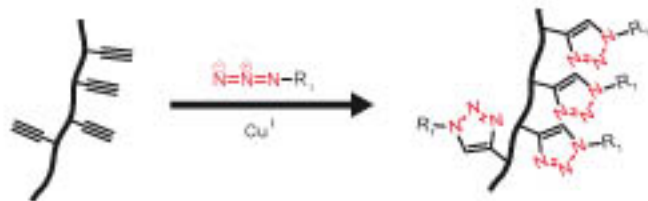


Johannes Gierlich

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



Cuvillier Verlag Göttingen

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

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

vorgelegt von
Johannes Gierlich
aus
Ludwigshafen/Rhein

2007

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

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

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

978-3-86727-313-8

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 1.3.2007



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

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

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

1. Auflage, 2007
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-313-8

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

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

Teile dieser Arbeit wurden bereits oder werden publiziert:

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

* * *

Während der Arbeit wurde auch an anderen Projekten mitgearbeitet:

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

Inhaltsverzeichnis

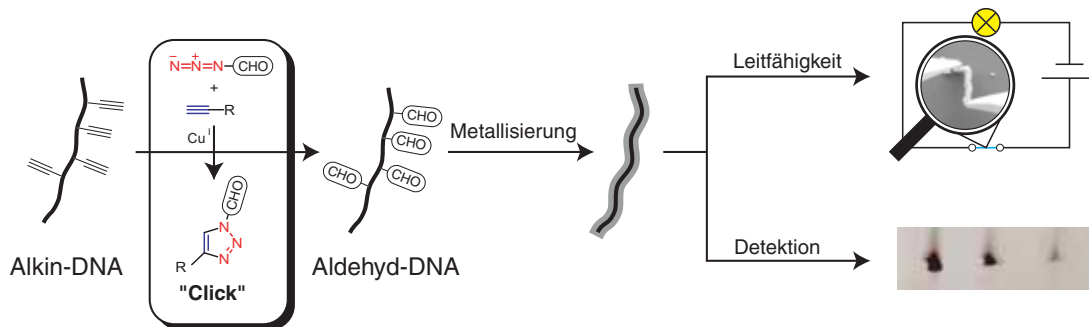
Zusammenfassung	xi
Summary	xiii
1. Einleitung	1
1.1. Festphasensynthese	3
1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	5
1.3. Postsynthetische Modifikation	6
2. Aufgabenstellung	8
3. Modifikationen an DNA	10
4. 1,3-Dipolare Cycloaddition an DNA („Click“-Chemie)	13
4.1. Einleitung	13
4.2. 1,3-Dipolare Cycloadditionen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

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

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

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

Zusammenfassung



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

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

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

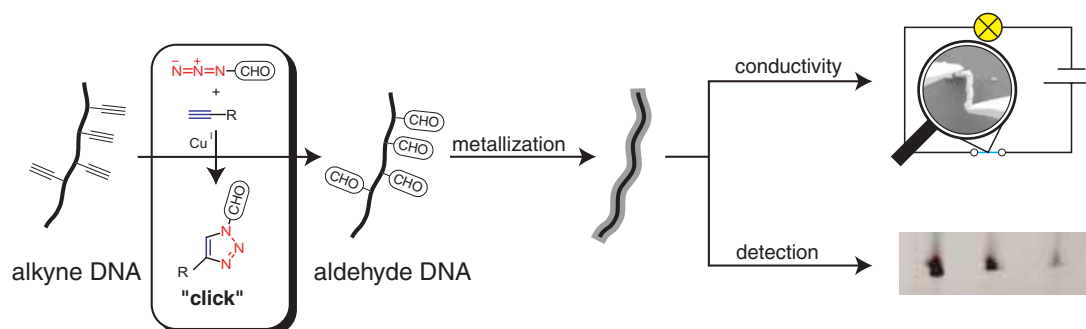
In Kooperation mit Prof. *Reinhoudt* an der Universität Twente wurde Alkin-DNA erfolgreich im *microcontact printing* (μ CP) auf azidmodifizierten Glasoberflächen verwendet. Um die DNA ohne Störung ihrer Struktur zu immobilisieren, wurden neue Festphasenmonomere für terminale Alkine synthetisiert. Diese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

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

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

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

Summary



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

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

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

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

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

1. Einleitung

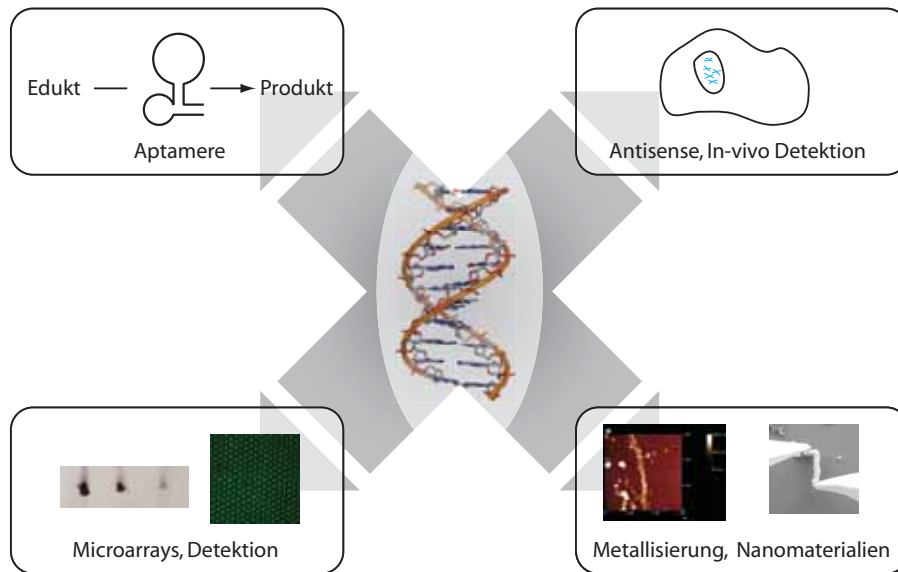


Abbildung 1.1: Verschiedene Anwendungen von DNA von Diagnostik bis hin zu Nanomaterialien (Bilder: D. Rożkiewicz, M. Fischler, Macmillan Publishers Ltd: *Nature*, © 1998).

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

1. Einleitung

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

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

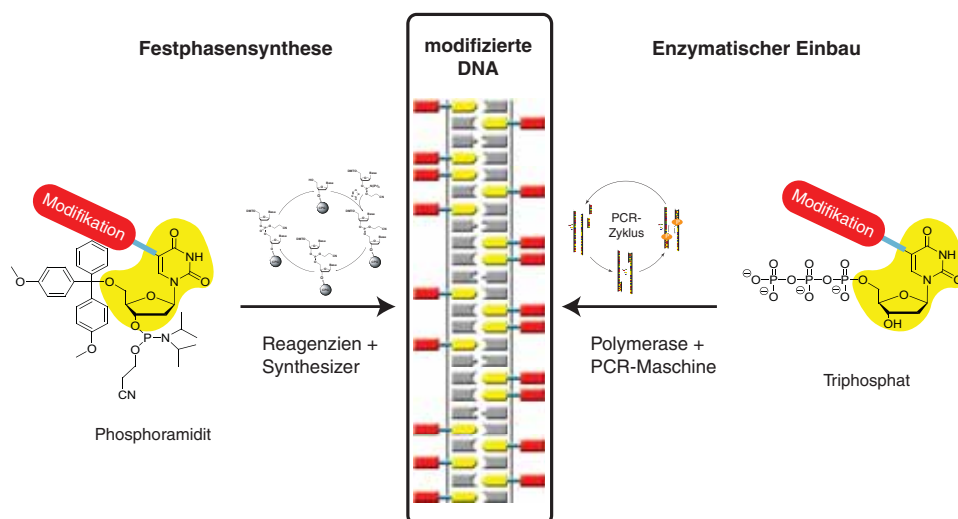


Abbildung 1.2: Verschiedene Methoden für die Herstellung von DNA durch Festphasensynthese mit Hilfe von Phosphoramiditchemie (links) oder durch enzymatischen Einbau des Triphosphats (rechts).

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

1.1. Festphasensynthese

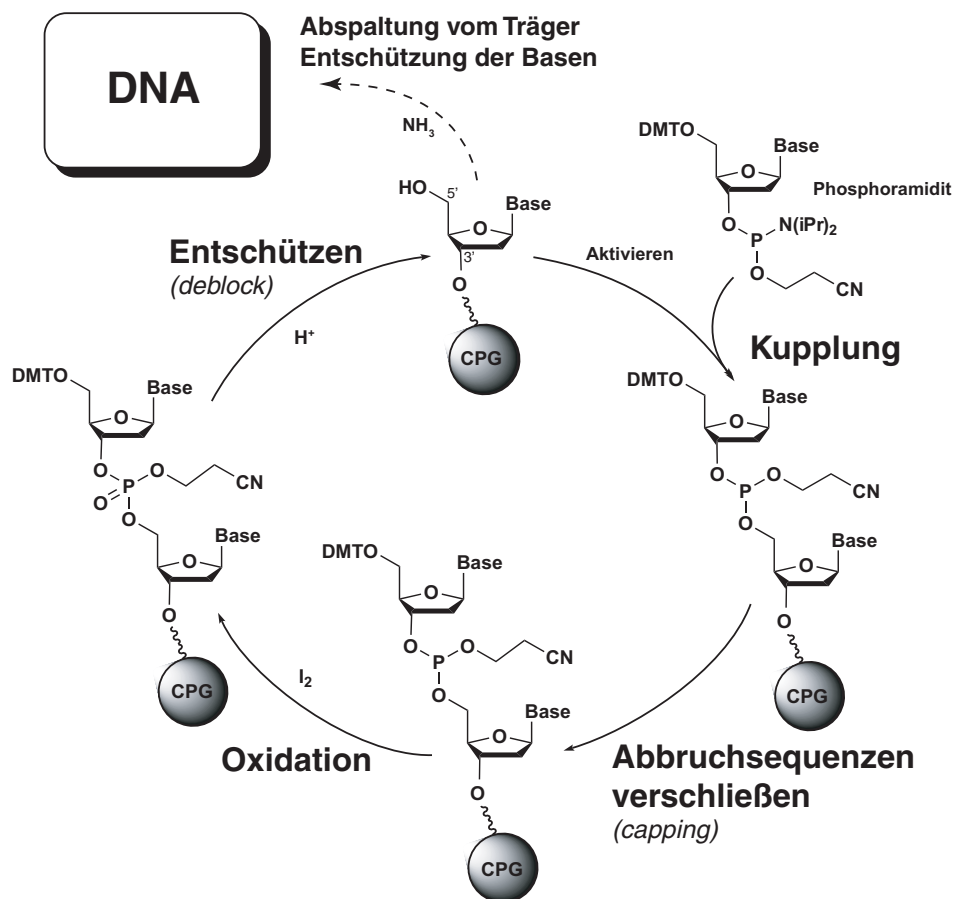


Abbildung 1.3: Prinzip der Festphasensynthese von DNA mit DMT-Phosphoramiditchemie.

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

1. Einleitung

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

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

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

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

1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

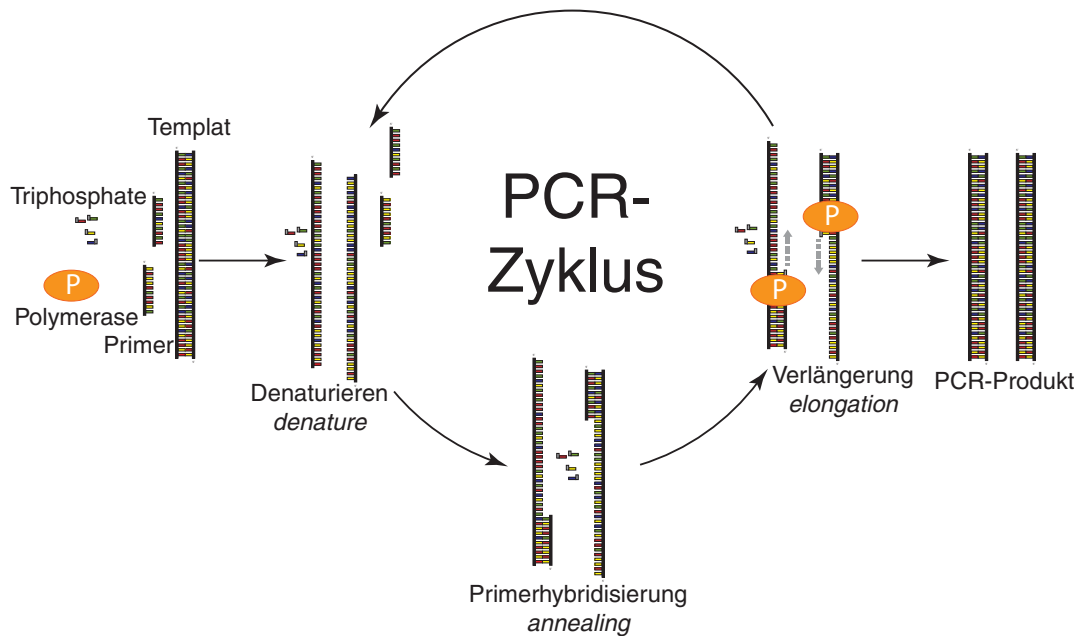


Abbildung 1.4: Das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR).

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

1. Einleitung

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

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

1.3. Postsynthetische Modifikation

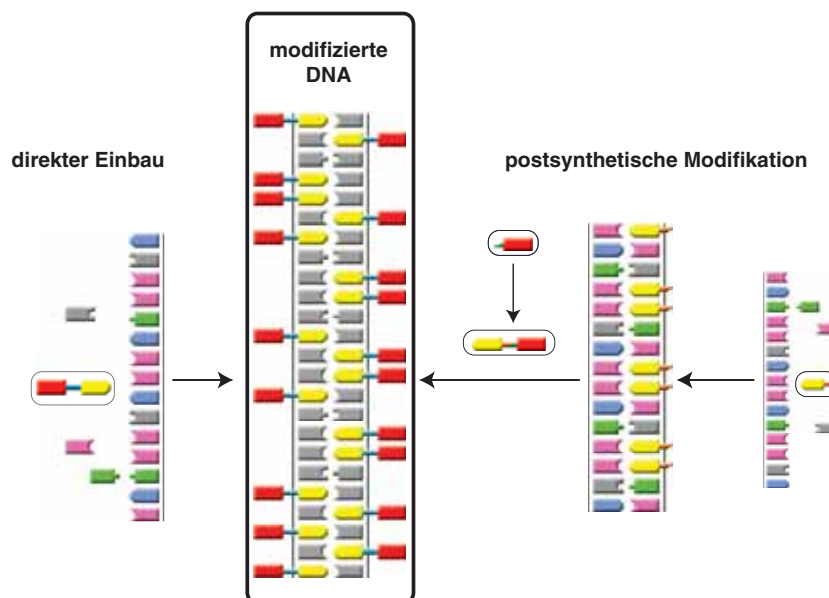


Abbildung 1.5: Verschiedene Wege zum Aufbau modifizierter DNA durch direkten Einbau einer modifizierten Base (links) oder durch Einbau einer Gruppe, welche nach der Synthese eine selektive Reaktion zulässt (rechts).

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

2. Aufgabenstellung

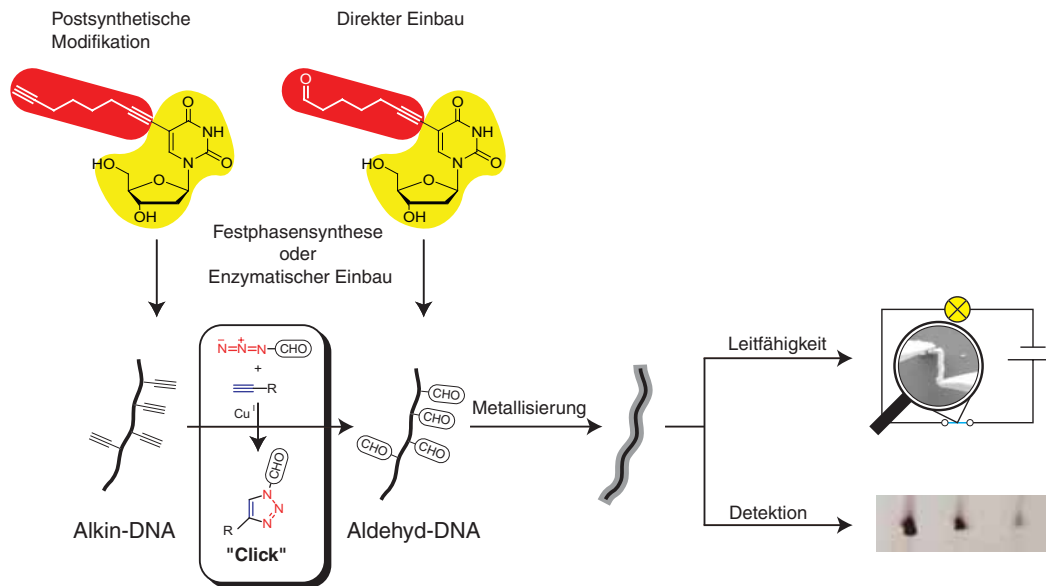


Abbildung 2.1: Funktionalisierung von Alkin-DNA mit Hilfe der 1,3-dipolaren Cycloaddition mit Aldehyden zur Abscheidung von Metallen.

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

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

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

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

3. Modifikationen an DNA

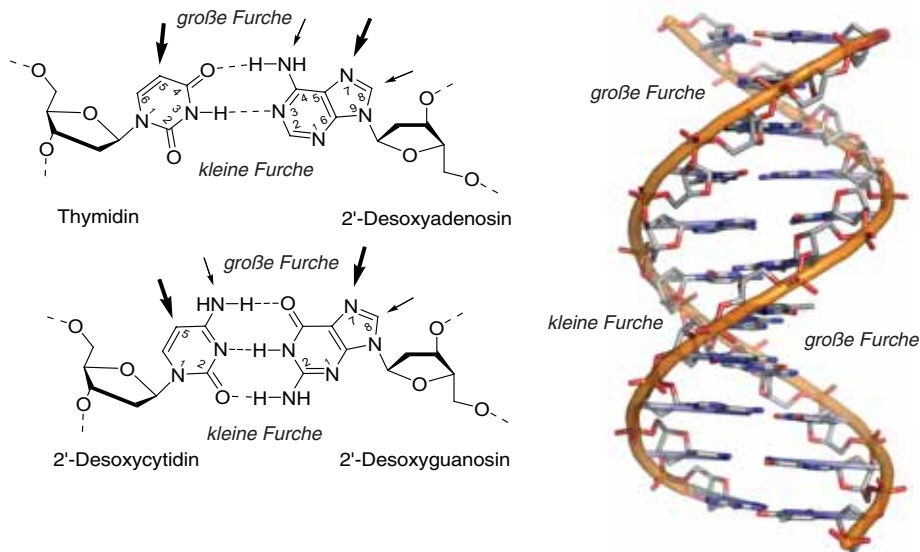


Abbildung 3.1: Basenpaarung in DNA (links); Die Struktur der B-DNA (rechts). Die Pfeile geben die Positionen zur Einführung von Modifikationen an DNA-Basen an (Die Nummerierung der Purine weicht von der IUPAC-Nummerierung ab).

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

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

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

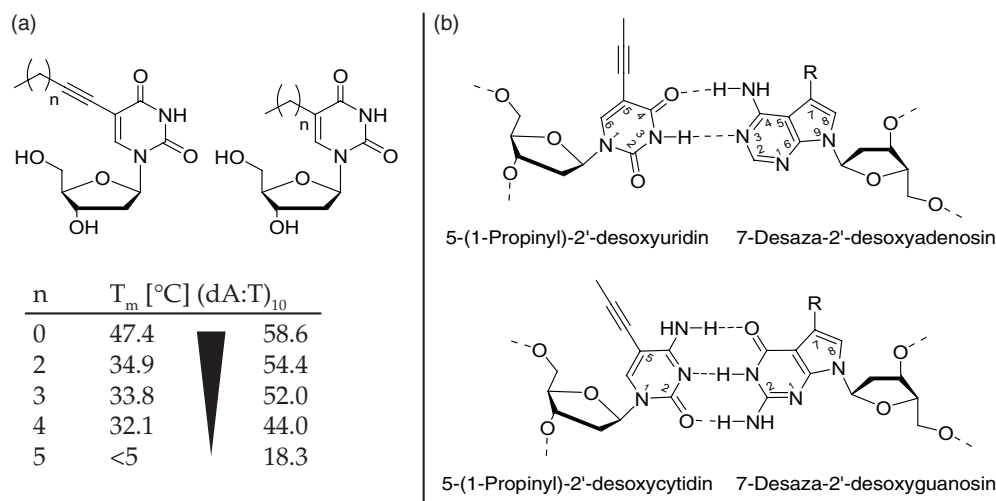


Abbildung 3.2: Links: Schmelzpunkte von modifizierten (dA:T)₁₀-Oligonukleotiden mit unterschiedlich langen Alkylketten (gemessen in 0.1 M NaCl, 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.2), 2 mM MgCl₂)^[11] Rechts: Basenpaarung von 5-Propinyl-Pyrimidinen und 7-Desazapurinen.

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

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