

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-diänyl)-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
	vii

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-diäthynyl)-2'-desoxyuridin (10)	126
8.2.3. Synthese von 5-(Okta-1,7-diäthynyl)-2'-desoxyuridin (12)	130
8.2.4. Synthese von 7-Desaza-7-(okta-1,7-diäthynyl)-2'-desoxyguanosin (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-äthynyl)-5'-O-triphosphat-2'-desoxyuridin (66) und 5-(5-(1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O- α -D-galactopyranosyl)-pent-1-äthynyl)-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