die Einführung des NPEs behindert wird. N²-Acetyl-geschütztes **81** wurde mit enantiomerenreinem *R*-NPE (Details zur Isomerentrennung siehe Abschnitt 3.3.1.1), PPh₃ und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) in einer Mitsunobu-Reaktion^[428,429] umgesetzt. Durch Inversion des stereogenen Zentrums entstand bei dieser Reaktion das *S*-NPE-geschützte Guanodin-Derivat **82** zu 76%. Es folgte die Umsetzung von **82** mit 12 M Methylamin-Lösung bei Raumtemperatur zur Abspaltung der Acetylschutzgruppe. Die säurelabile DMTr- und fluoridlabile TOM-Schutzgruppe sind unter diesen Reaktionsbedingungen stabil. Verbindung **83** wurde nach entfernen des Lösungsmittels ohne weitere Aufreinigung im nächsten

Schritt umgesetzt. Zur Einführung der UltraMILD-abspaltbaren *i*PrPac-Schutzgruppe wurde **83** unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss mit Isopropylphenoxyacetylchlorid umgesetzt. Bei dieser Reaktion reagiert auch die 3'-Hydroxygruppe mit dem Säurechlorid, sodass das zweifach substituierte Derivat **84** mit einer Ausbeute von 91% gebildet wurde. Die selektive Abspaltung der zusätzlichen *i*PrPac-Schutzgruppe an 3'-*O*-Position konnte durch Umsetzung von **84** mit einem 1:1:1 (v/v/v)-Gemisch aus NH₃/MeOH/THF erzielt werden. Aus dieser Reaktion resultierte Verbindung **85** (83%), die nur an Position *N*² basenlabil *i*PrPac-geschützt war nach einer Reaktionszeit von 2 h. Längere Reaktionszeiten können auch zu einer Abspaltung der Aminoschutzgruppe führen und sind deshalb zu vermeiden. Im letzten Reaktionsschritt folgte die Umsetzung des NPE-geschützten Derivats **85** zum finalen Phosphoramidit **86**. Die finale säulenchromatographische Aufreinigung wurde mit analysereinen Lösungsmitteln durchgeführt, um die Oxidation des Phosphoramidits zu vermeiden. Das gewünschte Zielderivat konnte mit 73% Ausbeute isoliert werden. Bevor das synthetisierte photolabil-geschützte Sonderamidit in RNA-Synthesen eingesetzt wurde, wurde es ebenfalls (analog zu dem NPE-geschützten DNA-Amidit) mindestens 24 h im Hochvakuum getrocknet.

Um eine Abspaltung einer photolabilen Schutzgruppe bei 405 nm zu ermöglichen, sollte zusätzlich versucht werden ein DEACM-geschütztes Uridin-Phosphoramidit unter UltraMILD-Bedingungen in eine RNA-Sequenz einzuführen. Hierzu wurde zunächst das benötigte Uridin-Phosphoramidit synthetisiert. Bereits bei der Erarbeitung der Syntheseroute stellte sich die Labilität der Cumarin-Schutzgruppe als Herausforderung dar. Die Reihenfolge, in der die einzelnen Schutzgruppen eingeführt wurden, spielte dabei eine entscheidende Rolle. Erste Versuche gingen von zuvor synthetisiertem DEACM-geschütztem Uridin **42** aus. Zwar war die Synthese des 5'-*O*-DMTr-geschützten Derivats **87** noch mit guten Ausbeuten (87%) möglich, jedoch wurde die DEACM-Schutzgruppe während der nach Literaturvorschrift^[64] durchgeführten Einführung der TOM-Schutzgruppe an 3'-Position bei 80 °C vollständig abgespalten. Der direkte Phosphoramidit-Vorläufer **88** konnte auf diesem Weg nicht dargestellt werden (Abb. 98).

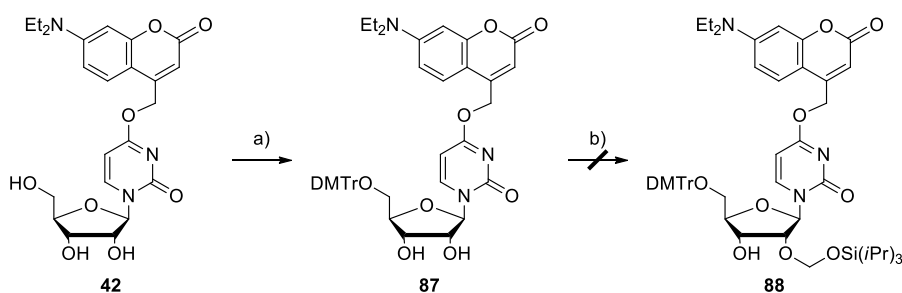


Abb. 98: Erste untersuchte Syntheseroute zum DEACM-geschützten Uridin-Phosphoramidit. a) DMTr-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 87%; b) Bu₂SnCl₂, DIPEA, TOM-Cl, 1,2-Dichlorethan, RT – 80 °C, resultiert in Abspaltung der DEACM-Gruppe.

Angelehnt an eine Literaturvorschrift von Pitsch *et al.* wurden in folgenden Versuchen zuerst die DMTr- und die TOM-Schutzgruppe eingeführt, bevor die Umsetzung mit der photolabilen Schutzgruppe erfolgte. Insgesamt ist diese Synthesestrategie zusätzlich um vier Reaktionsschritte kürzer (wenn man eine Syntheseroute ausgehend von Uridin anstrebt und dabei die Einführung der DEACM-Gruppe wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben angeht). Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass auch die alternative Synthesestrategie durch die Labilität der DEACM-Schutzgruppe beeinträchtigt wird. Verminderte Ausbeuten sind das Resultat. Die Syntheseroute ausgehend von Uridin **89** ist in Abb. 99 zusammengefasst.

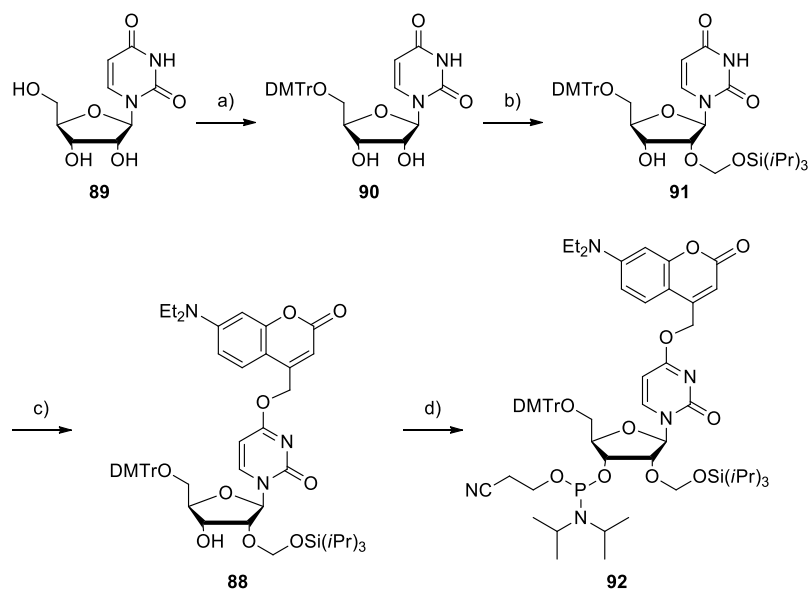


Abb. 99: Übersicht der Synthese des DEACM-geschützten Guanosin-Phosphoramidits **92**. a) DMTr-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 94%; b) Bu₂SnCl₂, DIPEA, TOM-Cl, 1,2-Dichlorethan, RT – 80 °C, 53% c) DEACM-OH, DEAD, PPh₃, THF, 0 °C - RT, 15%; d) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 36%.

Im ersten Reaktionsschritt wurde die 5'-Hydroxygruppe mit der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe versehen. Der primäre Alkohol der 5'-Position wird bei dieser Reaktion bevorzugt umgesetzt, sodass bei Einsatz eines geringen Überschusses DMTr-Cl die Tritylierung selektiv stattfindet. Mehrfach tritylierte Derivate wurden nicht beobachtet. Verbindung **90** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit 94%iger Ausbeute isoliert werden. Es folgte die Einführung der fluoridlabilen 2'-TOM-Schutzgruppe. [(Triisopropylsilyl)oxy]methylchlorid (TOM-Cl) wurde sowohl kommerziell erworben (*Sigma Aldrich*) als auch nach Literaturvorschrift^[64] hergestellt. Bei allen Reaktionen mit TOM-Cl konnte die Bildung des 2'-*O*-substituierten als auch des 3'-*O*-geschützten Derivats beobachtet werden. Zunächst wurde das DMTr-geschützte Uridin unter basischen Bedingungen mit Dibutylzinnchlorid umgesetzt, wobei 2',3'-Dibutylstannyliden gebildet wird. Der zyklische Übergangszustand wurde durch die weitere Umsetzung mit dem Säurechlorid bei 80 °C in die beiden TOM-geschützten Isomere umgesetzt. Die beiden Isomere konnten mittels säulenchromatographischer Aufreinigung gut voneinander getrennt und durch Analyse von 2D ¹H,¹H-COSY-NMR-Spektren identifiziert werden. Das gewünschte 2'-*O*-alkylierte Derivat **91** konnte mit einer Ausbeute von 53% isoliert werden. Das 3'-*O*-substituierte Nebenprodukt konnte mit einem Anteil von 27% nachgewiesen werden. Es folgte die Umsetzung von Verbindung **91** mit DEACM-OH unter Lichtausschluss. Dieser Reaktionsschritt zeigte die schwächsten Ausbeuten. Angelehnt an die Synthese der NPE-geschützten Derivate wurde eine Reaktionsführung unter Mitsunobu-Bedingungen angestrebt. Dabei wurde neben DEACM-OH auch DEAD und PPh₃ zur Reaktionslösung hinzugegeben, allerdings zeigte sich auch nach Verlängerung der Reaktionszeit auf 16 h nur wenig Produktbildung. Nach insgesamt 26 h wurde die Reaktion trotz geringem Umsatz beendet und aufgearbeitet. Bereits an diesem Punkt zeigte sich die Herausforderung in der Handhabung von Verbindung **88**. Unter zu basischen Bedingungen wurde die DEACM-Schutzgruppe teilweise abgespalten. Wurde die Reaktionslösung zu sauer, führte dies zu der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde basierend auf diesen Beobachtungen vermutet, dass die DEACM-Gruppe vergleichbar mit einer NDBF-Schutzgruppe^[76,77] nicht den Standardbedingungen der ammoniakalischen Abspaltung nach erfolgter Festphasensynthese standhalten würde. Das finale Phosphoramidit **92** konnte nach

säulenchromatographischer Aufreinigung mit 36% Ausbeute isoliert werden. Eine erste RNA-Testsynthese erfolgte unter UltraMILD-Bedingungen. Abspaltungstests bestätigten die Vermutungen, dass die DEACM-Schutzgruppe nicht stabil genug ist. Bei Versuchen mit einem 3:1 Gemisch aus 32% NH₄OH/EtOH (v/v) für 4 h bei Raumtemperatur wurde ein Großteil der DEACM-Gruppe abgespalten. Versuche mit 50 mM K₂CO₃/MeOH (ebenfalls 4 h RT) zeigten vergleichbare Ergebnisse. Auch bei kürzeren Abspaltungszeiten wurde zumindest ein Teil der photolabilen Schutzgruppe hydrolysiert. Allerdings verlief die Abspaltung der exozyklischen Schutzgruppen in diesen Fällen (50 mM K₂CO₃/MeOH, 2 h, RT) nicht quantitativ. Unter diesen Umständen wurde von einer RNA-Synthese mit DEACM-geschütztem Uridin im NMR-Maßstab abgesehen.

Für das Kollaborationsprojekt mit Katharina Hohmann (AK Fürtig) sollten zur NMR-spektroskopischen Untersuchung der Interaktion der C-terminalen Domäne des RNA-Chaperons StpA (StpA-CTD) mit bistabiler RNA zwei photolabil-geschützte RNA-20mere hergestellt werden. Das besondere an diesen 20meren ist, dass sie eine 5'-terminale Stamm-Schleifen-Struktur ausbilden kann, die sich in eine 3'-terminale Stamm-Schleifen-Struktur umfalten kann. Die ineinander übergehenden Haarnadelkonformationen liegen in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht vor.^[289] Besonders bei niedrigeren Temperaturen nimmt die Geschwindigkeit der Umfaltung ab. Durch die Interaktion der RNA mit Proteinen wie dem RNA-Chaperon StpA aus *E. coli* werden Wechselwirkungen zwischen Basenpaaren destabilisiert und die Kinetiken der (Rück-) Faltungsreaktionen von RNA beschleunigen. Der genaue Mechanismus der Beschleunigung und die Interaktion zwischen RNA und Chaperon ist allerdings weitestgehend unbekannt.^[431,432] Um die Rückfaltungsreaktion zeitaufgelöst NMR-spektroskopisch untersuchen zu können, sollte die bistabile RNA durch die Einführung einer einzelnen NPE-Schutzgruppe in Konformation A „gefangen“ und die Ausbildung von Konformation B unterbunden werden. Zur Herstellung der photolabil-geschützten bistabilen RNA-Sequenzen im NMR-Maßstab wurde ausschließlich das zuvor hergestellte enantiomerenreine rG^{S-NPE}-Phosphoramidit **86** verwendet. **86** wurde in Form einer 0,11 M Lösung in absolutem Acetonitril in RNA-Synthesen unter UltraMILD-Bedingungen eingesetzt (Details zur Synthese unter Abschnitt 4.2.4). Nach erfolgter Synthese und Abspaltung unter UltraMILD-Bedingungen wurde die RNA mittels RP-HPLC aufgereinigt. Vergleichbar zu dem in Kapitel 3.3.1.1 beschriebenen Vorgehen konnte auch bei den hergestellten RNA-Proben eine direkte Auftrennung nach DMTr-Abspaltung durch die Anpassung des Elutionsgradienten erzielt werden. Hier war auch die Kürze der Sequenzen (20 Nukleobasen) von Vorteil, da eine Abtrennung vor allem von n-1-Abbruchsequenzen bei längeren Oligonukleotiden erschwert wird. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurde die RP-HPLC-Aufreinigung bei 60 °C durchgeführt (Säule 2, Gradient 2 oder Säule 3, Gradient 3, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/MeOH-Puffer, pH 8,0 bei 60 °C). Das gewünschte Volllängenprodukt mit photolabiler Schutzgruppe konnte direkt sauber von Abbruchsequenzen abgetrennt und die Anzahl der HPLC-Aufreinigungsschritte auf ein Minimum begrenzt und Ausbeuteverluste verringert werden. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde, wurden alle RNAs über NAP-Säulen eluiert und mehrmals mit ddH₂O coevaporiert, um alle Pufferrückstände zu entfernen. Insgesamt wurden zwei photolabil-modifizierte und auch die beiden entsprechenden unmodifizierten RNA-Sequenzen in NMR-Mengen (min. 300 nmol) synthetisiert (Tabelle 5). Die Identität und Reinheit aller Sequenzen konnte mittels analytischer RP-HPLC sowie massenspektrometrisch bestätigt werden.

Tabelle 5: Bezeichnung und Sequenzen sowie Positionierung der photolabilen Schutzgruppen (X = rG^{S-NPE}) der synthetisierten RNAs zur Untersuchung der StpA-Interaktion.

Oligo	Sequenz 5'→3'
G^{S-NPE}-20mer(A)	5'-r[GAC CGX AAG GUC CGC CUU CC]-3'
ctrl-20mer(A)	5'-r[GAC CGG AAG GUC CGC CUU CC]-3'
G^{S-NPE}-20mer(B)	5'-r[GAA GGG CAA CCU UCG GXU UG]-3'
ctrl-20mer(B)	5'-r[GAA GGG CAA CCU UCG GGU UG]-3'

Alle hergestellten RNA-Proben wurden an Katharina Hohmann (AK Fürtig) übergeben, die die lichtinduzierte Umfaltung der RNAs in Gegenwart des StpA-Proteins NMR-spektroskopisch untersuchte. Die gewonnenen Erkenntnisse aus der Untersuchung der photolabil-modifizierte RNA werden nachfolgend kurz zusammengefasst. Weitere Details sowie die Ergebnisse der Untersuchung weiterer modifizierter RNAs können der erschienenen Publikation^[426] und der Doktorarbeit von Katharina Hohmann entnommen werden, auf die hiermit verwiesen sei.

3.3.2.2 NMR-Messungen und Erkenntnisse

Die Faltungskinetiken der NPE-modifizierte RNA **G^{S-NPE}-20mer(A)** wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten mittels NMR-Spektroskopie untersucht.^[289,290] Bei diesen Studien konnte gezeigt werden, dass eine einzelne NPE-Schutzgruppe an der gewählten Position 6 eine Umfaltung von Konformation A zu Konformation B vollständig unterbindet (Abb. 100).

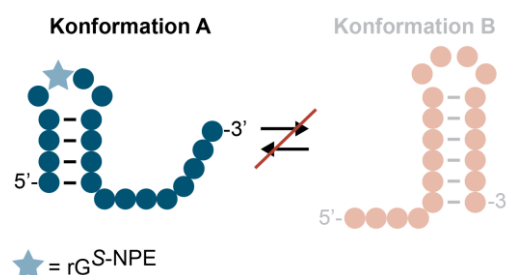


Abb. 100: Schematische Darstellung der photolabil-geschützten Sequenz **G^{S-NPE}-20mer(A)**. Die NPE-Schutzgruppe (blauer Stern) an Position 6 verhindert das Umfalten der RNA in Konformation B (Abb. angelehnt an die Literatur^[426]).

In den aktuellen Arbeiten von Katharina Hohmann konnte mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass das untersuchte RNA-20mer durch Einführung der photolabilen Schutzgruppe auch in Gegenwart des RNA-Chaperons StpA aus *E. coli* in Konformation A „gefangen“ bleibt und keine Umfaltung zur 3'-terminalen Haarnadelstruktur (Konformation B) stattfindet. In Abb. 101A ist die jeweilige Iminoprotonenregion der ¹H-NMR-Spektren vor Belichtung und nach Belichtung (355 nm, 4 W, 1 s) abgebildet. Die beiden Spektren auf der linken Seite zeigen dabei die Signale der RNA-Sekundärstruktur ohne Zusatz von StpA. Es ist deutlich zu sehen, dass im photolabil-geschützten Zustand nur Konformation A vorlag (blaue Zuordnung). Erst nach Belichtung konnte eine Umfaltung stattfinden und zusätzliche Signale detektiert werden (rote Zuordnung, Konformation B). Vergleicht man die beiden Spektren der RNA alleine mit den beiden rechten Spektren der RNA im Komplex mit StpA, lässt sich ein analoges Verhalten feststellen. Durch Zugabe von StpA kam es lediglich zu einer Verbreiterung der NMR-Signale, jedoch nicht zu einer Umfaltung. Nach Photolyse konnten die Signale ausgehend von Konformation B ebenfalls detektiert und zugeordnet werden.

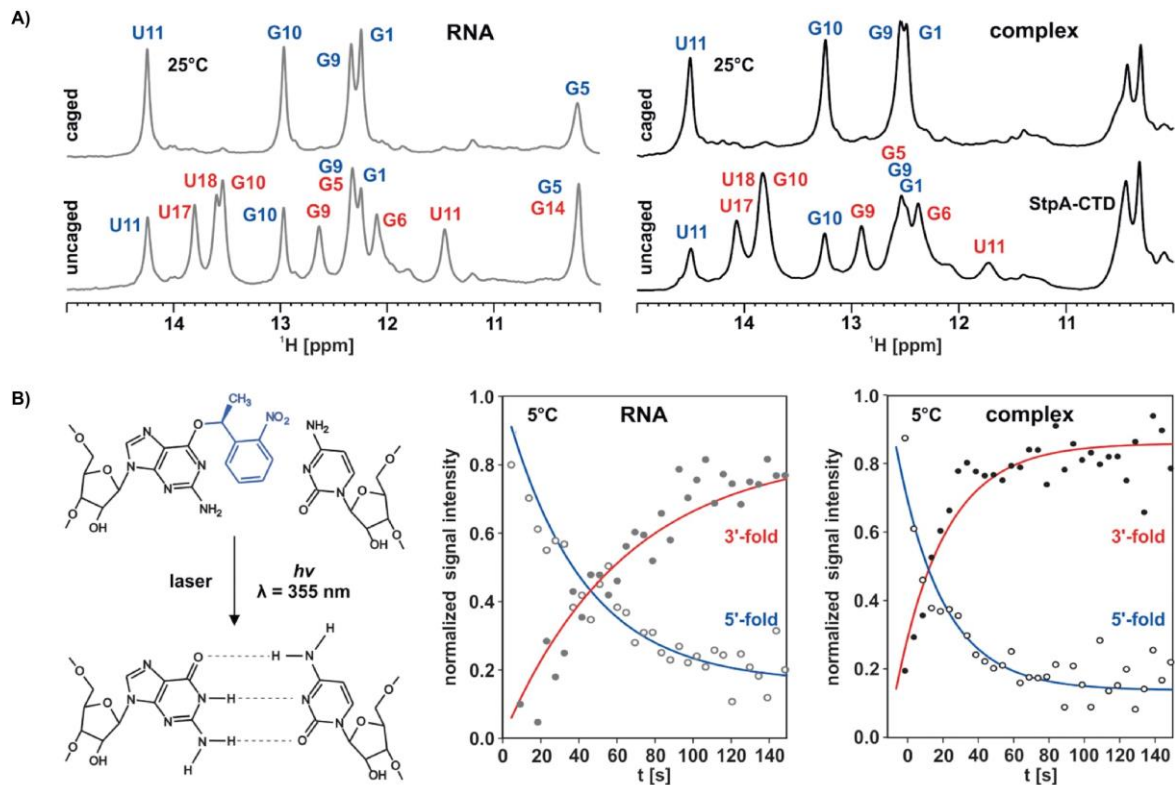


Abb. 101: Lichtinduzierte Umfaltung des bistabilen RNA-20mers. A) ¹H-NMR-Iminoprotonenspektren der RNA ohne StpA (linke Spektren) und im Komplex mit StpA (rechte Spektren) vor (oben) und nach (unten) Belichtung. Die Signale sind farblich den beiden Konformationen zugeordnet. Es ist deutlich zu sehen, dass vor Belichtung ausschließlich Konformation A vorliegt (blaue Signale). B) Schematische Darstellung der Photolyse- und Kinetiken der RNA-Umfaltung ohne StpA und im Komplex mit StpA. Nachdruck mit Erlaubnis^[426] (© 2021, Oxford University Press, CC BY Lizenz, Abb. von K. Hohmann)

Beim Vergleich der bestimmten Kinetiken wird deutlich, dass die Umfaltung durch Zugabe von StpA begünstigt/schneller abläuft. Die Kinetiken der RNA alleine lagen bei $k_{5'-3'RNA} = (16,6 \pm 6) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $k_{3'-5'RNA} = (3,1 \pm 1,2) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Im Falle der StpA-unterstützten Umfaltung konnten Kinetiken von $k_{5'-3'Komplex} = (30,4 \pm 5) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $k_{3'-5'Komplex} = (4,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ gemessen werden. Die Zugabe von StpA verdoppelt somit die Geschwindigkeit der Konformationsänderung. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersuchte Katharina Hohmann weitere (nicht lichtregulierbare) Faktoren, die das Faltungsverhalten der bistabilen RNA beeinflussen. Für weitere Informationen zu diesem Projekt sei daher an dieser Stelle auf die Publikation^[426] und die Doktorarbeit von Katharina Hohmann verwiesen.

3.3.3 Azobenzol-modifizierte G-Quadruplex-Sequenzen für CD-Messungen

Um die lichtregulierte Ausbildung von intermolekularen G-Quadruplexstrukturen mittels CD-spektroskopischer Methoden untersuchen zu können, wurden reversibel photoschaltbare *para/para*-verbrückte Azobenzol-Oligonukleotide synthetisiert. Hierbei wurde das benötigte Azobenzol-Phosphoramidit **100** hergestellt und anschließend zunächst nach Literaturangaben in eine 5 Nucleobasen lange DNA eingebaut (5'-d[GG-*para/para*-Azo-GG]-3').^[323] Dieses minimale Strukturmotiv wurde bereits zuvor von Dr. Chavdar Slavov (AK Wachtveitl, Goethe-Universität

Frankfurt) mittels CD-Spektroskopie untersucht und sollte nun in Ultrakurzzeitmessungen analysiert werden. Basierend auf dieser Sequenz wurde ein analoges *para/para*-verbrücktes RNA-Derivat synthetisiert, welches von Florian Hurter (AK Wachtveitl, Gothe-Universität Frankfurt) ebenfalls in ersten CD-Experimenten untersucht wurde.

3.3.3.1 Synthese eines Azobenzol-Phosphoramidits und Oligonukleotidsynthesen

Guanosin-reiche Oligonukleotide können G-Quadruplexstrukturen ausbilden. Die Sekundärstruktur kann dabei intra- und auch intermolekular entstehen. Das von Thevarpadam *et al.* vorgestellte *para/para*-substituierte Azobenzol-Phosphoramidit **100** wurde in einer 6-stufigen Synthese hergestellt (siehe Abb. 102).^[323]

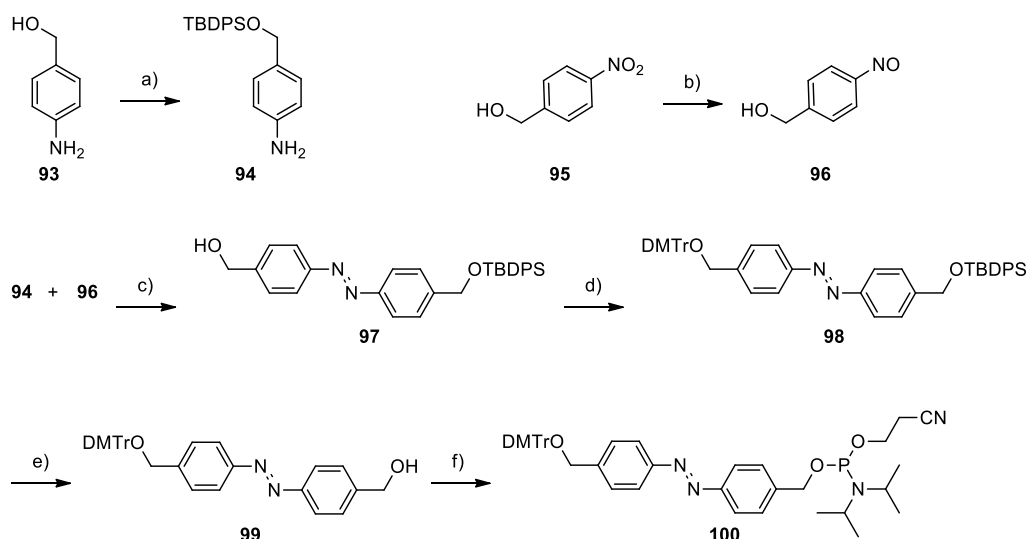


Abb. 102: Übersicht der Synthese des *para/para*-substituierten Azobenzol-Phosphoramidits **100**. a) TBDPSCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 74%; b1) NH₄Cl, Zn, EtOH/H₂O, RT; b2) FeCl₃·6 H₂O, EtOH/H₂O, < -5 °C, 83%; c) AcOH, RT, 30%; d) DMTrCl, DMAP, Pyridin, quantitativ; e) TBAF, THF, RT, 99%; f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 89%

Im ersten Reaktionsschritt wurde die Hydroxygruppe von 4-Aminobenzylalkohol **93** durch Umsetzung mit TBDPSCl unter Zugabe von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) geschützt. Nach 20 h Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet und das Produkt säulenchromatographisch isoliert. Verbindung **94** konnte als braune Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 74% erhalten werden. Die Synthese des Nitroso-Derivats **96** verlief ausgehend von 4-Nitrobenzylalkohol **95**. Die Nitroverbindung wurde durch Zugabe von Zinkstaub (Zn) und Ammoniumchlorid (NH₄Cl) in Ethanol bei Raumtemperatur reduziert. Die resultierende Hydroxylamin-Lösung wurde mit Eisen(III)chlorid-Hexahydrat (FeCl₃·6 H₂O) bei < -5 °C versetzt, wodurch die Oxidation zum entsprechenden Nitroso-Derivat **96** erfolgte. Die Reaktionstemperatur sollte nicht zu stark ansteigen, um eine weitere Oxidation zurück zur Nitro-Ausgangsverbindung **95** zu vermeiden. Der Reaktionsverlauf konnte durch einen Farbumschlag der Lösung von gelb zu grün beobachtet werden. Verbindung **96** konnte als dunkelgrünes Öl erhalten werden, welches in der Kälte grün auskristallisierte und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde. Eine Ausbeute von 83% konnte dabei erzielt werden. Im nächsten Reaktionsschritt folgte die Kupplung der

hergestellten Nitrosoverbindung **96** mit dem TBDPS-geschützten Amino-Derivat **94** in einer Mills-Reaktion.^[433] **94** und **96** wurden bei Raumtemperatur in konzentrierter Essigsäure umgesetzt und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt. Dabei konnte das TBDPS-geschützte Azobenzol **97** als orangefarbener Feststoff mit 30% Ausbeute isoliert werden. Da die im nächsten Reaktionsschritt eingeführte DMTr-Schutzgruppe säurelabil ist, wurde **97** vor der weiteren Umsetzung mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet, um alle Essigsäurereste vollständig zu entfernen. Es folgte die DMTr-Schätzung der freien Hydroxygruppe bei Raumtemperatur mit quantitativem Umsatz. Verbindung **98** wurde anschließend zur Abspaltung der fluoridlabilen TBDPS-Schutzgruppe mit 1 M TBAF-Lösung versetzt und säulenchromatographisch aufgereinigt. **99** konnte mit einer Ausbeute von 99% erzielt werden. Im letzten Reaktionsschritt wurde Verbindung **99** zum gewünschten Phosphoramidit umgesetzt. Die finale säulenchromatographische Aufreinigung wurde auch bei dieser Zielverbindung mit analysereinen Lösungsmitteln durchgeführt, um die Oxidation des Phosphoramidits zu vermeiden. Das *para/para*-substituierte Azobenzol-Phosphoramidit **100** konnte mit einer Ausbeute von 89% isoliert werden. Bevor das synthetisierte photoschaltbare Sonderamidit in Oligonukleotidsynthesen eingesetzt wurde, wurde es ebenfalls (analog zu den NPE-geschützten Amiditen) mindestens 24 h im Hochvakuum getrocknet.

Für kollaborative Projekte mit Dr. Chavdar Slavov und Florian Hurter (beide AK Wachtveitl) sollten zur CD-spektroskopischen Untersuchung Azobenzol-verbrückte Guanosin-Oligonukleotide hergestellt werden. In Vorarbeiten von Dr. Julie Thevarpadam konnte gezeigt werden, dass vier Desoxyguanosine, die über einen Azobenzol-Photoschalter verbrückt sind, intermolekular G-Quadruplexstrukturen ausbilden können.^[323] Eine solche Probe wurde bereits 2016 von Dr. Chavdar Slavov analysiert, um Erkenntnisse über die Dynamiken der intermolekularen Quadruplexbildung zu erlangen. Damals wurden stationäre UV/vis- und FTIR-Spektren sowie Ultrakurzzeit-Experimente durchgeführt. Dieses photoschaltbare minimale Strukturmotiv sollte nun reproduziert werden, um durch weitere ultraschnelle CD-Messungen zusätzliche Erkenntnisse zu erlangen. Analog dazu sollte ein entsprechendes RNA-5mer und ein RNA-7mer mit dem gleichen Azobenzol-Derivat hergestellt werden. Die beiden RNA-Proben sollten von Florian Hurter vergleichbar zu den Experimenten von Thevarpadam und Slavov spektroskopisch untersucht werden. Das hergestellte Phosphoramidit **100** wurde als 0,11 M Lösung in Acetonitril unter Standardbedingungen in DNA und RNA eingebaut (Details zur Synthese siehe Abschnitt 4.2.5). Nach erfolgter Synthese und ammoniakalischer Abspaltung wurden alle Oligonukleotide mittels RP-HPLC aufgereinigt. Die Elution fand in allen Fällen mit HFIP/MEOH bei 60 °C statt. Die Aufreinigung bei erhöhter Temperatur verhinderte die Ausbildung von intermolekularen Sekundärstrukturen und ermöglichte eine gute Abtrennung des Produktpeaks. Aufgrund der enormen Kürze aller Sequenzen konnte fast ausschließlich Produkt nachgewiesen werden. Bei niedrigeren Temperaturen konnten zusätzliche verbreiterte Peaks beobachtet werden, die massenspektrometrisch ebenfalls als Produktpeaks identifiziert wurden. Zusätzlich konnten alle Produkte sowohl als Monomere als auch als Dimere nachgewiesen werden. Abschließend wurden alle Oligonukleotide über NAP-Säulen eluiert und mehrmals mit ddH₂O coevaporiert, um alle Pufferrückstände zu entfernen. Insgesamt wurde 1 μM des photoschaltbaren DNA-5mers (**DNA-[GG-Azo-GG]**; 5'-d[GG(*para/para*-Azo)GG]-3') und jeweils ~300 nmol der beiden RNA-Sequenzen (**RNA-[GG-Azo-GG]**; 5'-r[GG(*para/para*-Azo)GG]-3' und **RNA-[GGG-Azo-GGG]**; 5'-r[GGG(*para/para*-Azo)GGG]-3') hergestellt (Tabelle 6). Die Identität und Reinheit aller Sequenzen konnte mittels analytischer RP-HPLC sowie massenspektrometrisch bestätigt werden.

Tabelle 6: Bezeichnung und Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide zur CD-spektroskopischen Untersuchung.

Oligo	Sequenz 5'→3'
DNA-[GG-Azo-GG]	5'-d[GG(<i>para/para</i> -Azo)GG]-3'
RNA-[GG-Azo-GG]	5'-r[GG(<i>para/para</i> -Azo)GG]-3'
RNA-[GGG-Azo-GGG]	5'-r[GGG(<i>para/para</i> -Azo)GGG]-3'

Alle hergestellten Proben wurden an Dr. Chavdar Slavov und Florian Hurter (AK Wachtveitl) übergeben, die die intermolekulare G-Quadruplexbildung CD-spektroskopisch untersuchten.

3.3.3.2 CD-Messungen und Erkenntnisse

In vorangegangenen Arbeiten^[323] konnte mit der Azobenzol-verbrückten DNA-Probe eine lichtregulierbare intermolekulare G-Quadruplexbildung festgestellt werden. Im *trans*-Zustand des Azobenzols war die Ausbildung einer Sekundärstruktur erkennbar. Durch Belichtung mit UV-Licht und damit Isomerisierung des Azobenzol-Linkers in den *cis*-Zustand wurde die intermolekulare Interaktion und Ausbildung der G-Tetraden gestört. Diese Beobachtung wurde ebenfalls NMR-spektroskopisch bestätigt. Insgesamt konnte man mit Hilfe der gesammelten Ergebnisse auf einen symmetrischen Aufbau schließen, der sich aus zwei antiparallelen bimolekularen G4 zusammensetzte (Abb. 103).

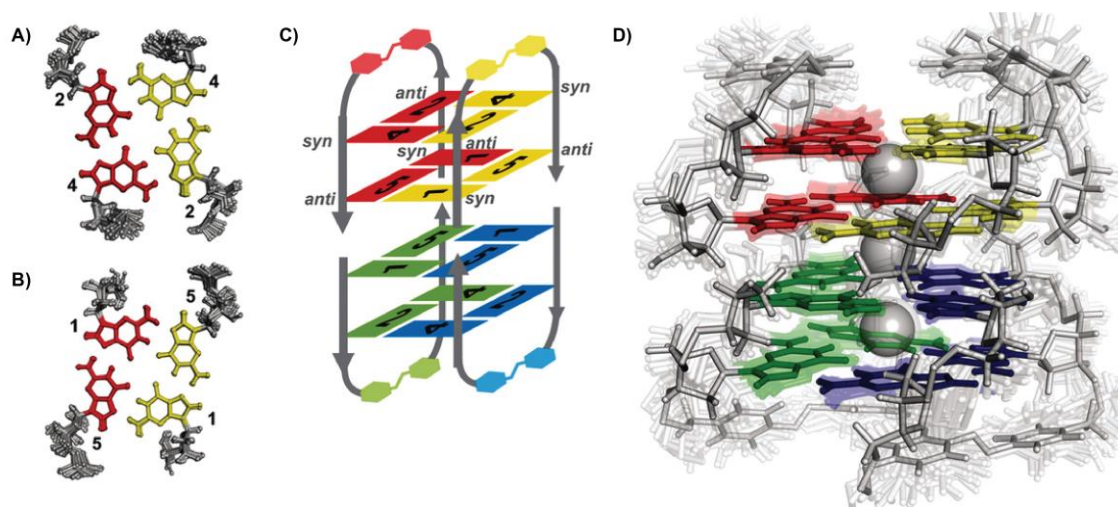


Abb. 103: Ausbildung eines intermolekularen G-Quadruplex. A) Darstellung der Guanosine 2 und 4 innerhalb einer G-Tetrade; B) Darstellung der Guanosine 1 und 5 innerhalb einer G-Tetrade; C) Schematische Darstellung der G-Quadruplex-Anordnung. Durch intermolekulare Wechselwirkungen entsteht ein insgesamt vierlagiger G-Quadruplex; D) NMR-basierte Struktur des Kalium (graue Kugeln)-koordinierten Quadruplexes (PDB-ID: 2N9Q). (Nachdruck mit Erlaubnis^[323], © 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA).

Das hergestellte DNA-5mer sollte nun in weiteren ultraschnellen CD-Experimenten eingesetzt werden, um zusätzliche Aufschlüsse über die Faltungsdynamiken zu erlangen. Erste Experimente lieferten leider keine brauchbaren Ergebnisse. Polarisationsartefakte erschwerten eindeutige Aussagen zum Faltungsverhalten. Zusätzlich wurde vermutet, dass die Faltungsdynamiken durch die Wechselwirkungen der Guanosine verlangsamt werden und daher keine erfolgreiche Messung im Femtosekunden-Bereich möglich war. Erste Messergebnisse der RNA-Proben deuteten darauf hin, dass sich, anders als erwartet, keine homogenen Struktur motive ausbildeten. Auch durch

Änderung der Kaliumkonzentration oder durch Belichtung und damit Isomerisierung des Azobenzol-Linkers ließen sich bisher keine nennenswerten Strukturänderungen herbeiführen. Auch im Falle des 7mers konnte keine lichtinduzierte Umstrukturierung beobachtet werden. Bisher deuten die Ergebnisse eher auf polymorphe Zustände hin. Ein Abbau der RNA konnte nach erneuter massenspektrometrischer Analyse ausgeschlossen werden. Für ein genaues Verständnis und weitere Erkenntnisse sind zusätzliche Experimente nötig. Diese werden im Rahmen der Doktorarbeit von Florian Hurter weiterverfolgt.

3.3.4 Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Dissertation verschiedene NPE- und Azobenzol-modifizierte Phosphoramidite hergestellt und erfolgreich in Oligonukleotide eingebaut werden. Die Synthese eines DEACM-geschützten Uridin-Phosphoramidits war aufgrund der labilen Schutzgruppe eine Herausforderung. Zwar konnte das gewünschte Phosphoramidit dargestellt werden, allerdings erwies es sich auch unter UltraMILD-Bedingungen als zu labil zum Einbau mittels chemischer Festphasensynthese. Die synthetisierten NPE- und Azobenzol-modifizierten Oligonukleotide konnten im NMR-Maßstab (> 300 nmol) synthetisiert und von verschiedenen Kollaborationspartnern erfolgreich in NMR- und CD-Spektroskopischen Experimenten eingesetzt werden.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen ermöglichten die Aufklärung der vielfältigen Faltungswege der G-Quadruplexstruktur innerhalb der cMYC-Promoterregion. Dank der Einführung der NPE-Schutzgruppe an unterschiedlichen Positionen innerhalb der DNA konnten einzelne Konformationen (sowohl die Hauptkonformation **stab.-2345** als auch die beiden Nebenkonzformationen **stab.-1234** und **stab.-1245**) stabilisiert und deren lichtinduzierte Sekundärstrukturbildung gezielt NMR-spektroskopisch untersucht werden. Außerdem konnte die StpA-unterstützte Umfaltung einer bistabilen RNA nach Photolyse analysiert werden. Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine einzelne definiert platzierte NPE-Schutzgruppe ausreicht, um die bistabile RNA zunächst in Konformation A so zu stabilisieren, dass eine Umfaltung zu Konformation B auch im Komplex mit StpA nicht nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe der Azobenzol-modifizierten Guanosin-reichen DNA- und RNA-Proben sollte eine G-Quadruplexausbildung mittels CD-Spektroskopie, angelehnt an vorangegangene Arbeiten von Thevarpadam *et al.*, untersucht werden. Erste Messungen des DNA-5mers mittels ultraschneller CD-Spektroskopie ergaben bislang keine verwertbaren Daten. Die beiden Azobenzol-verbrückten RNA-Proben wurden in ersten CD-spektroskopischen Untersuchungen eingesetzt. Dabei konnte bislang keine lichtregulierbare G-Quadruplexstruktur festgestellt werden. Weitere Untersuchungen bei unterschiedlichen Temperaturen sowie mit unterschiedlichen Natrium- und Kaliumkonzentrationen sollten folgen, um weitere Aussagen treffen zu können. Darüber hinaus sollte über zusätzliche Studien mittels NMR-Spektroskopie nachgedacht werden, um weitere Einblicke in die Strukturausbildung auf atomarer Ebene zu erlangen.

Alle kollaborativen Erkenntnisse lassen sich in einem Punkt zusammenfassen: die Einführung einzelner gut platzierter lichtregulierbarer Gruppen ermöglicht es, weitreichende Aussagen über das Zusammenspiel aus Struktur und Funktion von Oligonukleotiden treffen zu können.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien, Geräte und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle chemischen Reaktionen unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur durchgeführt. Wenn nötig, wurden die Apparaturen im Vakuum mit einem Heißluftfön ausgeheizt. Bei Verbindungen, die nicht an Luft stabil waren, wurde auf eine Handhabung und Lagerung (bei -20 °C) unter Argonatmosphäre geachtet.

Lösungsmittel und Reagenzien

Für chemische Synthesen wurden wasserfreie und größtenteils über Molsieb gelagerte Lösungsmittel der Reinheitsstufe p.a. (*pro analysi*) der Firmen *Acros Organics (Thermo Fisher Scientific)*, *Carl Roth*, *Sigma Aldrich (Merck)* oder *VWR* ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für Analysen mittels Dünnschichtchromatographie und Aufreinigungen über präparative Säulenchromatographie wurden Lösungsmittel technischer Qualität eingesetzt. Alle weiteren in der Synthese eingesetzten Reagenzien wurden ebenfalls von den zuvor genannten Firmen oder *abcr*, *Alfa Aesar*, *Apollo Scientific*, *Chempur*, *Fluorochem* und *TCl* bezogen.

Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Die zur analytischen Dünnschichtchromatographie verwendeten Normalphasen-Aluminiumfolien der Firma *Macherey-Nagel* waren mit einer 0,20 mm dicken Schicht aus Kieselgel 60 beschichtet und enthielten einen Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄. Für Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie (*reversed phase, RP-DC*) wurden mit Nanokieselgel RP-18W beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzmarker von *Sigma Aldrich* benutzt (0,15 mm Schichtdicke). Die Bestimmung der R_F-Werte fand bei Kammersättigung statt. Um UV-aktive Substanzen sichtbar zu machen, wurde eine UV-Lampe der Firma *Herolab* bei Wellenlängen von 254 nm oder 365 nm genutzt. Als Anfärbereagenzien wurde Anisaldehyd-Lösung (10 mL *p*-Anisaldehyd, 5 mL Eisessig, 420 mL Ethanol und 15 mL konz. Schwefelsäure) oder Ninhydrin-Lösung (0,6 g Ninhydrin, 2 mL Eisessig, 13 mL Wasser und 420 mL *n*-Butanol) verwendet. Präparative säulenchromatographische Aufreinigungen wurden per Hand mit Kieselgel 60 (Partikelgröße: 40 -63 µm) von *Macherey-Nagel* oder per Flash-Chromatographie über ein *puriFlash*[®] XS420-System der Firma *Interchim*, ausgestattet mit einem Multiwellenlängen-Detektor (200-840 nm) durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene SiHP *puriFlash*[®]-Säulen von *Interchim* oder sphärische SiOH *Chromabond*[®] Flash-Säulen der Firma *Macherey-Nagel* benutzt.

NMR-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der synthetisierten Produkte wurden NMR-Spektren an folgenden Geräten der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur aufgenommen:

DPX250 (¹H-NMR: 250 MHz)

AV300 (¹H-NMR: 300 MHz; ¹³C-NMR: 75 MHz; ³¹P-NMR: 121 MHz)

AV400 (¹H-NMR: 400 MHz; ¹³C-NMR: 101 MHz; ³¹P-NMR: 162 MHz)

AV500 (¹H-NMR: 500 MHz; ¹³C-NMR: 126 MHz; ³¹P-NMR: 202 MHz)

DRX600 (¹H-NMR: 600 MHz; ¹³C-NMR: 151 MHz)

Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel wurden über *Deutero* und *Eurisotop* bezogen. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben und auf die Signale der verwendeten Lösungsmittel (DMSO-d₆: 2,50; CDCl₃: 7,26; D₂O: 4,79; MeOD-d₄: 3,31) bezogen. Kopplungskonstanten *J* wurden in Hz angegeben. Multiplizitäten der Signale wurden wie folgt

abgekürzt: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, td = Triplett von Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett und m = Multipllett. Neben 1D-Spektren wurden zur Zuordnung der Signale teilweise auch 2D-NMR-Spektren (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HMBC, ^1H - ^{13}C -HSQC) aufgenommen und analysiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm *TopSpin* von *Bruker*.

Massenspektrometrie

LC-ESI-Massenspektren chemischer Verbindungen wurden an einem *Surveyor MSQ Plus* von *Thermo Fisher* gemessen. Messungen von Präzisionsmassen wurden von der Massenspektrometrie-Serviceeinheit der Goethe Universität an einem *MALDI LTQ Orbitrap XL* Gerät von *Thermo Scientific* mit α -Cyano-4-hydroxymizsäure- oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Matrix durchgeführt. Zur massenspektrometrischen Analyse von Oligonukleotiden wurden ESI-Spektren an einem *Bruker micrOTOF-QII* Gerät mit vorgeschalteter RP-HPLC (Säule: *XBridge Peptide BEH C18*, 2,1x250 mm, 300 Å, 3,5 μm) im Negativmodus gemessen.

Mikrowelle

Um lange Reaktionszeiten zu verkürzen wurde ein *Initiator EXP Eu* Mikrowellenreaktor von *Biotage* verwendet. Die Reaktionslösungen wurden hierbei in Glasvials zwischen 0,2-5,0 mL Fassungsvermögen überführt und mittels Metallkappe mit Septum (ebenfalls von *Biotage*) verschlossen.

Belichtungen

Belichtungen wurden mit LEDs (M365L2 LED, 365 nm, 360 mW, bis zu 700 mA; M420L2 LED, 420 nm, 290 mW, bis zu 500 mA; M455L2 LED, 455 nm, 1020 mW, max 1600 mA) von *Thorlabs* oder mit einem im Arbeitskreis selbstgebauten Multi-LED-Gerät mit LEDs von *Roithner Lasertechnik* durchgeführt. Dabei kamen ein *DC4104 4-Channel LED Driver* (ebenfalls von *Thorlabs*) und Küvetten von *Starna GmbH* und *Hellma GmbH & Co. KG* zum Einsatz.

Spektroskopische Untersuchungen

IR-Spektren wurden an einem *Jasco FT/IR-420* Spektrometer aufgenommen. Fluoreszenzstudien mit lichtaktivierbaren Oligonukleotiden wurden an einem *Platereader infinite M200 PRO* Gerät von *Tecan* durchgeführt. Die Bedienung erfolgte über die Software *Tecan i-control* (Version 3.19) ebenfalls von *Tecan*. Für die Messungen wurden *Corning® 96 Flat Black* Platten verwendet. Zur Aufnahme von CD-Spektren kam ein *Jasco J-710* Spektropolarimeter zum Einsatz. Es wurden jeweils 3 Scans mit einer Geschwindigkeit von 200 nm/min, 1 s Zeitkonstante und 1,0 nm Bandbreite bei 20 °C aufgenommen.

DEPC-H₂O und Puffer-Lösungen

Alle verwendeten Puffer wurden ausschließlich in RNase-freiem Wasser angesetzt. Hierfür wurde ultrareines Wasser (*MilliQ*) mit 0,1% (v/v) DEPC über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 15 min bei 120 °C autoklaviert.

HFIP/Et₃N-Puffer: Zu 950 mL Wasser wurden unter starkem Rühren 41,5 mL Hexafluorisopropanol (400 mM) und 2,3 mL Triethylamin (16,3 M) hinzugegeben. Anschließend wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt.

1 M TEAB-Puffer: Es wurden 139,4 mL frisch destilliertes Triethylamin in 800 mL Wasser gegeben und auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Trockeneis oder Triethylamin auf 8,0 eingestellt.

10x TBE-Puffer: Es wurden 109,0 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (90 mM), 55,6 g Borsäure (90 mM) und 10,0 g Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure (2,7 mM) in Wasser gelöst und auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgefüllt. Der Puffer wurde zur Verwendung in Gelelektrophoresen auf 1x-Puffer verdünnt.

10x PBS-Puffer: Es wurden 80,0 g Natriumchlorid (1,37 M), 2,0 g Kaliumchlorid (27 mM), 1,9 g Kaliumdihydrogenphosphat (14 mM) und 14,2 g Dinatriumhydrogenphosphat (100 mM) in Wasser gelöst und auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt. Der Puffer wurde zur Verwendung auf 1x-Puffer verdünnt.

Reversed-Phase HPLC und Anionenaustauschchromatographie

Die Aufreinigung von Oligonukleotiden und Analyse von enzymatischen Reaktionen erfolgte mittels RP-HPLC an *1260 Infinity* und *1200 Series* Geräten der Firma *Agilent Technologies*. Die hierbei verwendeten organischen Lösungsmittel waren stets von der Reinheitsstufe *HPLC Grade*. Wässrige Puffer wurde wie im Abschnitt „DEPC-H₂O und Puffer-Lösungen“ beschrieben angesetzt. Es wurden die folgenden HPLC-Säulen und Elutionsbedingungen verwendet:

Säule 1: *Xbridge Peptide BEH C18 Column*, 300 Å, 3,5 µm, 4,6x250 mm von *Waters*

Säule 2: *Xbridge Peptide BEH C18 OBD Prep Column*, 300 Å, 5 µm, 10x250 mm von *Waters*

Säule 3: *Xbridge BEH C18 OBD Prep Column*, 130 Å, 5 µm, 10x50 mm von *Waters*

Säule 4: *CHIRALPAK® IA*, 5 µm, 20x250 mm von *Chiralcel*

Säule 5: *MultoKrom 100-5 C18*, 100 Å, 5 µm, 4,6x250 mm von *CS Chromatographie-Service GmbH*

Säule 6: *MultoKrom 100-5 C18*, 100 Å, 5 µm, 10x250 mm von *CS Chromatographie-Service GmbH*

Säule 7: *Jupiter 4 µm Proteo C12*, 90 Å, 4 µm, 4,6x250 mm von *Phenomenex*

Gradient 1		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
2	5	95
30	45,5	54,5
32	100	0

Gradient 2		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
18	45,5	54,5
20	100	0
23	100	0

Gradient 3		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
2	22,5	77,5
9	45	55
10,5	100	0

Gradient 4		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
2	5	95
35	60	40
45	100	0
55	100	0

Gradient 5		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
2	5	95
40	40	60
50	60	40
55	100	0

Gradient 6		
Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
2	20	80
40	40	60
50	60	40
55	100	0

Gradient 7			Gradient 8		
Zeit	A	B	Zeit	A	B
[min]	[%]	[%]	[min]	[%]	[%]
0	5	95	0	5	95
13	23,7	76,3	1	5	95
15	100	0	5	20	80
20	100	0	9	100	0

Eluent A: MeOH

Eluent B: HFIP/Et₃N-Puffer, pH 8,0

Größere Oligonukleotidsynthesen im Maßstab von 17 µmol wurden teilweise mittels Anionenaustauschchromatographie über einen Purifier der Firma *GE Healthcare* ausgestattet mit einer *ResourceTM Q*-Säule (6mL, ebenfalls von *GE Healthcare*) aufgereinigt. Eluiert wurde hierbei mit 20% MeCN, 10 mM Tris, 25 mM NaClO₄, pH 8,0 (Eluent A) und 20% MeCN, 10 mM Tris, 500 mM NaClO₄, pH 8,0 (Eluent B) und einem Gradienten von 0% B auf 40% B innerhalb von 27 Säulenvolumen.

Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von gelösten Oligonukleotiden wurde ein *NanoDropTM 2000* Spektralphotometer der Firma *Thermo Fisher* verwendet. Zur Berechnung der Stoffmengen wurden die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ mittels *Oligo Analyse Tool* von *Eurofins Genomics* ermittelt.^[434] Bei photoaktivierbaren modifizierten Strängen wurden bei der Berechnung die Werte der im AK Heckel vorhandenen Tabelle zur Massenberechnung berücksichtigt. Im Falle von (zusätzlich) erworbenen Oligonukleotiden, wurden die vom Hersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten übernommen.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden 20% denaturierende Polyacrylamidgele (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung mit 7 M Urea in 1x TBE-Puffer) verwendet. Zur Polymerisation wurden 10% (v/v) APS und 1% (v/v) TEMED hinzugegeben. Es wurden je nach RNA 10-50 pmol Probe in Ladepuffer (% Formamid ohne Farbstoff, mit je 0,1% Bromphenolblau und Xylencyanol oder mit 0,5% Crocein Orange B) für 4 min bei 95 °C denaturiert und aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Alle Gelelektrophoresen wurden mit einer Multigel-Apparatur von *Biometra GmbH* und einem Power Pac HV Spannungsgerät von *Bio-Rad* bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte für 35-60 min bei 200-240 V. Anschließend wurden die Gele mit SYBR[®]-Gold von *Thermo Fisher* 1-10 min angefärbt. Die Detektion und Auswertung der Banden erfolgte mit einem Gel DocTM XR+ Transilluminator der Firma *Bio-Rad* und der Software *Image Lab* (Version 6.0, ebenfalls von *Bio-Rad*). Als Referenz wurde ein microRNA Marker (17/21/25 nt) von *NEB* verwendet.

4.2 Chemische Festphasensynthesen

Alle chemischen Synthesen von Oligonukleotiden wurde an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* (1 μmol Synthesemaßstab) oder an einem *Oligopilot OP10 plus* der Firma *GE Healthcare* (17 μmol Synthesemaßstab) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Phosphoramidite, CPG-Materialien (500/1000Å) und Reagenzien wurden über *Applied Biosystems*, *Carbosynth*, *emp Biotech*, *Glen Research*, *JT Baker*, *LGC Link*, oder *Sigma Aldrich* bezogen. Alle Phosphoramidite wurden für die Synthesen in absolutem Acetonitril gelöst. Kommerziell erhältliche Standard-Phosphoramidite wurden 0,1 M eingesetzt. Die Konzentration von selbst synthetisierten Phosphoramiditen war 0,12-0,15 M. Die Detritylierung erfolgte mit 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan oder mit 3% Dichloressigsäure in Toluol. Als Aktivator wurde eine 0,3 M 5-Benzylthio-1*H*-tetrazol (BTT)-Lösung in Acetonitril oder eine 0,5 M 4,5-Dicyanoimidazol (DCI)-Lösung in Acetonitril verwendet. Als Capping-Reagenzien wurden Gemische aus THF/Pyridin/ Pac_2O (85:10:5) und 20% *N*-Methylimidazol in Acetonitril eingesetzt. Die Oxidation des Phosphodiesterückgrates erfolgte durch eine 0,05 M Iod-Lösung bestehend aus Pyridin/Wasser/Iod (9:1:12,7 (v/v/w)). Bei der Synthese von Oligonukleotiden mit Phosphorthioatrückgrat wurde zur Oxidation eine frisch angesetzte 0,02 M 5-Amino-1,2,4-dithiazol-3-thion (Xanthanhydrid, XHD)-Lösung in MeCN/Pyridin (9:1) zur Oxidation verwendet. Anschließend wurde ein zweiter Capping-Schritt durchgeführt. Alle unmodifizierten Oligonukleotide wurden unter Standardbedingungen synthetisiert und entschützt. Die Synthesen von lichtaktivierbaren oder 5'-modifizierten Oligonukleotiden erfolgte dagegen unter UltraMILD-Bedingungen. Die Kupplungszeit für DNA-Phosphoramidite betrug 6 min (*ABI*) bzw. 3 min (*OP10*). Zum Einbau von RNA-Phosphoramiditen und kommerziell erworbenen oder zuvor selbst synthetisierten Sonderamiditen wurde die Kupplungszeit auf 12 min verlängert. Nach der Synthese wurden die Cyanoethyl-Schutzgruppen durch 10-minütiges Spülen der Festphasensäule mit 20% Diethylamin-Lösung in Acetonitril abgespalten. Anschließend wurde die Säule mit Acetonitril nachgewaschen und 30 min im Hochvakuum getrocknet. Die weitere Abspaltung erfolgte angelehnt an Protokolle von *GlenResearch*^[435].

Details zu Synthesen und Modifikationen sowie zur Abspaltung und Aufreinigung können den nachfolgenden Unterkapiteln entnommen werden.

4.2.1 Synthesen der Oligonukleotide zur Verwendung in chemoenzymatischen Experimenten

Die Synthesen wurden im 1 μmol Maßstab an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* oder im 17 μmol Maßstab an einem *Oligopilot OP10 plus* der Firma *GE Healthcare* durchgeführt. Alle DNA-Splints wurden unter Standardbedingungen synthetisiert (Bz-dA-CE, dmf-dG-CE, Ac-dC-CE, dT-CE). Nach allen Synthesen wurde zunächst die Cyanoethyl-Schutzgruppen durch einen DEA-Waschschritt (20% DEA in MeCN, 10 min) abgespalten. Die Abspaltung des CPG-Materials und der persistenten Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation mit 32%iger NH_4OH -Lösung für 4 h bei 60 °C. Anschließend wurde das CPG-Material durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel mit einem Vakuumkonzentrator (*Concentrator plus* von *Eppendorf*) bei 4 °C entfernt. Alle unmodifizierten RNAs wurden unter Standardbedingungen synthetisiert (Bz-rA-CE, dmf-rG-CE, Ac-rC-CE, rU-CE). Bei der Synthese von phosphorylierten und

modifizierten RNA-Fragmenten wurde unter UltraMILD-Bedingungen gearbeitet (Pac-rA-CE, *i*PrPac-rG-CE, Ac-rC-CE, rU-CE). Die hierfür verwendeten kommerziell erhältlichen Sonderamidite sind in Abb. 104 dargestellt. Die Abspaltung der synthetisierten RNAs erfolgte jeweils mit einem 3:1 Gemisch aus 32% NH₄OH/EtOH (v/v). Unter Standardbedingungen erfolgte die Inkubation für 4 h bei 60 °C. Unter UltraMILD-Bedingungen wurde die Inkubationszeit auf 2 h bei 60 °C verkürzt. Das CPG-Material wurde über einen Zentrifugenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators bei 4 °C entfernt. Zur Abspaltung der 2'-Silyl-Schutzgruppen wurde der Rückstand in 115 µL DMSO gelöst. Es wurden 60 µL Et₃N und 75 µL Et₃N·3HF hinzugefügt und das Gemisch für 2,5 h bei 60 °C und 500 rpm inkubiert. Um die abgespaltene RNA auszufällen, wurden dem Gemisch 25 µL 3 M NaOAc-Lösung und 1 mL kaltes *n*-Butanol hinzugefügt. Nach 2,5 h Fällung bei -20 °C wurden die RNAs durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 12000 g pelletiert. Die Fällung wurde mindestens 2x wiederholt, um sicherzustellen, dass alle Fluoridsalze entfernt wurden.

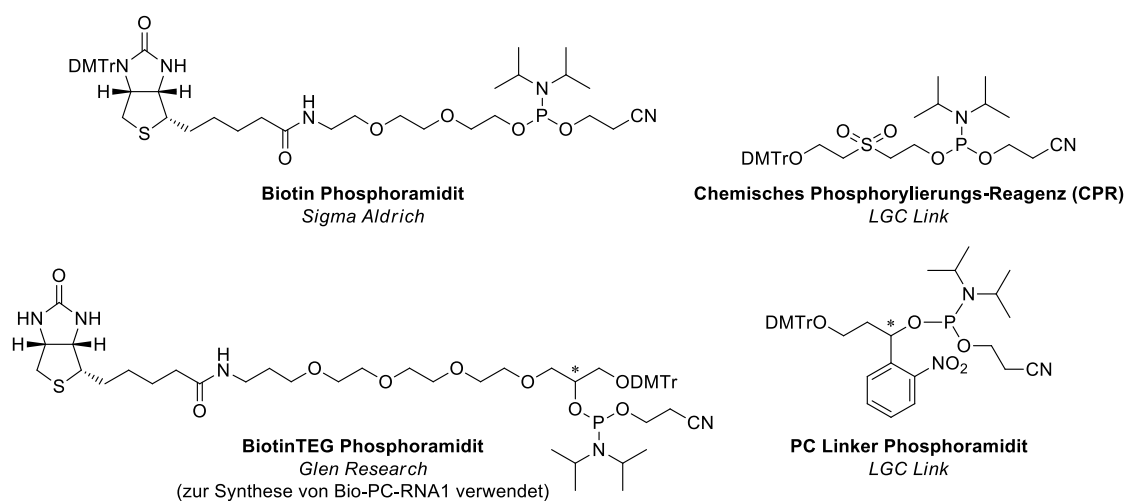


Abb. 104: Strukturen und Bezugsquellen der verwendeten kommerziell erhältlichen Sonderamidite, die für die Synthesen der modifizierten RNA-Fragmente eingesetzt wurden.

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte nach Abspaltung mittels RP-HPLC (Säule 2, Gradienten 2 oder Säule 3, Gradient 3, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/Et₃N-Puffer, pH 8,0, 4,0 mL/min bei 60 °C) oder im Fall von 17 µmol Synthesen teilweise auch mittels Anionenaustauschchromatographie (6 mL *Resource*TM Q-Säule, Eluent A: 20% MeCN, 10 mM Tris, 25 mM NaClO₄, pH 8,0, Eluent B: 20% MeCN, 10 mM Tris, 500 mM NaClO₄, pH 8,0, 6 mL/min bei Raumtemperatur, Gradient: innerhalb von 27 Säulenvolumen auf 40% Eluent B). Nach Aufreinigung *via* Anionenaustauschchromatographie wurden die Proben zum Entsalzen mehrfach mit DEPC-H₂O mit Hilfe von Zentrifugenfiltern (1000 bzw. 3000 MWCO von *Pall Corporation*) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde jeweils bei 4 °C im Vakuum entfernt. Im Falle DMTr-on hergestellter Oligonukleotide wurde die DMTr-Gruppe durch Inkubation in 80% Essigsäure (20 min, RT) abgespalten und erneut eine RP-HPLC-Aufreinigung durchgeführt. Abschließend wurden alle Proben mehrmals mit DEPC-H₂O coevaporiert und final lyophilisiert. Die Identität und Reinheit aller Proben wurde mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie bestätigt. Die Bezeichnungen und Sequenzen der synthetisierten Oligonukleotide können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der synthetisierten Oligonukleotide.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ϵ [$\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$]	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
Bio-RNA1	5'-Bio-r[GGC UAC GUA G]-3'	111000	3635,6	3635,7
Bio-PC-RNA1	5'-Bio-PC-r[GGC UAC GUA G]-3'	117200	4026,7	4027,2
Bio-34mer	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC U]-3'	370000	11308,6	11308,8
Bio-PC-34mer	5'-Bio-PC-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC U]-3'	376200	11761,7	11755,0
5'p-RNA2	5'-p-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA]-3'	204000	5833,8	5834,5
5'p-RNA3	5'-p-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CA]-3'	226900	6467,9	6468,6
5'p-RNA4	5'-p-r[AGG UUC GAA UCC CGU C]-3'	167300	5134,0	5135,4
5'p-RNA5	5'-p-r[UAG CCA CCA]-3'	94300	2876,4	2876,8
RNA1	5'-r[GGC UAC GUA G]-3'	109700	3198,5	3198,5
RNA2	5'-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA]-3'	204000	5753,8	5754,5
RNA3	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CA]-3'	226900	6387,9	6388,7
RNA4	5'-r[AGG UUC GAA UCC CGU C]-3'	167300	5054,7	5055,4
RNA5	5'-r[UAG CCA CCA]-3'	94300	2796,4	2796,9
RNA3^{NPE}-RNA4	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC ^{NPE} AGG UUC GAA UCC CGU C]-3'	394300	11958,6	11959,2
RNA3az-RNA4	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CA(mAzo) AGG UUC GAA UCC CGU C]-3'	384750	11869,2	11868,1
DNA1 (Splint 1+2)	5'-d[TCT AAC CAA CTG ATC TAC GTA GCC]-3'	258100	7253,3	7253,3
DNA2 (Splint 2+3)	5'-d[CCA TCA TTA TGA GTG TTG TGC TCT AAC CAA C]-3'	333700	9440,6	9440,6
DNA3 (Splint 3+4)	5'-d[GAT TCG AAC CTG TGA CCC CAT CA]-3'	269200	6965,2	6965,4
DNA4 (Splint 4+5)	5'-d[GGT GGC TAC GAC GGG ATT CGA A]-3'	276300	6837,2	6837,9
DNA/RNA (Phos)	5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC]-3'	100200	3470,6	3471,0
DNA/RNA (Thio)	5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC]-3'	100200	3646,3	3646,8
Dinuk1	5'-p-r[C(NPP-Linker)U]-p-3'	15450	967,1	967,2
2'OMe-25mer	5'-OH-2' OMe -r[AGC UUG AGA UAA GUC CGA CGA UCC U]-3'	270450	8328,5	8328,6
	synthetisiert von Janik Kaufmann (<i>AK Heckel</i>)			
12mer	5'-r[GGA UAG UGA UCC]-3'	124600	3835,3	3834,0
38mer-DNA	5'-d[TTC CTC CCT AGC CCA ACT CCC GCC TTG GAT CAC TAT CC]-3'	409200	11375,9	11380,6
34mer	5'-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC U]-3'	362500	10870,5	10871,6
NH₂-34mer	5'-NH ₂ -r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC U]-3'	362500	11023,5	11024,6

Alle analytischen RP-HPLC-Spektren sowie alle Massenspektren der hergestellten Oligonukleotide können den Zusatzinformationen der Publikationen Keyhani *et al.*^[294] und Blümler *et al.*^[386] entnommen werden.

4.2.2 Synthesen der Oligonukleotide zur chemo-enzymatischen Zyklisierung

Die Synthesen der Oligonukleotide, die in Abschnitt 3.2.4 verwendet wurden, wurden von Oliver Pereira im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. Alle Oligonukleotide, die im Rahmen der chemo-enzymatischen Zyklisierungsversuche verwendet wurden, wurden DMTr-off im 1 μ mol Maßstab an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* oder im 17 μ mol Maßstab an einem *Oligopilot OP10 plus* der Firma *GE Healthcare* unter UltraMILD-Bedingungen durchgeführt. Das zur Synthese des *Molecular Beacons* verwendete Cyanin-5-CPG-Material sowie das BBQ-650-Quencher-Phosphoramidit wurden von *LGC Link* bezogen. Nach allen Synthesen wurde zunächst die Cyanoethyl-Schutzgruppen durch einen DEA-Waschschritt (20% DEA in MeCN, 10 min) abgespalten. Anschließend erfolgte die Abspaltung durch Inkubation mit einem 3:1 Gemisch aus 32% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ (v/v) für 4 h bei 37 °C. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuumkonzentrator bei 4 °C entfernt. Zur Abspaltung der 2'-Silyl-Schutzgruppen wurde der Rückstand in 115 μL DMSO gelöst. Es wurden 60 μL Et_3N und 75 μL $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ hinzugefügt und das Gemisch für 2,5 h bei 55 °C und 500 rpm inkubiert. Die Fällung der Oligonukleotide erfolgte durch Zugabe von 25 μL 3 M NaOAc-Lösung und 1 mL kaltes *n*-Butanol und Lagerung bei -20 °C über Nacht. Es erfolgte die Pellettierung der Oligonukleotide durch Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 12000 g. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte mittels RP-HPLC (Säule 2, Gradienten 2 oder Säule 3, Gradient 3, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/ Et_3N -Puffer, pH 8,0, 4,0 mL/min bei 60 °C) oder mittels Anionenaustauschchromatographie (6 mL *ResourceTM Q*-Säule, Eluent A: 20% MeCN, 10 mM Tris, 25 mM NaClO_4 , pH 8,0, Eluent B: 20% MeCN, 10 mM Tris, 500 mM NaClO_4 , pH 8,0, 6 mL/min bei Raumtemperatur, Gradient: innerhalb von 27 Säulenvolumen auf 40% Eluent B). Zum Entsalzen mehrfach mit DEPC- H_2O mit Hilfe von Zentrifugenfiltern (1000 bzw. 3000 MWCO von *Pall Corporation*) gewaschen. Die Identität und Reinheit aller Proben wurde mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie bestätigt.

Tabelle 8: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der synthetisierten Oligonukleotide.

Oligo	Sequenz 5'→3'	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
Dinuk2	5'-p-r[C(NPP-Linker)C]-p-3'	967,1	967,2
Dinuk3	5'-p-r[C(DEACM-Linker)G]-p-3'	1087,2	1087,3
nat-20mer	5'-r[CUC CUC GCC CUU GCU CAC CG]-3'	6187,8	6188,6
8mer-1	5'-r[CUC CUC GC]-3'	2420,3	2420,6
8mer-2	5'-r[UUG CUC AC]-3'	2445,3	2445,7
<i>Molecular Beacon</i>	5'-BBQ650-r[CAC GGU GAG CAA GGG CGA GGA GCG UG]-Cy5-3'	9706,7	6708,0

Alle analytischen RP-HPLC-Spektren sowie alle Massenspektren der hergestellten Oligonukleotide können der Masterarbeit von Oliver Pereira (2021) entnommen werden.

4.2.3 Synthesen NPE-geschützter DNA zur Untersuchung der G-Quadruplexfaltung

Die photolabil-geschützten Oligonukleotide **cMYC-PU22-33** und **cMYC-PU22-wt** wurden im 4 μmol Maßstab an einem *Oligopilot OP10 plus* der Firma *GE Healthcare* durchgeführt. Alle übrigen Oligonukleotide wurden in mehreren 1 μmol Synthesen an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* hergestellt. Alle Sequenzen wurden unter UltraMILD-Bedingungen synthetisiert und abgespalten (Pac-dA-CE, iPrPac-dG-CE, Ac-dC-CE, dT-CE, dI-CE und 1000Å CPG). Das zuvor synthetisierte *R*-NPE-geschützte Desoxyguanosin-Sonderamidit **80** wurde als 0,11 M Lösung in MeCN eingesetzt. Pac₂O wurde als Capping-Reagenz verwendet. Bis auf **short-2345** und **wt-1245(caged)** wurden alle Synthesen DMTr-off hergestellt. Die Abspaltung erfolgte jeweils durch Inkubation der CPG-gebundenen DNAs in 32% NH₄OH für 4 h bei Raumtemperatur. Das CPG-Material wurde über Zentrifugenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel bei 4 °C unter Vakuum entfernt. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte mittels RP-HPLC (Säule 2, Gradient 2 oder Säule 3, Gradient 3, jeweils mit Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/Et₃N-Puffer, pH 8,0, 4,0 mL/min bei 60 °C). Das Lösungsmittel wurde erneut bei 4 °C mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators (*Concentrator plus* von *Eppendorf*) entfernt. Im Falle der DMTr-on synthetisierten Proben wurden die getrockneten DNAs zur Abspaltung der DMTr-Gruppe jeweils in 300 μL 80% Essigsäure für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Lösungsmittel erneut bei 4 °C im Vakuum entfernt wurde, erfolgte eine weitere Aufreinigung mittels RP-HPLC (gleiche Bedingungen wie zuvor). Abschließend wurden die aufgereinigten DNAs zur Entfernung von Pufferrückständen wie Et₃N über NAP-Säulen eluiert, mehrmals mit DEPC-Wasser coevaporiert und final lyophilisiert. Die Identität und Reinheit aller Sequenzen wurde mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie bestätigt. Die Bezeichnungen und Sequenzen der hergestellten NPE-geschützten Oligonukleotide können Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der synthetisierten *R*-NPE-geschützten DNA-Proben.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ϵ [$\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$]	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
wt-12345	5'-d[TGG GAG GGT TGG ^{R-NPE} GAG G ^{R-NPE} GT GG ^{R-NPE} G T]-3'	286300	7467,3	7467,4
stab.-1234	5'-d[TGG GAG GGT TGG ^{R-NPE} GAG G ^{R-NPE} GT TTT T]-3'	275200	7243,3	7243,3
stab.-1245	5'-d[TGG GAG G ^{R-NPE} GT TTT TAG G ^{R-NPE} GT GG ^{R-NPE} G T]-3'	275200	7392,3	7392,4
stab.-2345	5'-d[TTT TAG GGT TGG ^{R-NPE} GAG G ^{R-NPE} GT GG ^{R-NPE} G T]-3'	275200	7392,3	7392,4
wt-1245(caged)	5'-d[TGG GAG GGT TGG ^{R-NPE} GAG GGT GGG T]-3'	286300	7169,2	7171,0
wt-1234(caged)	5'-d[TGG GAG GGT TGG GAG GGT GG ^{R-NPE} G T]-3'	286300	7169,2	7169,3
short-1234	5'-d[TGG GAG G ^{R-NPE} GT TGG ^{R-NPE} GAG G ^{R-NPE} GT]-3'	235200	6176,1	6176,4
short-2345	5'-d[AGG GTT GG ^{R-NPE} G AGG ^{R-NPE} GTG G ^{R-NPE} GT]-3'	235200	6176,1	6175,9
extra(caged)	5'-d[AGG GTG GG ^{R-NPE} G AGG ^{R-NPE} GTG G ^{R-NPE} GT]-3'	238900	6201,1	6201,0
cMYC-PU22-33	5'-d[TGA GGG TGG ^{R-NPE} GIA GG ^{R-NPE} G TGG G ^{R-NPE} IA A]-3'	300500	7455,3	7456,3
cMYC-PU22-wt	5'-d[TGA GGG TGG G ^{R-NPE} GA GG ^{R-NPE} G TGG G ^{R-NPE} GA A]-3'	297100	7485,3	7486,4

4.2.4 Synthesen bistabiler RNAs zur Untersuchung der StpA-Interaktion

Alle RNA-Proben wurden entweder im 1 μmol Maßstab an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* oder im 17 μmol Maßstab an einem *Oligopilot OP10 plus* der Firma *GE Healthcare* durchgeführt. Die Synthesen der photolabil-geschützten Sequenzen fanden unter UltraMILD-Bedingungen statt (Pac-rA-CE, iPrPac-rG-CE, Ac-rC-CE, rU-CE). Das zuvor synthetisierte S-NPE-geschützte Guanosin-Sonderamidit **86** wurde als 0,11 M Lösung in MeCN eingesetzt. Die unmodifizierten RNAs wurden unter Standardbedingungen synthetisiert (Bz-rA-CE, iBu-rG-CE, Ac-rC-CE, rU-CE). Alle Sequenzen wurden DMTr-on hergestellt. Nach allen Synthesen wurde zunächst ein DEA-Waschschritt (20% DEA in MeCN, 10 min) durchgeführt, um die Cyanoethyl-Schutzgruppen abzuspalten. Die Abspaltung vom CPG-Material und der exozyklischen Basenschutzgruppen erfolgte anschließend durch Inkubation mit 400 μL eines 3:1 Gemischs aus 32% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ (v/v) für 4 h bei rt (UltraMILD) bzw. bei 60 °C (Standardbedingung). Das CPG-Material wurde mit Hilfe eines Zentrifugenfilters abgetrennt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum bei 4 °C entfernt. Die getrockneten RNA-Pellets wurden jeweils in 115 μL DMSO gelöst. Zur Abspaltung der 2'-Silyl-Schutzgruppen wurden 60 μL Et_3N und 75 μL $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ hinzugefügt und das Gemisch für 2,5 h bei 60 °C und 500 rpm inkubiert. Die vollständig entschützte RNA wurde durch Zugabe von 25 μL 3 M NaOAc-Lösung und 1 mL kaltes *n*-Butanol über Nacht bei -20 °C ausgefällt und anschließend für 30 min bei 4 °C und 12000 g pelletiert. Die Fällung wurde mindestens 2x wiederholt (jeweils 2 h Fällung bei -20 °C), um sicherzustellen, dass alle Fluoridsalze entfernt wurden. Die Aufreinigung der RNAs erfolgte mittels RP-HPLC (Säule 2, Gradient 7, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/ Et_3N -Puffer, pH 8,0, 4,0 mL/min bei 60 °C). Das Lösungsmittel wurde jeweils bei 4 °C im Vakuum entfernt. Zur Abspaltung der DMTr-Schutzgruppen wurden die RNAs jeweils in 300 μL 80% Essigsäure für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Lösungsmittel erneut bei 4 °C im Vakuum entfernt wurde, fand eine zweite RP-HPLC-Aufreinigung (gleiche Bedingungen wie zuvor) statt. Die aufgereinigten und getrockneten RNAs wurden mehrmals mit RNase-freiem ultrareinen Wasser coevaporiert und lyophilisiert. Die Identität und Reinheit aller Sequenzen wurde mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie bestätigt (Bezeichnungen und Sequenzen in Tabelle 10).

Tabelle 10: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der synthetisierten RNA-Proben.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ϵ [$\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$]	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
G^{S-NPE}-20mer(A)	5'-r[GAC CGG ^{S-NPE} AAG GUC CGC CUU CC]-3'	201400	6502,9	6503,0
ctrl-20mer(A)	5'-r[GAC CGG AAG GUC CGC CUU CC]-3'	199800	6352,9	6351,6
G^{S-NPE}-20mer(B)	5'-r[GAA GGG CAA CCU UCG GG ^{S-NPE} U UG]-3'	221000	6607,9	6608,0
ctrl-20mer(B)	5'-r[GAA GGG CAA CCU UCG GGU UG]-3'	219400	6457,9	6456,6

4.2.5 Synthese der Azobenzol-modifizierten G-Quadruplex-Sequenzen

Zur Herstellung der Proben wurden jeweils 2 (RNA-Proben) oder 6 (DNA-Probe) 1 μmol Synthesen unter Standardbedingungen (Ac-G-CE) an einem *ABI 392 RNA/DNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Das zuvor synthetisierte Azobenzol-Sonderamidit **100** wurde als 0,11 M Lösung in MeCN eingesetzt. Alle Sequenzen wurden DMTr-off synthetisiert. Nach den Synthesen folgte jeweils ein DEA-Waschschritt. Zur Abspaltung des CPG-Materials wurde die DNA-Probe über Nacht in 32% NH_4OH bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA-Proben wurden zur Abspaltung mit einem 3:1 Gemisch aus 32% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ (v/v) über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (400 rpm). Das CPG-Material wurde über Zentrifugenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel bei 4 °C im Vakuum entfernt. Zur Abspaltung der 2'-Silyl-Schutzgruppen der RNA-Proben wurden die getrockneten RNA-Pellets jeweils in 115 μL DMSO gelöst und 60 μL Et_3N sowie 75 μL $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 2,5 h bei 60 °C geschüttelt (300 rpm). Um die abgespaltene RNA auszufällen, wurden dem Gemisch 25 μL 3 M NaOAc-Lösung und 1 mL kaltes *n*-Butanol hinzugefügt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Anschließend wurden die RNAs durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 12000 g pelletiert. Die Fällung wurde 2x für 2 h bei -20 °C wiederholt, um sicherzustellen, dass alle Fluoridsalze entfernt wurden. Alle Sequenzen wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt. Dabei wurde im Falle des **DNA-[GG-Azo-GG]-5mers** Säule 2, Gradient 2 mit MeOH als Eluent A und HFIP/ Et_3N -Puffer, pH 8,0 als Eluent B verwendet. Die Flussrate betrug 4,0 mL/min bei 60 °C. Die RNA-Proben wurden jeweils mit Säule 3, Gradient 8, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/ Et_3N -Puffer, pH 8,0, 4,0 mL/min bei 60 °C aufgereinigt. Die Bezeichnung sowie die Sequenzen und entsprechenden Massen der hergestellten Azobenzol-modifizierten Oligonukleotide können Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der synthetisierten Azobenzol-verbrückten Oligonukleotide.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ϵ	berechnete	gemessene
		$[\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}]$	Masse [Da]	Masse [Da]
DNA-[GG-Azo-GG]	5'-d[GG(<i>para/para</i> -Azo)GG]-3'	45900	1557,3	1557,5
RNA-[GG-Azo-GG]	5'-r[GG(<i>para/para</i> -Azo)GG]-3'	52500	1622,3	1622,5
RNA-[GGG-Azo-GGG]	5'-r[GGG(<i>para/para</i> -Azo)GGG]-3'	76700	2312,4	2312,7

4.3 Enzymatische Synthesen

4.3.1 Verwendete Enzyme und Puffer

Grundsätzlich wurde bei allen Arbeiten mit RNA und Enzymen mit Latex- oder Nitril-Handschuhen von VWR gearbeitet und auf RNase-freie Bedingungen geachtet. Alle Enzyme und die entsprechenden Puffer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind kommerziell erhältlich und wurden von den aufgeführten Lieferanten bezogen. *T4* RNA Ligase 2 wurde hauptsächlich im AK Schwalbe hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieses Enzym wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit Alexandra Schuck und Dr. Ute Scheffer (AK Göbel) im AK Heckel nachgezogen. Magnetische Streptavidin Beads wurden in Lagerpuffer bei 4 °C aufbewahrt, Enzyme

und Reaktionspuffer bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ein Überblick über die verwendeten Materialien und Reaktionsbedingungen ist in Tabelle 12 gegeben.

Tabelle 12: Überblick über verwendete Enzyme, die Zusammensetzung der entsprechenden Puffer, Co-Faktoren sowie zusammengefasste Reaktionsbedingungen.

Enzym	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase)	Shrimp Alkaline Phosphatase	T4 Polynukleotid- kinase	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	T4 DNA Ligase	RtcB Ligase	TURBO™ DNase
Abkürzung	Rnl1	rSAP	PNK	Rnl2	Dnl	RtcB	DNase
Anwendung	3'-Ex/ Zyklierung	3'-DP	5'-p + 3'-DP	Splint-Ligation	Splint-Ligation	Ligation von 5'-OH mit 3'-p	DNase-Verdau
Lieferant	NEB	NEB	NEB	NEB/home-made (AKs Schwalbe und Heckel)	NEB	NEB	Thermo Fisher
Konzentration	10 000u/mL	1 000u/mL	10 000u/mL	10 000u/mL	400 000u/mL	15 μM	2000u/mL
Puffer	1X T4 Rnl1 Reaktionspuffer 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (pH 7,5)	1X CutSmart® Puffer 50 mM KOAc 20 mM Tris-Acetat 10 mM Mg(OAc) ₂ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA (pH 7,9)	1X T4 PNK Reaktionspuffer 70 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 5 mM DTT (pH 7,6)	1X T4 Rnl2 Reaktionspuffer 50 mM Tris-HCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (pH 7,5)	1X T4 DNA Ligase Reaktionspuffer 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM DTT (pH 7,5)	1X T4 RNA Ligase Reaktionspuffer 50 mM Tris-HCl 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂ 10 mM DTT (pH 8,3)	1X TURBO DNase- Puffer 10 mM Tris-HCl 2,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM CaCl ₂ (pH 7,9)
Co-Faktor	1 – 1,5 mM ATP	/	1,0 mM ATP	0,4 mM ATP	1,0 mM ATP	0,1 mM GTP und 1,0 mM MnCl ₂	/
Reaktionszeit	3 – 16 h	1 – 3 h	2 h	2 – 4 h	2 – 4 h	4 – 16 h	30 min
Reaktions- temperatur	17 – 37 °C	37 °C	37 °C	17 – 37 °C	17 – 37 °C	37 °C	37 °C
Deaktivierung	15 min bei 65 °C	5 min bei 65 °C	20 min bei 65 °C	5 min bei 80 °C	10 min bei 65 °C	10 min bei 65 °C	15 min bei 65 °C
Ausbeute	23 – 93% (Fragment- abhängig)	quantitativ	quantitativ	20 – 82% (Fragment- abhängig)	0-63% (Fragment- abhängig)	/	quantitativ

4.3.2 Vorbereitung der magnetischen Streptavidin Beads und Pufferaustausch

Die verwendeten magnetischen Streptavidin Beads (4 mg/mL) wurden von *New England Biolabs* bezogen und nach Herstellerangaben vorbereitet. Hierbei handelt es sich um 1 μm superparamagnetischen Partikeln, die kovalent an Streptavidin gebunden sind. Die Beads wurden in Lagerpuffer (0,1% BSA, 0,05% Tween^(R) 20, 0,05% NaN_3 in 1x PBS Puffer, pH 7,4) geliefert und bei 4 °C aufbewahrt. Zunächst wurde das Lagergefäß gevortext um eine homologe Suspension der Beads zu erhalten. Anschließend wurde das benötigte Volumen (typischerweise 250-800 μL ; abhängig von der Menge des zu bindenden Oligonukleotids) entnommen und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Da die Länge des zu immobilisierenden Oligonukleotids die Bindungskapazität beeinflusst, wurde stets darauf geachtet, dass die Menge der verwendeten Streptavidin Beads die berechnete Mindestmenge überstieg. In der Regel wurde ein Überschuss von 10% der benötigten Beads eingesetzt. Um den Lagerpuffer zu entfernen, wurden die Beads mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert und der klare Überstand entnommen. Die Beads wurden daraufhin im 3-10-fachen Volumen Bindepuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nachdem die Beads erneut mit einem Magneten an der Gefäßwand fixiert wurden, wurde der klare Überstand entnommen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, um den Lagerpuffer vollständig zu entfernen. Nach dem Waschen der Beads wurde eine wässrige Lösung der zu bindenden biotinylierten RNA (**Bio-RNA**) zu den Beads gegeben, gevortext und die Suspension für 20 min bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Danach wurden die Beads 2 min mit einem Magneten an der Gefäßwand fixiert und der klare Überstand entnommen. Anschließend wurden die Beads mit gebundener RNA erneut dreimal mit Bindepuffer gewaschen. Um sicherzustellen, dass die gesamte Menge an biotinylierter RNA an die Beads gebunden war, wurde die optische Dichte bei 260 nm ($\text{OD}_{\text{A}260}$) mittels *NanoDropTM* nach dem Binden der RNA und während der Waschschriffe kontrolliert. Abschließend wurden die Beads mit gebundener RNA im für die Reaktion benötigten Volumen Wasser resuspendiert und alle weiteren Komponenten hinzugefügt (Bisphosphate, Oligonukleotid-Fragmente, Puffer, Co-Faktoren, Enzyme). Falls im Laufe der Reaktion neue/zusätzliche Beads hinzugefügt werden mussten, wurden diese ebenso vorbereitet.

Zum Austausch eines Puffers/einer Reaktionslösung wurden die Beads für 2 min mit einem Magneten an der Gefäßwand fixiert, der klare Überstand entnommen und einmal mit Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads mit gebundener RNA im für den nächsten Schritt benötigten Volumen Wasser resuspendiert und die weiteren Komponenten hinzugefügt. Für die finale Freisetzung der biotinylierten und modifizierten RNA wurden die Beads mit einem Magneten an der Gefäßwand fixiert und der letzte Reaktionspuffer entnommen. Die Beads wurden dann in 100-200 μL sterilem ultrareinen Wasser resuspendiert und für 10 min auf 75 °C oder für 2 min auf 95 °C erhitzt, wodurch die Biotin/Streptavidin-Interaktion gelöst wurde. Die Beads wurden dann mit dem Magneten fixiert, während die finale RNA mit dem Überstand entnommen werden konnte.

4.3.3 Enzymatische 3'-Verlängerung mit T4 RNA Ligase 1

Die enzymatische 3'-Verlängerung mit T4 RNA Ligase 1 (Rnl1) wurde angelehnt an Angaben des Herstellers *New England Biolabs* durchgeführt. Dabei wurden während der Entwicklung der chemo-enzymatischen Synthesemethode (siehe Abschnitt 3.1.1) zunächst 25 µM des RNA-**12mers** und 100 µM **pNp** (RNA:pNp = 1:4) verwendet. Die Reaktionen wurden in 1x T4 RNA Ligase 1 Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) mit 20% (v/v) DMSO und 1 mM des Cofaktors ATP durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µL. Die Ligationsansätze wurden mit 1% (v/v) des Gesamtvolumens Rnl1 (10 000 Einheiten/mL) versetzt und jeweils für 16 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit und mit der Weiterentwicklung der chemo-enzymatischen Methode (besonders ab Abschnitt 3.2) wurde das Verhältnis von RNA:pNp auf 1:3 angepasst. Typischerweise wurden 5–50 µM RNA, 15–150 µM modifiziertes Nukleosid-3',5'-Bisphosphat (pNp), 1x T4 RNA Ligase 1 Puffer, 1 mM ATP und 5–15% (v/v) Rnl1 (10 000 Einheiten/mL) eingesetzt. Bei Ligationsreaktionen in Lösung (nicht an Streptavidin Beads gebunden) wurden den Ligationsansätzen zusätzlich 10% (v/v) DMSO hinzugefügt. Das Reaktionsvolumen betrug zwischen 20–500 µL, wobei die besten Ergebnisse mit niedriger RNA-Konzentration in kleinen Volumina erzielt werden konnten. Die Ligationsansätze wurden, abhängig vom Synthesemaßstab, 3-8 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert.

Zum Beenden der Ligationsreaktionen in Lösung wurde entweder das Enzym durch aufheizen der Probe für 15 min auf 65 °C denaturiert oder der Ligationsansatz mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei Ligationsreaktionen in Gegenwart von magnetischen Streptavidin Beads wurde auf eine Deaktivierung des Enzyms verzichtet und die Reaktion durch einen Waschschrift (siehe Abschnitt 4.3.2) beendet. Die Analyse erfolgte mittels RP-HPLC (Säule 1, Gradient 1, Eluent A: MeOH, Eluent B: HFIP/Et₃N-Puffer bei 60 °C) und *via* Massenspektrometrie. Die Bezeichnung, Sequenzen sowie berechnete und gemessene Massen der 3'-verlängerten RNAs sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der RNA-Proben nach enzymatischer 3'-Verlängerung mit **pN^{NPE}p**, **p(mAzo)p** oder **pU^{DEACM}p**.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ϵ [$\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$]	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
12merA^{NPE}-p	5'-r[GGA UAG UGA UCC A ^{NPE}]-p-3'	133300	4391,6	4391,6
12merA^{NPE}-A^{NPE}-p	5'-r[GGA UAG UGA UCC A ^{NPE} A ^{NPE}]-p-3'	142000	4869,7	4868,8
12merU^{DEACM}-p	5'-r[GGA UAG UGA UCC U ^{DEACM}]-p-3'	148600	4447,7	4446,8
RNA2-U^{DEACM}-p	5'-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA U ^{DEACM}]-p-3'	214950	6368,9	6369,8
DNA/RNA-C^{NPE}-p (Phos)	5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC C ^{NPE}]-p-3'	109750	4004,7	4005,1
DNA/RNA-C^{NPE}-p (Thio)	5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC C ^{NPE}]-p-3'	109750	4180,4	4180,9
Bio-RNA1-C^{NPE}-p	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC ^{NPE}]-p-3'	126750	4169,7	4169,7
Bio-RNA1-C^{NPE}-p + hv	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC]-p-3'	124250	4020,6	4020,7
Bio-RNA1-mAzo-p	5'-Bio-r[GGC UAC GUA G mAzo]-p-3'	114800	4092,7	4091,7
Bio-34mer-mAzo-p	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GCU CAG UUG GUU AGA GCA CAU CAC U]-p-3'	373800	11764,6	11765,9
RNA2-U^{NPE}-p	5'-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA U ^{NPE}]-p-3'	213550	6288,8	6289,7

RNA3-C^{NPE}-p	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC ^{NPE}]-p-3'	236450	6922,0	6923,0
RNA4-G^{NPE}-p	5'-r[AGG UUC GAA UCC CGU CG ^{NPE}]-p-3'	181000	5628,8	5629,6
RNA3^{NPE}-RNA4^{NPE}-p	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC ^{NPE} AGG UUC GAA UCC CGU CG ^{NPE}]-p-3'	408000	12532,7	12536,0
RNA2-mAzo-p	5'-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA mAzo]-p-3'	207800	6209,8	6209,6
RNA3-mAzo-p	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CA mAzo]-p-3'	230700	6843,9	6844,8
RNA4-mAzo-p	5'-r[AGG UUC GAA UCC CGU C mAzo]-p-3'	171100	5510,1	5511,5
RNA3az-RNA4az-p	5'-r[CAC UCA UAA UGA UGG GGU CA mAzo AGG UUC GAA UCC CGU C mAzo]-p-3'	384750	12326,4	12325,2
Bio-RNA1-Dinuk1-p	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC _{NPP} U]-p-3'	117200	4587,7	4586,3
22mer_{NPP}-p^(a)	5'-r[CUC CUC GCC CUU GCU CAC CGC _{NPP} C]-p-3'	171050	7137,9	7137,9
22mer_{DEACM}-p^(a)	5'-r[CUC CUC GCC CUU GCU CAC CGC _{DEACM} G]-p-3'	n.d.	7258,0	7257,9
10mer_{NPP}-p^(a)	5'-r[CUC CUC GCC _{NPP} C]-p-3'	64150	3370,4	3369,8
10mer_{DEACM}-p^(a)	5'-r[UUG CUC ACC _{DEACM} G]-p-3'	n.d.	3515,5	3514,9

^(a) = von Oliver Pereira im Rahmen seiner Masterarbeit hergestellt.

4.3.4 Enzymatische 3'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase*

Die 3'-Dephosphorylierung unter Verwendung von rekombinanter *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP) wurde mit 5-50 µM 3'-verlängerter RNA in 1x *Cut Smart* Puffer (50 mM KOAc, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg(OAc)₂, 100 µg/mL BSA, pH 7,9) von *NEB* durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Reaktionen betrug 20-500 µL. Zur Dephosphorylierung wurde den Ansätzen 10% (v/v) des Gesamtvolumens rSAP (1000 U/mL) hinzugefügt. Die Reaktionsansätze wurden 2 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Bei Dephosphorylierungen in Lösung wurde die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms (5 min bei 65 °C) beendet. Bei Streptavidin Bead-gebundenen Dephosphorylierungen wurde auf die Deaktivierung des Enzyms verzichtet. Stattdessen wurde ein Waschschrift (siehe Abschnitt 4.3.2) durchgeführt. In Tabelle 14 sind die Bezeichnungen, Sequenzen, Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen analysierter 3'-Dephosphorylierungen zusammengefasst.

Tabelle 14: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der RNA-Proben nach enzymatischer 3'-Dephosphorylierung.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ε [$\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$]	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
12merA^{NPE}	5'-r[GGA UAG UGA UCC A ^{NPE}]-OH-3'	133300	4311,7	4311,6
12merA^{NPE}-A^{NPE}	5'-r[GGA UAG UGA UCC A ^{NPE} A ^{NPE}]-OH-3'	142000	4788,7	4787,8
12merU^{DEACM}	5'-r[GGA UAG UGA UCC U ^{DEACM}]-OH-3'	148600	4367,7	4366,8
DNA/RNA-C^{NPE} (Phos)	5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC C ^{NPE}]-OH-3'	109750	3924,7	3925,2
DNA/RNA-C^{NPE} (Thion)	5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC C ^{NPE}]-OH-3'	109750	4100,4	4100,9
Bio-RNA1-C^{NPE}	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC ^{NPE}]-OH-3'	126750	4090,7	4090,3
Bio-RNA1-C^{NPE} + hv	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC]-OH-3'	124250	3940,7	3940,8
Bio-RNA1-mAzo	5'-Bio-r[GGC UAC GUA G mAzo]-OH-3'	114800	4012,7	4011,7
Bio-PC-RNA1-mAzo-p	5'-Bio-PC-r[GGC UAC GUA G mAzo]-p-3'	121000	4402,8	4403,3
RNA2-U^{NPE}	5'-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA U ^{NPE}]-OH-3'	213550	6208,9	6208,6
RNA2-U^{DEACM}	5'-r[UCA GUU GGU UAG AGC ACA U ^{DEACM}]-OH-3'	213550	6288,9	6289,7
Bio-RNA1-Dinuk1	5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC _{NPP} U]-OH-3'	117200	4507,7	4506,4

10mer_{NPP}^(a)	5'-r[CUC CUC GCC _{NPP} C]-3'	64150	3290,5	3289,9
10mer_{DEACM}^(a)	5'-r[UUG CUC ACC _{DEACM} G]-3'	n.d.	3435,5	3435,0

^(a) = von Oliver Pereira im Rahmen seiner Masterarbeit hergestellt.

4.3.5 (Re-) Phosphorylierung mit *T4* Polynukleotidkinase

Die enzymatische 5'-Phosphorylierung sowie 3'/5'-Rephosphorylierungen wurden mit *T4* Polynukleotidkinase (PNK) von *NEB* unter Standardbedingungen durchgeführt. Da PNK die Phosphorylierung von 5'-Hydroxygruppen katalysiert und gleichzeitig Monophosphatgruppen am 3'-Ende von Oligonukleotiden entfernt, können diese beiden Reaktionsschritte auf einmal durchgeführt werden. Die Reaktionen wurden mit 5-50 µM RNA in 1x PNK Puffer (70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,6) von *NEB* durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Reaktionen betrug 20-500 µL. Zur (Re-) Phosphorylierung wurde den Reaktionsansätzen 1 mM ATP als Cofaktor und 5-10% (v/v) des Gesamtvolumens PNK (10 000 U/mL) hinzugefügt. Die Reaktionen wurden 2 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Denaturierung des Enzyms zum Beenden der Reaktion fand für 15-20 min bei 65 °C statt.

4.3.6 Splint-Ligationen mit *T4* RNA Ligase 2

Splint-Ligationen wurden mit *T4* RNA Ligase 2 (Rnl2, 2 mg/mL) unter Verwendung verschiedener DNA-Splints in RNA Ligase 2 Puffer (50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) oder in DNA Ligase Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5) mit 0,4-1,0 mM ATP als Cofaktor durchgeführt. Im Allgemeinen wurden die Reaktionsbedingungen für alle Splint-Ligationen individuell angepasst. Insbesondere die Konzentrationen der einzelnen Oligonukleotide sowie deren Verhältnisse zueinander, die Inkubationstemperatur, die Ligationszeit und auch der verwendete Puffer wurden variiert. Besonders beim Vergrößern der Ligationsansätze wurden Einbußen der Ligationsausbeute beobachtet, sodass die Ligationen in vielen kleinen (20-150 µL), parallel ablaufenden Ansätzen durchgeführt wurden. Typischerweise wurden Oligonukleotide mit Konzentrationen von 1-10 µM eingesetzt. Ligationszeiten variierten zwischen 2-8 h, die Inkubationstemperaturen zwischen 17 °C und 37 °C. Bei Bead-gebundenen Splint-Ligationen wurden die 5'-phosphorylierte RNA und der DNA-Splint zunächst durch kurzes aufwärmen auf 80 °C und langsames abkühlen auf 37 °C vorkoordiniert, bevor dieses Gemisch zu dem gebundenen Akzeptor-Fragment hinzugefügt wurde. Bei Ligationen in Lösung (ohne Streptavidin Beads) wurde die Ligationsreaktion durch Erhitzen der Probe für 5 min auf 80 °C beendet. Bei Streptavidin Bead-gebundenen (Festphasensystem-basierten) Splint-Ligationen wurde stattdessen ein Waschschrift (Abschnitt 4.3.2) durchgeführt. Ligationsreaktionen wurden nach DNase-Verdau mittels RP-HPLC, denat. PAGE oder *via* Massenspektrometrie analysiert.

Details zu den Synthesen der genannten Oligonukleotide können Abschnitt 4.2.1 entnommen werden. Kommerziell erworbene Oligonukleotide sind als solche gekennzeichnet.

Splint-Ligation von 12merA^{NPE}A^{NPE} mit 5'-p-24mer

Eine 1:1:1 Mischung aus **12merA^{NPE}A^{NPE}** (RP-HPLC-aufgereinigt), **5'-p-24mer** (bezogen von *biomers.net GmbH*) und **DNA-38mer** (je 1 µM) wurde mit 0,2 mM ATP in 1x *T4* RNA Ligase

2 Puffer 3 min auf 75 °C erhitzt und auf 37 °C abgekühlt. Der Mischung wurden 1% Rnl2 hinzugegeben (finales Volumen 50 µL). Der Ligationsansatz wurde für 6 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Zur Denaturierung der Ligase wurde der Ansatz für 10 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde der DNA-Splint mit DNase abgebaut und die Ligationsreaktion mittels 20% denat. PAGE analysiert.

Zielsequenz: 5'-r[GGA UAG UGA UCC A^{NPE}A^{NPE}G GCG GGA GUU GGG CUA GGG AGG AA]-3'

Splint-Ligation von DNA/RNA-C^{NPE} (Phos)/(Thio) mit 5'p-RNA2

Eine 1:1:1 Mischung aus **DNA/RNA-C^{NPE}** (RP-HPLC-aufgereinigt), **5'p-RNA2** und **DNA-Splint** (je 8 µM) wurde in 1x T4 DNA Ligase Puffer (inklusive 1 mM ATP) 10 min auf 55 °C erhitzt und auf 25 °C abgekühlt. Der Mischung wurden 10% Rnl2 hinzugegeben (finales Volumen 100 µL). Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei 25 °C/300 rpm inkubiert. Zur Denaturierung der Ligase wurde der Ansatz für 10 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde der DNA-Splint mit DNase abgebaut und die Ligationsreaktion mittels 20% denat. PAGE analysiert.

Zielsequenz: 5'-d[CCC CCC CC]-r[C CCC C^{NPE}UC AGU UGG UUA GAG CAC A]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-C^{NPE} mit 5'p-RNA2 und von Bio-RNA1-mAzo mit 5'p-RNA2

Eine 1:1 Mischung aus **DNA1** und **5'p-RNA2** (je 4 µM) wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1-C^{NPE} / -mAzo** (4 µM) gegeben und 5% (v/v) T4 RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 50-250 µL). Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CA]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-C^{NPE} mit 5'p-RNA2-U^{NPE} (mAzo-Fragmente analog dazu)

Splint-Ligationen der ersten beiden modifizierten RNAs **RNA1** und **RNA2** wurden in finalen Volumina bis zu 100 µL mit jeweils 4-8 µM Oligonukleotid im Verhältnis 1:1:1 (RNA1:RNA2:DNA) durchgeführt.

Eine 1:1 Mischung aus **DNA1** und **5'p-RNA2-U^{NPE}** wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1-C^{NPE}** gegeben und 5% (v/v) T4 RNA Ligase 2 hinzugefügt. Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und ein weiterer Waschschrift durchgeführt.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{NPE}]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE} mit 5'p-RNA3-C^{NPE} (mAzo-Fragmente analog dazu)

Eine 1:1,2 Mischung aus **DNA2** und **5'p-RNA3-C^{NPE}** wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** gegeben und 5% (v/v) T4 RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 50 µL). Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und ein weiterer Waschschrift durchgeführt.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{NPE} CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC^{NPE}]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-3^{NPE} mit 5'p-RNA4-G^{NPE}

Eine 1:1,2 Mischung aus **DNA3** und **5'p-RNA4-G^{NPE}** wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** gegeben und 5% (v/v) *T4* RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 50 µL). Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und ein weiterer Waschschrift durchgeführt.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{NPE} CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC^{NPE} AGG UUC GAA UCC CGU CG^{NPE}]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE} mit 5'p-RNA3^{NPE}-RNA4^{NPE} (mAzo-Fragmente analog dazu)

Eine 1:1,2 Mischung aus **DNA2** und **5'p-RNA3^{NPE}-RNA4^{NPE}** wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** gegeben und 5% (v/v) *T4* RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 50-100 µL). Der Ligationsansatz wurde für 3 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und ein weiterer Waschschrift durchgeführt.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{NPE} CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC^{NPE} AGG UUC GAA UCC CGU CG^{NPE}]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-4^{NPE} mit 5'p-RNA5 (mAzo-Fragmente analog dazu)

Eine 1:1,2 Mischung aus **DNA4** und **5'p-RNA5** wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 27 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1-4^{NPE}** gegeben und 5% (v/v) *T4* RNA Ligase 2 zugegeben (finales Volumen 50-100 µL). Der Ligationsansatz wurde 3 h bei 27 °C/300 rpm inkubiert. Nach einem Pufferaustausch und Waschschrift wurde der DNA-Splint mit DNase abgebaut, die Beads in Wasser resuspendiert und das finale Konstrukt durch Erhitzen von den Beads gelöst.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{NPE} CAC UCA UAA UGA UGG GGU CAC^{NPE} AGG UUC GAA UCC CGU CG^{NPE}U AGC CAC CA]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-mAzo mit 5'p-RNA2-U^{NPE}

Eine 1:2 Mischung aus **DNA1** und **5'p-RNA2-U^{NPE}** (je 8/16 µM) wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1-mAzo** (8 µM) gegeben und 5% (v/v) *T4* RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 100 µL). Der Ligationsansatz wurde für 4 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und das Ligationsprodukt mittels RP-HPLC isoliert.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GmAzoU CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{NPE}]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-C^{NPE} mit 5'p-RNA2-U^{DEACM}

Eine 1:1 Mischung aus **DNA1** und **5'p-RNA2-U^{DEACM}** (je 8 µM) wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 37 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1-C^{NPE}** (8 µM) gegeben und 10% (v/v) *T4* RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 100 µL). Der Ligationsansatz wurde für 3,5 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und das Ligationsprodukt mittels RP-HPLC isoliert.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC^{NPE}U CAG UUG GUU AGA GCA CAU^{DEACM}]-3'

Splint-Ligation von Bio-RNA1-Dinuk1 mit 5'p-RNA2

Eine 1:1 Mischung aus **DNA1** und **5'p-RNA2** (je 3 μ M) wurden in DNA Ligase Puffer vorkoordiniert und auf 25 °C abgekühlt. Die Mischung wurde zur Suspension Bead-gebundener **Bio-RNA1-Dinuk** (3 μ M) gegeben und 10% (v/v) *T4* RNA Ligase 2 hinzugefügt (finales Volumen 80 μ L). Der Ligationsansatz wurde für 6 h bei 25 °C/300 rpm inkubiert. Der DNA-Splint wurde nach einem Pufferaustausch und Waschschrift mit DNase verdaut und das Ligationsprodukt mittels RP-HPLC isoliert.

Zielsequenz: 5'-Bio-r[GGC UAC GUA GC_{NPP}U UCA GUU GGU UAG AGC ACA]-3'

4.3.7 Abbau von DNA mit *TURBOTM DNase*

Der Abbau verwendeter DNA-Splints erfolgte durch Inkubation der Splint-Ligationsansätze mit *TURBOTM DNase* von *Thermo Fisher Scientific*. Den Ligationsansätzen wurden 10% (v/v) des 10x *TURBO DNase* Puffers (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, pH 7,9) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch mit 1-5% (v/v) DNase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zur Denaturierung der DNase für 10 min auf 65 °C erhitzt. Bei Streptavidin Bead-gebundenen Ligationsansätzen wurde auf die Deaktivierung des Enzyms verzichtet. Stattdessen wurde ein Waschschrift (siehe Abschnitt 4.3.2) durchgeführt.

4.3.8 Enzymatische Zyklisierungen

Enzymatische Zyklisierungen wurden im 50 μ L-Maßstab mit 3-5 μ M 5'p-RNA in 1x DNA Ligase Puffer durchgeführt. Nach Zugabe von 5% (v/v) *T4* RNA Ligase 1 wurden unmodifizierte RNAs 4 h bei 17 °C/300 rpm inkubiert. Ansätze mit photospaltbarer RNA wurden 4 h bei 37 °C/300 rpm geschüttelt. Nach Denaturierung des Enzyms (10 min bei 65 °C) wurden die Zyklisierungsansätze mittels RP-HPLC aufgereinigt und die Produkte massenspektrometrisch analysiert.

Tabelle 15: Bezeichnung, Sequenzen, berechnete Extinktionskoeffizienten sowie berechnete und gemessene Massen der RNA-Proben nach enzymatischer Zyklisierung. Mit „---“ ist die zu verknüpfende Stelle gekennzeichnet.

Oligo	Sequenz 5'→3'	ϵ [$\frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$]	berechnete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
circ-20mer ^(a)	---5'-r[CUC CUC GCC CUU GCU CAC CG]-3'---	64150	6250,8	6250,5
circ-22mer _{NPP} ^(a)	---5'-r[CUC CUC GCC CUU GCU CAC CGC _{NPP} C]-3'---	n.d.	7120,9	7119,8

^(a) = von Oliver Pereira im Rahmen seiner Masterarbeit hergestellt.

4.3.9 NaIO₄-Capping und 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie

Capping-Reaktionen mit NaIO₄ und die anschließende 3'-Modifikation durch Umwandlung des 2',3'-Dialdehyds in ein 3'-Rhodamin-modifiziertes RNA-Derivat wurden angelehnt an Literaturangaben durchgeführt.^[31,378,420] Alle Pufferreste sollten sorgfältig durch Waschschriffe entfernt werden, da ATP- und DTT-Reste die Oxidationsreaktion mit NaIO₄ stören. Bei allen Reaktionen wurde auf milde Reaktionsbedingungen und kurze Reaktionszeiten geachtet, um einen Abbau der RNA und eine Schädigung der Streptavidin Beads zu vermeiden. Zusätzlich wurde bei allen Cappingreaktionen auf Lichtausschluss geachtet. Sie wurden analog zu dem hier beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Bei unvollständigem Umsatz wurde der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 0,1 M NaOH auf etwa 8,0 eingestellt (Achtung: bei einem zu basischen pH wird die RNA hydrolysiert!).

10 µM **Bio-34mer** wurden an frisch vorbereitete Streptavidin Beads gebunden und mit 15 mM NaIO₄ in ultrareinem RNase-freiem Wasser für 15 min bei 37 °C/300 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Das Gesamtvolumen der Reaktion lag bei 100 µL. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 67 mg des Rhodamins (132 µmol, 1,0 Eq., hergestellt von Rebekka Weber (*AK Heckel*)) in 600 µL einer 9:1 Mischung H₂O/MeOH gelöst und 26 mg Borsäure (418 µmol, 3,8 Eq.) hinzugefügt. Nach 15 min wurden 30 µL des Gemischs zum Capping-Ansatz gegeben und der pH-Wert mit Et₃N vorsichtig auf 8,5 eingestellt. Das Gemisch wurde 1 h bei 37 °C/300 rpm inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µL einer 5 M NaBH₃CN Lösung (in NaOH) hinzugefügt. Das lilafarbene Gemisch wurde für weitere 45 min bei 37 °C/500 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschschriffe mit Bindepuffer (bis der Überstand farblos war) beendet. Danach wurden die Beads in Wasser resuspendiert und die RNA durch Erhitzen gelöst. Es folgte eine erste Aufreinigung über eine NAP-25-Säule, bevor das Produkt mittels RP-HPLC isoliert wurde.

4.4 Chemische Synthesen

In diesem Abschnitt wird auf die chemische Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Moleküle eingegangen. Hierbei handelt es sich stets um selbstständig durchgeführte Synthesen.

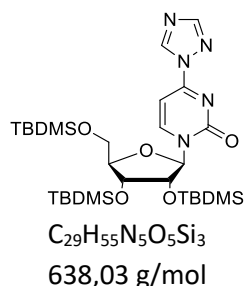
Die beschriebenen Synthesen wurden unter Argonatmosphäre in absoluten Lösungsmitteln durchgeführt. Wenn nötig, wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Hydrolyse-empfindliche Zwischenprodukte wurden über Nacht unter Argonatmosphäre und gegebenenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Synthesen des (*R*)-NPE-geschützten Desoxyguanosin ($\text{dG}^{\text{R-NPE}}$)-Phosphoramidits (**80**) und des (*S*)-NPE-geschützten Guanosin ($\text{rG}^{\text{S-NPE}}$)-Phosphoramidits (**86**) erfolgten nach Literaturvorschrift. In beiden Fällen wurden die durchgeführten Synthesen und erfassten spektroskopischen Daten ausführlich für die jeweilige Publikation zusammengefasst. Da die Details dieser Synthesen der jeweiligen *Supporting Information* entnommen werden können, werden sie an dieser Stelle nicht nochmal explizit beschrieben (für das $\text{dG}^{\text{R-NPE}}$ -PA siehe Grün *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 6185-6193^[425]; für das $\text{rG}^{\text{S-NPE}}$ -PA siehe Hohmann *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *49*, 11337-11349^[426]).

4.4.1 Synthese der lichtaktivierbaren Uridin-3',5'-Bisphosphate $\text{pU}^{\text{NPE}}\text{p}$ (**32**) und $\text{pU}^{\text{DEACM}}\text{p}$ (**39**)

Die Synthese des NPE-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates $\text{pU}^{\text{NPE}}\text{p}$ (**32**) wurde zusammen mit den Synthesen von $\text{pA}^{\text{NPE}}\text{p}$, $\text{pC}^{\text{NPE}}\text{p}$ (siehe auch Masterarbeit Blümmler 2017) und $\text{pG}^{\text{NPE}}\text{p}$ (siehe auch Doktorarbeit Goldau 2018) in Keyhani *et al.*^[294] im Jahr 2018 publiziert. Die Synthese des DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates $\text{pU}^{\text{DEACM}}\text{p}$ (**39**) erfolgte angelehnt an Keyhani *et al.*^[294]. Die hier beschriebenen Synthesen zu $\text{pU}^{\text{DEACM}}\text{p}$ wurden in Blümmler *et al.*^[386] veröffentlicht.

Synthese von 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-1-[4-triazolyl-pyrimidin-2(1*H*)-onyl]- β -D-ribosid (**37**)



9,41 g 1,2,4-Triazol (136,3 mmol, 20 Eq) wurden unter Argonatmosphäre in 140 mL absolutem MeCN suspendiert und mit einem Eisbad auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Im Argongegenstrom und unter starkem Rühren wurden 3,2 mL frisch destilliertes POCl_3 (34,1 mmol, 5 Eq) und 19,0 mL Et_3N (136,3 mmol, 20 Eq) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurden 4,00 g TBDMS-geschütztes Uridin **35** (6,8 mmol, 1 Eq) gelöst in 40 mL abs. MeCN über 25 min hinzugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 15 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde

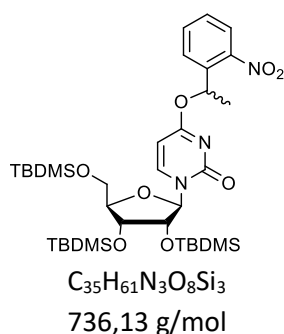
das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 150 mL CH₂Cl₂ aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet wurde.

Ausbeute: 4,24 g (6,7 mmol, 98%)

DC (CH/EE = 1:1): R_f: 0,75

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9,26 (s, 1H, Triazol-H); 8,88 (d, ³J_(H,H) = 7,2 Hz, 1H, H5); 8,12 (s, 1H, Triazol-H); 6,95 (d, ³J_(H,H) = 7,2 Hz, 1H, H6); 5,79 (s, 1H, 1'H); 4,21-4,14 (m, 3H, 2'H, 4'H und 5'H); 4,07-4,04 (m, 1H, 3'H); 3,84-3,81 (m, 1H, 5'H); 0,99-0,88 (m, 27H, 3x TBDMS-(CH₃)₃); 0,18-0,04 (m, 18H, 3x TBDMS-(CH₃)₂)ppm.

Synthese von 2',3',5'-Tris-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-O⁴-[(R,S)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]uridin (**38**)



3,00 g des Triazol-aktivierten Uridin-Derivats **37** (4,7 mmol, 1,0 Eq) wurden in 80 mL absolutem MeCN gelöst. Unter Lichtausschluss wurden 1,26 mL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU, 8,5 mmol, 1,8 Eq) und 0,94 g 1-(2-Nitrophenyl)ethanol (NPE-OH, 5,6 mmol, 1,2 Eq) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 4:1). Verbindung **38** wurde als hellgelber Feststoff erhalten.

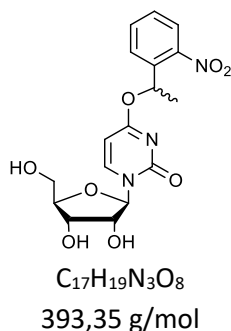
Ausbeute: 2,36 g (3,2 mmol, 68%)

DC (CH/EE = 4:1): R_f: 0,63

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,13 (d, ³J_(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H5); 8,00 (d, ³J_(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H_{ar} NPE); 7,79-7,73 (m, 2H, H_{ar} NPE); 7,58-7,54 (m, 1H, H_{ar} NPE); 6,49-6,48 (m, 1H, CH-NPE); 6,05 (d, ³J_(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H6); 5,73 (d, ³J_(H,H) = 4,2 Hz, 1H, 1'H); 4,11 (t, ³J_(H,H) = 4,3 Hz, 1H, 2'H); 4,02 (t, ³J_(H,H) = 4,3 Hz, 1H, 3'H); 3,96-3,90 (m, 2H, 4'H und 5'H); 3,72-3,70 (m, 1H, 5'H); 1,67 (d, ³J_(H,H) = 6,5 Hz, 3H, CH₃-NPE); 0,90-0,74 (m, 27H, 3x TBDMS-(CH₃)₃); 0,10-0,14 (m, 18H, 3x TBDMS-(CH₃)₂)ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₃₅H₆₁N₃O₈Si₃ Na⁺ [M+Na⁺] 758,36587; gemessen: 758,36736 (Δm = 0,00149; relativer Fehler Δm/m = 2,0ppm)

Synthese von O^4 -[(*R,S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]uridin (**39**)



2,30 g des Vorläufers **38** (3,1 mmol, 1,0 Eq) wurden in 50 mL absolutem THF gelöst. Es wurden 10,9 mL TBAF (1 M in THF, 10,9 mmol, 3,5 Eq) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Verbindung **39** konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute: 1,02 g (2,6 mmol, 83%)

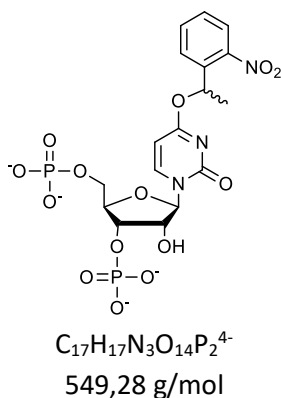
DC (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1): R_f: 0,61

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,30 (d, ³J_(H,H) = 7,4 Hz, 1H, H₅); 8,00 (d, ³J_(H,H) = 7,8 Hz, 1H, H_{ar} NPE); 7,80-7,73 (m, 2H, H_{ar} NPE); 7,60-7,56 (m, 1H, H_{ar} NPE); 6,49-6,48 (m, 1H, CH-NPE); 6,09 (d, ³J_(H,H) = 7,1 Hz, 1H, H₆); 5,72 (d, ³J_(H,H) = 3,0 Hz, 1H, 1'H); 5,38 (d, ³J_(H,H) = 5,2 Hz, 1H, 2'OH); 5,12 (t, ³J_(H,H) = 5,3 Hz, 1H, 5'OH); 4,99 (d, ³J_(H,H) = 5,0 Hz, 1H, 3'OH); 3,93-3,84 (m, 3H, 2'H, 3'H und 4'H); 3,71-3,66 (m, 1H, 5'H); 3,58-3,53 (m, 1H, 5'H); 1,66 (d, ³J_(H,H) = 7,0 Hz, 1H, CH₃-NPE)ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 169,7; 154,6; 147,6; 145,1; 136,9; 134,2; 129,1; 127,4; 94,7; 90,0; 89,9; 84,4; 74,5; 69,3; 68,9; 60,2; 21,6ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₁₇H₁₉N₃O₈ Na⁺ [M+Na⁺] 416,10644; gemessen: 416,10619 (Δm = 0,00030; relativer Fehler Δm/m = 0,6ppm)

Synthese von 3',5'-*O*-Bisphosphat- O^4 -[(*R,S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]uridin pU^{NPE}p (**32**)



Die Synthese wurde angelehnt an die Literatur^[118] durchgeführt. 10 mg O^4 -[(*R,S*)-1-(2-nitrophenyl)ethyl]uridin **39** (U^{NPE}, 25 μmol, 1 Eq) wurden unter Argonatmosphäre auf -12 °C gekühlt und 35 μL Diphosphorylchlorid (254 μmol, 10 Eq) langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 7 h bei -12 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis beendet und das Gemisch

mit 1 M vorgekühltem TEAB-Puffer (pH 8,0) auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 4 °C entfernt und das Rohprodukt dreimal mit MeOH coevaporiert. Anschließend fand eine Aufreinigung mittels RP-HPLC, Säule 6 und folgendem Gradienten statt, wobei **32** als weißer Feststoff erhalten wurde:

Tabelle 16: RP-HPLC-Gradient zur Aufreinigung von pU^{NPE}p (**32**).

Zeit [min]	400 mM TEAB [%]	MeCN [%]
0	95	5
1	95	5
5	15	85
30	60	40
35	100	0

Ausbeute: 2,2 mg (4 µmol, 16%)

RP-DC (*i*PrOH/NH₃/H₂O = 6:3:1): R_f: 0,27

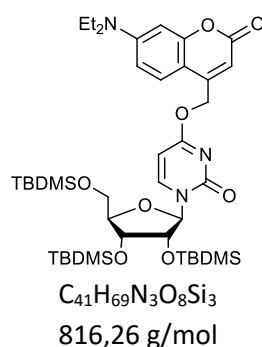
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8,00 (d, ³J_(H,H) = 7,9 Hz, 1H, H5); 7,84–7,82 (m, 1H, H_{ar} NPE); 7,78–7,71 (m, 2H, 2x H_{ar} NPE); 7,54–7,51 (m, 1H, H_{ar} NPE); 6,42–6,38 (m, 1H, CH-NPE); 6,00 (d, ³J_(H,H) = 7,7 Hz, 1H, H6); 5,83 (d, ³J_(H,H) = 4,8 Hz, 1H, 1'H); 4,61–4,57 (m, 1H, 2'H); 4,36 (t, ³J_(H,H) = 4,6 Hz, 1H, 3'H); 4,21 (m, 1H, 4'H); 4,06–3,95 (m, 2H, 5'-CH₂); 1,81–1,80 (d, ³J_(H,H) = 7,0 Hz, 3H, CH₃-NPE)ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 164,9; 151,0; 148,1; 140,6; 133,1; 132,8; 129,4; 128,6; 123,9; 102,1; 88,3; 83,5; 76,0; 70,0; 63,6; 48,1; 15,1ppm.

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O): δ = 2,55; 2,09ppm.

ESI-MS: m/z berechnet für C₁₇H₂₀N₃O₁₄P₂ [M-H⁺]⁻ 552,04; gemessen: 552,01

Synthese von 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*O*⁴-{[7-(diethylamino)-cumarin-4-yl]methyl}uridin (**41**)



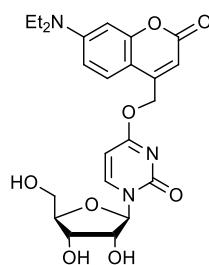
3,00 g des Triazol-aktivierten Uridin-Derivats **37** (4,7 mmol, 1,0 Eq) wurden in 100 mL absolutem MeCN gelöst. Der orangefarbenen Lösung wurden 1,26 mL 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU, 8,5 mmol, 1,8 Eq) und 1,28 g 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (DEACM-OH, nach Literaturvorschrift^[390] hergestellt, 5,2 mmol, 1,1 Eq) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Lichtausschluss 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 4:1 → 2:1). Das Produkt **41** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,98 g (4,7 mmol, 52%)

DC (CH/EE = 4:1): R_f: 0,40

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,24 (d, ³J_(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H5); 7,48 (d, ³J_(H,H) = 9,0 Hz, 1H, DEACM-H5); 6,71 (d, ³J_(H,H) = 9,0 Hz, 1H, DEACM-H6); 6,56 (s, 1H, DEACM-H8); 6,24 (d, ³J_(H,H) = 7,0 Hz, 1H, H6); 6,02 (s, 1H, DEACM-H3); 5,80 (m, 1H, 1'H); 5,56 (bs, 2H, O-CH₂-DEACM); 4,22 (m, 1H, 2'H); 4,08 (m, 1H, 3'H); 4,00-3,95 (m, 2H, 4'H und 5'H); 3,76-3,73 (m, 1H, 5'H); 3,46-3,41 (m, 4H, 2x CH₂-CH₃); 1,12 (t, ³J_(H,H) = 6,1 Hz, 6H, 2x CH₂-CH₃); 0,92-0,83 (m, 27H, 3x TBDMS-(CH₃)₃); 0,12-0,02 (m, 18H, 3x TBDMS-(CH₃)₂)ppm.

Synthese von O⁴-{7-(Diethylamino)-cumarin-4-yl}methyl}uridin (**42**)



C₂₃H₂₇N₃O₈

473,48 g/mol

1,90 g des Vorläufers **41** (2,3 mmol, 1,0 Eq) wurden in 40 mL absolutem THF gelöst. Es wurden 8,2 mL TBAF (1 M in THF, 8,2 mmol, 3,5 Eq) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Verbindung **42** konnte als hellgelber Feststoff isoliert werden.

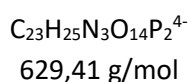
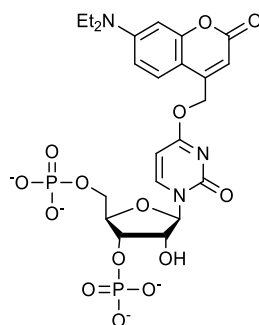
Ausbeute: 953 mg (2,3 mmol, 86%)

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1): R_f: 0,61

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,42 (d, ³J_(H,H) = 7,5 Hz, 1H, H5); 7,48 (d, ³J_(H,H) = 9,0 Hz, 1H, DEACM-H5); 6,74-6,70 (m, 1H, DEACM-H6); 6,57-6,56 (m, 1H, DEACM-H8); 6,24 (d, ³J_(H,H) = 7,0 Hz, 1H, H6); 6,02 (s, 1H, DEACM-H3); 5,80-5,79 (m, 1H, 1'H); 5,54 (bs, 2H, O-CH₂-DEACM); 5,47-5,45 (m, 1H, 2'OH); 5,16 (t, ³J_(H,H) = 5,0 Hz, 1H, 3'OH); 5,03-5,00 (m, 1H, 5'OH); 4,00-3,89 (m, 3H, 2'H, 3'H und 4'H); 3,77-3,55 (m, 2H, 5'-CH₂); 3,45-3,43 (m, 4H, 2x CH₂-CH₃); 1,13 (t, ³J_(H,H) = 6,9 Hz, 6H, 2x CH₂-CH₃)ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ = 170,0; 160,7; 155,8; 154,6; 150,5; 145,2; 125,5; 108,8; 105,3; 97,1; 96,9; 94,4; 90,0; 87,7; 84,8; 84,2; 74,5; 73,5; 68,8; 63,2; 59,9; 44,0; 12,3ppm.

Synthese von 3',5'-O-Bisphosphat-O⁴-{[7-(diethylamino)-cumarin-4-yl]methyl}uridin pU^{DEACM}p (43)



Die Synthese wurde angelehnt an die Literatur^[118,294] durchgeführt. 15 mg DEACM-geschütztes Uridin **42** (32 μ mol, 1 Eq) wurden unter Argonatmosphäre auf -12 °C gekühlt und 44 μ L Diphosphorylchlorid (317 μ mol, 10 Eq) langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 h bei -12 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis beendet und das Gemisch mit 1 M vorgekühltem TEAB-Puffer (pH 8,0) auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 4 °C entfernt und das Rohprodukt mittels NMR-Spektroskopie und massenspektrometrisch analysiert. Das Produkt konnte hierbei eindeutig nachgewiesen werden. Da weitere Aufreinigungsversuche zur Hydrolyse der DEACM-Schutzgruppe führten, wurde das Rohprodukt (eine Mischung aus 2',5'- und 3',5'-pU^{DEACM}p) mehrmals mit RNase-freiem ultrareinen Wasser coevaporiert und anschließend eine Testligation mit T4 RNA Ligase 1 durchgeführt. Da eine 3'-Extension sowie eine 3'-Dephosphorylierung erfolgreich durchgeführt und massenspektrometrisch bestätigt werden konnten, wurde auf eine finale Aufreinigung des Rohproduktes verzichtet.

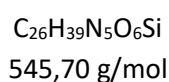
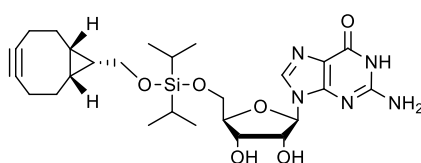
Ausbeute: Das Rohprodukt konnte als Gemisch aus 3',5'- und 2',5'-Bisphosphat identifiziert werden
RP-DC (*i*PrOH/NH₃/H₂O = 6:3:1): R_f: 0,27

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O): δ = 1,01; 0,84; 0,64; 0,55ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₂₃H₂₉N₃O₁₄P₂ H⁺ [M+H⁺] 634,11975; gemessen: 634,11876 (Δm = 0,00099; relativer Fehler $\Delta m/m$ = 1,6ppm)

4.4.2 Synthese des fluoridlabilen Cyclooctin-Initiatornukleosids (50)

Synthese von 5'-O-(((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-ylmethoxy)diisopropylsilyl)guanosin (50)



Variante 1: *In situ*-Synthese

Die Synthese wurde angelehnt an die Literatur^[398] durchgeführt. Vor der Synthese wurde die benötigte Menge Guanosin **52** dreimal mit Pyridin coevaporiert und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Während der gesamten Synthese wurde streng auf Luft- und Feuchtigkeitsausschluss geachtet. 38,0 mg Guanosin **52** (135 μmol , 1 Eq.) wurden in 100 μL DMF suspendiert und auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Parallel dazu wurden 24,4 μL Dichlordiisopropylsilan (135 μmol , 1 Eq.) in 50 μL DMF in einem Schlenkrohr vorgelegt und ebenfalls auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. In einem dritten Kolben wurde ein Reaktionsgemisch aus 20,3 mg Octin-Alkohol **53** (135 μmol , 1 Eq.), 8,3 mg DMAP (67,5 μmol , 0,5 Eq) und 47,1 μL Et_3N (337,5 μmol , 2,5 Eq.) in 50 μL DMF angesetzt und auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt, bevor es unter Luftausschluss zu dem vorgelegten Dichlordiisopropylsilan gegeben wurde. Der Reaktionsverlauf wurde *via* DC kontrolliert. Nach 20 minütigem Rühren wurde die Reaktionslösung aus Octin-Alkohol und Silan zu der vorgekühlten Guanosin-Suspension gegeben. Das finale Gemisch wurde 24 h gerührt, wobei sich die Lösung langsam von $-10\text{ }^\circ\text{C}$ auf Raumtemperatur erwärmte. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2,5 mL CH_2Cl_2 aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit jeweils 1,5 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit 2,0 mL gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 + 1% Et_3N \rightarrow $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Verbindung **50** wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5,9 mg (10,8 μmol ; 8%)

Variante 2: Schutzgruppen-basierte Synthese

25,7 μL Dichlordiisopropylsilan (143 μmol , 1,0 Eq.) wurden unter Luftausschluss in 50 μL DMF vorgelegt und auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. 21,5 mg Octin-Alkohol (143 μmol , 1,0 Eq.) gelöst in 50 μL DMF wurden mit 8,75 mg DMAP (72 μmol , 0,5 Eq.) und 50,0 μL Et_3N (358 μmol , 2,5 Eq.) versetzt und zu dem vorgelegten Dichlordiisopropylsilan gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, bevor 58,6 mg 2',3'-O-Di(acetyl)-4-N-acetyl-guanosin **61** (143 μmol , 1,0 Eq.) gelöst in 50,0 μL DMF hinzugefügt wurden. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt, wobei sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 3,0 mL CH_2Cl_2 aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 + 1% Et_3N \rightarrow $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1). Verbindung **50** wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

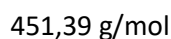
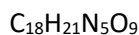
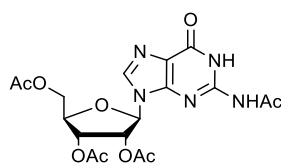
Ausbeute: 16,1 mg (29,5 μmol ; 21%)

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 9:1): R_f : 0,12

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 10,63 (bs, 1H, NH); 7,82 (s, 1H, H8); 6,49 (bs, 2H, NH_2); 5,72-5,71 (d, $^3J_{(H,H)}$ = 5,1 Hz, 1H, 1'H); 5,51 (m, 1H, 2'OH); 5,17 (m, 1H, 3'OH); 4,34 (m, 1H, 2'H); 4,17 (m, 1H, 3'H); 3,94-3,92 (m, 2H, 4'H und 5'H); 3,87-3,83 (m, 1H, 5'H); 3,73 (d, $^3J_{(H,H)}$ = 7,7 Hz, 2H, O- CH_2 -Oct); 2,61-2,60 (m, 2H, 2x *iPr-H*); 2,11-1,96 (m, 4H, Oct-H); 1,47-1,35 (m, 4H, Oct-H); 1,00-0,98 (m, 12H, 4x *iPr-CH}_3*); 0,85 (m, 1H, Oct-H); 0,78-0,77 (m, 2H, Oct-H)ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6): δ = 156,7; 153,8; 151,3; 134,8; 129,7; 116,6; 99,0; 86,2; 84,2; 73,7; 69,8; 62,6; 59,5; 45,7; 29,0; 28,7; 28,6; 22,1; 20,9; 20,8; 19,4; 17,3; 14,0; 12,6; 11,4; 10,9ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}$ H^+ [$\text{M}+\text{H}^+$] 546,27424; gemessen: 546,27254 (Δm = 0,00170; relativer Fehler $\Delta m/m$ = 3,1ppm)

Synthese von 2',3',5'-O-Tri(acetyl)-4-N-acetyl-guanosin (60)

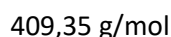
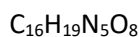
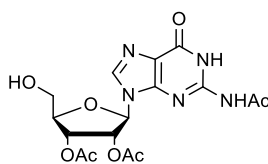
10,0 g Guanosin **52** (35,3 mmol, 1 Eq.) wurden in 60 mL Pyridin gelöst. Der Reaktionslösung wurden 43,4 mL Ac_2O (459,0 mmol, 13 Eq.) und 0,475 g DMAP (3,9 mmol, 0,11 Eq.) hinzugefügt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Um einen vollständigen Umsatz zu erreichen, wurde der Reaktionsansatz zusätzlich 8 h refluxiert. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von EtOH beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 5%iger Zitronensäure, gefolgt von gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Verbindung **60** wurde als brauner Feststoff erhalten, der für mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 14,92 g (33,05 mmol; 93%)

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 98:2$): R_f : 0,14

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 12,09$ (bs, 1H, NH); 11,65 (bs, 1H, NH); 8,25 (s, 1H, H8); 6,08 (d, $^3J_{(H,H)} = 6,4$ Hz, 1H, 1'H); 5,82 (t, $^3J_{(H,H)} = 6,2$ Hz, 1H, 2'H); 5,49-5,47 (m, 1H, 3'H); 4,41-4,26 (m, 3H, 4'H und 5'- CH_2); 2,20 (s, 3H, Ac); 2,12 (s, 3H, Ac); 2,05-2,03 (m, 6H, 2x Ac)ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 173,5$; 170,1; 169,4; 169,2; 154,7; 148,6; 148,2; 137,8; 120,4; 84,5; 79,8; 72,1; 70,3; 63,1; 23,9; 20,5; 20,4; 20,1ppm.

Synthese von 2',3'-O-Di(acetyl)-4-N-acetyl-guanosin (61)

Es wurden 1,69 g Iod (6,65 mmol, 3 Eq.) in 150 mL MeOH gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. 1,00 g vollständig acetyliertes Guanosin **60** (2,22 mmol, 1 Eq.) wurden in 15 mL MeOH gelöst und zu der Iod-Methanol-Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 65 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung bis zum vollständigen entfärben der Lösung beendet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} 9:1$). Das Produkt **61** wurde als hellgelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,29 g (0,71 mmol; 32%)

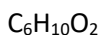
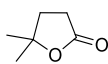
DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$): R_f : 0,55

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 12,07 (bs, 1H, NH); 11,72 (bs, 1H, NH); 8,30 (s, 1H, H8); 6,06 (d, $^3J_{(H,H)}$ = 6,8 Hz, 1H, 1'H); 5,76-5,73 (m, 1H, 2'H); 5,46-5,45 (m, 1H, 3'H); 5,38 (t, $^3J_{(H,H)}$ = 5,4 Hz, 1H, 5'OH); 4,21 (m, 1H, 4'H); 3,74-3,63 (m, 2H, 5'-CH₂); 2,19 (s, 3H, Ac); 2,13 (s, 3H, Ac); 1,99 (m, 3H, Ac)ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₁₆H₁₉N₅O₈ Na⁺ [M+Na⁺] 432,11258; gemessen: 432,11214 (Δm = 0,00044; relativer Fehler $\Delta m/m$ = 1,0ppm)

4.4.3 Synthese des Initiatornukleosids mit fluoridlabiler Biotineinheit (51)

Synthese von 5,5-Dimethyldihydrofuran-2(3H)-on (63)



114,14 g/mol

7 mL Lävulinsäure (68,1 mmol, 1,0 Eq.) wurden in 150 mL THF auf -78 °C gekühlt, bevor 50 mL Methylmagnesiumbromid (149,9 mmol, 2,2 Eq.) hinzugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 3 h gerührt, wobei es sich langsam auf Raumtemperatur erwärmte und anschließend über Nacht auf 50 °C erhitzt. Nach abkühlen der Lösung wurde durch Zugabe von Essigsäure ein pH-Wert von 4 eingestellt und die Lösung für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 100 mL H₂O hinzugegeben und dreimal mit jeweils 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene flüssige braune Rückstand wurde unter Vakuum fraktioniert destilliert. Das gewünschte Produkt **63** konnte ab 65 °C als klare Flüssigkeit abgetrennt werden.

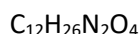
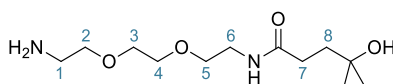
Ausbeute: 3,91 g (34,2 mmol; 50%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,61 (t, $^3J_{(H,H)}$ = 8,1 Hz, 2H, CH₂); 2,05 (t, $^3J_{(H,H)}$ = 8,1 Hz, 2H, CH₂); 1,42 (s, 6H, 2x CH₃)ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 176,8; 84,7; 34,8; 29,5; 27,9ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₆H₁₀O₂ H⁺ [M+H⁺] 115,07536; gemessen: 115,07523 (Δm = 0,00013; relativer Fehler $\Delta m/m$ = 1,1ppm)

Synthese von N-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-4-hydroxy-4-methylpentanamid (64)



262,35 g/mol

Es wurden 2,5 g des Dimethyl-Laktons **63** (21,9 mmol, 1 Eq.) in 2,5 mL H₂O vorgelegt und 6,5 mL 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin) (43,8 mmol, 2 Eq.) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 90 °C gerührt, wobei sich die Lösung gelb verfärbte, und anschließend im

Hochvakuum getrocknet. Das ölige, gelbe Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Et₂O/MeOH/MeCN/Et₃N 5:2:2:1). Verbindung **64** wurde als gelber Rückstand isoliert.

Ausbeute: 3,72 g (14,2 mmol; 65%)

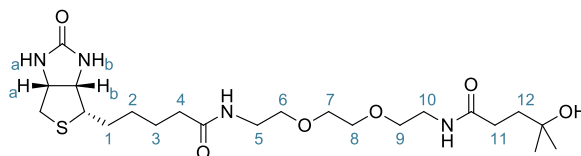
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 3,63 (s, 4H, 2x CH₂ 3 und 4); 3,56-3,53 (m, 4H, 2x CH₂ 2 und 5); 3,37-3,34 (m, 2H, CH₂ 6); 2,83 (t, ³J_(H,H) = 5,3 Hz, 2H, CH₂ 1); 2,31-2,27 (m, 2H, CH₂ 7); 1,77-1,73 (m, 2H, CH₂ 8); 1,19 (s, 6H, 2x CH₃)ppm.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,85 (m, 1H, NH); 3,50 (bs, 4H, 2x CH₂ 3 und 4); 3,40-3,36 (m, 4H, 2x CH₂ 2 und 5); 3,18-3,17 (m, 2H, CH₂ 6); 2,67 (t, ³J_(H,H) = 5,8 Hz, 2H, CH₂ 1); 2,14-2,10 (m, 2H, CH₂ 7); 1,58-1,54 (m, 2H, CH₂ 8); 1,05 (s, 6H, 2x CH₃)ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ = 176,6; 72,9; 71,3; 71,3; 70,8; 70,6; 41,9; 40,4; 40,2; 32,3; 29,1ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C₁₂H₂₆N₂O₄ H⁺ [M+H⁺] 263,19653; gemessen: 263,19557 (Δm = 0,00096; relativer Fehler Δm/m = 3,6ppm)

Synthese von *N*-(2-(2-(2-((4-hydroxy-4-methylpentyl)amino)-2-oxoethoxy)ethoxy)ethyl)-5-(2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid (**65**)



C₂₂H₄₀N₄O₆S
488,64 g/mol

Zu einer Lösung aus 931 mg Biotin (3,81 mmol, 1,0 Eq.) und 730 μL DIPEA (4,19 mmol, 1,1 Eq.) in 4,5 mL DMF wurden 545 μL Isobutylchloroformiat (4,19 mmol, 1,1 Eq.) bei 0 °C hinzugetropft und 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 500 mg Verbindung **64** (1,91 mmol, 0,5 Eq.) und 233 mg DMAP (1,91 mmol, 0,5 Eq.) gelöst in 4,0 mL DMF hinzugegeben und für weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,0 mL H₂O und 1 M HCl bis zu einem pH-Wert von 2 beendet. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie) unter Umkehrphasenbedingung aufgereinigt (H₂O/MeCN 0:100 → H₂O/MeCN 40:60) aufgereinigt, wobei Verbindung **65** als gelblicher Feststoff erhalten wurde.

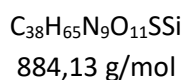
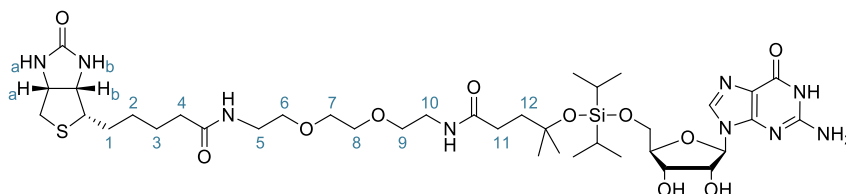
Ausbeute: 665 mg (1,36 mmol; 36%)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,84-7,81 (m, 1H, NH); 7,06-7,04 (m, 1H, NH); 6,42 (s, 1H, NH_a); 6,35 (s, 1H, NH_b); 4,32-4,29 (m, 1H, H_a); 4,14-4,12 (m, 1H, H_b); 3,81-3,70 (m, 2H, CH₂ 7); 3,51-3,49 (m, 3H, CH₂ 8 und CH₂ 6); 3,41-3,37 (m, 3H, CH₂ 6 und CH₂ 9); 3,19-3,15 (m, 1H, S-CH); 3,13-3,09 (m, 2H, CH₂ 10); 2,84-2,80 (m, 1H, S-CH₂); 2,67-2,61 (m, 2H, CH₂ 5); 2,59-2,56 (m, 1H, S-CH₂); 2,32-2,28 (m, 1H, CH₂ 11); 2,18 (t, ³J_(H,H) = 5,8 Hz, 1H, CH₂ 4); 2,14-2,10 (m, 1H, CH₂ 11); 1,87-1,78 (m, 1H, CH₂ 4); 1,66-1,41 (m, 6H, CH₂ 2, CH₂ 3 und CH₂ 12); 1,39-1,28 (m, 2H, CH₂ 1); 1,03-1,00 (m, 3H, CH₃); 0,89-0,87 (m, 3H, CH₃)ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 174,6; 172,8; 162,7; 69,5; 69,1; 68,4; 61,0; 59,2; 55,4; 45,4; 40,0; 39,8; 39,0; 38,5; 33,7; 30,8; 29,1; 28,1; 27,6; 24,6; 21,3; 18,9; 10,5 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_6\text{S Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 511,25608; gemessen: 511,25563 ($\Delta m = 0,00045$; relativer Fehler $\Delta m/m = 0,9\text{ppm}$)

Synthese des fluoridlabilen Initiatorguanosisins mit 5'-O-verknüpfter Biotineinheit (51)



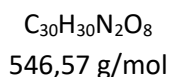
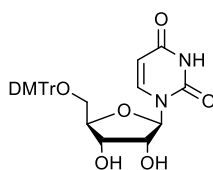
100 mg Biotin-Alkohol **65** (0,51 mmol, 1,0 Eq.) wurden zusammen mit 16 mg Imidazol (0,24 mmol, 1,2 Eq.) in 1,0 mL entgastem DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. 210 μL DIPEA (1,21 mmol, 5,9 Eq.) und 65 μL Dichlordiisopropylsilan (0,36 mmol, 1,8 Eq.) wurden der Lösung hinzugefügt und 1 h bei 0 °C und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf -60 °C gekühlt und eine Lösung aus 137 mg Guanosin (0,49 mmol, 2,4 Eq.) und 32 mg Imidazol (0,48 mmol, 2,4 Eq.) in 2,5 mL entgastem DMF hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde erneut 1 h bei -60 °C und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe gesättigter NaHCO_3 -Lösung beendet und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Es wurde ein NMR vom Rohprodukt aufgenommen.

Ausbeute: Das Rohprodukt konnte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , Rohprodukt): δ = 7,98 (bs, 2H, NH_2); 7,88 (s, 1H, H8); 5,81 (d, $^3J_{(\text{H},\text{H})} = 6,2$ Hz, 1H, 1'H); 4,65 (t, $^3J_{(\text{H},\text{H})} = 5,8$ Hz, 1H, 2'H); 4,51-4,48 (m, 2H, H_a und 2'OH); 4,32-4,28 (m, 3H, H_b , 3'H und 3'OH); 4,11-4,10 (m, 1H, 4'H); 3,88-3,84 (m, 1H, 5'- CH_2); 3,75-3,71 (m, 1H, 5'- CH_2); 3,56-3,54 (m, 8H, CH_2 5, CH_2 6, CH_2 9 und CH_2 10); 3,38-3,35 (m, 6H, CH_2 7, CH_2 8 und CH_2 11); 3,23-3,19 (m, 1H, S-CH); 2,94-2,92 (m, 1H, S- CH_2); 2,74-2,72 (m, 1H, S- CH_2); 2,24-2,20 (m, 2H, CH_2 4); 1,77-1,55 (m, 10H, CH_2 1, CH_2 2, CH_2 3, CH_2 12 und 2x CH_2 -iPr); 1,31-1,29 (m, 3H, CH_3); 1,19 (s, 12H, 4x iPr- CH_3); 1,04-1,03 (m, 3H, CH_3) ppm.

4.4.4 Synthese des DEACM-geschützten Uridin-Phosphoramidits (92)

Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)uridin (90)



Die beschriebene Synthese wurde nach Literaturvorschrift durchgeführt. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[64]

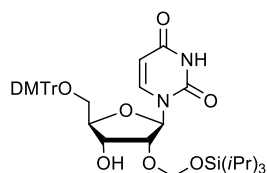
3,00 g kommerziell erhältliches Uridin **89** (12,3 mmol, 1,0 Eq) wurden in 40 mL absolutem Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 4,58 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (13,5 mmol, 1,1 Eq) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 15 min bei 0 °C gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und die gelbe Lösung für weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 mL EtOH beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH₂Cl₂/Et₃N 99:1 → CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Verbindung **90** konnte als hellgelber Feststoff, der unter Vakuum aufschäumte, erhalten werden.

Ausbeute: 6,29 g (11,5 mmol, 94%)

DC (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1): R_f: 0,57

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 11,38 (s, 1H, NH); 7,73 (d, ³J_(H,H) = 8,1 Hz, 1H, H6); 7,38-7,37 (m, 4H, H_{ar} DMTr); 7,26-7,24 (m, 5H, H_{ar} DMTr); 6,91-6,89 (m, 4H, H_{ar} DMTr); 5,76 (d, ³J_(H,H) = 3,4 Hz, 1H, 1'H); 5,53-5,52 (m, 1H, 2'OH); 5,31 (d, ³J_(H,H) = 8,1 Hz, 1H, H5); 5,19-5,17 (m, 1H, 3'OH); 4,12-4,07 (m, 2H, 2'H und 3'H); 3,98-3,95 (m, 1H, 4'H); 3,74 (s, 6H, 2x OCH₃); 3,29-3,21 (m, 2H, 5'-CH₂)ppm.

Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[[triisopropylsilyl]oxy]methyluridin (**91**)



C₄₀H₅₂N₂O₉Si
732,93 g/mol

Die beschriebene Synthese wurde nach Literaturvorschrift durchgeführt. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[64]

1,00 g DMTr-geschütztes Uridin **90** (1,8 mmol, 1,0 Eq) wurden in 6,50 mL 1,2-Dichlorethan gelöst und 1,12 mL DIPEA (6,4 mmol, 3,5 Eq) hinzugegeben. 0,83 g Dibutylzinndichlorid (2,0 mmol, 1,1 Eq) wurde langsam zur Reaktionslösung zugefügt und das Gemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Stunde wurde die Reaktionslösung auf 80 °C erhitzt und 0,25 mL [[Triisopropylsilyl]oxy]methylchlorid (TOM-Cl, 2,2 mmol, 1,2 Eq) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 20 min bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Wasserbadtemperatur 30 °C nicht überstieg. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH/EE 7:3 + 1% Et₃N → CH/EE 3:7). Verbindung **91** wurde als hellgelber Feststoff erhalten.

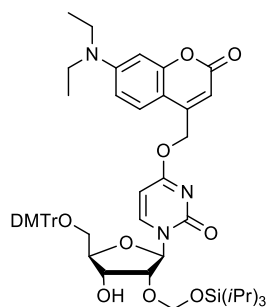
Ausbeute: 716 mg (1,0 mmol, 53%)

DC (CH/EE = 7:3): R_f: 0,60

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11,37 (s, 1H, NH); 7,66 (d, ³J_(H,H) = 8,1 Hz, 1H, H6); 7,39-7,22 (m, 9H, H_{ar} DMTr); 6,90-6,88 (m, 4H, H_{ar} DMTr); 5,91 (d, ³J_(H,H) = 5,4 Hz, 1H, 1'H); 5,42 (d, ³J_(H,H) = 8,1 Hz, 1H, H5); 5,18-5,17 (m, 1H, 3'OH); 4,99-4,91 (m, 2H, O-CH₂-O); 4,31-4,28 (m, 1H, 2'H); 4,15-4,11 (m,

1H, 3'H); 3,98-3,95 (m, 1H, 4'H); 3,74 (s, 6H, 2x OCH₃); 3,26-3,24 (m, 2H, 5'-CH₂); 1,02-0,97 (m, 21H, 3x *i*Pr-TOM)ppm.

Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[[triisopropylsilyl]oxy]methyl}-O⁴-{[7-(diethylamino)-cumarin-4-yl]methyl}uridin (88**)**



C₅₄H₆₇N₃O₁₁Si
962,21 g/mol

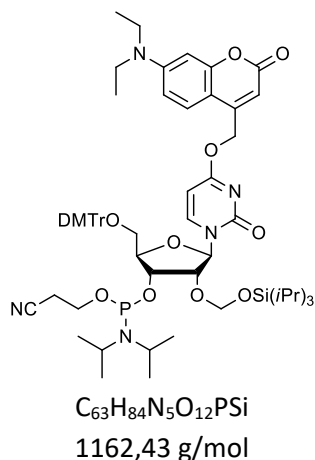
3,0 g **91** (4,1 mmol, 1,0 Eq) wurden in 24,0 mL absolutem THF gelöst und 1,6 g PPh₃ (6,1 mmol, 1,5 Eq) hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf 0 °C gekühlt, bevor 1,2 g DEACM-OH (nach Literaturvorschrift^[390] hergestellt, 4,9 mmol, 1,2 Eq) langsam und unter Lichtausschluss hinzugegeben wurden. Anschließend wurden 1,1 mL DEAD (6,1 mmol, 1,5 Eq) innerhalb von 10 min zugetropft und die Reaktionslösung für 35 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung für weitere 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH/EE 7:3 + 1% Et₃N → CH/EE 3:7). Verbindung **88** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 589 mg (0,6 mmol, 15%)

DC (CH/EE = 3:7): R_f: 0,74

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,91-7,89 (m, 1H, H₆); 7,68-7,66 (m, 1H, DEACM-H5); 7,33-7,21 (m, 9H, H_{ar} DMTr); 6,92-6,89 (m, 5H, 4x H_{ar} DMTr und DEACM-H6); 6,74-6,71 (m, 1H, DEACM-H8); 6,55 (m, 1H, DEACM-H3); 5,94-5,93 (m, 1H, 1'H); 5,63-5,61 (m, 1H, H5); 5,20-5,16 (m, 1H, 3'OH); 5,10-5,07 (m, 2H, O-CH₂-DEACM); 4,97-4,91 (m, 2H, O-CH₂-O); 4,36-4,34 (m, 1H, 2'H); 4,30-4,27 (m, 1H, 3'H); 4,14-4,09 (m, 1H, 4'H); 3,74 (s, 6H, 2x OCH₃); 3,73-3,68 (m, 2H, 5'-CH₂); 3,47-3,42 (m, 4H, 2x CH₂); 1,16-1,13 (m, 6H, 2x CH₃); 0,98-0,95 (m, 21H, 3x *i*Pr-TOM)ppm.

Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-[[triisopropylsilyl]oxy]methyl}-O⁴-[[7-(diethylamino)-cumarin-4-yl]methyl]uridin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (92**)**



500 mg von Verbindung **88** (0,52 mmol, 1,0 Eq) wurden in 14 mL absolutem CH_2Cl_2 gelöst und 317 μ L DIPEA (1,82 mmol, 3,5 Eq) hinzugegeben. Nachdem 232 mL 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorphosphin (1,04 mmol, 2,0 Eq) zugegeben wurden, wurde das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Extraktion wurde die organische Phase durch Zugabe von 50 mL CH_2Cl_2 vergrößert und mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Lösungsmitteln der Reinheitsstufe p.a. aufgereinigt (SiO_2 , CH/Aceton/ Et_3N 79:20:1 \rightarrow CH/Aceton 2:1). Phosphoramidit **92** wurde als hellgelber Schaum erhalten, der abschließend 16 h im Hochvakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 216 mg (0,18 mmol, 36%)

DC (CH/Aceton = 2:1): R_f : 0,42

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7,95-7,84 (m, 1H, H6); 7,68-7,65 (m, 1H, DEACM-H5); 7,39-7,37 (m, 2H, H_{ar} DMTr); 7,33-7,30 (m, 2H, H_{ar} DMTr); 7,26-7,24 (m, 5H, H_{ar} DMTr); 6,91-6,88 (m, 4H, H_{ar} DMTr); 6,74-6,71 (m, 1H, DEACM-H6); 6,55 (m, 1H, DEACM-H8); 6,00-5,92 (m, 1H, 1'H); 5,69-5,57 (m, 1H, H5); 5,54-5,51 (m, 1H, DEACM-H3); 5,10-5,08 (m, 2H, O-CH₂-DEACM); 4,99-4,97 (m, 1H, O-CH₂-O); 4,93-4,90 (m, 1H, O-CH₂-O); 4,59-4,45 (m, 1H, 2'H); 4,35-4,31 (m, 1H, 3'H); 4,26-4,20 (m, 1H, 4'H); 4,12-4,02 (m, 2H, 2x H-*i*Pr); 3,92-3,64 (m, 10H, 2x OCH₃ und CH₂-CH₂-CN); 3,58-3,52 (m, 2H, 5'-CH₂); 3,47-3,42 (m, 4H, 2x CH₂-DEACM); 2,77-2,66 (m, 3H, 3x H-*i*Pr₃-TOM); 1,19-1,09 (m, 18H, 2x CH₃-DEACM und 2x *i*Pr); 0,98-0,94 (m, 18H, 3x *i*Pr-TOM)ppm.

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ = 149,95; 149,50ppm.

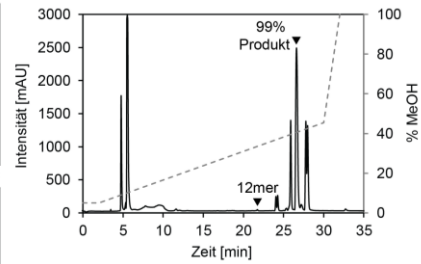
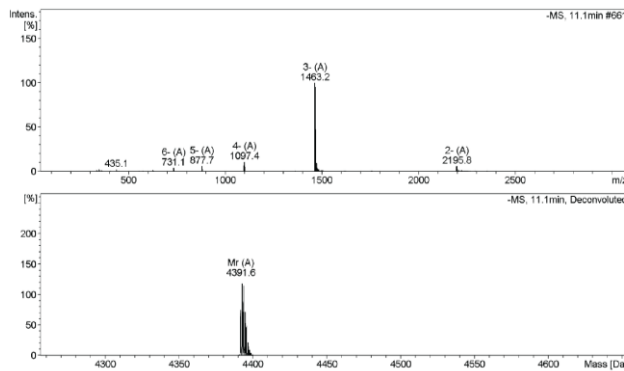
MALDI-MS: m/z berechnet für $C_{63}H_{84}N_5O_{12}PSi^+$ [M^+] 1161,5623; gemessen: 1161,3658 und m/z berechnet für $C_{63}H_{84}N_5O_{12}PSi Na^+$ [$M+Na^+$] 1184,5516; gemessen: 1184,3547

5 Anhang

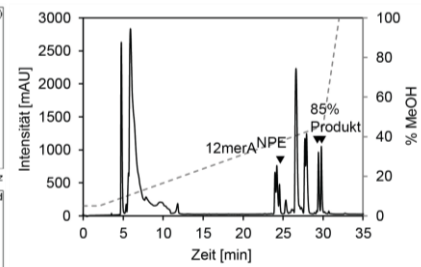
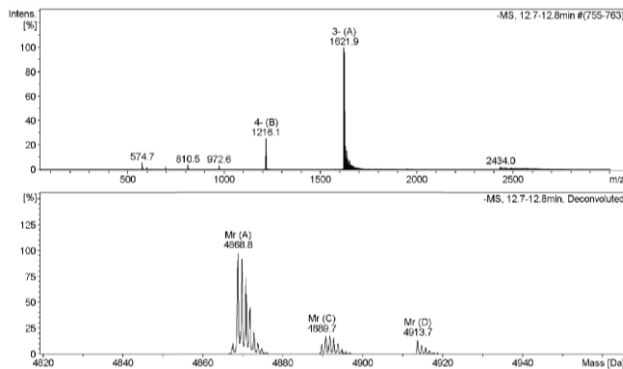
5.1 Zusätzliche Spektren

5.1.1 Spektren der enzymatischen 3'-Verlängerung mit *T4* RNA Ligase 1

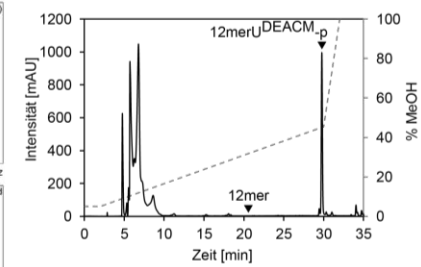
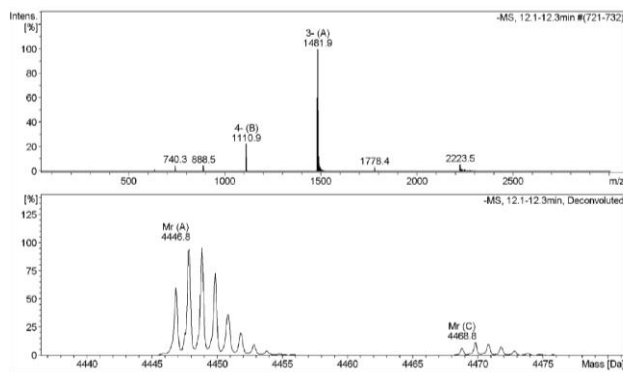
12merA^{NPE}-p



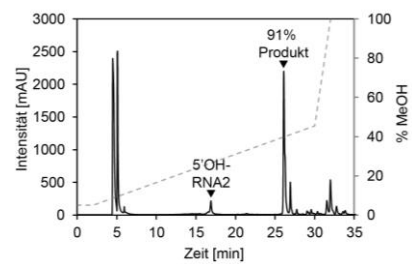
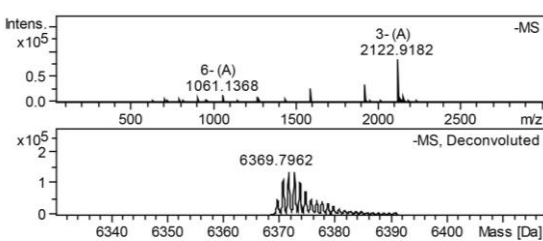
12merA^{NPE}A^{NPE}-p

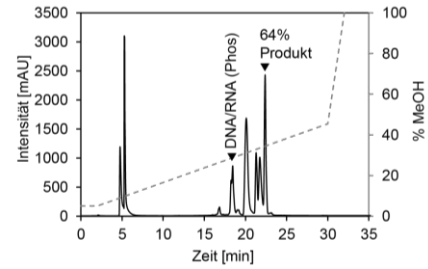
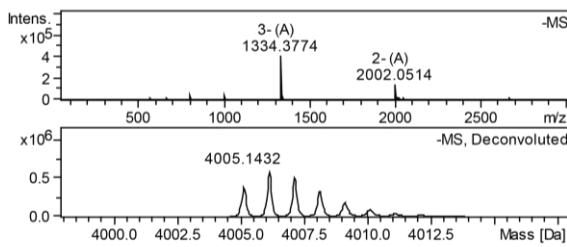
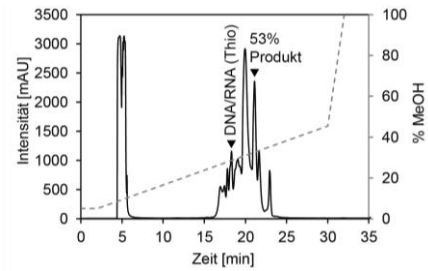
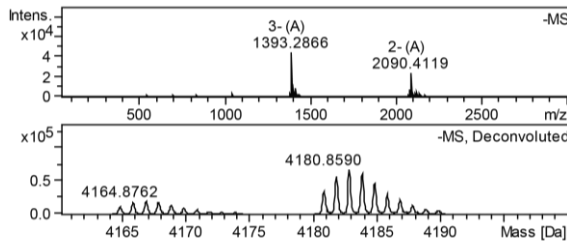
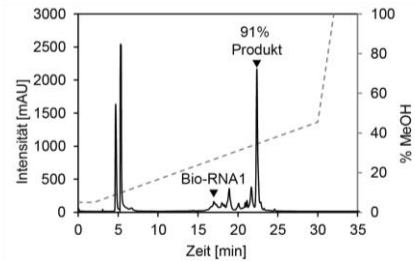
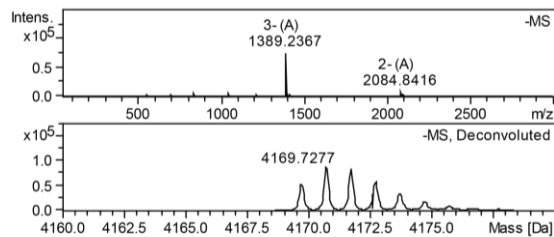
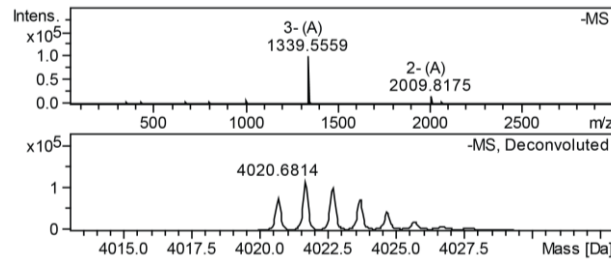
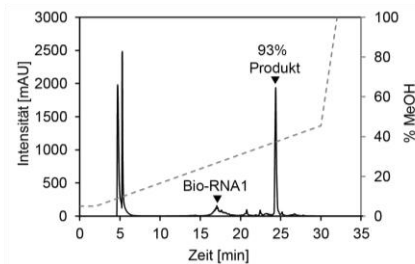
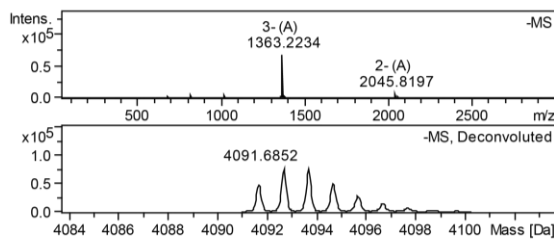
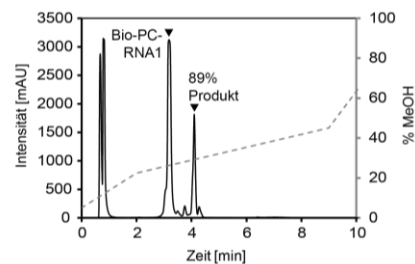
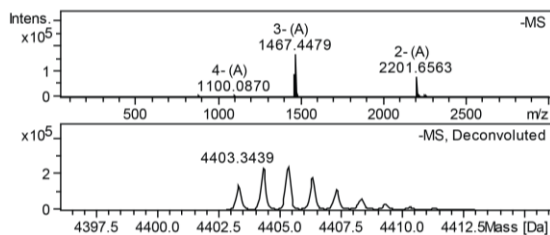


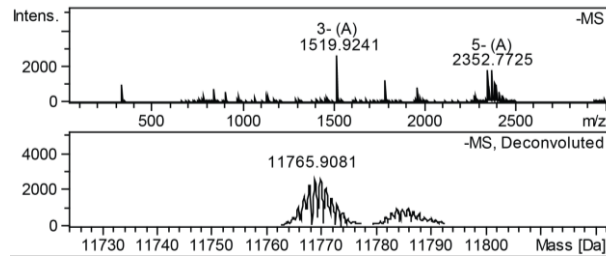
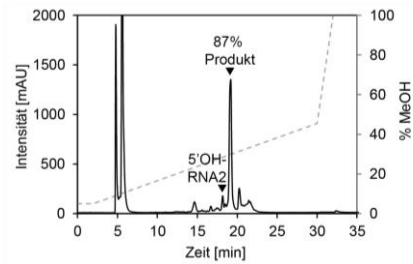
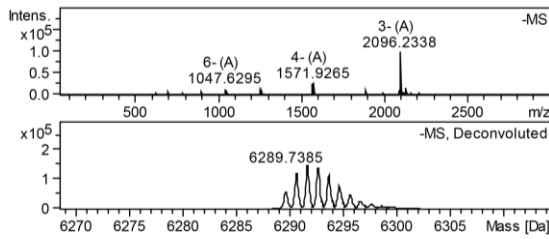
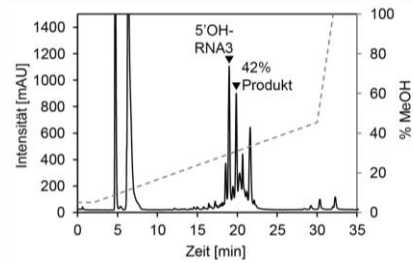
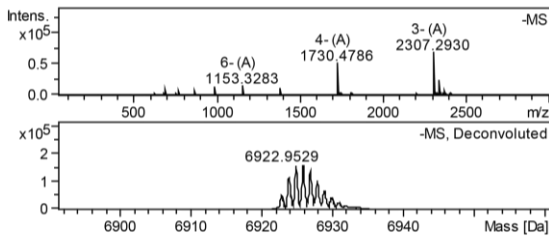
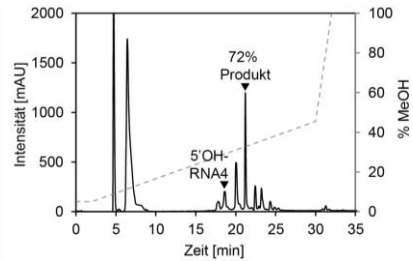
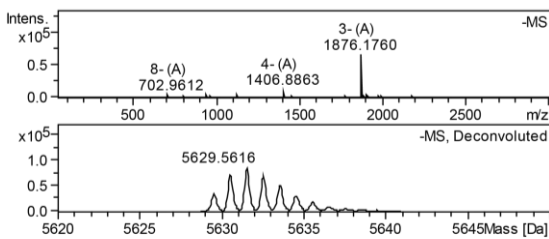
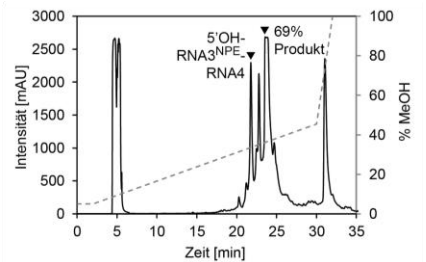
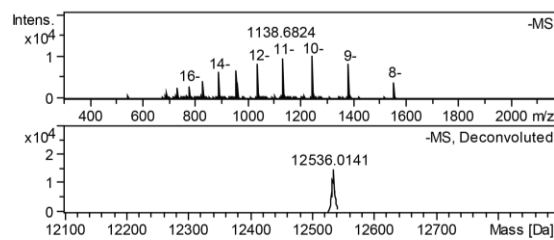
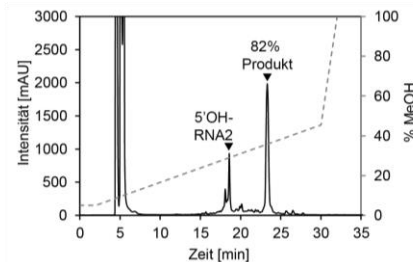
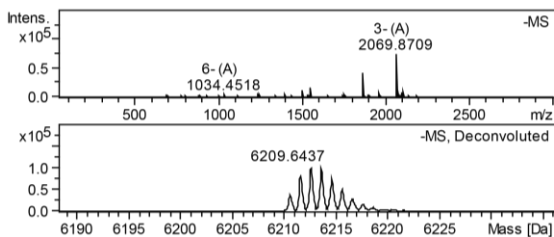
12merU^{DEACM}-p



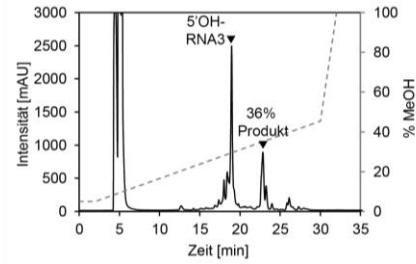
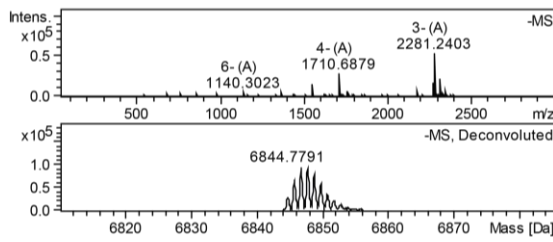
RNA2U^{DEACM}-p



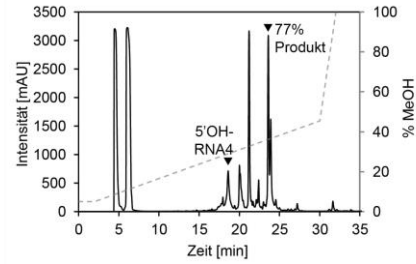
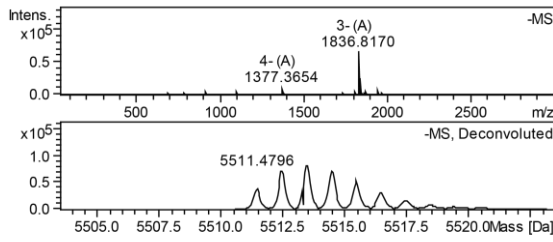
DNA/RNA-C^{NPE}-p (Phos)**DNA/RNA-C^{NPE}-p (Thio)****Bio-RNA1-C^{NPE}-p****Bio-RNA1-C^{NPE}-p + hv****Bio-RNA1-(mAzo)-p****Bio-PC-RNA1-(mAzo)-p**

Bio-34mer-(mAzo)-p**RNA2-U^{NPE}-p****RNA3-C^{NPE}-p****RNA4-G^{NPE}-p****RNA3^{NPE}-RNA4^{NPE}-p****RNA2-(mAzo)-p**

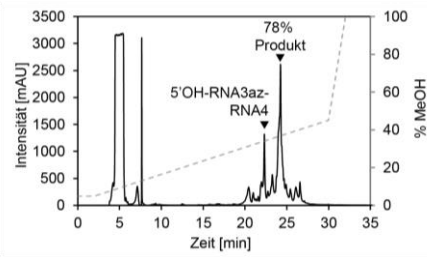
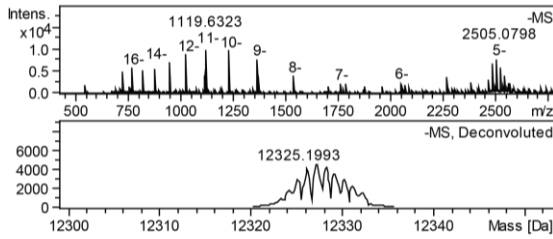
RNA3-(mAzO)-p



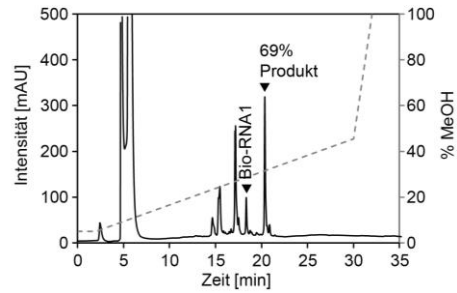
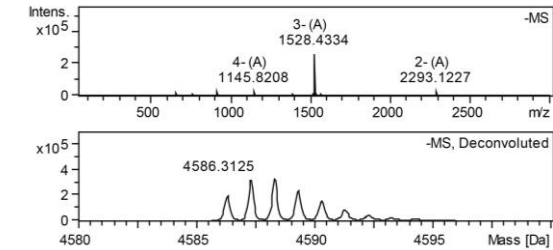
RNA4-(mAzO)-p



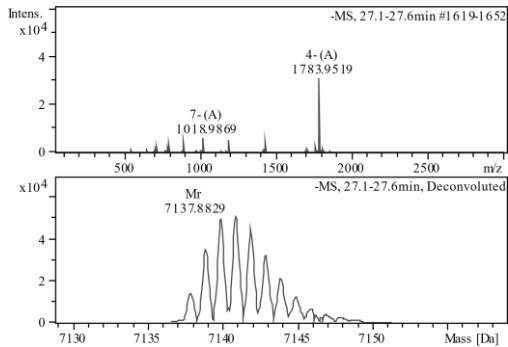
RNA3az-RNA4az-p



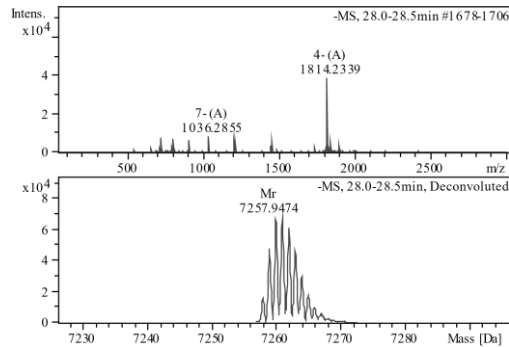
Bio-RNA1-Dinuk1-p



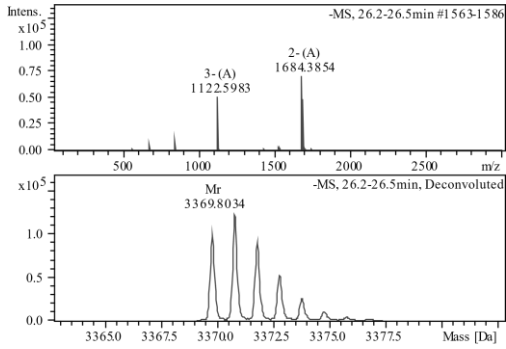
22mer_{NPP}-p



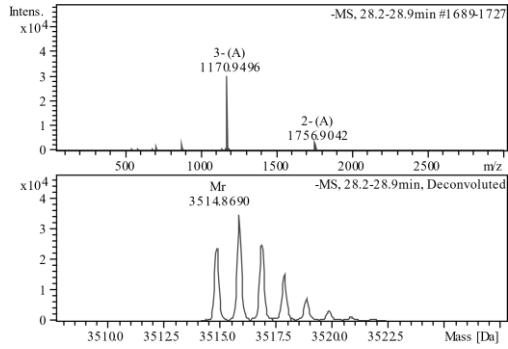
22mer_{DEACM}-p



10mer_{NPP}-p

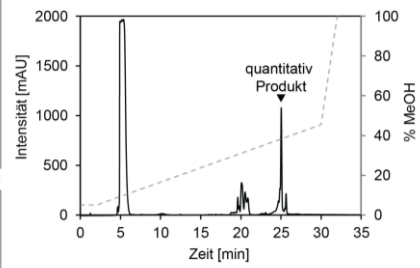
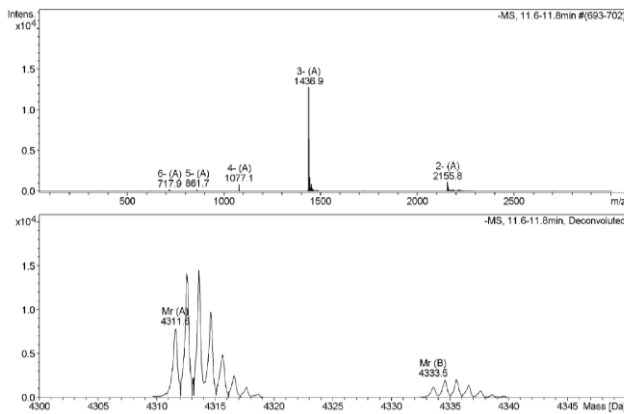


10mer_{DEACM}-p

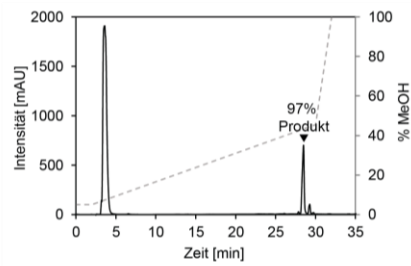
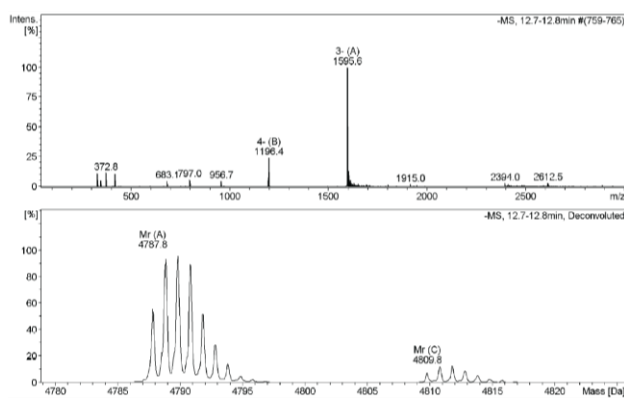


5.1.2 Spektren der enzymatischen 3'-Dephosphorylierung mit rSAP

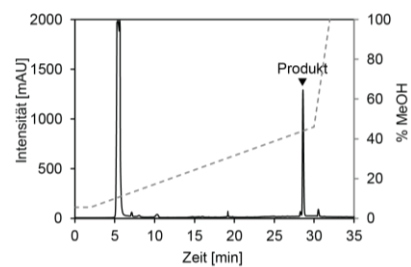
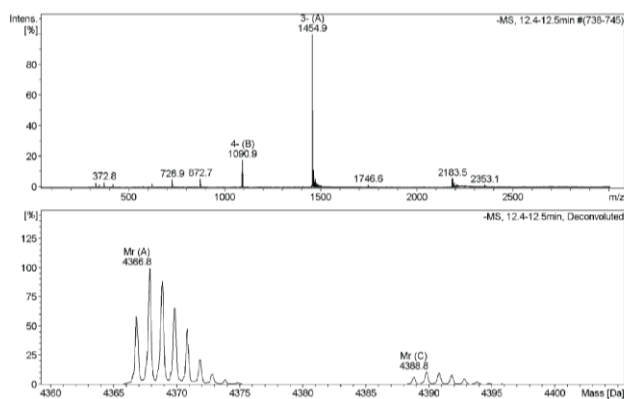
12mer_A^{NPE}

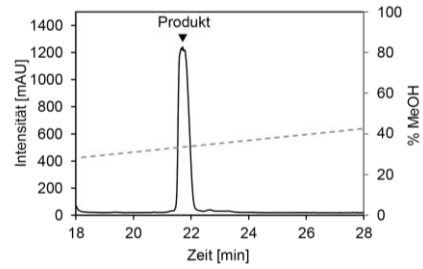
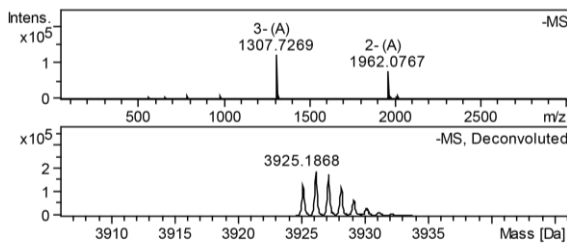
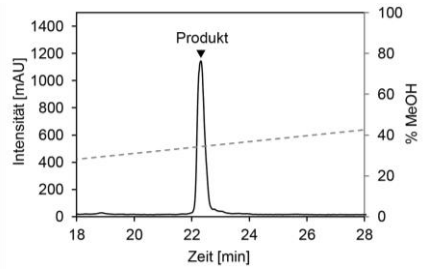
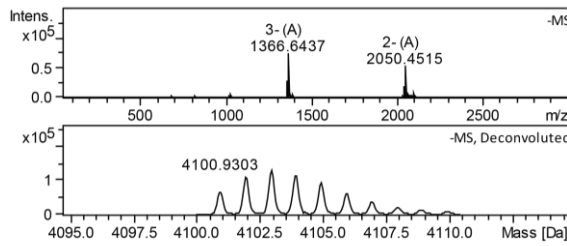
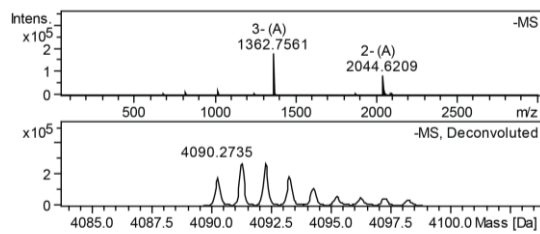
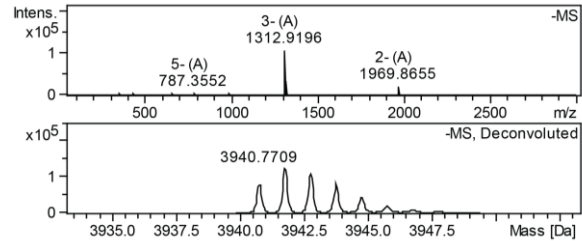
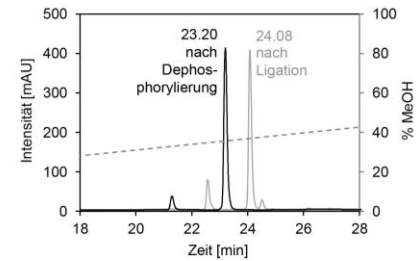
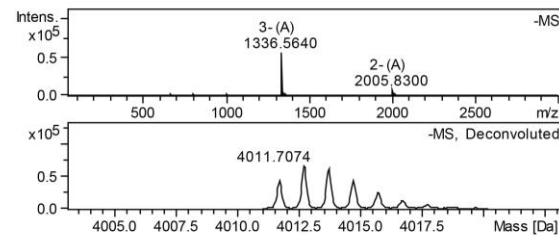
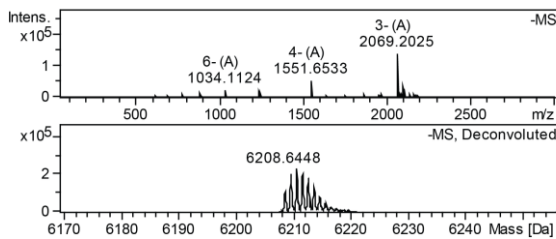
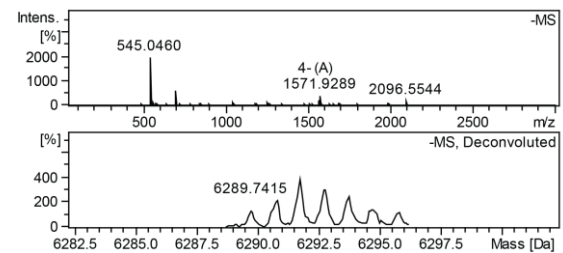
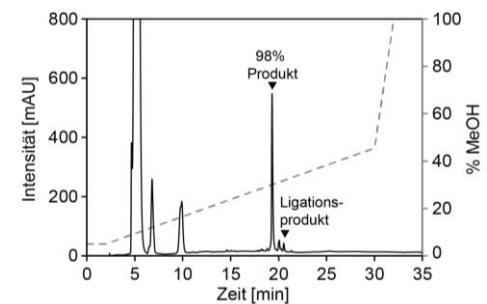
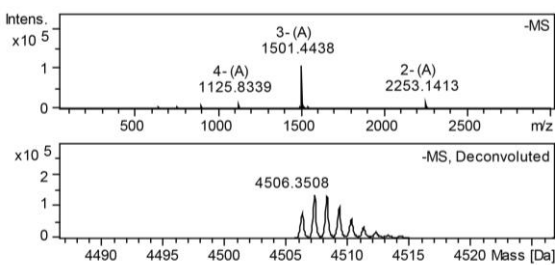


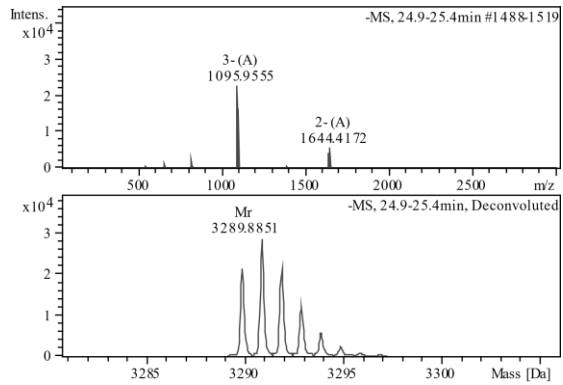
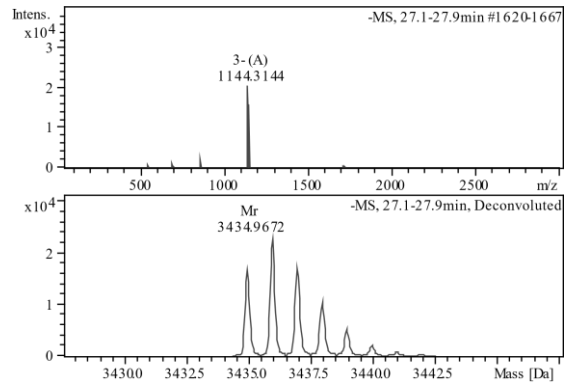
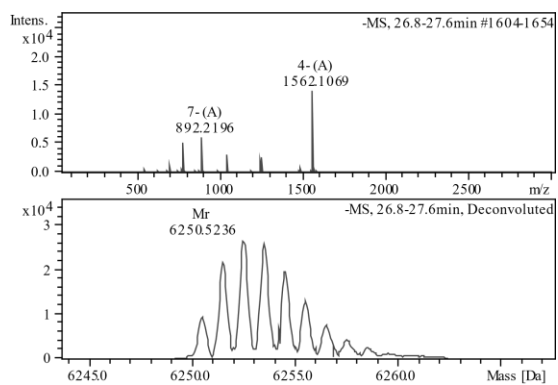
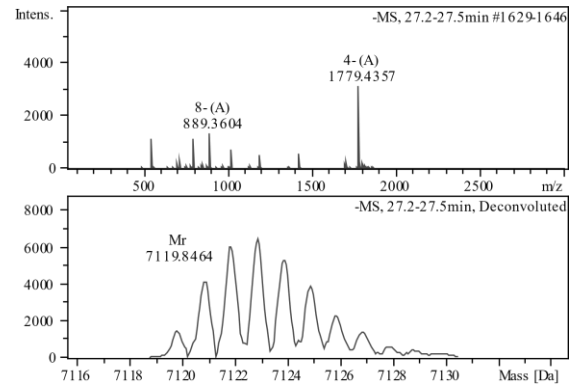
12mer_A^{NPE}A^{NPE}



12mer_U^{DEACM}



DNA/RNA-C^{NPE} (Phos)**DNA/RNA-C^{NPE} (Thio)****Bio-RNA1-C^{NPE}****Bio-RNA1-C^{NPE} +hv****Bio-RNA1-mAzo****RNA2-U^{NPE}****RNA2-U^{DEACM}****Bio-RNA1-Dinuk**

10mer_{NPP}**10mer_{DEACM}****5.1.3 Spektren der enzymatischen Zyklisierung****circ-20mer****circ-22mer_{NPP}**

5.1.4 NMR-Spektren

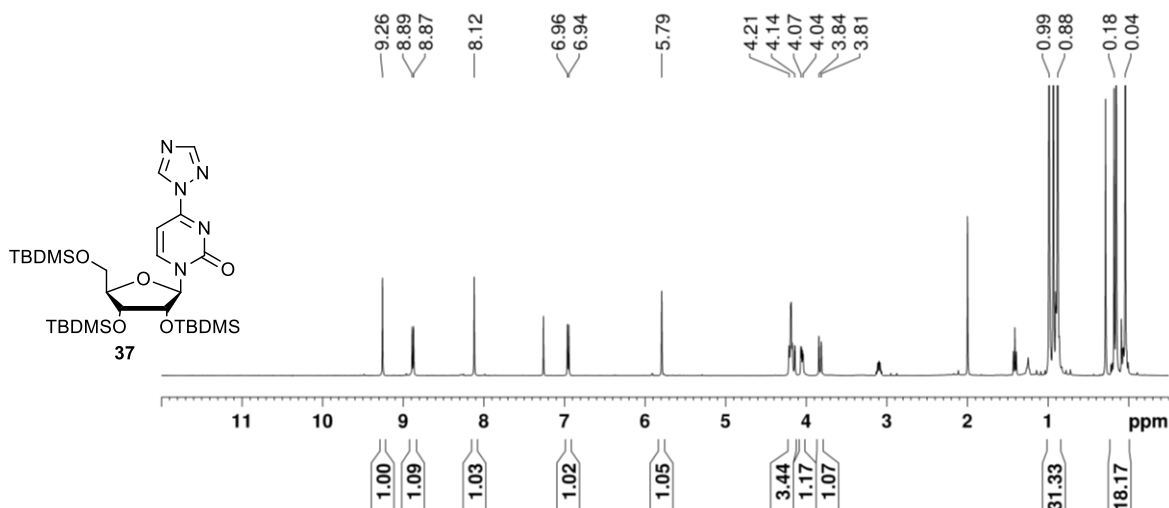


Abb. S1: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **37** aufgenommen in CDCl_3 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

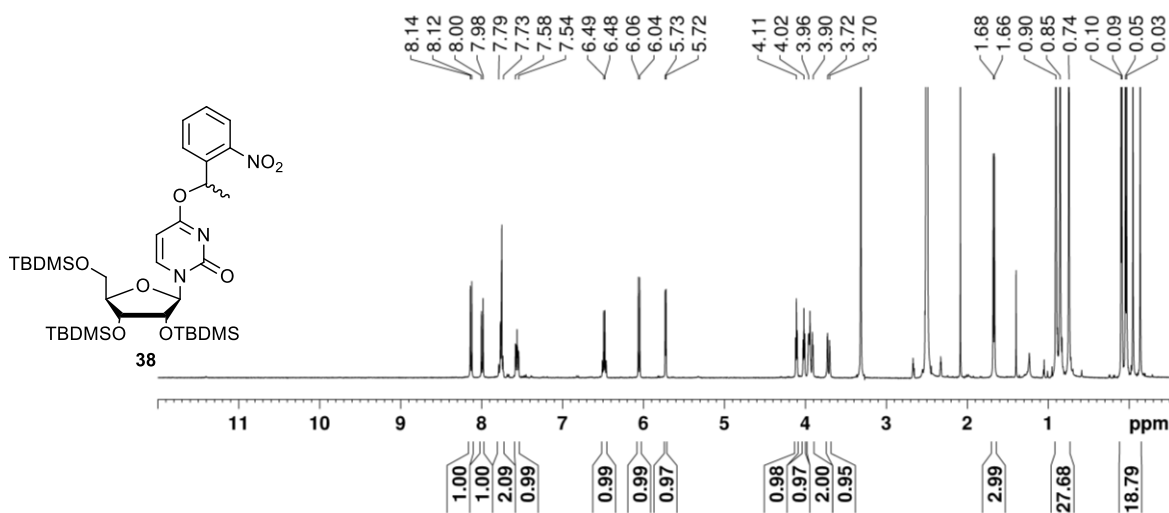


Abb. S2: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **38** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

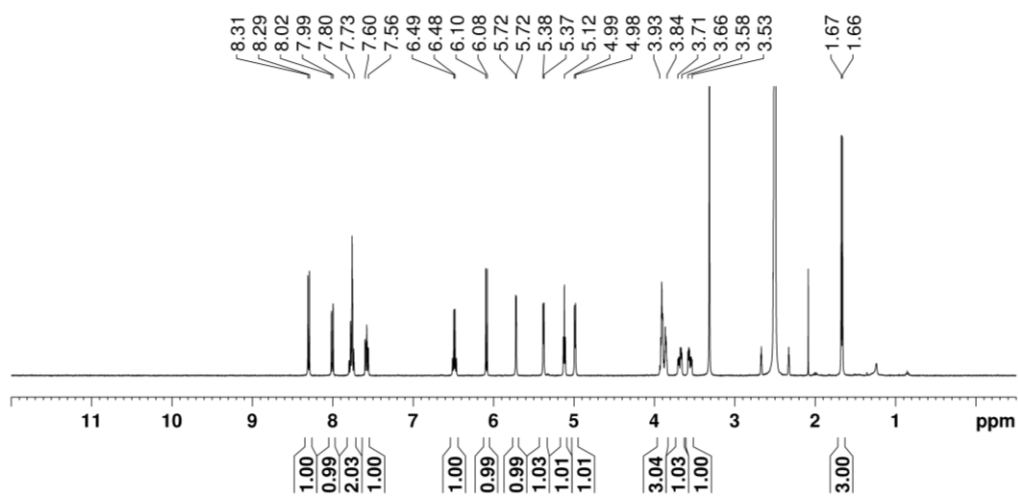


Abb. S3: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **39** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

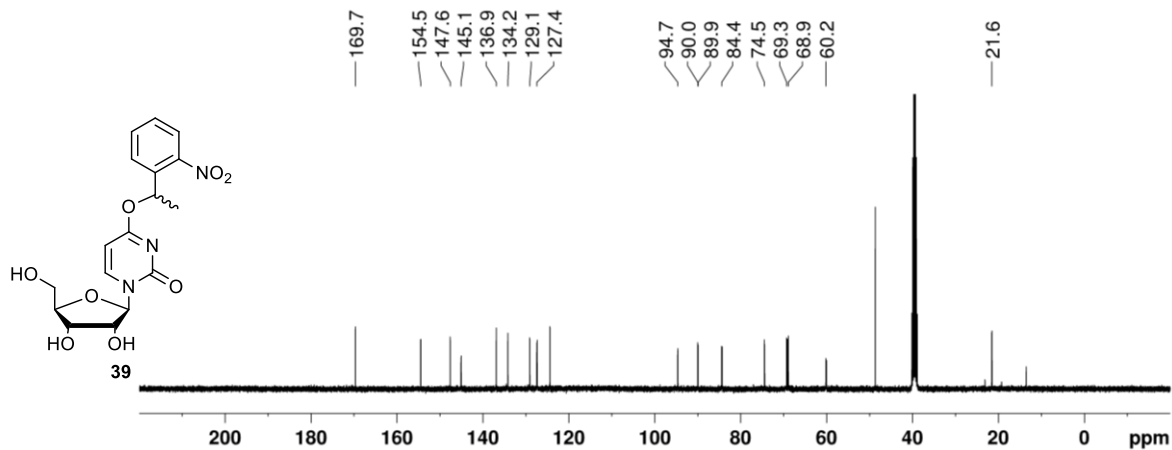


Abb. S4: ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung 39 aufgenommen in DMSO-d₆ (101 MHz) an einem Bruker AV400 Spektrometer.

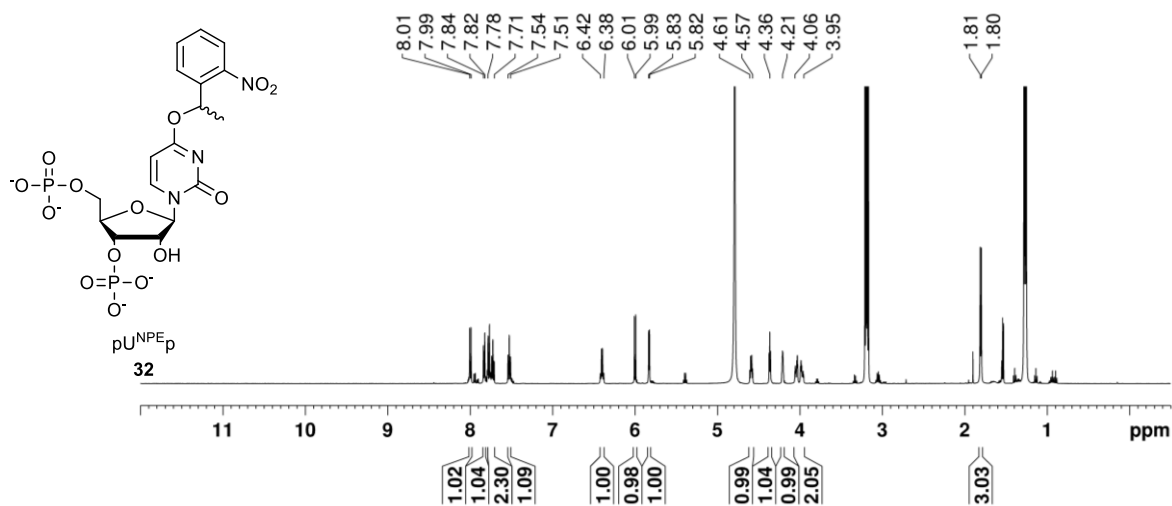


Abb. S5: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung 32 aufgenommen in D₂O (500 MHz) an einem Bruker AV500 Spektrometer.

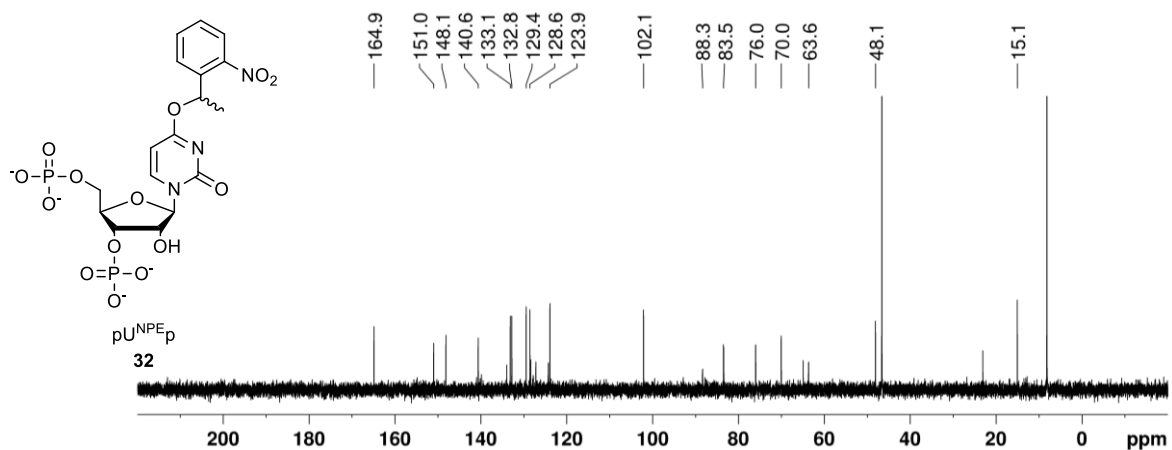


Abb. S6: ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung 32 aufgenommen in D₂O (126 MHz) an einem Bruker AV500 Spektrometer.

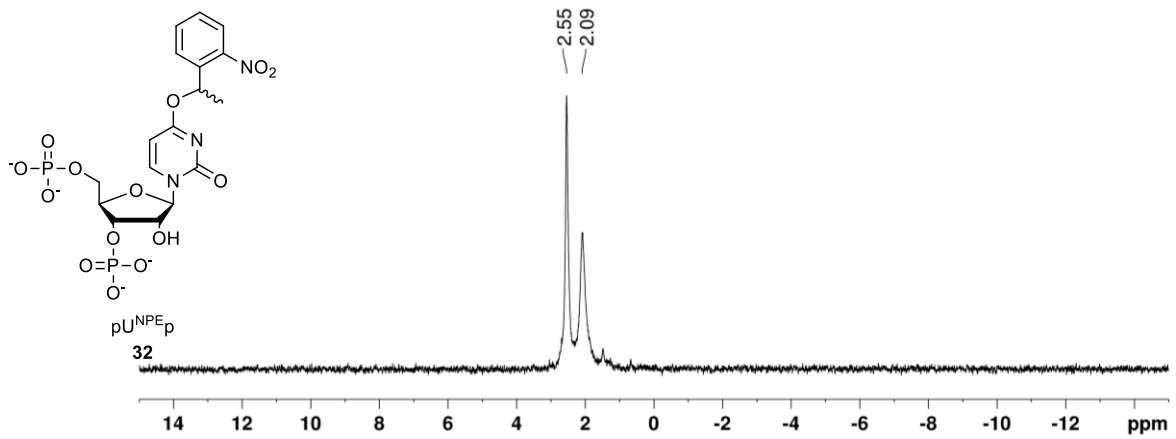


Abb. S7: ³¹P-NMR-Spektrum von Verbindung **32** aufgenommen in D₂O (202 MHz) an einem Bruker AV500 Spektrometer.

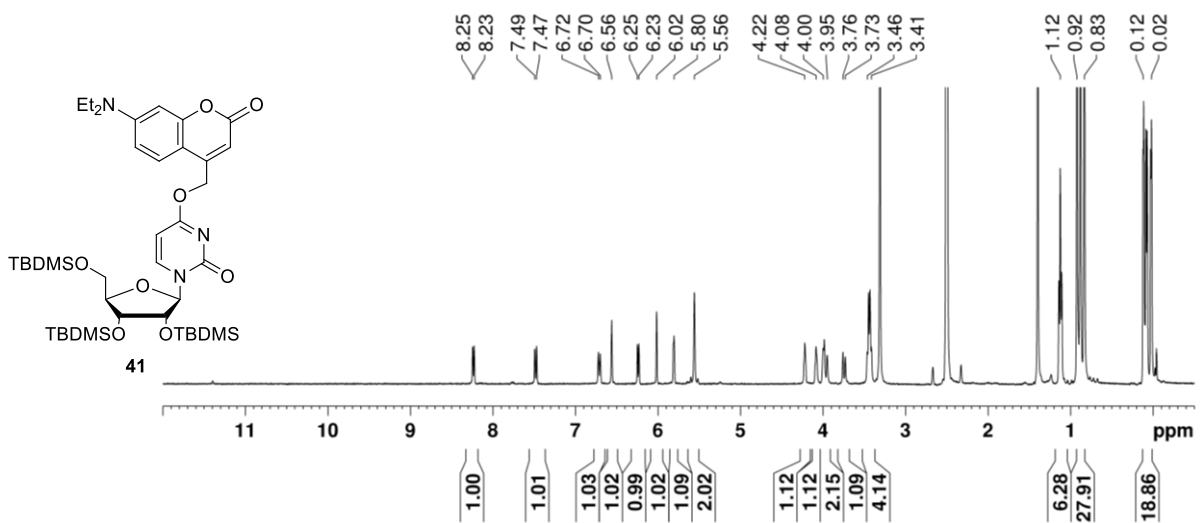


Abb. S8: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **41** aufgenommen in DMSO-d₆ (400 MHz) an einem Bruker AV400 Spektrometer.

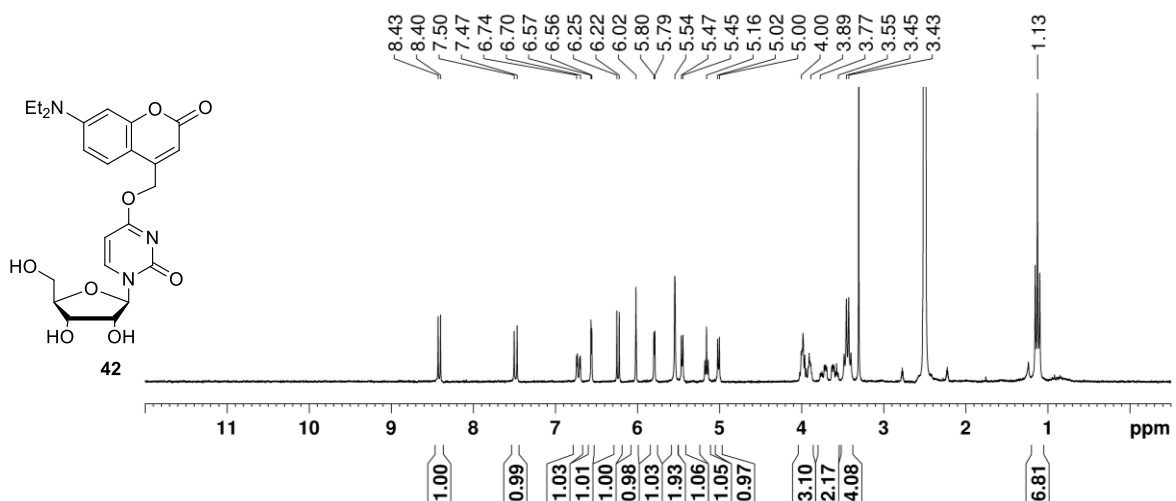


Abb. S9: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **42** aufgenommen in DMSO-d₆ (250 MHz) an einem Bruker DPX250 Spektrometer.

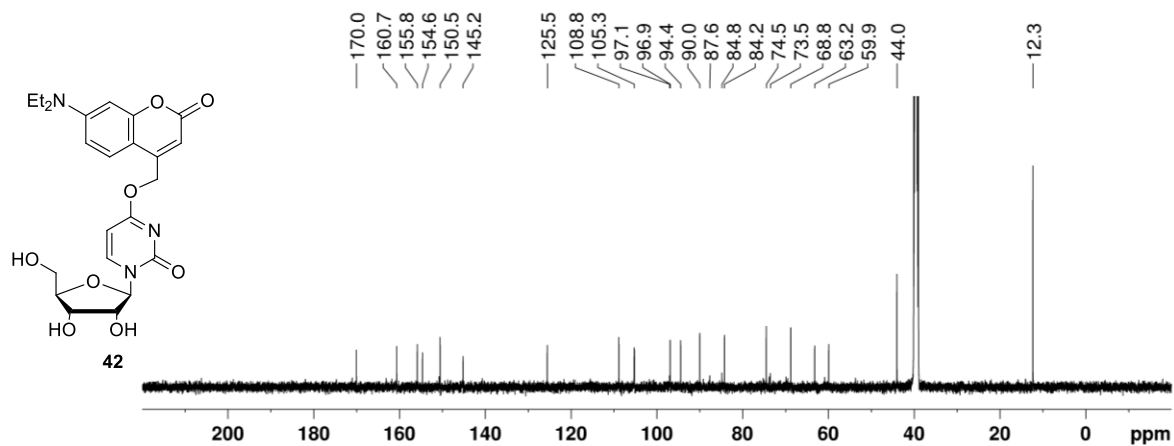


Abb. S10: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **42** aufgenommen in DMSO-d_6 (126 MHz) an einem *Bruker AV500* Spektrometer.

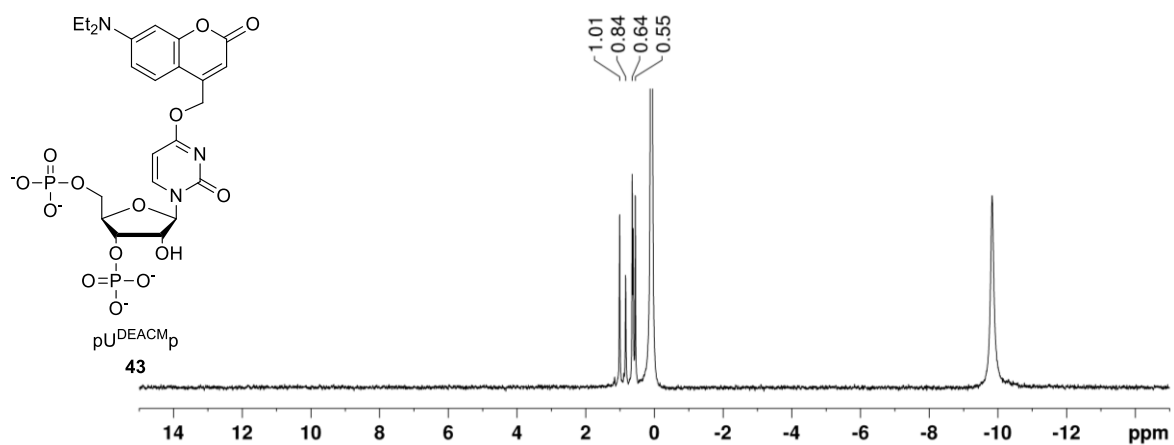


Abb. S11: ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **43** aufgenommen in D_2O (202 MHz) an einem *Bruker AV500* Spektrometer.

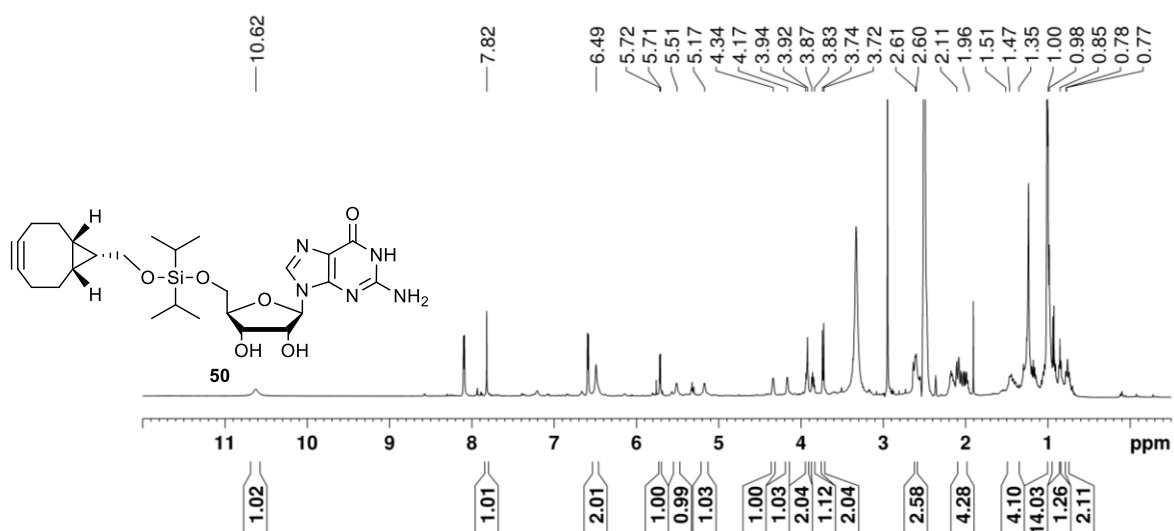


Abb. S12: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **50** aufgenommen in DMSO-d_6 (500 MHz) an einem *Bruker AV500* Spektrometer.

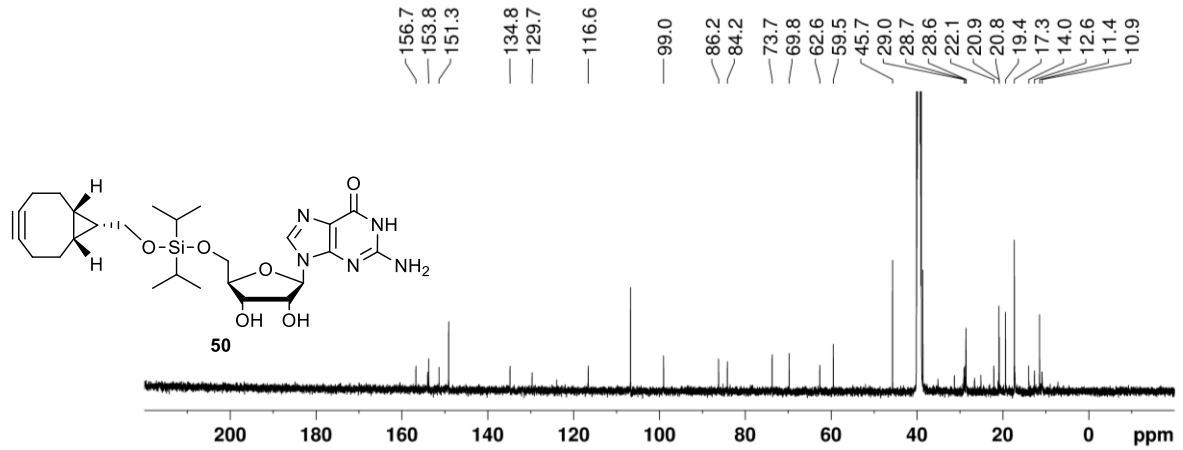


Abb. S13: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **50** aufgenommen in DMSO-d_6 (126 MHz) an einem *Bruker AV500* Spektrometer.

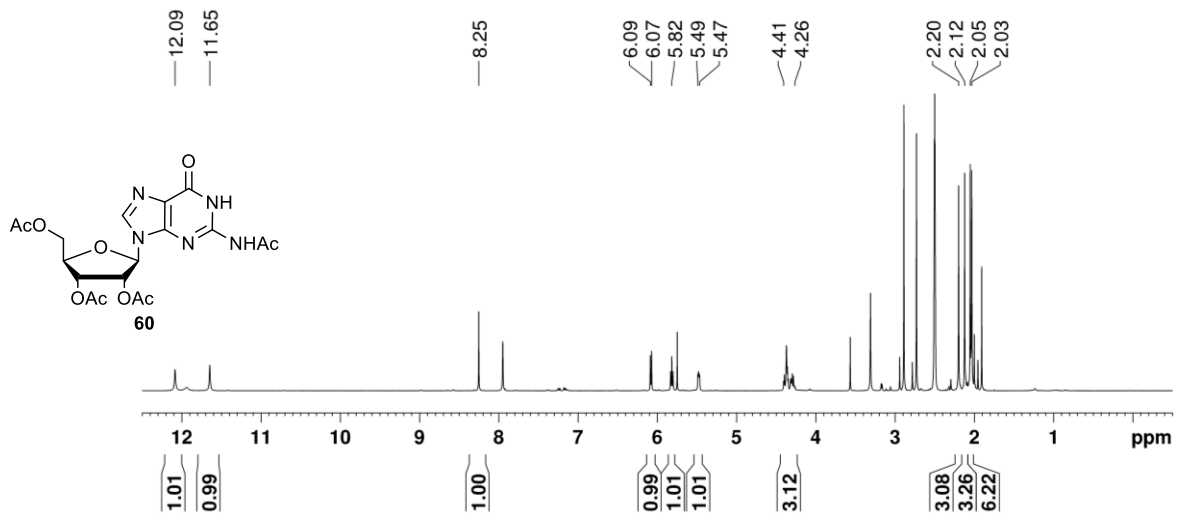


Abb. S14: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **60** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

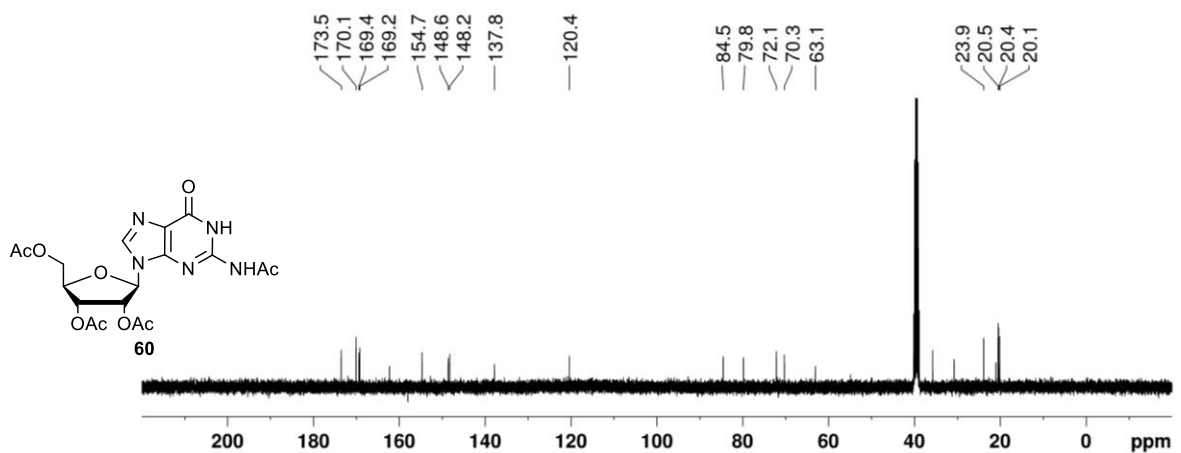


Abb. S15: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **60** aufgenommen in DMSO-d_6 (101 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

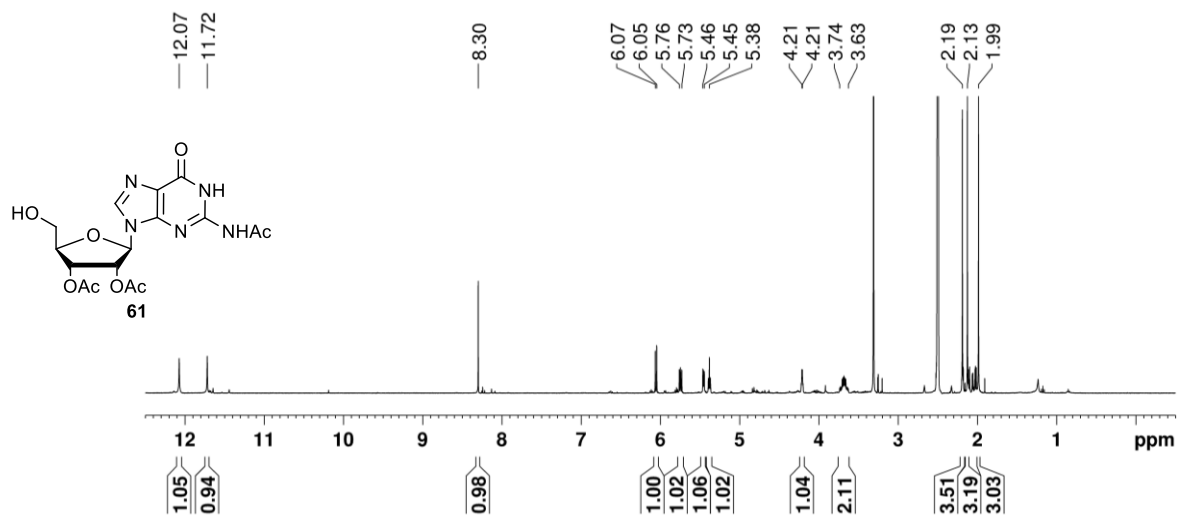


Abb. S16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **61** aufgenommen in DMSO- d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

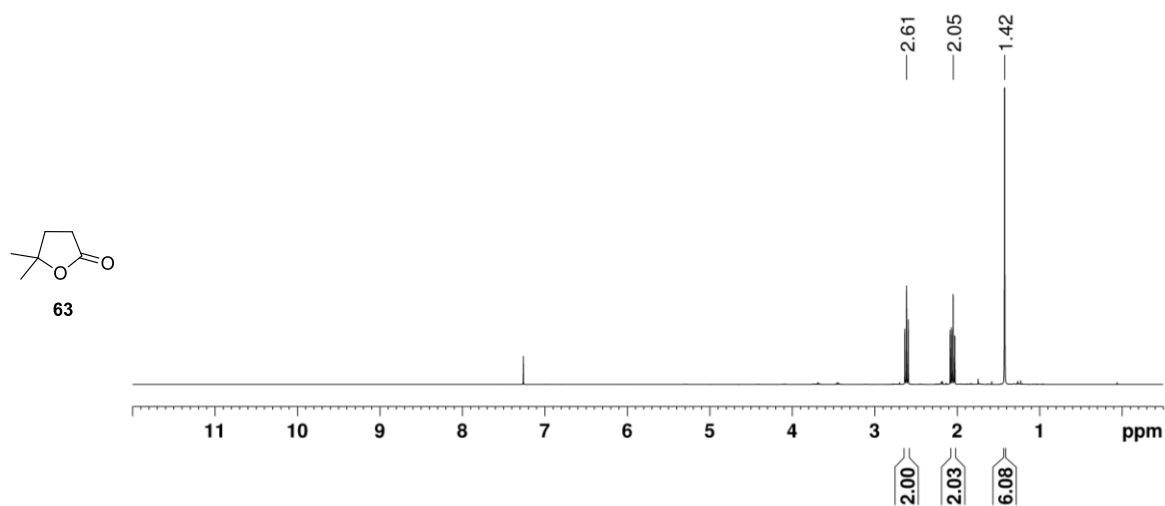


Abb. S17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **63** aufgenommen in CDCl_3 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

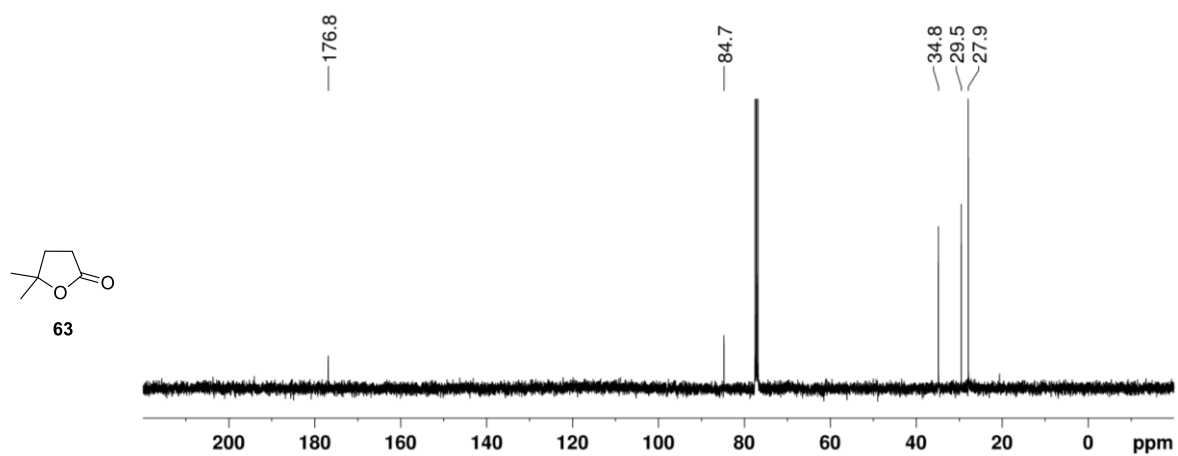


Abb. S18: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **63** aufgenommen in CDCl_3 (101 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

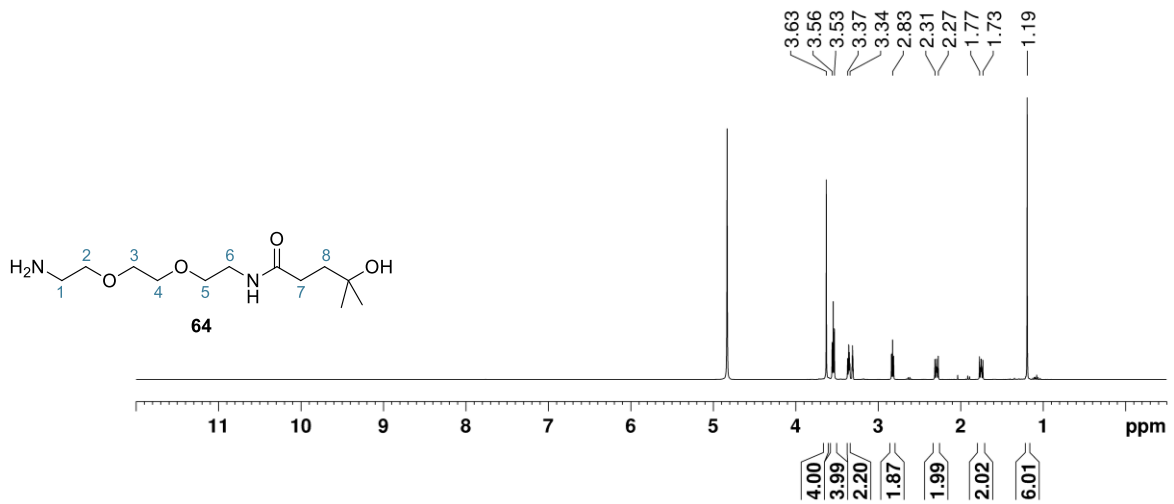


Abb. S19: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **64** aufgenommen in CD_3OD (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

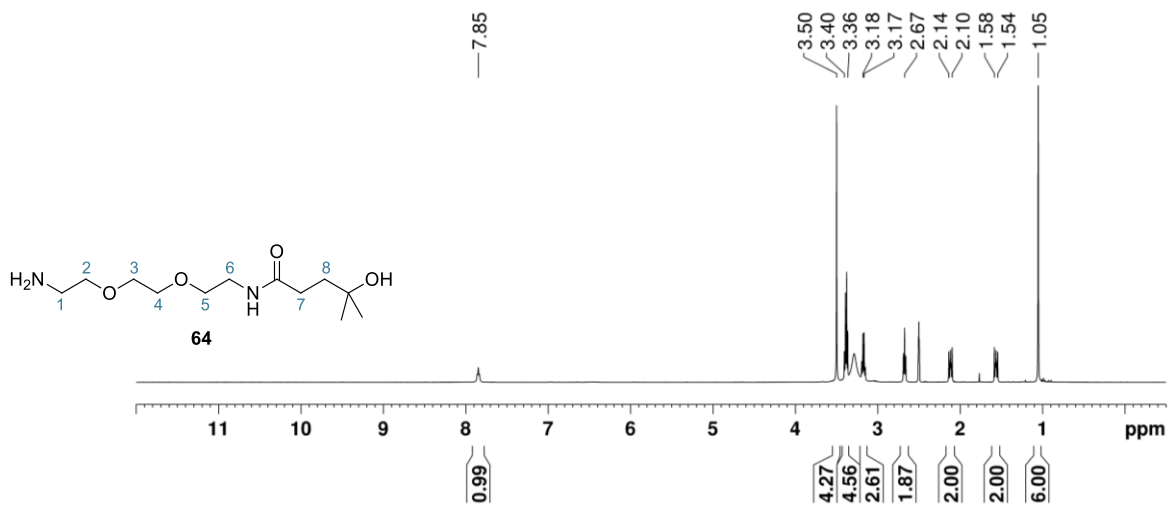


Abb. S20: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **64** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

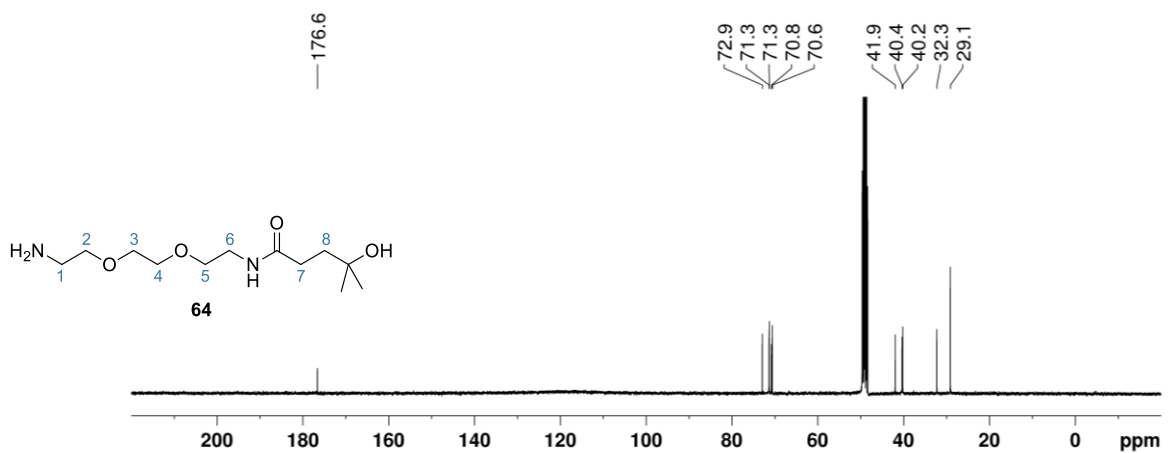


Abb. S21: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **64** aufgenommen in CD_3OD (101 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

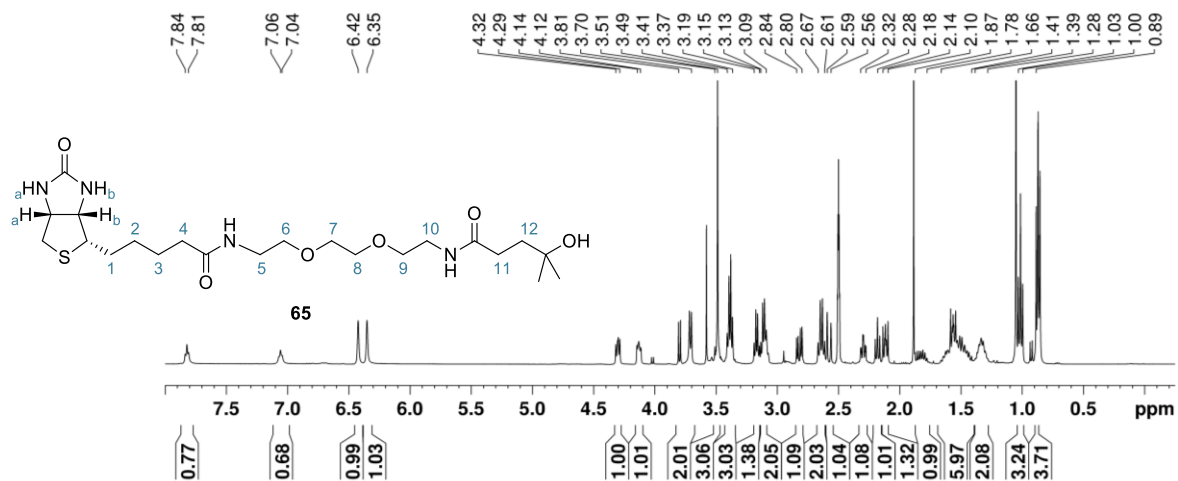


Abb. S22: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **65** aufgenommen in DMSO-d₆ (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

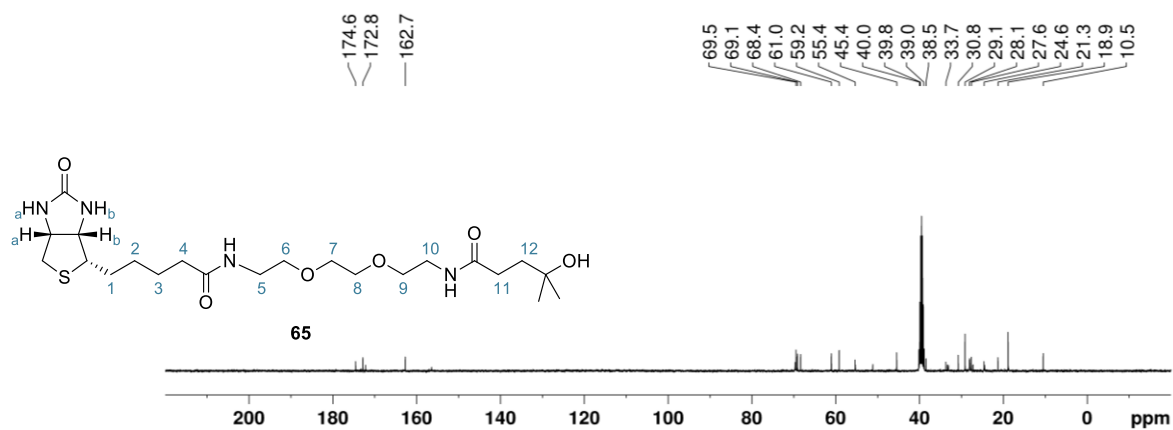


Abb. S23: ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung **65** aufgenommen in DMSO-d₆ (101 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

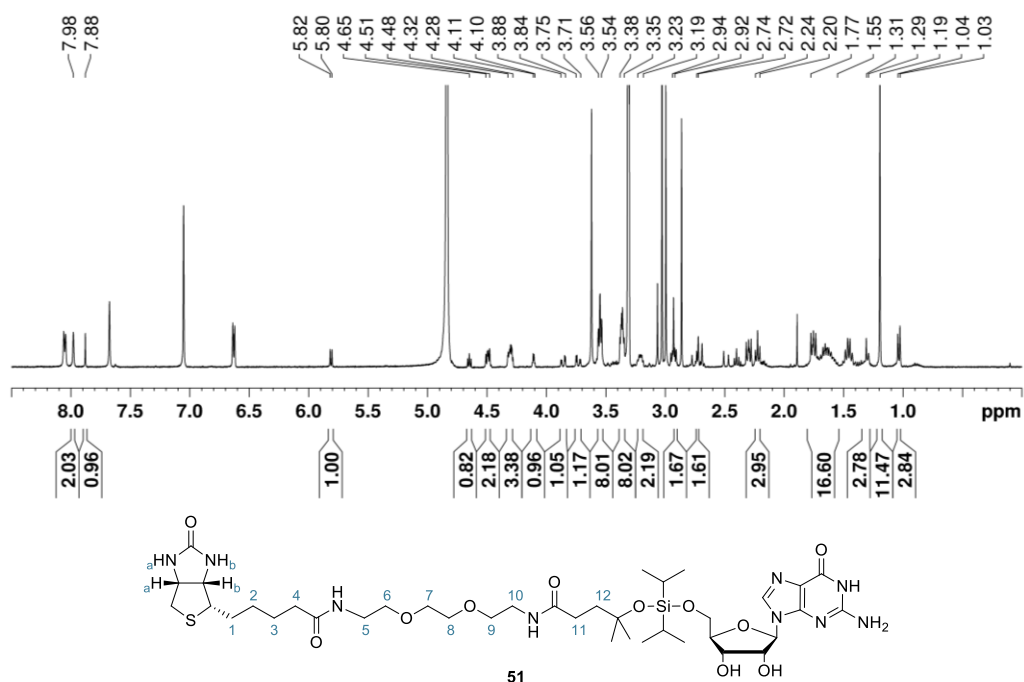


Abb. S24: ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes **51** aufgenommen in CD₃OD (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

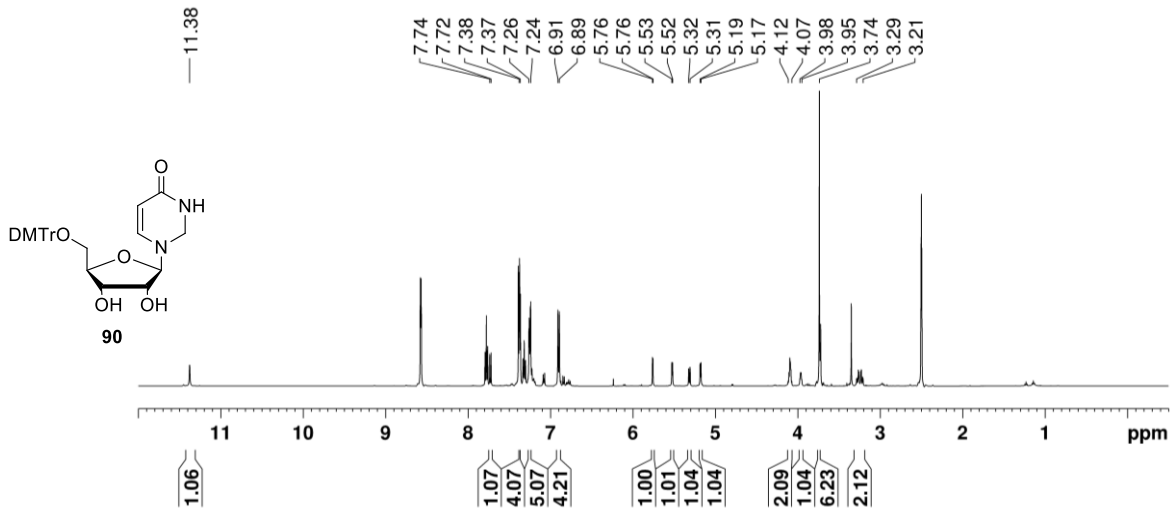


Abb. S25: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **90** aufgenommen in DMSO-d_6 (500 MHz) an einem *Bruker AV500* Spektrometer.

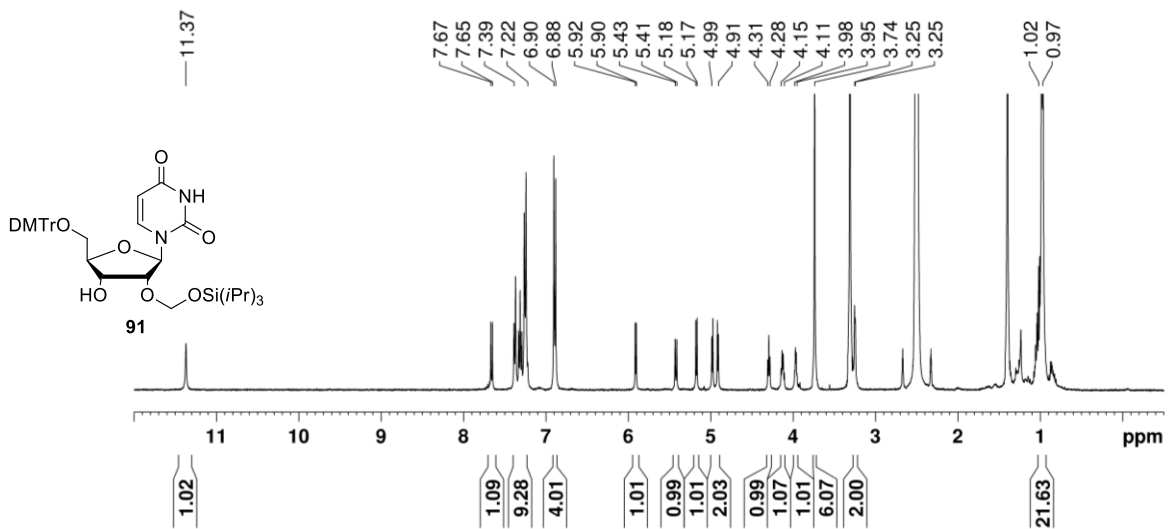


Abb. S26: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **91** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

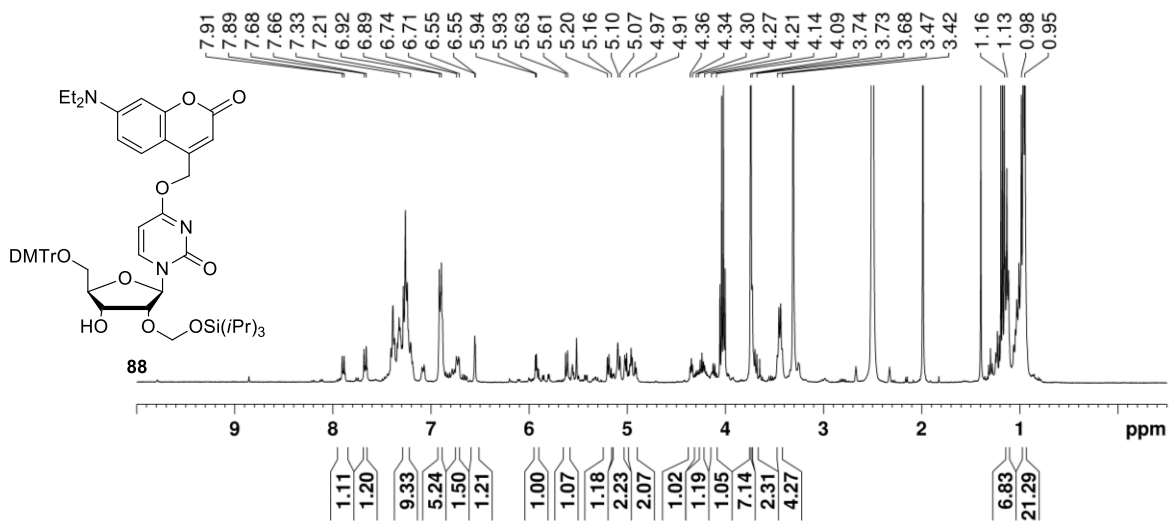


Abb. S27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **88** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

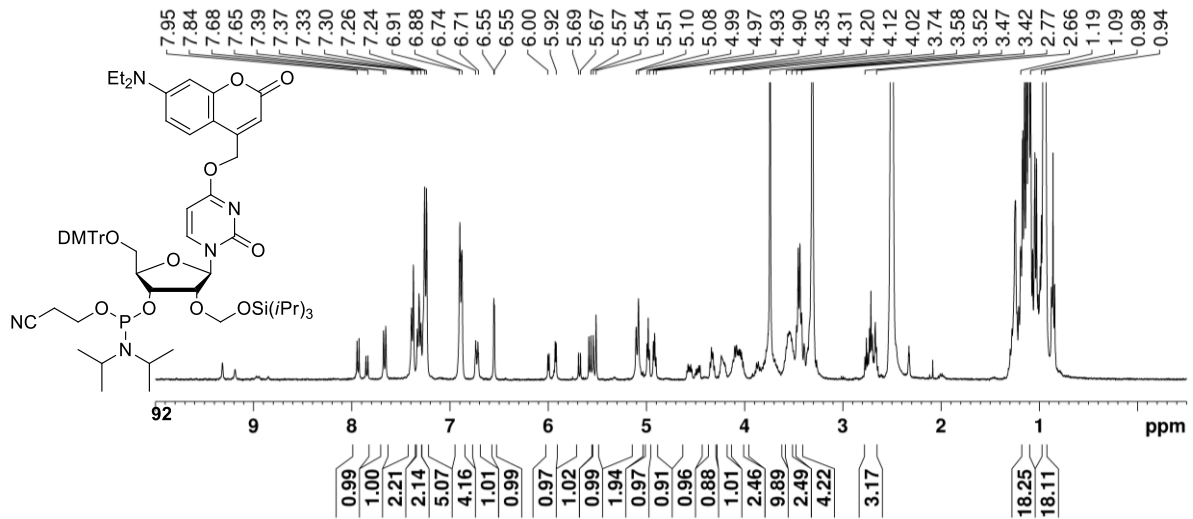


Abb. S28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **92** aufgenommen in DMSO-d_6 (400 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

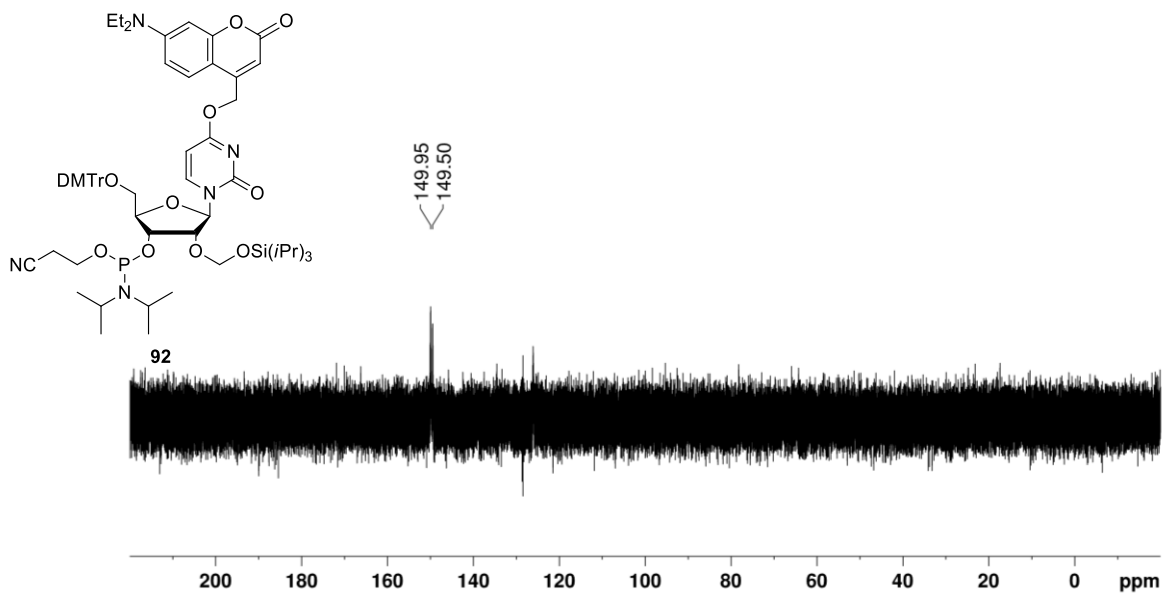


Abb. S29: $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **92** aufgenommen in DMSO-d_6 (162 MHz) an einem *Bruker AV400* Spektrometer.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional	ε	molekularer Extinktionskoeffizient
3D	dreidimensional	eq.	Äquivalent
A	Adenin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
abs.	absolut	ESI	Elektronensprayionisation
Ac	Acetyl	et al.	<i>et alii</i>
AcOH	Essigsäure	EtOAc	Essigsäureethylester
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat	EtOH	Ethanol
analyt.	analytisch	3'-Ex	<i>3'-extension</i> (3'-Verlängerung)
APS	Ammoniumpersulfat	FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
H_{ar}	aromatische Protonen	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	G	Guanin
aq.	<i>aqueous</i>	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Azo	Azobenzol	G4	G-Quadruplex
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i> (8-Brom-7-hydroxychinolin-2-yl)methyl	HFIP	Hexafluorisopropanol
BODIPY	Borondipyromethen, IUPAC: 4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-5-indacen	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
BTT	5-(Benzylthio)-1H-tetrazol	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Bz	Benzyl	HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
C	Cytosin	HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
c	Konzentration	iPrPac	<i>para</i> -Isopropylphenoxyacetyl
CD	Circular Dichroismus	J	Kopplungskonstante
CEO	β-Cyanoethyloxid	K_d	Dissociationskonstante
CH	Cyclohexan	kDa	Kilodalton
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>	λ	Wellenlänge
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>	LED	<i>Light Emitting Diode</i>
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition	LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
δ	chemische Verschiebung	m	<i>meta</i>
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	M	Molar
DC	Dünnschichtchromatographie	mA	Milliampere
DCI	4,5-Dicyanoimidazol	MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
DCM	Dichlormethan	mAU	<i>milli-Absorbance Units</i>
ddH₂O	doppelt demineralisiertes Wasser	MeCN	Acetonitril
DEA	Diethylamin	MeOH	Methanol
DEACM	7-Diethylaminocumarin	MHz	Megahertz
DEAD	Diethylazodicarboxylat	mRNA	<i>messengerRNA</i>
denat.	denaturierend	MS	Massenspektrometrie
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat	n.b.	nicht bestimmt
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	NDBF	Nitrodibenzofuran
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin	nm	Nanometer
DMF	Dimethylformamid	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
DMSO	Dimethylsulfoxid	NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl	NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NPP	1-(2-Nitrophenyl)propyl
Dnl	<i>T4</i> DNA Ligase	o	<i>ortho</i>
DP	Dephosphorylierung	OD	Optische Dichte
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)	OMe	<i>O</i> -Methyl
DTT	1,4-Dithiothreitol	p	<i>para</i>
p	Phosphatgruppe	T	Thymin
p.a.	<i>pro analysi</i>	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
PA	Phosphoramidit	TBMDs	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TBE	Tris-Borat-EDTA
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	TCA	Trichloressigsäure
PC	<i>photo-cleavable</i> (photospaltbar)	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PDB	Protein-Datenbank	THF	Tetrahydrofuran
PEG	Polyethylenglykol	TOM	[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl
PNK	<i>T4</i> Polynukleotidkinase	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PPG	<i>Photoremovable Protecting Group</i>	tRNA	<i>transfer</i> RNA
ppm	<i>parts per million</i>	U	Uracil
R	beliebiger Rest	UV	ultraviolett
R_f	Retentionsfaktor	ü.N.	über Nacht
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt
Rnl	RNA Ligase	v/v	Volumenanteil
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)	vis	<i>visible</i> (sichtbarer Spektralbereich)
rpm	<i>revolutions per minute</i>	W	Watt
rSAP	<i>recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	wt%	Gewichtsprozent
RT	Raumtemperatur		

5.3 Erklärung zum Urheberrecht und Copyright ©

Die vorliegende Dissertation und die darin beschriebenen Arbeiten wurde von mir, Anja Blümmler, am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Alexander Heckel durchgeführt und verfasst.

Alle Arbeiten, Textstellen und Abbildungen, die sich auf fremde Veröffentlichungen beziehen, sind als solche gekennzeichnet. Abbildungen, die identisch aus früheren Publikationen entnommen wurden, sind ebenfalls gekennzeichnet und nur mit der ausdrücklichen urheberrechtlichen Erlaubnis der Autoren und Verlage nachgedruckt worden.

Neben Abbildungen, die aus Publikationen entnommen wurden, bei denen als Autor^[386] oder Coautor^[294,424–426] mitgearbeitet wurde, handelt es sich bei den folgenden Abbildungen um identische Nachdrucke anderer Autoren oder Herausgeber, die in dieser Arbeit mit Erlaubnis abgebildet wurden:

Abb. 4 (T4 RNA Ligase 1): Publikation^[111], © 2006, *ASBMB*, veröffentlicht über *Elsevier Inc.*, CC BY 4.0 Lizenz.

Abb. 7A (Aufnahme der CPG-Poren): Publikation^[143], © 2011 *Integrated DNA Technologies Inc.*, CC BY 4.0 Lizenz.

Abb. 7B (Aufnahme der PS-Kügelchen): Publikation^[144], © 2015, *Kinovate Life Sciences Inc.*, Nachdruck mit Erlaubnis, E-Mail vom 11.01.2022.

Abb. 8A: Publikation^[155], © 2008, *The Royal Society of Chemistry*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

Abb. 17 (Abb. links): Publikation^[239], © 2016, *Die Autoren*, veröffentlicht über *Portland Press*, CC BY 4.0 Lizenz.

Abb. 18 (Abb. links): Publikation^[241], © 2016, *Elsevier B.V.*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

Abb. 21: Publikation^[260], © 2011, *The Royal Society of Chemistry*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

Abb. 25A (Zebrafische): Publikation^[12], © 2020, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

Abb. 25B (Angiogenese): Publikation^[234], © 2013, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

Abb. 25C (Blutgerinnung): Publikation^[198], © 2021, *Die Autoren*, veröffentlicht über *Wiley-VCH GmbH*, CC BY 4.0 Lizenz.

Abb. 82: Publikation^[187], © 2012, *Die Autoren*, veröffentlicht über *Oxford University Press*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

Abb. 103: Publikation^[323], © 2016, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*, Erlaubnis über das *Copyright Clearance Center CCC* eingeholt.

5.4 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Übersicht über ausgewählte Modifikationsmöglichkeiten, die häufig in der Synthese therapeutisch-interessanter Oligonukleotide verwendet werden. Abbildung angelehnt an Ochoa et al.^[14] und erweitert nach Literatur^[15–17] 2
- Abb. 2:** Chemische Festphasensynthese von Nukleinsäuren nach der Phosphoramidit-Methode. A) Isobutyryl-geschütztes Guanosin-Phosphoramidit zum Einsatz in der chemischen Festphasensynthese. Die funktionalen Einheiten sind farblich hervorgehoben: säurelabile DMTr-Schutzgruppe (gelb), basenlabile Isobutyryl-Schutzgruppe (grün), fluoridlabile Silyl-Schutzgruppen (rot) und Cyanoethyl-geschützte Phosphoramidit-Einheit (blau). B) Schematische Darstellung des Syntheszyklus der chemischen Festphasensynthese nach der Phosphoramidit-Methode (B_n = beliebige Nukleobase)..... 5
- Abb. 3:** Unnatürliche Basenpaare und Nukleotide, die von Polymerasen als Substrate akzeptiert werden und sich somit zur positionsspezifischen enzymatischen Modifikation von RNAs eignen. A) Unnatürliche Basenpaare zur Erweiterung des genetischen Alphabets. B) Beispiele für zusätzlich modifizierte unnatürliche Nukleotide, die als Triphosphate mittels Polymerasen in RNA eingebaut werden können (Zucker-Phosphateinheit zur besseren Übersicht nicht gezeigt). C) Ausgewählte modifizierte Initiatornukleotide, die sich zur enzymatischen Modifikation des 5'-Endes von RNA eignen. 9
- Abb. 4:** Interaktion verschiedener Ligasen mit Oligonukleotidfragmenten (türkis). Darstellung der T4 RNA Ligase 1 mit einzelsträngiger tRNA mit Erlaubnis entnommen aus ^[111] (Nachdruck, CC BY 4.0 Lizenz). Die veröffentlichten Kristallstrukturen der Interaktionen der T4 RNA Ligase 2^[112] und der T4 DNA Ligase^[113] mit Nukleinsäureduplexen und ATP im aktiven Zentrum wurden der Proteindatenbank PDB entnommen und mit Biovia Discovery Studio^[114] dargestellt. 10
- Abb. 5:** Schematische Darstellung der enzymatischen Ligation mit T4 RNA Ligase 2. Dargestellt sind die drei Schritte der Adenylierung des Enzyms unter Abspaltung von PP_i (I), der 5'-5'-Phosphoanhydridbindungsbildung (II) und der Ausbildung der neuen Phosphodiesterbindung zwischen Donor- und Akzeptor-RNA (III) angelehnt an Nandakumar et al.^[112]. Die Kristallstruktur der Ligase (PDB-ID: 2HVS^[112]) wurde mit Biovia Discovery Studio^[114] verkleinert dargestellt..... 11
- Abb. 6:** Ausgewählte modifizierte Nukleosid-3',5'-Bisphosphate, die erfolgreich von Ligasen akzeptiert und mit dem 3'-Ende von RNAs verknüpft werden konnten..... 12
- Abb. 7:** CPG und Polystyrol-Trägermaterialien sowie Linkerstrukturen. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von CPG-Poren (Nachdruck mit Erlaubnis aus ^[143] © 2011, Integrated DNA Technologies) und Darstellung eines Start-Nukleosids, welches über einen LCAA- und einen Succinyl-Linker mit dem CPG-Material verbunden ist. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polystyrol-Kügelchen (Nachdruck mit Erlaubnis aus ^[144] © 2015, Kinovate Life Sciences) und Darstellung eines Succinyl-gebundenen Universal Supports..... 14
- Abb. 8:** Der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln und Interaktionsmöglichkeiten. A) Zu sehen ist eine Reaktionssuspension vor der Fixierung der Partikel (links) und die klare Reaktionslösung nach Isolation der Partikel mit Hilfe eines Magneten (rechts) (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus ^[155] (© 2008, The Royal Society of Chemistry). B) Interaktionsmöglichkeiten: a) Amidbindung; b) Disulfidbrücke; c) Bindung durch Alkin-Azid-Cycloaddition; d) Phosphoramidatbindung; e) Bindung über einen Aminolinker; f) Hybridisierung einer komplementären Zielsequenz; g) Interaktion eines Interkalators mit doppelsträngiger Nukleinsäure und h) Bindung durch Substratspezifische Wechselwirkung (angelehnt an ^[150])..... 15
- Abb. 9:** Darstellung der Biotin/Streptavidin-Interaktion (PDB-ID: 6J6J^[161], dargestellt mit Biovia Discovery Studio^[114]). Die vier Untereinheiten sind farblich markiert. Jede Untereinheit bindet ein Biotin-Molekül. Links: Blick von oben auf das Protein. Mitte: Gesamtansicht mit Blick in eine Bindetasche. Rechts: Zoom auf die Bindetasche und die Wasserstoffbrücken-basierte Biotin-Interaktion (Biotin schwarz hinterlegt). 15
- Abb. 10:** Verschiedene Strategien eine Biotineinheit mit dem 5'-Ende eines Oligonukleotids zu verknüpfen. A) Kovalente Verbindung des Biotins über einen PEG-Linker. B) Photolabil-verknüpfte

Biotineinheit. Die Abspaltung des Oligonukleotids erfolgt durch Bestrahlung. C) Fluoridlabile Silyl- verknüpfte Biotineinheit zur Abspaltung unter milden chemischen Bedingungen.....	16
Abb. 11: Schematische Übersicht verschiedener Strategien zur chemischen Ligation (modifizierter) 3'- und 5'-Enden. A) Kondensationsreaktionen mit terminalem Phosphodiester; B) S _N 2-Reaktionen mit terminalem Phosphorthioat; C) Umsetzung eines Phosphorthioates mit Sangers Reagenz; D) Ausbildung einer Oximbindung; E) Zyklisierung durch CuAAC; F) Ausbildung eines Chelatkomplexes.....	18
Abb. 12: Schematische Übersicht enzymatischer Zyklisierungsmethoden unter Ausbildung einer natürlichen Phosphodiesterbindung basierend auf Ligationsreaktionen.....	19
Abb. 13: Photolyse eines ortho-Nitrobenzyl-geschützten zyklischen Adenosinmonophosphates (1) nach Engels et al. ^[214] als erste publizierte Anwendung in biologischem Kontext.....	21
Abb. 14: Mechanismus der Photolyse von o-Nitrobenzyl-basierten photolabilen Schutzgruppen. ^[209,216]	22
Abb. 15: Mechanismus der Photolyse von Cumarin-basierten photolabilen Schutzgruppen nach Schade et al. ^[209,224]	23
Abb. 16: Strukturen wichtiger Vertreter photolabiler Schutzgruppen (LG = Abgangsgruppe).	23
Abb. 17: Darstellung der Grünlücke durch Kombination der Absorptionsspektren von Pflanzenbestandteilen (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus Johnson et al. ^[239] und angepasst; CC BY 4.0 Lizenz) sowie ausgewählte photolabile Schutzgruppen, die sich zum Einsatz in der Grünlücke eignen.	24
Abb. 18: Darstellung des phototherapeutischen Fensters durch Kombination der Absorptionsspektren von zelleigenen Chromophoren (Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus Dąbrowski et al. ^[241] und angepasst; © 2016, Elsevier B.V.) sowie ausgewählte photolabile BODIPY (18)- und Cy7 (19)-basierte Schutzgruppen.	25
Abb. 19: Durch Anregung des thermodynamisch stabilen Isomers A in den angeregten Zustand, kann eine Photoisomerisierung in das metastabile Isomer erfolgen. Die Rückisomerisierung ist sowohl photochemisch, als auch thermisch möglich. A) Schematische Darstellung potentieller Energieebenen. B) Schematische Darstellung der Absorptionsspektren der Isomere A und B. (Abb. angelehnt an die Literatur ^[255,256]).....	26
Abb. 20: Überblick über bekannte und häufig genutzte Photoschalter (angelehnt an Literatur ^[255,256]). A) Photoschalter die um eine Doppelbindung isomerisieren: Stilben, Azobenzol und Hemithioindigo. B) Photoschalter, die perizyklische Reaktionen eingehen und zwischen einer offenen und geschlossenen Form isomerisieren: Fulgid, Spiropyran und Diarylethen.	27
Abb. 21: A) Darstellung des elektrostatischen Potentials der beiden Azobenzol-Isomere (rot: negativ; blau: positiv). Die Entstehung des Dipols in cis-Konformation ist deutlich zu erkennen. B) Absorptionsspektren der beiden Azobenzol-Isomere (durchgezogene Linie: trans; gestrichelte Linie: cis). Nachdruck (angepasst) mit Erlaubnis entnommen aus Beharry et al. ^[260] (© 2011, The Royal Society of Chemistry).....	28
Abb. 22: Strukturen bathochrom-verschobener Azobenzol-Derivate im Vergleich zu unsubstituiertem Azobenzol 25 . Zusätzlich sind 2,2'-Azonaphthalen 26 mit erweitertem π-System, tetra ortho-Methoxy-substituiertes Azobenzol 27 und BF ₂ -koordiniertes Azobenzol 28 dargestellt.	28
Abb. 23: Überblick über verschiedene Ansatzpunkte zum Einbringen photolabiler Schutzgruppen in Nukleoside und Oligonukleotide (angelehnt an Literatur ^[210]). A) Einbau auf Watson-Crick- Franklin-Basenpaarseite; B) Einbau am Phosphodiester; C) Einbau an 2'-OH von RNA; D) Einbau als Linker zwischen zwei Nukleosiden im Rückgrat.....	29
Abb. 24: Übersicht über verschiedene Strategien zur Nutzung von photolabilen Schutzgruppen zur Regulation von Oligonukleotiden. A) Störung der Duplexbildung; B) Störung der Ausbildung sekundärer Strukturen am Beispiel einer Haarnadelstruktur; C) Lokale Störung der Interaktion mit einem Gegenstrang; D) Lichtinduzierte Fragmentierung; E) verschiedene Zyklisierungsansätze...	30
Abb. 25: Ausgewählte Beispiele verschiedener Anwendungen von lichtaktivierbaren Oligonukleotiden mit deutlich sichtbarem Ergebnis. A) Unterdrückung der GFP-Expression in Zebrafischen vor und nach Belichtung (Nachdruck mit Erlaubnis ^[12] (© 2020, Wiley-VCH Verlag	

GmbH & Co KGaA). B) Regulation der Angiogenese (Nachdruck mit Erlaubnis ^[234] (© 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA). C) Aktivierung der Blutgerinnung (Nachdruck mit Erlaubnis ^[198] ; CC BY 4.0 Lizenz).....	33
Abb. 26: Azobenzol-Modifikationen zur reversiblen Regulierung von Nukleinsäuren. A) Modifizierte Nucleobasen; B) Photoschaltbare C-Nucleoside; C) Azobenzol-Linker zum Einbau in das Zucker-Phosphatrückgrat.....	34
Abb. 27: Schematische Darstellung reversibler Regulationsmöglichkeiten von Oligonucleotiden durch Azobenzol-Photoschalter. Je nach Position und Anzahl kann durch lichtinduzierte Isomerisierung des Photoschalters ein stabiler Duplex lokal gestört werden oder eine Dissoziation der Stränge erfolgen.....	35
Abb. 28: Schematische Darstellung eines transkriptionsregulierenden Riboschalters. A) Zustand vor Binden des Liganden. Die RNA-Polymerase kann binden; die Transkription findet statt. B) Zustand mit gebundenem Liganden. Durch Ausbildung des Terminators dissoziiert die RNA-Polymerase, wodurch die Transkription terminiert wird (angelehnt an Kim et al. ^[340]).....	36
Abb. 29: Darstellung der tRNA ^{Phe} . A) Sequenz und Sekundärstruktur. Die fünf Regionen, die die typische Kleeblattstruktur bilden, sind farblich hervorgehoben. B) Tertiärstruktur der tRNA ^{Phe} mit Akzeptor- und Anticodon-Domäne (gleicher Farbcode wie in A). Die Struktur (PDB-ID: 1EHZ ^[345]) wurde mit PyMOL ^[346] dargestellt.....	37
Abb. 30: Strukturen einiger ausgewählter Nucleobasen-Modifikationen, wie sie in tRNAs gefunden werden können.	38
Abb. 31: A) Vier Guanosine bilden in Anwesenheit monovalenter Kationen eine G-Tetrade; B) G-Quadruplex aus drei G-Tetraden; C) Schematische Darstellung eines dreilagigen G-Quadruplexes.	38
Abb. 32: Faltungstopologien von G-Quadruplexen. A-C) Dargestellt sind eine parallele, zwei antiparallele und eine Hybridanordnung. D) Mögliche Looporientierungen: laterale Schleife (gelb), propellerartige Schleife (rot), diagonale Schleife (lila).....	39
Abb. 33: Nicht-kanonischer Polymorphismus von G-Quadruplexstrukturen. Dargestellt sind A) Ausbuchtungen (Bulges) durch ein zusätzliches Nucleosid (N), das nicht an einer G-Tetrade beteiligt ist; B) Snap-back-Motiv, bei dem eine extra Schleife entsteht; C) Vakante Stelle, durch eine fehlende Guanosineinheit in der oberen Tetrade; D) Zusätzliche Guanosine können durch Verschiebung in 3'- oder 5'-Richtung Teil des G4 werden (G-register shift) und E) Ein zusätzlicher G-reicher Abschnitt kann einen Abschnitt im bestehenden G4 ersetzen (spare-tire exchange). ...	40
Abb. 34: Schematische Darstellung unterschiedlicher Struktur- und Faltungsdynamiken auf einer Zeitskala im Bereich von Pikosekunden bis hin zu Tagen (Abb. angelehnt an die Literatur ^[376,377]). Neben ausgewählten relevanten Dynamiken sind NMR-Methoden gezeigt, die die entsprechenden Bereiche auf der Zeitskala abdecken.	41
Abb. 35: Strukturen der NPE-geschützten (pN^{NPE}p mit N = A, C, G, U, 29-32) und Azobenzol-C-modifizierten (p(p/mAzo)p , 33-34) Nucleosid-3',5'-Bisphosphate.	46
Abb. 36: Allgemeine Syntheseroute zum lichtaktivierbaren Nucleosid-3',5'-Bisphosphat am Beispiel von pU^{NPE}p . a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, quantitativ; b) 1,2,4-Triazol, POCl ₃ , Et ₃ N, MeCN, 0 °C – RT, 98%; c) (R,S)-NPE-OH, DBU, MeCN, RT, 68%; d) TBAF, THF, RT, 83%; e) Diphosphorylchlorid, 1 M TEAB, -12 °C, 16%.	47
Abb. 37: Schematische Übersicht der chemo-enzymatischen RNA-Synthese. Es werden drei enzymatische Schritte durchlaufen: 3'-Verlängerung mit Rnl1, 3'-Dephosphorylierung mit rSAP und Splint-Ligation der endständig-modifizierten RNA mit einer 5'p-Donor-RNA in Gegenwart eines DNA-Splints mit Rnl2.....	48
Abb. 38: 20% denat. PAA-Gele der chemo-enzymatischen Synthese NPE-modifizierter RNA. A) Gel der RP-HPLC-aufgereinigten 3'-terminal NPE-modifizierten Test-RNA jeweils nach 3'-Verlängerung (12merN^{NPE}-p) sowie nach 3'-Dephosphorylierung (12merN^{NPE}). B) Denat. PAGE der Splint-Ligation von 12merA^{NPE} mit 5'p-48mer . Neben den beiden Edukt-RNAs ist das RP-HPLC-aufgereinigte Ligationprodukt 61mer^{NPE} und der Ligationmix aufgetragen. Die Polyacrylamidgele wurden von Sara Keyhani-Goldau aufgenommen (Abb. mit Erlaubnis modifiziert übernommen aus der Literatur ^[294] , © 2018, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA).....	49

Abb. 39: Darstellung der Sekundärstruktur des 2'dG-spezifischen Riboschalters als NPE-geschützte Form vor Belichtung (dGsw ^{79-NPE} , links) und mit gebundenem Liganden nach Belichtung (dGsw ⁷⁹ , rechts). Zusätzlich sind die entsprechenden ¹ H- und ¹⁵ N- ¹ H-NMR-Spektren abgebildet. Die NMR-Messungen wurden von Dr. Sara Keyhani-Goldau durchgeführt (Abb. mit Erlaubnis modifiziert übernommen aus der Literatur ^[294] , © 2018, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA).	51
Abb. 40: Schematische Darstellung des multiplen Einbaus von pA^{NPE}p in direkter Nachbarschaft. Aus einer unmodifizierten RNA (12mer) wird eine 14 Nukleobasen lange RNA mit zweifacher 3'-terminaler NPE-Modifikation (12merA^{NPE}-A^{NPE}).	51
Abb. 41: Multipler Einbau von pA^{NPE}p am 3'-Ende eines RNA- 12mers . A) Übereinandergelegte RP-HPLC-Chromatogramme nach jedem enzymatischen Schritt. Die Trennbarkeit der einzelnen Spezies ist deutlich sichtbar (Detektion jeweils bei 254 nm; Elutionsbedingungen jeweils Säule 1, Gradient 1 bei 60 °C). B) 20% denat. PAGE der RP-HPLC-aufgereinigten RNA-Fragmente. C) 20% denat. PAGE der Fragmente sowie des Splint-Ligationsmix der zweifach-modifizierten RNA mit einem 5'p-24mer.	53
Abb. 42: Übersicht über die Synthese des DEACM-geschützten Uridin-3',5'-Bisphosphates pU^{DEACM}p . a) DEACM-OH, DBU, MeCN, RT, 52%; b) TBAF, THF, RT, 87%; c) Diphosphorylchlorid, 1 M TEAB, -12 °C, Gemisch aus 2',5'- und 3,5'-pU ^{DEACM} p.	54
Abb. 43: RP-HPLC-Chromatogramme vor Ligation (12mer ; schwarzes Chromatogramm), nach 3'-Verlängerung der unmodifizierten RNA mit pU^{DEACM}p via T4 RNA Ligase 1 (blaues Chromatogramm) und nach 3'-Dephosphorylierung (rotes Chromatogramm) (Detektion jeweils bei 254 nm; Elutionsbedingungen jeweils Säule 1, Gradient 1 bei 60 °C).	55
Abb. 44: Isolierung der Ligationsprodukte nach enzymatischer 3'-Verlängerung. A) RP-HPLC-Chromatogramm des Phosphodiester-DNA/RNA-Mixmers nach 3'-Verlängerung. B) RP-HPLC-Chromatogramm des Phosphorthioat-DNA/RNA-Mixmers nach 3'-Verlängerung. Edukt- und Produktpeaks sind jeweils markiert (Aufreinigungsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH als Eluenten bei 60 °C).	57
Abb. 45: Chemo-enzymatischer Einbau von pC^{NPE}p in DNA/RNA-Mixmere mit Phosphodiesterückgrat (linke Seite) und Phosphorthioatrückgrat (rechte Seite) im Vergleich. 20% denat. PAGE der Edukte und der Ligationsansätze. Die Ausbeuten wurden durch Vergleich der Bandenintensitäten mit Image Lab ^[388] ermittelt.	58
Abb. 46: Chemo-enzymatische 3'-Verlängerung einer 2'OMe-RNA. Gezeigt ist eine strukturelle Darstellung des Zucker-Phosphatrückgrates von Methoxy-RNA sowie das aufgenommene Gelfoto nach denat. Gelelektrophorese und übereinandergelegte RP-HPLC-Chromatogramme der Edukt-RNA (schwarze durchgezogene Linie) und des Ligationsansatzes (rote gestrichelte Linie) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). Beide Analysen zeigten keine Verlängerung des Start-Oligonukleotids.	60
Abb. 47: Zusammenfassung der Erkenntnisse und Übersicht über Möglichkeiten zur Einführung lichtadressierbarer Modifikationen in RNA mittels der vorgestellten chemo-enzymatischen Synthesemethode.	62
Abb. 48: Fixieren der Beads mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes. 0 s: Suspension der magnetischen Streptavidin Beads in wässriger Pufferlösung ohne Einfluss des Magneten. 5 s: Bereits nach 5 s akkumulieren die Beads durch die Anziehungskraft des Magneten an der Gefäßwand. 15 s: Vollständig an der Gefäßwand fixierte Beads und klarer Überstand.	63
Abb. 49: Schematische Darstellung des Arbeitsflusses der Festphasen-basierten chemo-enzymatischen RNA-Synthese.	64
Abb. 50: Zur Synthese biotinylierter RNA-Fragmente verwendete Phosphoramidite. A) Biotin-Phosphoramidit zur Synthese einer dauerhaft biotinylierten RNA. B) Verwendete Sonderamidite zur Synthese der photolabil biotinylierten RNA Bio-PC-RNA1	65
Abb. 51: Photolabiler Biotin-NHS-Ester zum postsynthetischen RNA-Labeling.	65
Abb. 52: Strukturelle Darstellung der zwei geplanten Initiatornukleoside mit fluoridlabiler 5'-Modifikation: labiler Cyclooctinrest zum Einsatz in Cu-freien Click-Reaktionen (50) und labile Biotineinheit (51).	66

- Abb. 53:** Kupfer-freie SPAAC. A) Schematische Darstellung der Spannungs-geförderten Alkin-Azid-Cycloaddition. B) Häufig in SPAAC-Reaktionen eingesetzte Cyclooctin-Derivate. 67
- Abb. 54:** In situ-Synthese des Initiatornukleosids **50** zum Einsatz in Kupfer-freien Click-Reaktionen. In situ-Synthese: Dichlordiisopropylsilan, (1R,8S,9s)-Bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-yl-methanol, DMAP, Et₂N, DMF, -10 °C, 8%. 67
- Abb. 55:** Bildung möglicher Nebenprodukte bei der in situ-Synthese des fluoridlabilen Octin-substituierten Initiatornukleosids. Neben Polymerisationsreaktionen des Silans kann es zur Bildung unerwünschter Dimere und zyklischer Silylether kommen. 68
- Abb. 56:** Schutzgruppen-basierte Strategie zur Synthese des Initiatornukleosids **50** zum Einsatz in Kupfer-freien Click-Reaktionen. a) Ac₂O, DMAP, Pyridin, Reflux, 93%; b) I₂, MeOH, 68 °C, 32%; c1) Dichlordiisopropylsilan, (1R,8S,9s)-Bicyclo[6.1.0]non-4-in-9-yl-methanol, DMAP, Et₂N, DMF, -10 °C – RT, Rohprodukt; c2) NH₄OH, RT, NaOAc-Fällung, 21%. 69
- Abb. 57:** Vorgeschlagener Mechanismus der selektiven 5'-Deacetylierung nach Ren et al.^[407] 69
- Abb. 58:** Syntheseroute zum fluoridlabilen Initiatornukleosid **51** mit 5'-ständiger Biotineinheit. a) MeMgBr, THF, -78 °C bis 50 °C, AcOH, RT, 50%; b) 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin), H₂O, 90 °C, 65%; c) Isobutylchloroformiat, DIPEA, DMF, 0 °C, Verbindung **64**, DMAP, DMF, 0 °C, 36%; d) Dichlordiisopropylsilan, DIPEA, Imidazol, Guanosin, DMF, -60 °C bis RT, Rohprodukt. 70
- Abb. 59:** Darstellung der zu modifizierenden Sequenz angelehnt an die Sequenz der tRNA^{Met} nach Cory et al.^[408]. Die einzelnen RNA-Fragmente (**RNA1-5**) sind farblich markiert. Positionen, die mit lichtadressierbaren Nukleosid-3',5'-Bisphosphaten wie mit **pC^{NPE}p** und **p(mAzo)p** modifiziert werden sollten, sind mit blauen Sternen gekennzeichnet. 72
- Abb. 60:** Vergleich der enzymatischen 3'-Verlängerung in Lösung und an Streptavidin Beads gebunden. A) Schematische Darstellung des ersten Reaktionsschritts mit Bead-gebundener RNA. B) Analyse der 3'-Verlängerung von **Bio-RNA1** mit **pC^{NPE}p** (links) und **p(mAzo)p** (rechts) in Lösung und an Beads gebunden mittels 20% denat. PAGE. C) RP-HPLC-Chromatogramme der Festphasen-basierten 3'-Verlängerungen mit **pC^{NPE}p** (links) und **p(mAzo)p** (rechts) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). 74
- Abb. 61:** Vergleich der enzymatischen 3'-Dephosphorylierung mit rSAP in Lösung und an Streptavidin Beads gebunden. A) Schematische Darstellung des zweiten enzymatischen Schritts mit Bead-gebundener 3'-modifizierter RNA. B) 20% denat. PAGE der 3'-Dephosphorylierung von **Bio-RNA1-C^{NPE}-p** in Lösung (links) und mit immobilisierter RNA (rechts). C) Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach Bead-gebundener 3'-Dephosphorylierungen von **Bio-RNA1-C^{NPE}-p** (links) und **Bio-RNA1-mAzo-p** (rechts) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). 75
- Abb. 62:** Vergleich der Splint-Ligation der modifizierten Akzeptor-RNA **Bio-RNA1-C^{NPE}** mit der 5'-phosphorylierten Donor-RNA **5'p-RNA2** in Lösung und an Streptavidin Beads gebunden. A) Schematische Darstellung des Festphasen-basierten dritten enzymatischen Schritts. B) 20% denat. PAGE der Splint-Ligation von **Bio-RNA1-C^{NPE}** mit **5'p-RNA2** in Lösung (links) und mit immobilisierter RNA (rechts). C) Vergleich des zeitlichen Ligationsverlaufs in Lösung (links) und Bead-gebunden (rechts). 76
- Abb. 63:** Schematische Darstellung des linearen Syntheseverlaufs. Nach Immobilisierung des ersten RNA-Fragments über eine Biotin/Streptavidin-Interaktion werden die enzymatischen Reaktionsschritte solange nacheinander durchgeführt, bis die modifizierte Gesamtsequenz erreicht ist. 77
- Abb. 64:** Vergleich analytischer RP-HPLC-Chromatogramme nach 3'-Verlängerung, 3'-Dephosphorylierung und Belichtung. Uridin wurde als interner Standard (IS, Peak nach 5 min) verwendet. Verglichen wurden die Spektren der unmodifizierten RNA **Bio-RNA1** (schwarzes Spektrum), nach 3'-Verlängerung unbelichtet (**Bio-RNA1-C^{NPE}-p**, blaues Spektrum) und belichtet (**Bio-RNA1-C-p**, gestrichelte blaue Linie) sowie nach 3'-Dephosphorylierung unbelichtet (**Bio-RNA1-C^{NPE}**, rotes Spektrum) und belichtet (**Bio-RNA1-C**, gestrichelte rote Linie). Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C. 78
- Abb. 65:** Analyse verschiedener Reaktionsbedingungen der Splint-Ligationen mit Rnl2. A) Vergleich der Ligationszeiten für die Reaktion des NPE-geschützten RNA-Fragments mit **5'p-RNA2**

- und analog dazu der Azobenzol-modifizierten Akzeptor-RNA. B) Analyse verschiedener Oligonukleotid-Verhältnisse zueinander und Puffer mittels 20% denat. PAGE. C) Zusammengefasste Ausbeuten des ersten Syntheszyklus..... 79
- Abb. 66:** Analyse nach zweiter 3'-Verlängerung. A) Denat. PAGEs zur Analyse der NPE- und Azobenzol-Modifikationen. Das linke Gel zeigt NPE-modifizierte RNAs, das Gel rechts fasst den Azobenzol-Einbau zusammen. In beiden Fällen ist nur eine schwache Ausbeute nach der zweiten 3'-Verlängerung zuerkennen (Ausbeuten durch Vergleich der Bandenintensitäten mit Image Lab^[388] bestimmt) B) Zusammenfassung der Gesamtausbeuten..... 80
- Abb. 67:** Schematische Darstellung des konvergenten Syntheseverlaufs. Die einzelnen RNA-Fragmente werden zunächst in Lösung am 3'-Ende modifiziert und durch Umsetzung mit PNK rephosphoryliert. Nach Immobilisierung des ersten RNA-Fragments über eine Biotin/Streptavidin-Interaktion wird die Gesamtsequenz durch aufeinanderfolgende Splint-Ligationen hergestellt. .. 81
- Abb. 68:** Analyse und Aufreinigung der enzymatischen 3'-Verlängerungen der einzelnen RNA-Fragmente mittels RP-HPLC. A) Verlängerung der RNAs mit NPE-modifizierten Nukleosid-3',5'-Bisphosphaten. B) Verlängerung der RNAs mit **p(mAzo)p**. Edukte und Produkte sind jeweils gekennzeichnet. Die Elutionsbedingung war in allen Fällen Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C. 82
- Abb. 69:** 3'/5'-Rephosphorylierung mit PNK. A) Schematische Darstellung der Rephosphorylierungsreaktion. B) 20% denat. PAGE der zeitaufgelösten 5'-Phosphorylierung von **RNA2-U^{NPE}** mit PNK. C) Denat. PAGE nach enzymatischer 3'-Verlängerung mit Rnl1 und anschließender Rephosphorylierung der einzelnen NPE-modifizierten RNA-Fragmente mit PNK. B) Denat. PAGE nach enzymatischer 3'-Verlängerung und anschließender Rephosphorylierung der mAzo-modifizierten RNA-Fragmente..... 83
- Abb. 70:** Fragmentierung der RNA, Positionen der Modifikationen und entsprechende DNA-Splints..... 84
- Abb. 71:** Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der ersten Splint-Ligationen. A) Ligation NPE-modifizierter RNAs bei 17 °C, 27 °C und 37 °C. B) Ligation mAzo-modifizierter RNAs bei 37 °C. 84
- Abb. 72:** Massenspektrometrische Analyse der Ligationsprodukte nach RP-HPLC-Aufreinigung der ersten Bead-gebundenen Splint-Ligation. A) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutiertes (unten) Massenspektrum von **Bio-RNA1^{NPE}-RNA2^{NPE}** (berechnete Masse = 10361,5) und Chromatogramm der RP-HPLC-Aufreinigung. B) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutiertes (unten) Massenspektrum von **Bio-RNA1az-RNA2az** (berechnete Masse = 10204,5) und Chromatogramm der RP-HPLC-Aufreinigung (Elutionsbedingung jeweils Säule 1, Gradient 4 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). 85
- Abb. 73:** A) 20% denat. PAGE nach der dritten Festphasen-gebundenen Splint-Ligation NPE-modifizierter RNAs. RNA3 und RNA 4 dienen als interne Referenz-RNAs. Zur Bestimmung der schrittweisen Ausbeuten wurden die Bandenintensitäten der Produkte zueinander ins Verhältnis gesetzt. B) Zusammenfassung der Gesamtausbeute nach drei durchlaufenen Reaktionszyklen. .. 86
- Abb. 74:** Multiple enzymatische Reaktionen zur Synthese eines tRNA-Derivats. A) Analyse der Splint-Ligationsreaktionen mittels denat. PAGE. Zur Bestimmung der schrittweisen Ausbeuten wurden die Bandenintensitäten der Produkte mit Image Lab^[388] zueinander ins Verhältnis gesetzt. B) Zusammenfassung der Gesamtausbeuten. 87
- Abb. 75:** Untersuchte RP-HPLC-Aufreinigung des finalen NPE-modifizierten 77 Nucleobasen langen RNA-Konstruktes. A) Vollständiges Chromatogramm und relevanter Ausschnitt der Aufreinigung mit Säule 1, Gradient 4 (HFIP/MeOH; 60 °C). B) Vollständiges Chromatogramm und relevanter Ausschnitt der Aufreinigung mit Säule 1 und dem angepassten Gradient 5 (HFIP/MeOH; 60 °C). (● = **Bio-RNA1^{NPE}**, ● = **Bio-RNA1-2^{NPE}**, ● = **Bio-RNA1-4^{NPE}**, ● = **Bio-RNA1-5^{NPE}**)..... 88
- Abb. 76:** Finale RP-HPLC-Aufreinigung der NPE-modifizierten Volllänge-sequenz. A) Vollständiges Chromatogramm und relevanter Ausschnitt der Aufreinigung mit Säule 1, Gradient 6 (HFIP/MeOH; 60 °C). B) Massenspektrometrische Analyse der isolierten RNA-Fragmente. Das gewünschte Produkt wurde nach 21 min eluiert..... 89
- Abb. 77:** Splint-Ligation der Azobenzol-modifizierten RNA **Bio-RNA1-mAzo** mit **5'p-RNA2-U^{NPE}**. A) Denat. PAGE der Splint-Ligation. B) Relevanter Ausschnitt des RP-HPLC-Chromatogramms der

- Aufreinigung des Splint-Ligationsansatzes (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 4 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). C) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutiertes (unten) Massenspektrum von **Bio-RNA1-mAzo-RNA2-U^{NPE}** (berechnete Masse = 10283,5). 91
- Abb. 78:** Einbau einer DEACM-Schutzgruppe und Kombination mit einer NPE-modifizierten RNA. A) RP-HPLC-Chromatogramm der 3'-Verlängerung von **RNA2** mit **pU^{DEACM}p**. (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C) B) 20% denat. PAGE der Splint-Ligation von **Bio-RNA1-C^{NPE} mit 5'p-RNA2-U^{DEACM}** 92
- Abb. 79:** Massenspektrometrische Analyse des DEACM- und NPE-geschützten 30mers vor Belichtung (A, -hv, berechnete Masse = 10441,6) sowie nach Abspaltung der DEACM-Schutzgruppe (B, hv₁, berechnete Masse = 10212,5) und einer zweiten Bestrahlung zur Photolyse der NPE-Funktion (C, hv₂, berechnete Masse = 10063,4). Rechts: Übereinandergelegte RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach Belichtung. 93
- Abb. 80:** Strukturen der verwendeten Phosphoramidite zur Synthese des photospaltbaren Dinukleotids **68**. 94
- Abb. 81:** Zusammenfassung des chemo-enzymatischen Einbaus eines Dinukleotids mit photolabilem NPP-Linker im Rückgrat. A) RP-HPLC-Chromatogramme nach 3'-Verlängerung (links, Säule 1, Gradient 1) und Splint-Ligation von **Bio-RNA1-Dinuk1** mit **5'p-RNA2** (rechts, Säule 1, Gradient 4). B) 20% denat. PAGE der Splint-Ligation des Rückgrat-modifizierten Fragments sowie massenspektrometrische Analyse des Ligationsproduktes (berechnete Masse = 10327,4). 96
- Abb. 82:** Zyklisierung photospaltbarer RNA nach Wu et al.. A) Prinzip der Modifikation und Zyklisierung. B) Auswirkung des modifizierten Oligonukleotids auf die GFP-Expression vor Belichtung (links, zyklische RNA) und nach Belichtung (rechts, lineare RNA). DsRed wurde als zellinterner Standard verwendet. Das linearisierte Oligonukleotid PS1 reduziert die GFP-Expression. Aufnahmen der Plasmide dienen als Referenz. Nachdruck mit Erlaubnis^[187] (© 2012, Die Autoren, veröffentlicht über Oxford University Press) 97
- Abb. 83:** Strukturen der verwendeten photolabilen Phosphoramidite und der hergestellten Dinukleotide. **Dinuk2** ist durch einen NPP-Linker im Rückgrat verknüpft. **Dinuk3** wurde mit einem DEACM-Linker synthetisiert. 98
- Abb. 84:** Enzymatische RNA-Zyklisierung mit Rnl1. A) Schematische Darstellung der linearen und zyklischen Sequenz. B) Exemplarisches RP-HPLC-Chromatogramm der Auftrennung der linearen und zyklischen RNA (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C) und C) Denat. PAGE der Zyklisierungsreaktion mit Rnl1 (HPLC und PAGE von Oliver Pereira durchgeführt). 99
- Abb. 85:** Enzymatische 3'-Verlängerung des 20mers um ein NPP-spaltbares (links) und um ein DEACM-spaltbares Dinukleotid (rechts) (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). 99
- Abb. 86:** Auftrennung der enzymatischen Zyklisierungen. A) Schematische Darstellung der photolabilen zyklischen Sequenz (N_{PPG}N = **Dinuk2** bzw. **Dinuk3**) B und C) RP-HPLC-Chromatogramme der NPP- (B) und DEACM- (C) modifizierten zyklischen 22mere (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 mit HFIP/MeOH bei 60 °C). 100
- Abb. 87:** Design und Anwendbarkeit des verwendeten Molecular Beacons. A) Strukturen des verwendeten Cy5-CPGs und BBQ-650-Phosphoramidits sowie berechnete Sekundärstruktur des Molecular Beacons. B) Fluoreszenzmessung des Molecular Beacons bei Zugabe der komplementären unmodifizierten Kontrollsequenz **nat-20mer** (0 – 2 Eq.) bei 27 °C und 37 °C. Es ist lediglich ein maximal 5x Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten 101
- Abb. 88:** Untersuchung der Lichtaktivierbarkeit von **circ-22mer_{NPP}** in Gegenwart eines Molecular Beacons. A) Schematische Darstellung der Interaktion der Modifizierten RNA vor und nach Belichten. B) Fluoreszenzmessung des Molecular Beacons bei Zugabe NPP-modifizierten zyklischen 22mers **circ-22mer_{NPP}** bei 37 °C. Bereits vor Belichtung (blauer Graph) des zyklischen Derivats fand eine fast vollständige Hybridisierung mit dem Molecular Beacon statt. Nach Belichtung 1 (hv₁, 365 nm, 10 min, 2 mW, roter Graph) und nach Belichtung 2 (hv₂, 365 nm, 2 min, 20 mW, gelber Graph) konnte jeweils nur ein geringer Fluoreszenzanstieg detektiert werden. Die Messungen wurden von Oliver Pereira im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. 102

- Abb. 89:** Schematische Darstellung möglicher Anwendungen zweifach photospaltbarer zyklischer RNAs. A) Untersuchung der Interaktion mit einer Fluorophor-markierten Zielsequenz: nach erster Belichtung kann eine Hybridisierung stattfinden. Eine zweite Belichtung führt zu einer Verdrängung der Fragmente und Abnahme der Fluoreszenz. B) Regulierung der GFP-Expression: Nach Belichtung blockiert die lineare RNA die Promotorregion. es kommt zu einer Unterdrückung der GFP-Expression (Fluoreszenz nimmt ab). Durch Verdrängung der Fragmente nach zweiter Belichtung steigt die Expressionsrate und damit auch die Fluoreszenz wieder an. 103
- Abb. 90:** Optionales NaIO₄-Capping. Das 2',3'-Diol kann durch Zugabe von NaIO₄ oxidiert und für weitere enzymatische Reaktionen unzugänglich werden..... 104
- Abb. 91:** 3'-Modifikation durch Morpholino-Chemie. A) Schematische Darstellung der 3'-Modifikation von **Bio-34mer** mit einem Rhodamin-Derivat nach Periodat-Capping. B) Fragmentiertes (oben) und dekonvolutiertes (unten) Massenspektrum nach 3'-Modifikation (berechnete Masse [M+Na⁺] = 11807,5) sowie das aufgenommene RP-HPLC-Chromatogramm (Elutionsbedingung Säule 1, Gradient 1 verlängert mit HFIP/MeOH bei 60 °C). 105
- Abb. 92:** Zusammenfassung der Erkenntnisse und Übersicht der Modifikationsmöglichkeiten mittels Festphasen-basierter chemo-enzymatischer RNA-Synthese. 107
- Abb. 93:** Übersicht der Synthese des R-NPE-geschützten Desoxyguanosin-Phosphoramidits **80**. a) TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT, quantitativ; b) iPrPac-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 63%; c) (S)-NPE, PPh₃, DEAD, THF, 0 °C – RT, 55%; d) TBAF, AcOH, THF, RT, 93%; e) DMTr-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 91%; f) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 68%. 110
- Abb. 94:** Isomerentrennung des racemischen R,S-NPE-Alkohols. Elutionsbedingung: Säule 4 mit nHex/EtOH 9:1 isokratisch bei RT. Pro Injektion wurden 100 mg rac-NPE aufgetrennt..... 111
- Abb. 95:** Ausbildung von Konformationsisomeren der cMYC-22-Wildtypsequenz. A) ¹H-NMR-Spektrum der Iminoprotonen-Region der Wildtypsequenz. Die Ausbildung einer Hauptkonformation ist deutlich zu erkennen. B) Schematische Darstellung der Spare-Tire-Isomere. Nachdruck mit Erlaubnis^[425] (© 2021, Die Autoren, veröffentlicht durch die American Chemical Society, Abb. von Dr. T. Grün) 114
- Abb. 96:** Kinetiken der G4-Spare-Tire-Isomere basierend auf Daten der zeitaufgelösten NMR-Studien (100 μM DNA, 5 mM K⁺, 298 K). Dargestellt sind jeweils ¹H-NMR-Spektren der Iminoprotonen-Region vor (untere Spektren) und nach Belichtung (obere Spektren). Zusätzlich sind die Kinetiken nach biexponentieller nichtlinearer Regression der lichtinduzierten Faltung des Wildtyps (A, grau), der stabilisierten Hauptkonformation **stab.-2345** (B, rosa) und der stabilisierten Nebenkonformationen **stab.-1234** (C, grün) und **stab.-1245** (D, blau) dargestellt. Nachdruck mit Erlaubnis^[425] (© 2021, Die Autoren, veröffentlicht durch die American Chemical Society, Abb. von Dr. T. Grün) 115
- Abb. 97:** Übersicht der Synthese des S-NPE-geschützten Guanodin-Phosphoramidits **86**. a) (R)-NPE, PPh₃, DIAD, THF, RT, 76%; b) 12 M MeNH₂ in H₂O, THF, RT, 93% c) iPrPac-Cl, DMAP, Pyridin, 0 °C – RT, 91%; d) NH₃/MeOH/THF 1:1:1 (v/v/v), RT, 83%; e) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 73%. 116
- Abb. 98:** Erste untersuchte Syntheseroute zum DEACM-geschützten Uridin-Phosphoramidit. a) DMTr-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 87%; b) Bu₂SnCl₂, DIPEA, TOM-Cl, 1,2-Dichlorethan, RT – 80 °C, resultiert in Abspaltung der DEACM-Gruppe. 117
- Abb. 99:** Übersicht der Synthese des DEACM-geschützten Guanodin-Phosphoramidits **92**. a) DMTr-Cl, Pyridin, 0 °C – RT, 94%; b) Bu₂SnCl₂, DIPEA, TOM-Cl, 1,2-Dichlorethan, RT – 80 °C, 53% c) DEACM-OH, DEAD, PPh₃, THF, 0 °C - RT, 15%; d) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 36%. 118
- Abb. 100:** Schematische Darstellung der photolabil-geschützten Sequenz **G^{S-NPE}-20mer(A)**. Die NPE-Schutzgruppe (blauer Stern) an Position 6 verhindert das Umfalten der RNA in Konformation B (Abb. angelehnt an die Literatur^[426]). 120
- Abb. 101:** Lichtinduzierte Umfaltung des bistabilen RNA-20mers. A) ¹H-NMR-Iminoprotonenspektren der RNA ohne StpA (linke Spektren) und im Komplex mit StpA (rechte Spektren) vor (oben) und nach (unten) Belichtung. Die Signale sind farblich den beiden Konformationen zugeordnet. Es ist deutlich zu sehen, dass vor Belichtung ausschließlich

- Konformation A vorliegt (blaue Signale). B) Schematische Darstellung der Photolysereaktion und Kinetiken der RNA-Umfaltung ohne StpA und im Komplex mit StpA. Nachdruck mit Erlaubnis^[426] (© 2021, Oxford University Press, CC BY Lizenz, Abb. von K. Hohmann) 121
- Abb. 102:** Übersicht der Synthese des para/para-substituierten Azobenzol-Phosphoramidits **100**. a) TBDPS-Cl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 74%; b1) NH₄Cl, Zn, EtOH/H₂O, RT; b2) FeCl₃·6 H₂O, EtOH/H₂O, < -5 °C, 83%; c) AcOH, RT, 30%; d) DMTr-Cl, DMAP, Pyridin, quantitativ; e) TBAF, THF, RT, 99%; f) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 89% 122
- Abb. 103:** Ausbildung eines intermolekularen G-Quadruplex. A) Darstellung der Guanosine 2 und 4 innerhalb einer G-Tetrad; B) Darstellung der Guanosine 1 und 5 innerhalb einer G-Tetrad; C) Schematische Darstellung der G-Quadruplex-Anordnung. Durch intermolekulare Wechselwirkungen entsteht ein insgesamt vierlagiger G-Quadruplex; D) NMR-basierte Struktur des Kalium (graue Kugeln)-koordinierten Quadruplexes (PDB-ID: 2N9Q). (Nachdruck mit Erlaubnis^[323], © 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA). 124
- Abb. 104:** Strukturen und Bezugsquellen der verwendeten kommerziell erhältlichen Sonderamidite, die für die Synthesen der modifizierten RNA-Fragmente eingesetzt wurden. 131

5.5 Literaturverzeichnis

- [1] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, *75*, 280–284.
- [2] S. T. Crooke, B. F. Baker, R. M. Crooke, X. H. Liang, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 427–453.
- [3] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [4] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [5] S. Ni, H. Yao, L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A. Lu, G. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1683.
- [6] L. Li, S. Xu, H. Yan, X. Li, H. S. Yazd, X. Li, T. Huang, C. Cui, J. Jiang, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 2221–2231.
- [7] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [8] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494–498.
- [9] R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 125–140.
- [10] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, *337*, 816–821.
- [11] C. Zhuo, J. Zhang, J. Lee, J. Jiao, D. Cheng, L. Liu, H. Kim, Y. Tao, M. Li, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 238.
- [12] W. Zhou, W. Brown, A. Bardhan, M. Delaney, A. S. Ilk, R. R. Rauen, S. I. Kahn, M. Tsang, A. Deiters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 8998–9003.
- [13] C. R. Dass, E. G. Saravolac, Y. Li, L.-Q. Sun, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 289–299.
- [14] S. Ochoa, V. T. Milam, *Molecules* **2020**, *25*, 4659.
- [15] S. T. Crooke, X.-H. Liang, B. F. Baker, R. M. Crooke, *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100416.
- [16] J. K. Sharma, Vivek K; Watts, *Futur. Med. Chem.* **2019**, *71*, 222–238.
- [17] G. Clavé, M. Reverte, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 94–150.
- [18] F. Eckstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4292–4294.
- [19] M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 7706–7710.
- [20] *AIDS Treat. News* **1998**, *307*, 7.
- [21] R. Azad, V. Browndriver, R. Buckheit, K. Anderson, *Antiviral Res.* **1995**, *28*, 101–111.
- [22] F. Eckstein, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 374–387.
- [23] A. Sood, B. R. Shaw, B. F. Spielvogel, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000–9001.
- [24] S. Paul, S. Roy, L. Monfregola, S. Shang, R. Shoemaker, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3253–3264.
- [25] P. S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1979**, *18*, 5134–5143.
- [26] K. Nagahama, R. N. Veedu, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2707–2709.
- [27] P. von Matt, T. Lochmann, K.-H. Altmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1549–1552.
- [28] D. Baraniak, J. Boryski, *Biomedicines* **2021**, *9*, 628.
- [29] R. O. Dempcy, O. Almarsson, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 7864–7868.
- [30] K. Skakuj, K. E. Bujold, C. A. Mirkin, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2020**, *81*, 1–26.
- [31] E. P. Stirchak, J. E. Summerton, D. D. Weller, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 6129–6141.
- [32] J. Summerton, D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187–195.
- [33] T. K. Warren, A. C. Shurtleff, S. Bavari, *Antiviral Res.* **2012**, *94*, 80–88.
- [34] J. Chen, J. Wu, Y. Hong, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3191–3194.
- [35] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [36] R. D'Agata, M. Giuffrida, G. Spoto, *Molecules* **2017**, *22*, 1951.
- [37] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735–8738.
- [38] S. N. Mikhailov, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2059–2062.
- [39] W. Guschlbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1421–1433.
- [40] M. A. Campbell, J. Wengel, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680.

- [41] H. Xiong, R. N. Veedu, S. D. Diermeier, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3295.
- [42] K. Bartosik, K. Debiec, A. Czarnecka, E. Sochacka, G. Leszczynska, *Molecules* **2020**, *25*, 3344.
- [43] E. Paredes, M. Evans, S. R. Das, *Methods* **2011**, *54*, 251–259.
- [44] L. K. McKenzie, R. El-Khoury, J. D. Thorpe, M. J. Damha, M. Hollenstein, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5126–5164.
- [45] R. Klimek, M. Wang, V. R. McKenney, E. M. Schuman, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 615–618.
- [46] T. Kwon, N. Piton, C. Grünewald, J. W. Engels, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1381–1386.
- [47] W. Xu, K. M. Chan, E. T. Kool, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 1043–1055.
- [48] H.-S. Lee, H. Seok, D. H. Lee, J. Ham, W. Lee, E. M. Youm, J. S. Yoo, Y.-S. Lee, E.-S. Jang, S. W. Chi, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10154.
- [49] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, S. Steinwand, P. Mondal, M. Biswas, I. Burghardt, J. Wachtveitl, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 2845–2854.
- [50] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [51] E. H. Khorana, H. G.; Razzell, W. E.; Gilham, P. T.; Tener, G. M.; Pol, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1002–1003.
- [52] P. T. Gilham, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212–6222.
- [53] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [54] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526–3527.
- [55] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5319–5324.
- [56] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278–3279.
- [57] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223–2311.
- [58] M. J. Gait, M. Singh, R. C. Sheppard, M. D. Edge, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1081–1096.
- [59] K. Miyoshi, T. Huang, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 5491–5506.
- [60] H. Ito, Y. Ike, S. Ikuta, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 1755–1769.
- [61] R. T. Pon, N. Usman, K. K. Ogilvie, *BioTechniques* **1988**, *6*, 768–75.
- [62] M. Smith, D. H. Rammner, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430–440.
- [63] K. K. Ogilvie, K. L. Sadana, E. A. Thompson, M. A. Quilliam, J. B. Westmore, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 2861–2863.
- [64] S. Pitsch, P. A. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3773–3795.
- [65] B. Sproat, F. Colonna, B. Mullah, D. Tsou, A. Andrus, A. Hampel, R. Vinayak, *Nucleosides and Nucleotides* **1995**, *14*, 255–273.
- [66] R. Welz, S. Müller, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 795–797.
- [67] C. Vargeese, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1046–1050.
- [68] B. S. Sproat, in *Methods Mol. Biol.*, Humana Press, New Jersey, **2005**, pp. 17–32.
- [69] D. Gasparutto, T. Livache, H. Bazin, A. Duplaa, A. Guy, A. Khorlin, D. Molko, A. Roget, R. Téoule, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5159–5166.
- [70] R. K. Gaur, S. Paliwal, P. Sharma, K. C. Gupta, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1989**, *18*, 323–329.
- [71] D. A. Bintzler, C. E. Terrell, *J. Biomol. Tech.* **2000**, *11*, 122–134.
- [72] Glen Research “Glen Report 19.29: Technical Brief - About Activators: Now and Tomorrow” <https://www.glenresearch.com/reports/gr19-29> letzter Zugriff: 01.12.2021, **n.d.**
- [73] Y. S. Sanghvi, Z. Guo, H. M. Pfundheller, A. Converso, *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 175–181.
- [74] A. H. Krotz, P. G. Klopchin, K. L. Walker, G. S. Srivatsa, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3875–3878.
- [75] P. Järvinen, M. Oivanen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5396–5401.
- [76] H. Lusic, R. Uprety, A. Deiters, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 916–919.
- [77] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*,

- 1450–1453.
- [78] D. Müller, S. Trucks, H. Schwalbe, M. Hengesbach, *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 1233–1243.
- [79] E. M. LeProust, B. J. Peck, K. Spirin, H. B. McCuen, B. Moore, E. Namsaraev, M. H. Caruthers, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2522–2540.
- [80] T. Persson, U. Kutzke, S. Busch, R. Held, R. K. Hartmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 51–56.
- [81] Y. Shiba, H. Masuda, N. Watanabe, T. Ego, K. Takagaki, K. Ishiyama, T. Ohgi, J. Yano, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3287–3296.
- [82] L. Jud, R. Micura, *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 3406–3413.
- [83] S. Sambandan, G. Akbalik, L. Kochen, J. Rinne, J. Kahlstatt, C. Glock, G. Tushev, B. Alvarez-Castelao, A. Heckel, E. M. Schuman, *Science* **2017**, *355*, 634–637.
- [84] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 8783–8798.
- [85] R. T. Batey, M. Inada, E. Kujawinski, J. D. Puglisi, J. R. Williamson, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4515–4523.
- [86] J. C. Schlatterer, A. Jäschke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344*, 887–892.
- [87] C. Domnick, F. Eggert, C. Wuebben, L. Bornewasser, G. Hagelueken, O. Schiemann, S. Kath-Schorr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7891–7896.
- [88] M. Henkel, A. Marx, *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 668–669.
- [89] G. Martin, W. Keller, *RNA* **2007**, *13*, 1834–1849.
- [90] M.-L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e78–e78.
- [91] F. Muttach, F. Mäsing, A. Studer, A. Rentmeister, *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 5988–5993.
- [92] C. P. M. Scheitl, M. Ghaem Maghami, A.-K. Lenz, C. Höbartner, *Nature* **2020**, *587*, 663–667.
- [93] K. Hartstock, B. S. Nilges, A. Ovcharenko, N. V. Cornelissen, N. Püllen, A. Lawrence-Dörner, S. A. Leidel, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6342–6346.
- [94] M. Ghaem Maghami, S. Dey, A. Lenz, C. Höbartner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9335–9339.
- [95] J. F. Milligan, O. C. Uhlenbeck, in *Methods Enzymol.*, **1989**, pp. 51–62.
- [96] H. Depmeier, E. Hoffmann, L. Bornewasser, S. Kath-Schorr, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2826–2847.
- [97] K. Dhami, D. A. Malyshev, P. Ordoukhanian, T. Kubelka, M. Hocek, F. E. Romesberg, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10235–10244.
- [98] I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2007**, *51*, 9–10.
- [99] A. Hegelein, D. Müller, S. Größl, M. Göbel, M. Hengesbach, H. Schwalbe, *Chem. - A Eur. J.* **2020**, *26*, 1800–1810.
- [100] C. Domnick, F. Eggert, S. Kath-Schorr, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8253–8256.
- [101] C. Pitulle, R. G. Kleinedam, B. Sproat, G. Krupp, *Gene* **1992**, *112*, 101–105.
- [102] F. Huang, J. He, Y. Zhang, Y. Guo, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1848–1861.
- [103] C. M. Dojahn, M. Hesse, C. Arenz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3128.
- [104] F. Huang, G. Wang, T. Coleman, N. Li, *RNA* **2003**, *9*, 1562–1570.
- [105] F. Muttach, N. Muthmann, A. Rentmeister, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 278–284.
- [106] A. Ovcharenko, F. P. Weissenboeck, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 4098–4103.
- [107] L. Anhäuser, N. Klöcker, F. Muttach, F. Mäsing, P. Špaček, A. Studer, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3161–3165.
- [108] V. Rosemeyer, A. Laubrock, R. Seibl, *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 446–449.
- [109] C. K. Ho, L. K. Wang, C. D. Lima, S. Shuman, *Structure* **2004**, *12*, 327–339.
- [110] A. E. Tomkinson, S. Vijayakumar, J. M. Pascal, T. Ellenberger, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 687–699.
- [111] K. El Omari, J. Ren, L. E. Bird, M. K. Bona, G. Klarmann, S. F. J. LeGrice, D. K. Stammers, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1573–1579.
- [112] J. Nandakumar, S. Shuman, C. D. Lima, *Cell* **2006**, *127*, 71–84.
- [113] K. Shi, T. E. Bohl, J. Park, A. Zasada, S. Malik, S. Banerjee, V. Tran, N. Li, Z. Yin, F. Kurniawan, K. Orellana, H. Aihara, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 10474–10488.

- [114] Dassault Systèmes, **2015**.
- [115] O. C. Uhlenbeck, R. I. Gumpert, **1982**, pp. 31–58.
- [116] R. Silber, V. G. Malathi, J. Hurwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1972**, *69*, 3009–3013.
- [117] J. W. Cranston, R. Silber, V. G. Malathi, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7447–7456.
- [118] J. R. Barrio, M. del C. G. Barrio, N. J. Leonard, T. E. England, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2077–2081.
- [119] T. E. England, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2069–2076.
- [120] T. E. England, O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1978**, *275*, 560–561.
- [121] E. Romaniuk, L. W. McLaughlin, T. Neilson, P. J. Romaniuk, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *125*, 639–643.
- [122] A. G. Bruce, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 3665–3678.
- [123] H. Paulsen, W. Wintermeyer, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 117–123.
- [124] P. Brodelius, P.-O. Larsson, K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 81–89.
- [125] A. Depaix, A. Mlynarska-Cieslak, M. Warminski, P. J. Sikorski, J. Jemielity, J. Kowalska, *Chem. – A Eur. J.* **2021**, *27*, 12190–12197.
- [126] M. J. Moore, C. C. Query, in *Methods Enzymol.*, **2000**, pp. 109–123.
- [127] M. R. Stark, J. A. Pleiss, M. Deras, S. A. Scaringe, S. D. Rader, *RNA* **2006**, *12*, 2014–2019.
- [128] I. Lebars, B. Vilenko, S. Bourbigot, P. Turek, P. Wolff, B. Kieffer, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e117–e117.
- [129] T. Weinrich, E. A. Jaumann, U. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Chem. – A Eur. J.* **2018**, *24*, 6202–6207.
- [130] B. M. Akiyama, M. D. Stone, in *Methods Enzymol.*, Elsevier Inc., **2009**, pp. 27–46.
- [131] V. de Jesus, N. S. Qureshi, S. Warhaut, J. K. Bains, M. S. Dietz, M. Heilemann, H. Schwalbe, B. Fürtig, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4723.
- [132] S. Warhaut, K. R. Mertinkus, P. Höllthaler, B. Fürtig, M. Heilemann, M. Hengesbach, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 5512–5522.
- [133] J. Nandakumar, S. Shuman, *Mol. Cell* **2004**, *16*, 211–221.
- [134] B. Zhao, Z. Tong, G. Zhao, R. Mu, H. Shang, Y. Guan, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2014**, *46*, 727–737.
- [135] S. Maguire, G. J. S. Lohman, S. Guan, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, e80–e80.
- [136] S. Müller, B. Appel, *RNA Biol.* **2017**, *14*, 1018–1027.
- [137] H. Chen, K. Cheng, X. Liu, R. An, M. Komiyama, X. Liang, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, e54–e54.
- [138] P. Obi, Y. G. Chen, *Methods* **2021**, *196*, 85–103.
- [139] N. Tanaka, A. K. Chakravarty, B. Maughan, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 43134–43143.
- [140] N. Tanaka, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7727–7731.
- [141] M. Englert, S. Xia, C. Okada, A. Nakamura, V. Tanavde, M. Yao, S. H. Eom, W. H. Konigsberg, D. Söll, J. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 15235–15240.
- [142] N. Muthmann, K. Hartstock, A. Rentmeister, *WIREs RNA* **2020**, *11*, 1–33.
- [143] Integrated DNA Technologies, *Chemical Synthesis and Purification of Oligonucleotides Contents*, **2011**.
- [144] Kinovate Life Sciences, “NitroPhase®HL Solid Support,” can be found under https://www.kinovate.com/downloads/04_NPHL_flyer_0415.pdf, **2015**.
- [145] S. Obika, M. Sekine, *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides*, Springer Singapore, Singapore, **2018**.
- [146] R. T. Pon, in *Protoc. Oligonucleotides Analog.*, Humana Press, New Jersey, **1993**, pp. 465–496.
- [147] M. H. Lyttle, D. Hudson, R. M. Cook, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2793–2798.
- [148] A. P. Guzaev, M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2380–2381.
- [149] E. Katz, *Magnetochemistry* **2019**, *5*, 61.
- [150] A. G. Pershina, A. E. Sazonov, V. D. Filimonov, *Russ. Chem. Rev.* **2014**, *83*, 299–322.
- [151] F. Damavandi, W. Wang, W.-Z. Shen, S. Cetinel, T. Jordan, J. Jovel, C. Montemagno, G. K.-S.

- Wong, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13053.
- [152] W. Sheng, W. Wei, J. Li, X. Qi, G. Zuo, Q. Chen, X. Pan, W. Dong, *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *387*, 1116–1124.
- [153] D. T. Nguyen, K.-S. Kim, *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, *31*, 1289–1305.
- [154] R. N. Grass, E. K. Athanassiou, W. J. Stark, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4909–4912.
- [155] C. G. Tan, R. N. Grass, *Chem. Commun.* **2008**, 4297.
- [156] C. Bian, Q. Zeng, H. Xiong, X. Zhang, S. Wang, *Bioelectrochemistry* **2010**, *79*, 1–5.
- [157] A. A. El-Gendy, E. M. M. Ibrahim, V. O. Khavrus, Y. Krupskaya, S. Hampel, A. Leonhardt, B. Büchner, R. Klingeler, *Carbon N. Y.* **2009**, *47*, 2821–2828.
- [158] O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad, M. Uhlén, *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 43–54.
- [159] M. Uhlen, *Nature* **1989**, *340*, 733–734.
- [160] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1–5.
- [161] X. Fan, J. Wang, X. Zhang, Z. Yang, J.-C. Zhang, L. Zhao, H.-L. Peng, J. Lei, H.-W. Wang, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2386.
- [162] B.-I. Haukanes, C. Kvam, *Nat. Biotechnol.* **1993**, *11*, 60–63.
- [163] C. M. Dundas, D. Demonte, S. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9343–9353.
- [164] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlén, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 501–510.
- [165] K. Tomaya, M. Takahashi, N. Minakawa, A. Matsuda, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3836–3839.
- [166] J. Olejnik, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 361–366.
- [167] X. Bai, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 535–541.
- [168] J. Cowell, M. Buck, A. H. Essa, R. Clarke, W. Vollmer, D. Vollmer, C. M. Hilkens, J. D. Isaacs, M. J. Hall, J. Gray, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1688–1691.
- [169] S. Fang, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 708–715.
- [170] S. Fang, Y. Guan, E. R. Blatchley, C. Shen, D. E. Bergstrom, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 592–597.
- [171] K. Cuddy, B. Foley, J. S. Jaffe, D. Gillespie, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2281–2281.
- [172] R. Wilson, *Nucleic Acid Ther.* **2011**, *21*, 437–440.
- [173] Y. Wang, K. Nakamura, X. Liu, N. Kitamura, A. Kubo, D. J. Hnatowich, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1338–1343.
- [174] N. Hégarat, G. M. Cardoso, F. Rusconi, J.-C. François, D. Praseuth, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e92.
- [175] T. Kojima, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e150–e150.
- [176] H. A. Marble, R. H. Davis, *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*, 393–396.
- [177] E. Takita, K. Kohda, H. Tomatsu, S. Hanano, K. Moriya, T. Hosouchi, N. Sakurai, H. Suzuki, A. Shinmyo, D. Shibata, *DNA Res.* **2014**, *21*, 727–727.
- [178] H. L. Sanger, G. Klotz, D. Riesner, H. J. Gross, A. K. Kleinschmidt, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73*, 3852–3856.
- [179] M.-T. Hsu, M. Coca-Prados, *Nature* **1979**, *280*, 339–340.
- [180] S. Memczak, M. Jens, A. Elefsinioti, F. Torti, J. Krueger, A. Rybak, L. Maier, S. D. Mackowiak, L. H. Gregersen, M. Munschauer, A. Loewer, U. Ziebold, M. Landthaler, C. Kocks, F. le Noble, N. Rajewsky, *Nature* **2013**, *495*, 333–338.
- [181] Z. Li, C. Huang, C. Bao, L. Chen, M. Lin, X. Wang, G. Zhong, B. Yu, W. Hu, L. Dai, P. Zhu, Z. Chang, Q. Wu, Y. Zhao, Y. Jia, P. Xu, H. Liu, G. Shan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 256–264.
- [182] I. Jost, L. A. Shalamova, G. K. Gerresheim, M. Niepmann, A. Bindereif, O. Rossbach, *RNA Biol.* **2018**, *15*, 1–8.
- [183] R. Micura, *Chem. - A Eur. J.* **1999**, *5*, 2077–2082.
- [184] N. I. Sokolova, D. T. Ashirbekova, N. G. Dolinnaya, Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **1988**, *232*, 153–155.
- [185] K. Murayama, H. Okita, T. Kuriki, H. Asanuma, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 804.
- [186] N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, O. I. Gryaznova, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3721–3738.

- [187] L. Wu, Y. Wang, J. Wu, C. Lv, J. Wang, X. Tang, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 677–686.
- [188] Y. Xu, E. T. Kool, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5595–5598.
- [189] M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10151–10152.
- [190] H. Maruyama, R. Oikawa, M. Hayakawa, S. Takamori, Y. Kimura, N. Abe, G. Tsuji, A. Matsuda, S. Shuto, Y. Ito, H. Abe, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 7042–7048.
- [191] M. B. Sturm, S. Roday, V. L. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5544–5550.
- [192] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 15329–15334.
- [193] L. Zapata, K. Bathany, J.-M. Schmitter, S. Moreau, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 1022–1028.
- [194] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [195] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [196] P. Seyfried, L. Eiden, N. Grebenovsky, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 359–363.
- [197] P. Müller, P. Seyfried, A. Frühauf, A. Heckel, in *Methods Enzymol.*, **2019**, pp. 89–111.
- [198] P. Müller, M. Sahlbach, S. Gasper, G. Mayer, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 22441–22446.
- [199] L. Yang, H. B. Kim, J.-Y. Sul, S. B. Yeldell, J. H. Eberwine, I. J. Dmochowski, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1250–1254.
- [200] C. Wang, D. Ikhlef, S. Kahlal, J. Y. Saillard, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *316*, 1–20.
- [201] L. Wang, D. E. Ruffner, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2502–2504.
- [202] T. Zhou, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e173–e173.
- [203] P. J. Hagerman, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 265–286.
- [204] F. J. Mearns, E. L. S. Wong, K. Short, D. B. Hibbert, J. J. Gooding, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1971–1981.
- [205] X. Tang, M. Su, L. Yu, C. Lv, J. Wang, Z. Li, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3848–3855.
- [206] A. Besaratinia, J. Yoon, C. Schroeder, S. E. Bradforth, M. Cockburn, G. P. Pfeifer, *FASEB J.* **2011**, *25*, 3079–3091.
- [207] G. J. Clydesdale, G. W. Dandie, H. K. Muller, *Immunol. Cell Biol.* **2001**, *79*, 547–568.
- [208] T. J. McMillan, E. Leatherman, A. Ridley, J. Shorrocks, S. E. Tobi, J. R. Whiteside, *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 969–976.
- [209] R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272.
- [210] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
- [211] N. Ankenbruck, T. Courtney, Y. Naro, A. Deiters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2768–2798.
- [212] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [213] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 697–699.
- [214] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 7–11.
- [215] L. Josa-Culleré, A. Llebaria, *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 296–314.
- [216] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458.
- [217] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [218] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [219] J. H. Kaplan, G. C. Ellis-Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6571–6575.
- [220] H. Bayley, C.-Y. Chang, W. Todd Miller, B. Niblack, P. Pan, in *Methods Enzymol.*, **1998**, pp. 117–135.
- [221] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333–6335.
- [222] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [223] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [224] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [225] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.

- [226] R. O. Schoenleber, B. Giese, *Synlett* **2003**, 0501–0504.
- [227] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40.
- [228] A. Treibs, F.-H. Kreuzer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208–223.
- [229] J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrman, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7343–7346.
- [230] A. P. Gorka, R. R. Nani, J. Zhu, S. Mackem, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [231] R. R. Nani, A. P. Gorka, T. Nagaya, H. Kobayashi, M. J. Schnermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13635–13638.
- [232] G. Zheng, L. Cochella, J. Liu, O. Hobert, W. H. Li, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1332–1338.
- [233] J. C. Gripenburg, B. K. Ruble, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6198–6204.
- [234] F. Schäfer, J. Wagner, A. Knau, S. Dimmeler, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13558–13561.
- [235] W. F. Cheong, S. A. Prah, A. J. Welch, *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, *26*, 2166–2185.
- [236] V. V. Tuchin, *Physics-Uspekhi* **1997**, *40*, 495–515.
- [237] M. Bojtár, A. Kormos, K. Kis-Petik, M. Kellermayer, P. Kele, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 9410–9414.
- [238] M. Bojtár, K. Németh, F. Domahidy, G. Knorr, A. Verkman, M. Kállay, P. Kele, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164–15171.
- [239] M. P. Johnson, *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 255–273.
- [240] K. Gundlach, M. Werwie, S. Wiegand, H. Paulsen, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2009**, *1787*, 1499–1504.
- [241] J. M. Dąbrowski, B. Pucelik, A. Regiel-Futyra, M. Brindell, O. Mazuryk, A. Kyzioł, G. Stochel, W. Macyk, L. G. Arnaut, *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67–101.
- [242] A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710–711.
- [243] R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- [244] A. Gandioso, M. Palau, A. Nin-Hill, I. Melnyk, C. Rovira, S. Nonell, D. Velasco, J. García-Amorós, V. Marchán, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 375–384.
- [245] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3783–3786.
- [246] N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller, R. Weinstein, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6369–6372.
- [247] E. Palao, T. Slanina, L. Muchová, T. Šolomek, L. Vítek, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 126–133.
- [248] A. Rodrigues-Correia, P. Seyfried, A. Heckel, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2014**, *57*, 6.11.1-6.11.32.
- [249] V. San Miguel, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5380–5388.
- [250] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358–3377.
- [251] Y. Becker, E. Unger, M. A. H. Fichte, D. A. Gacek, A. Dreuw, J. Wachtveitl, P. J. Walla, A. Heckel, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 2797–2802.
- [252] M. Abe, Y. Chitose, S. Jakkampudi, P. Thuy, Q. Lin, B. Van, A. Yamada, R. Oyama, M. Sasaki, C. Katan, *Synthesis* **2017**, *49*, 3337–3346.
- [253] M. A. H. Fichte, X. M. M. Weyel, S. Junek, F. Schäfer, C. Herbivo, M. Goeldner, A. Specht, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8948–8952.
- [254] J. P. Olson, H.-B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954–5957.
- [255] M. Kathan, S. Hecht, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5536–5550.
- [256] J. Volarić, W. Szymanski, N. A. Simeth, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12377–12449.
- [257] Y. Hirshberg, E. Fischer, *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 1723–1723.
- [258] G. S. Hartley, *Nature* **1937**, *140*, 281–281.
- [259] H. Fliegl, A. Köhn, C. Hättig, R. Ahlrichs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9821–9827.
- [260] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422.
- [261] C. Brown, S. K. Rastogi, S. L. Barrett, H. E. Anderson, E. Twichell, S. Gralinski, A. McDonald,

- W. J. Brittain, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2017**, *336*, 140–145.
- [262] A. R. Dias, M. E. Minas Da Piedade, J. A. Martinho Simões, J. A. Simoni, C. Teixeira, H. P. Diogo, Y. Meng-Yan, G. Pilcher, *J. Chem. Thermodyn.* **1992**, *24*, 439–447.
- [263] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809–1825.
- [264] S. Crespi, N. A. Simeth, B. König, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 133–146.
- [265] W. Moormann, T. Tellkamp, E. Stadler, F. Röhricht, C. Näther, R. Puttreddy, K. Rissanen, G. Gescheidt, R. Herges, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 15081–15086.
- [266] T. Kolmar, A. Becker, R. A. Pfretzschner, A. Lelke, A. Jäschke, *Chem. – A Eur. J.* **2021**, *27*, 17386–17394.
- [267] M. Dong, A. Babalhavaeji, S. Samanta, A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2662–2670.
- [268] D. Bléger, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11338–11349.
- [269] N. Koumura, R. W. J. Zijlstra, R. A. van Delden, N. Harada, B. L. Feringa, *Nature* **1999**, *401*, 152–155.
- [270] I. Aprahamian, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 347–358.
- [271] D. Roke, S. J. Wezenberg, B. L. Feringa, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 9423–9431.
- [272] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261.
- [273] M. Zhu, H. Zhou, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8434–8445.
- [274] G. Cabré, A. Garrido-Charles, M. Moreno, M. Bosch, M. Porta-de-la-Riva, M. Krieg, M. Gascón-Moya, N. Camarero, R. Gelabert, J. M. Lluch, F. Busqué, J. Hernando, P. Gorostiza, R. Alibés, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, DOI 10.1038/s41467-019-08796-9.
- [275] V. Arkhipova, H. Fu, M. W. H. Hoorens, G. Trinco, L. N. Lameijer, E. Marin, B. L. Feringa, G. J. Poelarends, W. Szymanski, D. J. Slotboom, A. Guskov, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 1513–1520.
- [276] S. D. Pritzl, D. B. Konrad, M. F. Ober, A. F. Richter, J. A. Frank, B. Nickel, D. Trauner, T. Lohmüller, *Langmuir* **2022**, *38*, 385–393.
- [277] M. Doroudgar, J. Morstein, J. Becker-Baldus, D. Trauner, C. Glaubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 9515–9528.
- [278] J. Morstein, A. C. Impastato, D. Trauner, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 73–83.
- [279] A. Heckel, M. C. R. Buff, M.-S. L. Raddatz, J. Müller, B. Pötzsch, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6748–6750.
- [280] C. Helmling, D.-P. Klötzner, F. Sochor, R. A. Mooney, A. Wacker, R. Landick, B. Fürtig, A. Heckel, H. Schwalbe, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 944.
- [281] L. Zhang, D. Liang, Y. Wang, D. Li, J. Zhang, L. Wu, M. Feng, F. Yi, L. Xu, L. Lei, Q. Du, X. Tang, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 44–51.
- [282] T. Lucas, F. Schäfer, P. Müller, S. A. Eming, A. Heckel, S. Dimmeler, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15162.
- [283] B. K. Ruble, S. B. Yeldell, I. J. Dmochowski, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *150*, 182–188.
- [284] Y. Wu, Z. Yang, Y. Lu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *57*, 95–104.
- [285] L. Yang, I. J. Dmochowski, *Molecules* **2021**, *26*, 1481.
- [286] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471–473.
- [287] G. Mayer, L. Kröck, V. Mikat, M. Engeser, A. Heckel, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1966–1970.
- [288] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7305–7309.
- [289] P. Wenter, B. Fürtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2600–2603.
- [290] P. Wenter, B. Fürtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsch, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 417–420.
- [291] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895–20900.
- [292] H. Ando, T. Furuta, R. Y. T sien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [293] S. Chaulk, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3173–3178.
- [294] S. Keyhani, T. Goldau, A. Blümmler, A. Heckel, H. Schwalbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12017–12021.

- [295] S. Boháčová, L. Ludvíková, L. Poštová Slavětínská, Z. Vaníková, P. Klán, M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1527–1535.
- [296] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, J. A. Yoder, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [297] A. Deiters, R. A. Garner, H. Lusic, J. M. Govan, M. Dush, N. M. Nascone-Yoder, J. A. Yoder, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15644–15650.
- [298] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–2748.
- [299] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [300] Q. Liu, A. Deiters, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 45–55.
- [301] X. Xu, L. Xiao, C. Gu, J. Shang, Y. Xiang, *ACS Omega* **2021**, *6*, 13153–13160.
- [302] J. Hemphill, J. Govan, R. Uprety, M. Tsang, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7152–7158.
- [303] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [304] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570–9571.
- [305] J. L. Richards, X. Tang, A. Turetsky, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6255–6258.
- [306] J. Hemphill, Q. Liu, R. Uprety, S. Samanta, M. Tsang, R. L. Juliano, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3656–3662.
- [307] I. A. Shestopalov, S. Sinha, J. K. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 650–651.
- [308] X. M. M. Weyel, M. A. H. Fichte, A. Heckel, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2183–2190.
- [309] J. C. Griepenburg, T. L. Rapp, P. J. Carroll, J. Eberwine, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2342–2346.
- [310] A. S. Lubbe, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1052–1079.
- [311] K. E. Darrah, A. Deiters, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 13253–13267.
- [312] C. Wang, M. P. O’Hagan, Z. Li, J. Zhang, X. Ma, H. Tian, I. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 720–760.
- [313] S. Mori, K. Morihiro, S. Obika, *Molecules* **2014**, *19*, 5109–5118.
- [314] M. Liu, H. Jinmei, H. Abe, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2964–2967.
- [315] N. Grebenovsky, V. Hermanns, A. Heckel, *ChemPhotoChem* **2020**, *4*, 5245–5248.
- [316] H. Asanuma, T. Yoshida, T. Ito, M. Komiyama, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7995–7998.
- [317] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 17870–17876.
- [318] N. Grebenovsky, L. Luma, P. Müller, A. Heckel, *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25*, 12298–12302.
- [319] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. Liang, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393–2395.
- [320] K. Yamana, A. Yoshikawa, H. Nakano, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 637–640.
- [321] L. Wu, K. Koumoto, N. Sugimoto, *Chem. Commun.* **2009**, *1*, 1915.
- [322] L. Wu, Y. Wu, H. Jin, L. Zhang, Y. He, X. Tang, *Medchemcomm* **2015**, *6*, 461–468.
- [323] J. Thevarpadam, I. Bessi, O. Binas, D. P. N. Gonçalves, C. Slavov, H. R. A. Jonker, C. Richter, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2738–2742.
- [324] H. Asanuma, D. Matsunaga, M. Komiyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 35–36.
- [325] Y. Nakasone, H. Ooi, Y. Kamiya, H. Asanuma, M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9001–9004.
- [326] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [327] L. Trantírek, R. Štefl, M. Vorlíčková, J. Koča, V. Sklenář, J. Kypr, *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 907–922.
- [328] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Acta Crystallogr.* **1953**, *6*, 673–677.
- [329] P. Svoboda, A. D. Cara, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 901–908.
- [330] S. J. Green, D. Lubrich, A. J. Turberfield, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2966–2975.
- [331] P. J. McCown, K. A. Corbino, S. Stav, M. E. Sherlock, R. R. Breaker, *RNA* **2017**, *23*, 995–1011.
- [332] R. T. Batey, *Q. Rev. Biophys.* **2012**, *45*, 345–381.
- [333] J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem.* **2020**, *2*, 123–136.
- [334] J. T. Grün, H. Schwalbe, *Biopolymers* **2022**, *113*, 1–15.

- [335] M. D. Berg, C. J. Brandl, *RNA Biol.* **2021**, *18*, 316–339.
- [336] R. R. Breaker, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 427–431.
- [337] J. Wirmer-Bartoschek, H. Schwalbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5376–5377.
- [338] E. A. Doherty, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 457–475.
- [339] J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Genome Biol.* **2007**, *8*, R239.
- [340] J. N. Kim, R. R. Breaker, *Biol. Cell* **2008**, *100*, 1–11.
- [341] M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecnik, *J. Biol. Chem.* **1958**, *231*, 241–257.
- [342] C. Lorenz, C. Lünse, M. Mörl, *Biomolecules* **2017**, *7*, 35.
- [343] P. Schimmel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 45–58.
- [344] S. H. Kim, G. J. Quigley, F. L. Suddath, A. McPherson, D. Sneden, J. J. Kim, J. Weinzierl, A. Rich, *Science* **1973**, *179*, 285–288.
- [345] H. Shi, P. B. Moore, *RNA* **2000**, *6*, S1355838200000364.
- [346] Schrödinger, **2021**.
- [347] C. Brandmayr, M. Wagner, T. Brückl, D. Globisch, D. Pearson, A. C. Kneuttinger, V. Reiter, A. Hienzsch, S. Koch, I. Thoma, P. Thumbs, S. Michalakakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11162–11165.
- [348] K. Hoogsteen, *Acta Crystallogr.* **1963**, *16*, 907–916.
- [349] D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**, *334*, 364–366.
- [350] A. Wong, G. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13895–13905.
- [351] J. Jana, S. Mohr, Y. M. Vianney, K. Weisz, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 338–353.
- [352] I. Frasson, V. Pirota, S. N. Richter, F. Doria, *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *204*, 89–102.
- [353] A. Maity, F. R. Winnerdy, W. D. Chang, G. Chen, A. T. Phan, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 3315–3327.
- [354] A. Varizhuk, D. Ischenko, V. Tsvetkov, R. Novikov, N. Kulemin, D. Kaluzhny, M. Vlasenok, V. Naumov, I. Smirnov, G. Pozmogova, *Biochimie* **2017**, *135*, 54–62.
- [355] H. L. Lightfoot, T. Hagen, N. J. Tatum, J. Hall, *FEBS Lett.* **2019**, *593*, 2083–2102.
- [356] T. M. Bryan, *Molecules* **2019**, *24*, 3439.
- [357] N. Kim, *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 2898–2917.
- [358] P. Murat, G. Marsico, B. Herdy, A. Ghanbarian, G. Portella, S. Balasubramanian, *Genome Biol.* **2018**, *19*, 229.
- [359] P. Lejault, J. Mitteau, F. R. Sperti, D. Monchaud, *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 436–455.
- [360] T. M. Bryan, *Molecules* **2020**, *25*, 3686.
- [361] D. Müller, I. Bessi, C. Richter, H. Schwalbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10895–10901.
- [362] S. Neidle, *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100553.
- [363] S. Neidle, M. Sanderson, in *Principles of Nucleic Acid Structure* (Eds.: S. Neidle, M. Sanderson), Academic Press, **2022**, pp. 1–28.
- [364] Z. Luo, M. Dauter, Z. Dauter, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70*, 1790–1800.
- [365] E. Westhof, *RNA* **2015**, *21*, 486–487.
- [366] N. Pujari, S. L. Saundh, F. A. Acquah, B. H. M. Mooers, A. R. Ferré-D’Amaré, A. K.-W. Leung, *Crystals* **2021**, *11*, 952.
- [367] X. Wang, E. Alnabati, T. W. Aderinwale, S. R. Maddhuri Venkata Subramaniya, G. Terashi, D. Kihara, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2302.
- [368] E. Bertosin, P. Stömmer, E. Feigl, M. Wenig, M. N. Honemann, H. Dietz, *ACS Nano* **2021**, *15*, 9391–9403.
- [369] Y. Takizawa, H. Tanaka, S. Machida, M. Koyama, K. Maehara, Y. Ohkawa, P. A. Wade, M. Wolf, H. Kurumizaka, *Open Biol.* **2018**, *8*, 170255.
- [370] A. Pyne, R. Thompson, C. Leung, D. Roy, B. W. Hoogenboom, *Small* **2014**, *10*, 3257–3261.
- [371] A. L. B. Pyne, A. Noy, K. H. S. Main, V. Velasco-Berrelleza, M. M. Piperakis, L. A. Mitchenall, F. M. Cugliandolo, J. G. Beton, C. E. M. Stevenson, B. W. Hoogenboom, A. D. Bates, A. Maxwell, S. A. Harris, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1053.
- [372] Y. Xin, A. A. Zargariantabrizi, G. Grundmeier, A. Keller, *Molecules* **2021**, *26*, 4798.
- [373] M. Adrian, B. Heddi, A. T. Phan, *Methods* **2012**, *57*, 11–24.

- [374] A. Kotar, H. N. Foley, K. M. Baughman, S. C. Keane, *Methods* **2020**, *183*, 93–107.
- [375] R. Schnieders, S. Keyhani, H. Schwalbe, B. Fürtig, *Chem. – A Eur. J.* **2020**, *26*, 102–113.
- [376] M. Marušič, J. Schlagnitweit, K. Petzold, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 2685–2710.
- [377] J. R. Bothe, E. N. Nikolova, C. D. Eichhorn, J. Chugh, A. L. Hansen, H. M. Al-Hashimi, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 919–931.
- [378] R. Schnieders, B. Knezic, H. Zetzsche, A. Sudakov, T. Matzel, C. Richter, M. Hengesbach, H. Schwalbe, B. Fürtig, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2020**, *82*, 1–73.
- [379] C. Helmling, A. Wacker, M. T. Wolfinger, I. L. Hofacker, M. Hengesbach, B. Fürtig, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2647–2656.
- [380] C. Helmling, S. Keyhani, F. Sochor, B. Fürtig, M. Hengesbach, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2015**, *63*, 67–76.
- [381] A. Gato, M. Catala, C. Tisné, P. Barraud, in *Methods Mol. Biol.*, **2021**, pp. 307–323.
- [382] P. Barraud, A. Gato, M. Heiss, M. Catala, S. Kellner, C. Tisné, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3373.
- [383] T. Biedenbänder, V. de Jesus, M. Schmidt-Dengler, M. Helm, B. Corzilius, B. Fürtig, *Nucleic Acids Res.* **2022**, 1–16.
- [384] J. T. Grün, C. Hennecker, D.-P. Klötzner, R. W. Harkness, I. Bessi, A. Heckel, A. K. Mittermaier, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 264–273.
- [385] J. Wirmer-Bartoschek, L. E. Bendel, H. R. A. Jonker, J. T. Grün, F. Papi, C. Bazzicalupi, L. Messori, P. Gratteri, H. Schwalbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7102–7106.
- [386] A. Blümmler, H. Schwalbe, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, DOI 10.1002/anie.202111613.
- [387] N. Rublack, S. Müller, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1906–1913.
- [388] Bio-Rad Laboratories, **2020**.
- [389] O. Pikovskaya, A. Polonskaia, D. J. Patel, A. Serganov, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 748–755.
- [390] I. Seven, T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, S. Brüß, I. Krstić, T. F. Prisner, A. Heckel, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 4037–4043.
- [391] T. M. Haas, P. Ebensperger, V. B. Eisenbeis, C. Nopper, T. Dürr, N. Jork, N. Steck, C. Jessen-Trefzer, H. J. Jessen, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 5339–5342.
- [392] N. Li, N. M. El Zahar, J. G. Saad, E. R. E. van der Hage, M. G. Bartlett, *J. Chromatogr. A* **2018**, *1580*, 110–119.
- [393] M. Enmark, M. Rova, J. Samuelsson, E. Örnkov, F. Schweikart, T. Fornstedt, *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 3383–3394.
- [394] S. Verma, F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 99–134.
- [395] M. Flamme, S. Hanlon, H. Iding, K. Puentener, F. Sladojevich, M. Hollenstein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *48*, 128242.
- [396] S. A. Cifrá, M. Rinaldi, P. Gasparini, D. Seripa, L. Bisceglia, L. Zelante, M. G. Farace, V. M. Fazio, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4134–4142.
- [397] D. B. Munafó, G. B. Robb, *RNA* **2010**, *16*, 2537–2552.
- [398] E. M. Schneider, M. Zeltner, V. Zlateski, R. N. Grass, W. J. Stark, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 938–941.
- [399] M. Golomb, M. Chamberlin, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2858–2863.
- [400] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [401] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16.
- [402] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1821–1826.
- [403] R. K. Pathak, C. D. McNitt, V. V. Popik, S. Dhar, *Chem. – A Eur. J.* **2014**, *20*, 6861–6865.
- [404] K. N. Jayaprakash, C. G. Peng, D. Butler, J. P. Varghese, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5410–5413.
- [405] K. Furusawa, T. Katsura, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 887–890.
- [406] W. T. Markiewicz, E. Biala, R. Kierzek, *Bull. Polish Acad. Sci.* **1984**, *32*, 433–451.
- [407] B. Ren, L. Cai, L.-R. Zhang, Z.-J. Yang, L.-H. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8083–8086.
- [408] S. Cory, K. A. Marcker, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *12*, 177–194.
- [409] M. Zuker, “The UNAFold Web Server,” can be found under

- <http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>, **2003**.
- [410] M. Chauleau, S. Shuman, *RNA* **2013**, *19*, 1840–1847.
- [411] M. Moore, P. Sharp, *Science* **1992**, *256*, 992–997.
- [412] S. Petkovic, S. Müller, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 2454–2465.
- [413] C. J. Kershaw, R. T. O’Keefe, in *Methods Mol. Biol.*, **2013**, pp. 257–269.
- [414] Y. Oda, J. Chiba, F. Kurosaki, Y. Yamade, M. Inouye, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1945–1952.
- [415] Z.-X. Xiao, H.-M. Cao, X.-H. Luan, J.-L. Zhao, D.-Z. Wei, J.-H. Xiao, *Mol. Biotechnol.* **2007**, *35*, 129–133.
- [416] A. K. Chakravarty, R. Subbotin, B. T. Chait, S. Shuman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 6072–6077.
- [417] C. Chen, Z. Wang, N. Jing, W. Chen, X. Tang, *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 12–21.
- [418] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491–496.
- [419] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature* **1996**, *14*, 303–308.
- [420] Y. V. Tarasenko, T. V. Abramova, V. I. Mamatuk, V. N. Silnikov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2016**, *35*, 32–42.
- [421] R. Klimek, P. G. Donlin-Asp, C. Polisseni, V. Hanff, E. M. Schuman, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 12683–12686.
- [422] D. Proudnikov, A. Mirzabekov, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4535–4542.
- [423] Y.-F. Li, *J. Drug Discov. Dev. Deliv.* **2016**, *3*, 1021.
- [424] R. W. Harkness, C. Hennecker, J. T. Grün, A. Blümmler, A. Heckel, H. Schwalbe, A. K. Mittermaier, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 1247–1262.
- [425] J. T. Grün, A. Blümmler, I. Burkhart, J. Wirmer-Bartoschek, A. Heckel, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6185–6193.
- [426] K. F. Hohmann, A. Blümmler, A. Heckel, B. Fürtig, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 11337–11349.
- [427] P. Potier, A. Abdennaji, J.-P. Behr, *Chemistry (Easton)*. **2000**, *6*, 4188–4194.
- [428] O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380–2382.
- [429] K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, K. V. P. P. Kumar, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.
- [430] A. M. Fleming, J. Zhou, S. S. Wallace, C. J. Burrows, *ACS Cent. Sci.* **2015**, *1*, 226–233.
- [431] O. Mayer, L. Rajkowitsch, C. Lorenz, R. Konrat, R. Schroeder, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1257–1269.
- [432] M. Doetsch, T. Gstrein, R. Schroeder, B. Fürtig, *RNA Biol.* **2010**, *7*, 735–743.
- [433] C. Mills, *J. Chem. Soc., Trans.* **1895**, *67*, 925–933.
- [434] Eurofins Genomics Germany GmbH, “Oligo Analyse Tool,” can be found under <https://eurofinsgenomics.eu/de/ecom/tools/oligo-analysis/>, **2022**.
- [435] Glen Research, *Deprotection Guide*, **2020**.