

Postsynthetische DNA-Modifizierung mithilfe der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition

Philipp M. E. Gramlich, Christian T. Wirges, Antonio Manetto und Thomas Carell*

Biokonjugation · DNA · Festphasensynthesen · Klickchemie · Polymerasekettenreaktion

Die Markierung von DNA ist von größter Bedeutung für die Biomedizin und bildet die Basis für die Konstruktion DNA-basierter funktionaler Nanomaterialien. Seit kurzem zählt die Kupfer(I)-katalysierte Huisgen-Cycloaddition von Aziden mit Alkinen (CuAAC) zum Repertoire der DNA-Markierungsmethoden. Diese Methode ermöglicht die Modifizierung von DNA mit beispielloser Effizienz. Nicht nur kleine Oligonucleotide, sondern auch ganze Genfragmente können so hochgradig chemisch modifiziert werden. Die CuAAC-Reaktion liefert die markierten Polynukleotide, meist nach einfacher Ausfällung, in ausgezeichneter Reinheit und ist auf dem besten Wege, die Synthese funktionalisierter DNA-Stränge zu revolutionieren. Die Methode wird von entscheidender Bedeutung für die Erzeugung neuer diagnostischer Systeme und für die nanotechnologische Forschung sein.

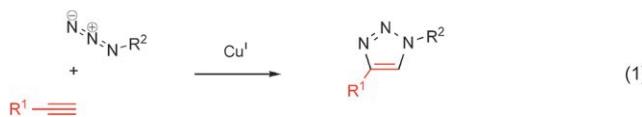
1. Einleitung

Die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden mit Alkinen – die Huisgen-Reaktion^[1] – wird seit kurzem für eine große Zahl neuer Anwendungen eingesetzt,^[2] (ca. 1000 Publikationen) nachdem entdeckt wurde, dass sie effizient durch Kupfer(I) katalysiert werden kann [Gl. (1)].^[3] Die mehrstufige kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), die in diesem Kurzaufsatz beleuchtet werden soll, ist eines der

prominentesten Beispiele für eine Gruppe von Reaktionen, die man Klickreaktionen nennt. Merkmale dieser Reaktionen sind gemäß der Definition von Sharpless eine sehr hohe Ausbeute, milde Reaktionsbedingungen sowie die Verträglichkeit mit einer großen Bandbreite funktionaler Gruppen.^[4] Typischerweise benötigen diese Reaktionen keine oder nur eine simple Aufarbeitung, und die Produkte fallen in hoher Reinheit an.

Die bedeutendste Eigenschaft der CuAAC ist ihre einzigartige Bioorthogonalität, da weder Azide noch terminale Alkine Funktionen sind, die in natürlichen Systemen vorkommen. Eine große Zahl von Biomolekülen, darunter Peptide,^[5] Proteine,^[6] Polysaccharide^[7] und auch ganze Viren^[8] sowie Zellen,^[9] wurden mithilfe der neuen Reaktion effizient modifiziert. Der Einsatz der CuAAC zur DNA-Modifizierung wurde durch die Tatsache verzögert, dass Kupferionen in der Regel die DNA schädigen, üblicherweise in Form von Strangbrüchen.^[10] Dieses Problem konnte durch Zugabe stark Kupfer(I) stabilisierender Liganden wie Tris(benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA)^[11] gelöst werden. Nach diesem Durchbruch ist die CuAAC auf dem besten Weg, die Standardmethode zur Markierung und Modifizierung von DNA zu werden.

In einer Vielzahl von Anwendungen, z.B. in der molekularen Diagnostik, ist es von zentraler Bedeutung, DNA mit Markierungen (z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen) zu versehen, um die Detektion von DNA-Analyten zu ermöglichen. Darüber hinaus wird oft Biotin an DNA-Moleküle angeknüpft, um die DNA-Reinigung zu vereinfachen. Auch wurde die DNA mit Kohlenhydraten modifiziert, um z.B. selektive Sil-



[*] Dipl.-Chem. P. M. E. Gramlich, Dipl.-Chem. C. T. Wirges, Dr. A. Manetto, Prof. Dr. T. Carell
Zentrum für Integrierte Proteinforschung (CiPS^M) am Department für Chemie und Biochemie, Ludwigs-Maximilians-Universität Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de
Dipl.-Chem. P. M. E. Gramlich, Dr. A. Manetto
BASECLICK GmbH
Bahnhofstraße 9–15, 82327 Tutzing (Deutschland)
Homepage: <http://www.baseclick.eu>

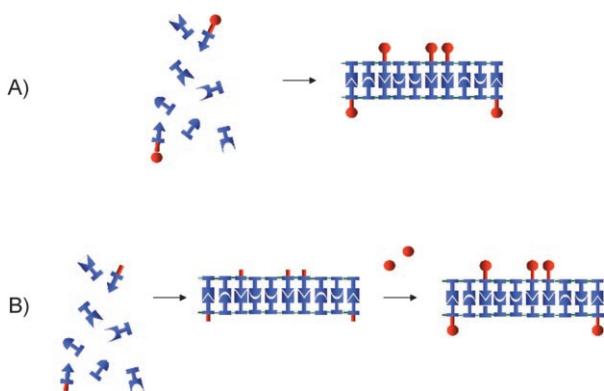


Abbildung 1. Präsynthetische (A; blau: Nucleotide, rot: Marker) und postsynthetische Modifizierungsmethode (B; blau: Nucleotide, rote Stäbchen: reaktive Gruppe, rote Kugeln: Marker). Details siehe Text.

berabscheidungen an diesen DNA-Kohlenhydrat-Konjugaten zu erreichen. Es gibt zwei Strategien zur Einführung von Markierungen in Oligonukleotide: die präsynthetische und die postsynthetische Modifizierung (Abbildung 1). Präsynthetische Modifizierung bedeutet, dass die Nukleotidmonomere, aus denen die DNA synthetisiert wird, die gewünschte Markierung bereits enthalten; d.h., diese modifizierten Oligonukleotide werden im Rahmen des üblichen Phosphoramiditverfahrens mit in den DNA-Strang eingebaut. Bei der postsynthetischen Modifizierung wird während der DNA-Synthese zunächst eine kleinere reaktive Gruppe mit eingebaut, die im Anschluss mit dem Marker funktionalisiert wird.

Bei der präsynthetischen Strategie (Abbildung 1 A) muss ein Phosphoramidit hergestellt werden, das die gewünschte

Markierung bereits enthält und so stabil ist, dass es die recht harschen Bedingungen der DNA-Synthese (Säure, Base, oxidative Bedingungen) und der Entschützung (stark alkalische Bedingungen) übersteht. Phosphor(III)-Atome im Phosphoramidit, die relativ leicht zu Phosphor(V) im Phosphoramidat oxidiert werden können, müssen in Gegenwart des Markers stabil sein. Die präsynthetische Modifizierungsmethode schließt daher viele Marker aus, die selbst reaktive funktionelle Gruppen enthalten, die basen- oder säureempfindlich sind. Alternativ kann der Marker auch als das entsprechende Triphosphat synthetisiert werden und dann während einer Polymerasekettenreaktion (PCR) durch eine DNA-Polymerase in DNA eingebaut werden. Diese Methode ist aus sterischen Gründen sowie durch die Tatsache limitiert, dass nicht alle Triphosphate als Substrat von den Polymerasen akzeptiert werden.

Bei der postsynthetischen Strategie (Abbildung 1 B) wird zunächst eine kleine reaktive Gruppe in die DNA eingeführt, und anschließend werden die gewünschten Marker über diese Gruppen angebunden. Dies geschieht nach der DNA-Synthese, Abspaltung vom Harz und Reinigung der DNA (Abbildung 1 B). Derzeit werden vor allem Aminogruppen über so genannte Aminomodifizierer (aminomodifier) eingebaut und diese anschließend mit Reaktivestern (z.B. solchen mit *N*-Hydroxysuccinimideneinheiten) der entsprechenden Marker umgesetzt.^[12] Auf diese Weise ist es möglich, empfindliche Moleküle in den DNA-Strang einzubauen. Die Methode ist ausgesprochen vielseitig, denn ist der DNA-Strang einmal hergestellt, kann eine Vielzahl von Gruppen mit ihm zur Reaktion gebracht werden. Allerdings sind die Ausbeuten der Kupplung des Reaktivesters mit dem Amin in der DNA oft relativ niedrig, und die entsprechenden DNA-Stränge müssen



Philipp Gramlich studierte Chemie an der Technischen Universität München, der University of Sydney und der Ludwig-Maximilians-Universität München. Er führte seine Diplom- und Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell auf dem Gebiet der Klickchemie und der Entwicklung von Methoden zur mehrfachen DNA-Modifizierung durch. Derzeit arbeitet er bei der Firma Baseclick GmbH.



Antonio Manetto schloss sein Chimestudium an der Universität Bologna ab. Er führte in dieser Zeit Forschungen bei Dr. C. Chatgilialoglu am Consiglio Nazionale delle Ricerche in Bologna durch. Anschließend promovierte er in der Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Derzeit ist er „Manager Research and Development“ bei der Firma Baseclick GmbH.



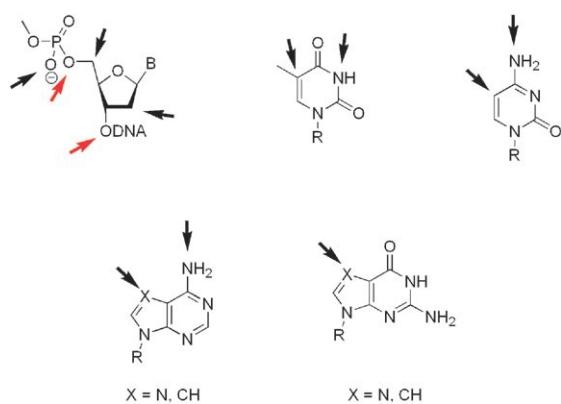
Christian Wirges studierte Chemie an der Universität Marburg und an der Fakultät für Neurochemie der Universität Stockholm. Anschließend wechselte er für seine Promotion zur Arbeitsgruppe von Prof. T. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Thema seiner Arbeit ist die Synthese von modifizierten Nukleotidbausteinen zur prä- und postsynthetischen Modifizierung von DNA.



Thomas Carell erhielt seinen Doktorgrad 1993 von der Universität Heidelberg (Prof. H. A. Staab). Nach einem Postdoktorandenfenthal am MIT bei Prof. J. Rebek war er unabhängiger Gruppenleiter an der ETH Zürich, assoziiert mit Prof. F. Diederich. 2000 akzeptierte er eine C4-Professur für Organische Chemie an der Philipps-Universität Marburg. 2004 wechselte er zum Department für Chemie und Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Er erhielt 2004 den Gottfried Wilhelm Leibniz-Preis und ist seit 2008 gewähltes Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina.

anschließend aufwändig durch HPLC gereinigt werden. So vielseitig diese Methode auch ist, macht sie die DNA-Markierung aus diesem Grund doch ausgesprochen teuer. Auch im Fall der Nucleobasen mit reaktiven Aminogruppen ist es möglich, diese in Form ihrer Triphosphate direkt über Primer-Verlängerung oder PCR in DNA einzubauen und anschließend die DNA zu markieren.^[13]

Die genannten Probleme lassen sich mit der CuAAC lösen: Diese Reaktion verläuft ausgesprochen sauber, mit hohen Ausbeuten und unter milden Reaktionsbedingungen. Die Ausführung der CuAAC an Oligonucleotiden erfordert die Herstellung von DNA, die Alkine oder Azide als funktionelle Gruppen enthält. Wie in Schema 1 gezeigt, wurden Alkin- und Azidgruppen bereits an verschiedenen Positionen in



Schema 1. Positionen, an denen bereits Azide oder Alkine in DNA eingeführt wurden. An den mit roten Pfeilen markierten Positionen wurden lediglich terminale Azid- und Alkinreste eingeführt. B = Nucleobase.

Nucleinsäuren eingeführt. Darüber hinaus wurde DNA mit einer großen Zahl nicht nucleotidischer Alkin- oder Azid-DNA-Modifizierungsreagentien umgesetzt.^[14,15] Es muss beachtet werden, dass die Synthese von azidmodifizierter DNA durch die Standardfestphasensynthese ausgesprochen schwierig ist, da Azide durch die Phosphor(III)-Spezies der Phosphoramidite relativ leicht reduziert werden. Azidmodifizierte DNA ist daher in der Regel nur schwer zugänglich.

In diesem Kurzaufsatzz fassen wir die aktuellsten Entwicklungen bei der Modifizierung von Oligonucleotiden mithilfe der CuAAC zusammen. In den Abschnitten 2–6 beschreiben wir die Anwendung von DNA-Strängen, die mithilfe der Festphasensynthese und nach Modifizierung mit der CuAAC gewonnen wurden.^[16] In Abschnitt 7 fassen wir die Klickchemie an DNA in Kombination mit enzymatischen Strategien zusammen.

2. Herstellung oberflächenimmobilisierter DNA

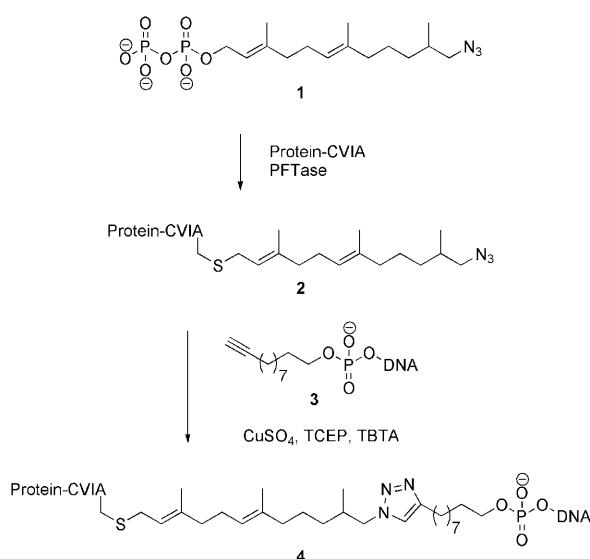
Im ersten Beispiel für eine erfolgreiche Modifizierung von DNA^[*] mithilfe der Azid-Alkin-Cycloaddition wurde eine 5'-alkylaminomodifizierte DNA verwendet, die mit Succinimidyl-5-azidovalerat umgesetzt wurde, um die DNA postsynthetisch am 5'-Terminus mit einer Azidgruppe zu verse-

hen.^[17,18] Der direkte Einbau von Azidgruppen in synthetische DNA ist wie schon oben erwähnt schwierig, weil die Azidgruppe mit den Phosphor(III)-Atomen der Phosphoramidite in einer Staudinger-Reduktion reagiert.^[16] Anschließend wurde eine thermische (nicht Kupfer(I)-katalysierte) Cycloaddition mit einem alkinmodifizierten Fluoresceinmolekül durchgeführt. Das Produkt wurde in exzellenter Ausbeute, aber als Mischung des 1,4- und des 1,5-Triazols isoliert. Die Entstehung beider Triazole ist typisch für die Huisgen-Cycloaddition, wenn sie ohne Kupfer(I)-Katalyse durchgeführt wird. Die eben geschilderte zweistufige Prozedur ermöglicht es auch, azidmodifizierte DNA-Stränge zu erzeugen und diese dann mithilfe der CuAAC an Glasoberflächen anzuknüpfen.^[19] Ein alternativer Ansatz zur Immobilisierung von DNA an Oberflächen mithilfe der CuAAC nutzt Alkin-gruppen, die am 5'-Ende des DNA-Stranges eingefügt werden. Die modifizierte DNA reagiert anschließend mit azid-modifizierten Goldoberflächen.^[20] Noch einfacher gelang es Reinhoudt et al., DNA zu immobilisieren: Sie pressten Polydimethylsiloxan(PDMS)-Stempel, die mit alkinmodifizierter DNA bedeckt waren, direkt auf azidmodifizierte Glasflächen. Bei dem hohen Druck reagieren die Alkingruppen vermutlich direkt mit den Aziden auch in Abwesenheit von Kupfer(I).^[15]

3. Herstellung von DNA-Protein-Konjugaten

Besonders erfolgreich wurde die CuAAC zur Synthese von komplexen DNA-Protein-Konjugaten eingesetzt.^[21] Di Stefano et al. verlängerten das grün fluoreszierende Protein (GFP) mit dem Tetrapeptid CVIA, was mithilfe des Enzyms Farnesylytransferase (PFTase), das dieses Peptid spezifisch erkennt, eine Anknüpfung des azidmodifizierten Isoprendiphosphats **1** ermöglichte (Schema 2).^[22] So wurde ein azid-haltiges GFP-Protein **2** synthetisiert, das anschließend mit einem DNA-Einzelstrang, der am 5'-terminalen Phosphatrest eine Alkingruppe enthielt, in einer CuAAC umgesetzt wurde. Um zu testen, ob die angeknüpfte DNA nun noch hybridisierungsfähig ist, wurde ein zweiter DNA-Gegenstrang mit dem Farbstoff Texasrot ausgestattet und mit dem DNA-Protein-Konjugat umgesetzt. Dabei konnte in der Tat eine effiziente Hybridisierung beobachtet werden. Mithilfe dieser Methode, die die Synthese von DNA-Protein-Konjugaten ermöglicht, gelang der Gruppe die Herstellung nanoskaliger DNA-Tetraeder, die mit vier grün fluoreszierenden Proteinen dekoriert sind.^[23] Derzeit wird diese Methode weiter ausgearbeitet, um komplexe proteinmodifizierte DNA-Nanostrukturen aufzubauen.

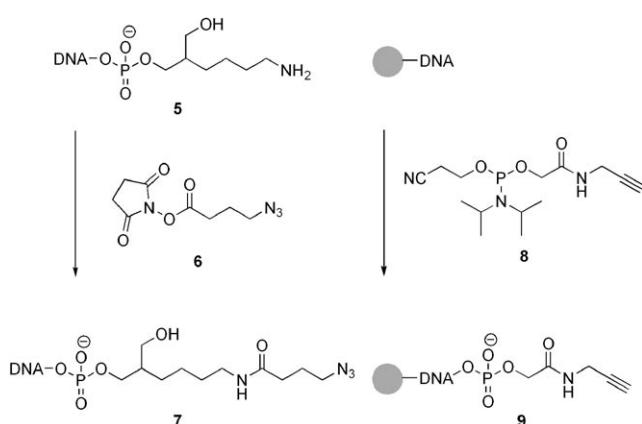
[*] In diesem Beispiel wurde die Cycloaddition wegen der DNA schädigenden Wirkung von Kupfer(I) in wässriger Lösung lediglich thermisch, ohne Kupfer(I)-Katalyse, durchgeführt. In der Folge der Veröffentlichung von Kupfer(I) stabilisierenden Liganden, die die Klickreaktion ebenfalls stark katalysieren, aber das Auftreten freier Kupferionen in Lösung vermeiden, setzte sich die Kupfer(I)-katalysierte Variante der Azid-Alkin-Reaktion durch. Dennoch sehen wir die Arbeit von Ju et al. trotz der fehlenden Kupferkatalyse als die erste Anwendung der Klickchemie an DNA an.



Schema 2. Strategie zur Synthese von DNA-Protein-Konjugaten. TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphanhydrochlorid, TBTA = Tris(benzyl-triazolylmethyl)amin.

4. Herstellung cyclischer und verzweigter DNA-Strukturen

Besonders die Synthese von cyclischer und verknoteter DNA wurde durch die CuAAC stark vereinfacht.^[16,24] Brown et al. gelang es z.B., einzelsträngige Oligonucleotide (ssODNs) am 5'-terminalen Ende mit einer Alkingruppe und am 3'-terminalen Ende mit einer Azidgruppe zu versehen.^[25] Das Azid wurde, wie von Ju et al. beschrieben,^[17] durch Kupplung von Succinimidyl-4-azidobutyrat mit einem Amino-Linker in der DNA erzeugt (7 in Schema 3). Die Alkin-gruppe wurde direkt während der DNA-Synthese eingeführt, indem die Festphasensynthese mit einem Phosphoramidit 8 abgebrochen wurde. Die derart Alkin-Azid-modifizierte DNA reagiert unter hoher Verdünnung in einer CuAAC mit sich selbst und ergibt in hohen Ausbeuten einzelsträngige cyclische Oligonucleotide. Bei Zugabe komplementärer Oligonucleotide, die ebenfalls Azid- und Alkingruppen enthalten,

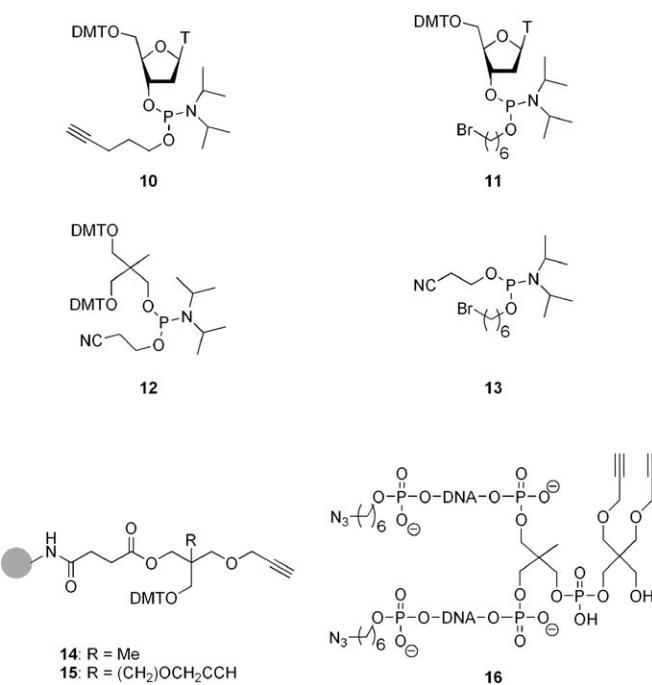


Schema 3. Bausteine für die Synthese cyclischer und verknoteter DNA. ● = Harz.

ten, kann auch diese DNA nach der Hybridisierung cyclisieren, wodurch verknotete DNA-Strukturen entstehen. In einem solchen Fall wirkt das erste cyclische Oligonucleotid als Templat für die zweite CuAAC-katalysierte Klickreaktion. Eine besondere Eigenschaft von derart verknoteten DNA-Strukturen ist, dass sie ausgesprochen resistent gegen den Abbau durch Exonuclease sind.

Die Exonucleasestabilität cyclischer DNA wurde auch von Matsuda et al. untersucht.^[26] Diese Gruppe stellte doppelsträngige Oligonucleotide her, die an den κB-Transkriptionsfaktor binden sollten, um diesen in vitro und später auch ex vivo zu inhibieren. Dafür wurden Propargyl- und Azoethoxy-Linker jeweils an der N3-Position von Thymin angefügt, und diese Thymidineinheiten wurden in die Oligonucleotide eingeführt, was DNA-Stränge mit 5'-Azido- und 3'-Alkingruppen lieferte. Dem folgte eine CuAAC zur Cyclisierung der DNA. Diese kleinen cyclischen DNA-Strukturen, auch DNA-Hanteln oder Doppelhaarnadeln genannt, banden hocheffizient an den Transkriptionsfaktor. Durch die Cyclisierung wurden das Bindeverhalten und die Struktur der inneren doppelsträngigen Binderegion des Oligonucleotids nicht bzw. kaum beeinflusst, allerdings konnte die Exonucleasestabilität dieser Oligonucleotide erneut gesteigert werden.

Eine ganze Serie komplexer DNA-Strukturen wurde durch die Arbeiten von Morvan et al. zugänglich gemacht.^[27] Dabei wurden Alkinyl- und Bromalkylgruppen über die Phosphoramiditgruppe in Nucleotide (10 und 11) eingeführt. Auf diese Art und Weise gelang es, DNA-Stränge mit Alkin- oder Bromalkylgruppen schnell und effizient herzustellen (Schema 4). Die Bromalkylgruppe ist ausgesprochen stabil während des Standard-Phosphoramiditverfahrens und fun-



Schema 4. Bausteine für die Synthese cyclischer, verzweigter oder bicyclischer DNA, wie sie von Morvan et al. entwickelt wurden. ● = Harz, DMT = Dimethoxytrityl.

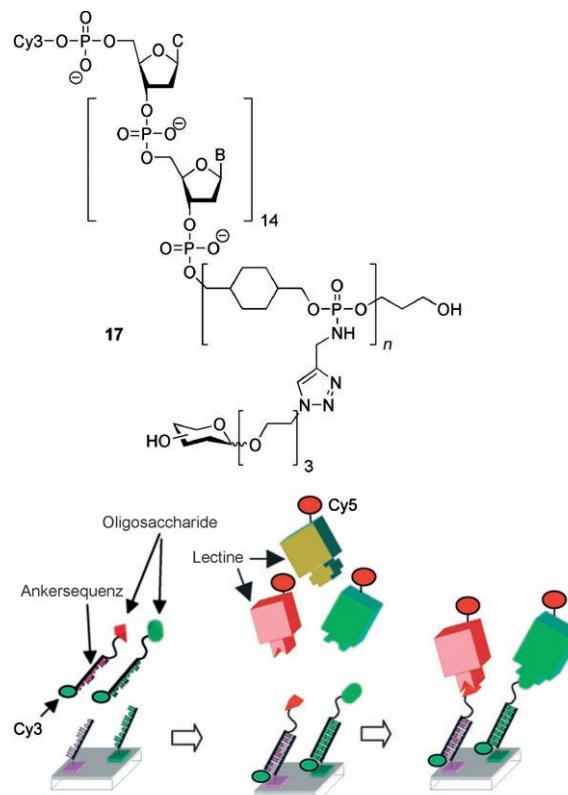
giert als Vorstufe für Azidgruppen. Dazu wird die DNA nach der Festphasensynthese mit Natriumazid behandelt, um die Bromalkylgruppe in eine Azidalkylgruppe umzuwandeln.^[28] Das Phosphoramidit **13** wurde verwendet, um DNA mit einem azidmodifizierten 5'-Ende zu erzeugen. Die universalen Festphasenträger **14** und **15** können zur Einführung von Alkingruppen in die 3'-Position von DNA verwendet werden. Mithilfe derart alkin- und azidmodifizierter DNA gelang der Aufbau komplexer cyclischer und verzweigter DNA-Strukturen. Bicyclische DNA-Strukturen wurden unter anderem mithilfe des Doppelalkinbausteins **15** und des Phosphoramidits **12** realisiert, die eine bzw. zwei DMT-geschützte Hydroxygruppe(n) enthalten. **12** und **15** liefern verzweigte DNA-Strukturen, die zwei terminale Alkingruppen tragen. Mit dem Baustein **16**, der durch Abbrechen der DNA-Synthese mit **13** erhalten wird, können auch Strukturen mit zwei Aziden und zwei Alkinen erhalten werden. Die Cyclisierung derartiger modifizierter DNA-Strukturen mithilfe der CuAAC liefert dann bicyclische DNA-Verbindungen.

5. Analytische Anwendungen modifizierter DNA

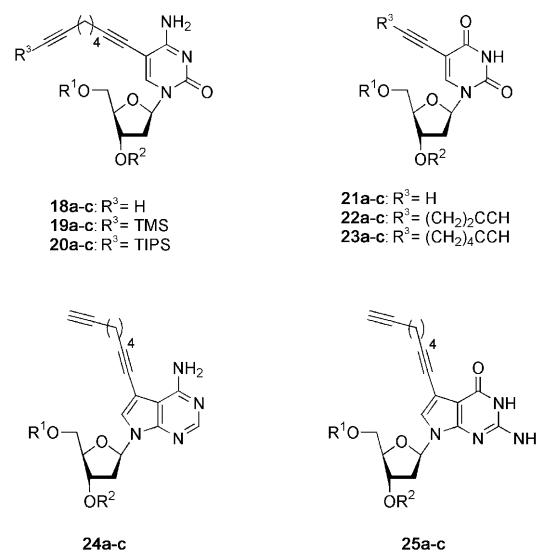
Die Einsatzmöglichkeiten von Oligonucleotiden in der Analytik werden durch die CuAAC dank ihrer sehr hohen Ausbeuten, ihrer exzellenten Selektivität und der leichten Aufarbeitung der modifizierten Oligonucleotide enorm erweitert. Zum Beispiel kann DNA auf diese Weise auch an sehr hydrophobe, ausgesprochen stabile Farbstoffmoleküle angeknüpft werden sowie mit unterschiedlichen Molekülen hochgradig modifiziert werden.^[29]

Morvan et al. synthetisierten Oligonucleotidgerüste, die bis zu zehn Alkingruppen enthalten, für die Konjugation mit Galactose^[30] und Fucose^[31] unter Bildung der Produkte **17** ($n=1, 3$; Schema 5, oben). Auf diese Weise entstehen hochgradig kohlenhydratmodifizierte DNA-Strukturen. Das so erzeugte Fucosederivat bindet zwanzigmal stärker an das fucosespezifische bakterielle Lectin (PA-IIL) als einzelne Fucosemoleküle. Diese Technik wurde für die Synthese von DNA-basierten Kohlenhydrat-Arrays weiterentwickelt (Schema 5, unten).^[32] Hierfür wurden zunächst 3'-aminomodifizierte Oligonucleotide kovalent an funktionalisierte Glasoberflächen immobilisiert und anschließend mit entsprechenden DNA-Gegensträngen hybridisiert. Als Gegenstrang wurde beispielsweise **17** verwendet, das ein über CuAAC angeknüpftes Kohlenhydratmolekül am 3'-Terminus sowie eine Cy3-Fluoreszenzmarkierung am 5'-Terminus enthält. So konnte die Hybridisierung der kohlenhydratmodifizierten DNA-Moleküle an die DNA-Arrays durch resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) beobachtet werden. Die so hergestellten Kohlenhydrat-Arrays wurden für die Untersuchung von Wechselwirkungen mit Cy5-markierten Lectinen verwendet. Die Wechselwirkungen wurden FRET-spektroskopisch beobachtet. Die Empfindlichkeit der Methode ist exzellent; die Lectine konnten bis zu einer Konzentration von 2–20 nm nachgewiesen werden.

Die DNA-Synthese konnte mithilfe der CuAAC auch in vivo nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wird 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin **21a** (Schema 6) synthetisiert und direkt in



Scheme 5. DNA-Kohlenhydrat-Konjugate (oben; $n=1, 3$) und ihre Anwendung für die Herstellung von Mikro-Arrays (unten).^[32]



Scheme 6. An den Nucleobasen modifizierte Phosphoramidite und Triphosphate. **18a–25a:** R¹=R²=H; **18b–25b:** R¹=P(O[−])₃, R²=H; **18c–25c:** R¹=DMT, R²=P(NiPr₂)[O(CH₂)₂CN]. TIPS=Triisopropylsilyl, TMS=Trimethylsilyl.

Mäuse injiziert, oder die Substanz wird zu NIH-3T3-Zellkulturen gegeben.^[33] Dank der Strukturähnlichkeit zwischen dem Alkylinuridin **21a** und Thymidin lässt sich die modifizierte Base durch Polymerasen während der S-Phase der Zellteilung in die neu synthetisierte DNA einbauen. Während

jedes Zellzyklus wird weiteres **21a** in die DNA der Zellen integriert. Nach der Lyse der Zellen wird die genomische DNA isoliert und in einer CuAAC mit azidmodifizierten Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt. So kann die Menge an neu synthetisierter DNA effizient und hochempfindlich nachgewiesen werden. Die Methode ist empfindlicher und wesentlich einfacher als der bislang gebräuchliche Bromdesoxyuridin (BrdU)-Proliferations-Assay, der zeitaufwändige immunologische Anfärbeschritte mit Anti-BrdU-Antikörpern umfasst.

Eine sehr einfache und hochempfindliche DNA-Detektionsmethode wurde kürzlich von Carell et al. auf Basis des photographischen Silberhalogenidprozesses entwickelt.^[34] Photographisch aktive AgBr-Emulsionen sind typischerweise nicht lichtempfindlich oberhalb von 520 nm. Um eine Empfindlichkeit in diesem Wellenlängenbereich zu erreichen, werden den Silverbromidkristallen organische Farbstoffe (Sensibilatoren) zugesetzt; man spricht von einer Sensibilisierung des photographischen Films. Dank dieser Sensibilisierung sowie der Tatsache, dass mithilfe photographischer Methoden Signalverstärkungen um einen Faktor von ca. 10^{11} erreicht werden können, sollte ein auf Photographie beruhender Prozess im Prinzip einen DNA-Nachweis ermöglichen, der ähnlich empfindlich wie die PCR ist. In der Studie wurde ein photographischer Film verwendet, dem keine sensibilisierenden Farbstoffmoleküle zugesetzt worden waren. Der entsprechende photographisch aktive Schwarzweißfilm ist daher bei Wellenlängen > 520 nm kaum lichtempfindlich. Anschließend wurde DNA synthetisiert, die die Bausteine **18c** oder **23c** (Schema 6) enthielt. Über diese alkinhaltigen Nucleobasen wurden mithilfe der CuAAC photographisch aktive Rotlichtsensibilatoren (Pinacyanofarbstoffazide) in die DNA eingeführt. Nach dem Auftragen dieser sensibilisatormodifizierten DNA auf den rotlichtunempfindlichen photographischen Film wurde die entsprechende Stelle kurzzeitig mit rotem Licht belichtet. Nur diejenigen Teile des photographischen Films, die die DNA mit dem angeknüpften Rotlichtfarbstoff enthielten, wurden lichtempfindlich. Die anschließende photographische Entwicklung des derart behandelten Schwarzweißfilms ergab in der Tat an der Position der DNA einen intensiven schwarzen Fleck – das bedeutet, dass der Rotlichtfarbstoff die Lichtenergie absorbiert hatte und an die Silverbromidkristalle weitergegeben hatte, analog zu einem Sensibilisator. Mit dieser Methode kann DNA mit bloßem Auge nachgewiesen werden; die Nachweisgrenze beträgt nur 300 fmol.

Die enorme Empfindlichkeit des neuartigen photographischen Verfahrens wurde genutzt, um direkt die DNA des Pesterregers nachzuweisen. Dazu wurde ein Ansatz auf Basis eines „molecular beacon“ (MB; „molekulares Leuchtfieber“) gewählt (Abbildung 2). Für einen ersten Versuch wurde ein kommerziell verfügbares „molecular beacon“ verwendet, das sowohl mit Cy3 als auch mit BHQ2 (einem Fluoreszenzlöscher) an den Enden modifiziert ist und an eine charakteristische Sequenz im Genom von *Yersinia pestis* bindet. Im geschlossenen Zustand des „molecular beacon“, in der Haarnadelkonformation, ist der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 sehr dicht an BHQ2 positioniert, wodurch die Fluoreszenz des Cy3-Farbstoffes effizient gelöscht wird. Bei Hybridisierung

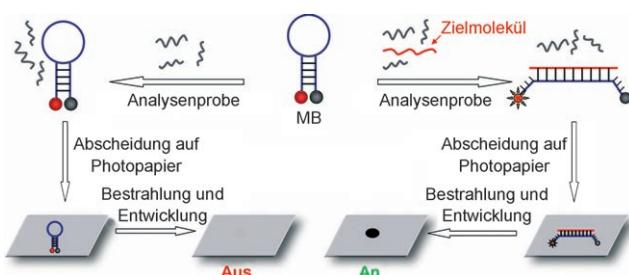


Abbildung 2. DNA-Photographie nach dem „molecular beacon“-Prinzip. Es wird ausschließlich das Zielmolekül detektiert.^[34]

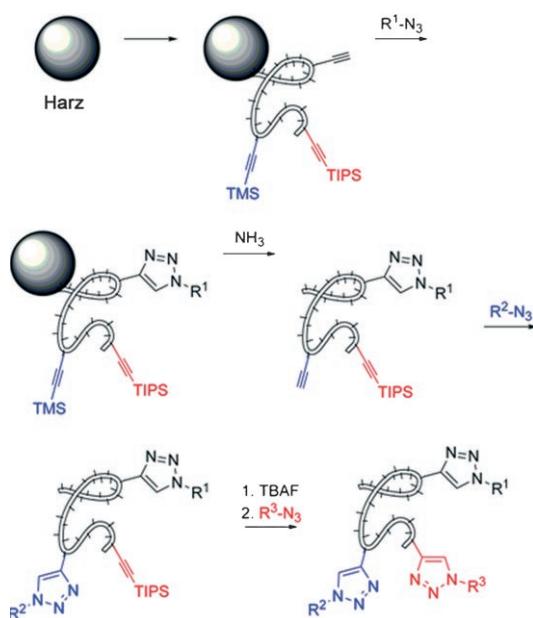
mit einer komplementären Genomsequenz öffnet sich jedoch die Haarnadel, was den Abstand zwischen Cy3 und dem Fluoreszenzlöscher vergrößert und so die Lösung wesentlich verringert; so kann der Cy3-Farbstoff im geöffnetem Zustand eine signifikante Fluoreszenz zeigen. Wird nun das „molecular beacon“ einmal im geschlossenen und einmal im geöffneten Zustand mit gebundener Analyt-DNA tropfenweise auf den Schwarzweißfilm aufgetragen, der keine Rot-sensibilatoren enthält, und der Film nachfolgend kurzfristig belichtet, resultiert nur im zweiten Fall eine Sensibilisierung der Silverbromidkristalle. Im nachfolgenden Entwicklungs-schritt entsteht an der Stelle des geöffneten „molecular beacon“ ein Fleck von intensiver schwarzer Farbe. Mit bloßem Auge lässt sich so das Genom des Pesterregers mit einer Nachweisgrenze von 600 fmol nachweisen.

6. Mehrfache, sequenzielle Markierung von DNA

Das Anbringen von Alkinylketten an der 5-Position von Pyrimidinen (**18–23** in Schema 6) oder an der 7-Position von 7-Desazapurinen (**24** und **25** in Schema 6) ermöglicht es, DNA vielseitig zu markieren. Diese Positionen an den Nucleobasen haben den Vorteil, dass die entsprechenden Triphosphate in der Regel während einer PCR oder Primer-Verlängerung von den Polymerasen akzeptiert und eingebaut werden (Abschnitt 7).^[35] Funktionelle Moleküle, die an diese Positionen angeknüpft werden, ragen in die große Furche von B-Duplex-DNA, was nur kleine Änderungen der zur effizienten Hybridisierung mit den Gegenstrang erforderlichen Duplexstruktur sowie der Duplexstabilität nach sich zieht. Die Gruppen beeinflussen auch das Schmelzverhalten der modifizierten DNA-Stränge nur geringfügig; in der Regel beobachtet man bei den modifizierten DNA-Duplexen kleine Zunahmen der Schmelztemperaturen gegenüber den Werten natürlicher DNA, was die geringen Auswirkungen von Modifikationen an der C5-Position von Pyrimidinen und der C7-Position von 7-Desazapurinen auf den Duplex verdeutlicht.^[36,37] Die Wahl der Alkingruppen beeinflusst die Effizienz der nachfolgenden Modifizierung wesentlich. Ist eine sehr dichte Funktionalisierung von DNA-Einzelsträngen oder -Doppelsträngen erwünscht, so haben sich die Octadiinyleinheiten, die in die Hauptfurche zeigen, gegenüber einfachen Ethinyleinheiten wie in **21** als überlegen herausgestellt. Die Octadiinyleinheiten positionieren die Dreifachbindung etwas weiter außerhalb des Stranges, sodass diese besser zu-

gänglich ist. In der Tat konnten einzelsträngige Oligonukleotide mit sechs konsekutiv octadiinylmodifizierten Uridineinheiten effizient und quantitativ in einer CuAAC mit vielzähligen Aziden (Fluorescein, Cumarin oder Kohlenhydrate) umgesetzt werden.^[38]

Mit unterschiedlich alkinmodifizierten Basen gelang es im Anschluss auch, DNA sequenziell mit unterschiedlichen Markern zu modifizieren. Solche DNA-Moleküle werden unter anderem für die Synthese von FRET-Sonden oder in der molekularen Diagnostik benötigt. Hierzu wurden DNA-Stränge hergestellt, die das TMS- (**19c**) und TIPS-geschützte 5-Alkin-2'-desoxycytidin (**20c**)^[39] sowie das Uridinalogon **23c** enthalten; dies ermöglicht die Durchführung dreier unterschiedlicher sequenzieller CuAACs: zunächst am freien Alkinrest des Uridinalogons, nach TMS-Entschüttung am zweiten Alkinrest und nach TIPS-Entschüttung schließlich am dritten (Schema 7).^[39] So lassen sich drei unterschiedliche Modifikationen mit zuvor unerreichter Ausbeute und Effizienz in die DNA einführen. Die CuAAC-Modifizierung von DNA ist sogar direkt am Harz möglich – das bedeutet, dass die Marker während der DNA-Synthese direkt am Synthesizer eingefügt werden können. Meist ist die hochgradig modifizierte DNA nach Reinigung durch eine einfache Fällung der Oligonukleotide aus Ethanol sauber genug für weitere Anwendungen. Die Ausbeuten betragen dabei zwischen 60 und 90 % für die dreistufige CuAAC-Sequenz.



Schema 7. Sequenzielle Modifizierung von DNA.

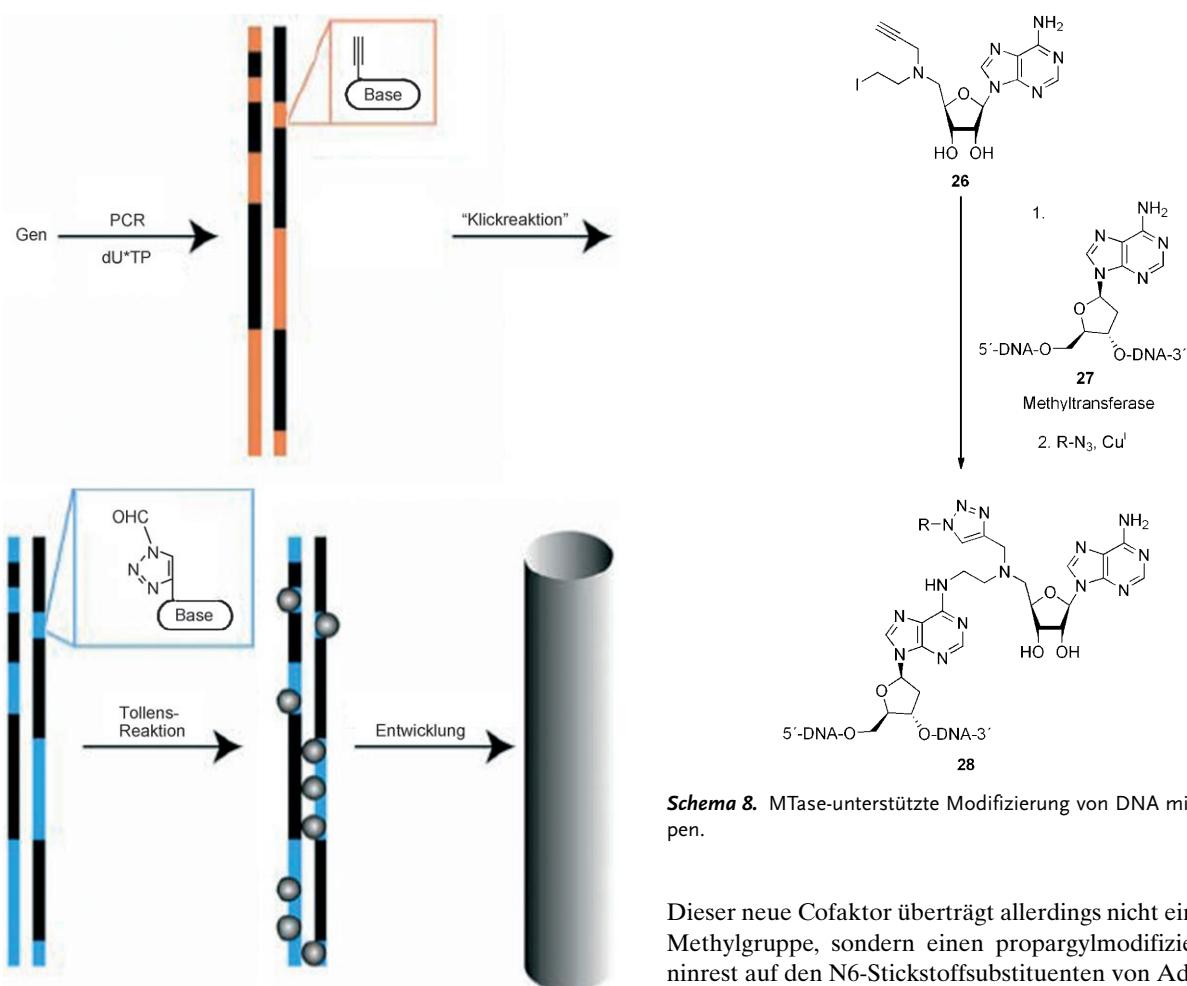
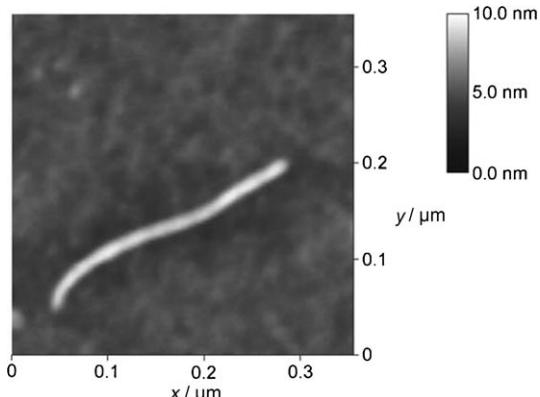
7. Enzymatischer Einbau von Alkinen in DNA und DNA-Metallierung

Die alkinmodifizierten Triphosphate **18b–25b** können effizient durch PCR enzymatisch in DNA eingebaut werden; besonders gut sind hierfür die *Pwo*-, *Deep-Vent-exo*- und *KOD-XL*-Polymerase geeignet.^[36] Es gelingt sogar, sehr lange (bis zu 2000-mere) PCR-Produkte zu erzeugen, in denen

alle natürlichen Cytosinbasen durch die alkinmodifizierten Cytosinbasen **18b** ersetzt sind. Unter Verwendung z.B. von Galactoseazid konnte diese hoch alkinmodifizierte DNA anschließend in einer CuAAC umgesetzt werden. Hierbei wurden an die langen Amplikone 887 Kohlenhydratmoleküle angeknüpft. Auch bei dieser hochgradigen DNA-Modifizierung zeigt sich, dass Bisalkineinheiten wie in **18, 23, 24** oder **25** zu höheren Ausbeuten führen als die einfache, ethinylmodifizierte Base **21**. Der gleichzeitige Austausch aller vier kanonischen Basen gegen alkinmodifizierte Basen in einer PCR hat sich als nicht durchführbar erwiesen, was zeigt, dass die Polymerasen nicht dazu in der Lage sind, ein Alkinnucleotid gegenüber von einem anderen Alkinnucleotid zu platzieren. Hier sind weitere Forschungsarbeiten notwendig. Lediglich bei einfachen Primer-Verlängerungen gelang es, kurze DNA-Stränge zu erzeugen, in denen tatsächlich alle vier Basen durch alkinmodifizierte Basen ersetzt sind.^[40] Besonders wichtig ist die Beobachtung, dass die alkinmodifizierte DNA ihrerseits als effizientes Templat für eine Standard-PCR fungieren kann. Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte zeigt dabei, dass beim Ablesen der alkinmodifizierten Template in der Regel keine Mutationen auftreten, was bedeutet, dass die alkinmodifizierten Basen die vollen Kodierungseigenschaften der natürlichen Basen aufweisen.

Eine interessante Anwendung der hochgradig kohlenhydratmodifizierten DNA ist die Erzeugung von metallierten DNA-Strängen (Abbildung 3). Carell et al. synthetisierten zu diesem Zweck 2000-mere DNA-Stränge, in denen alle natürlichen dT-Basen durch die Alkinyluridine **21b** oder **22b** ersetzt waren.^[35] Diese DNA wurde anschließend mit Galactoseazid in einer CuAAC modifiziert. Behandelt man diese DNA mit einer Tollens-Lösung, wird an jedem Kohlenhydratmolekül an der DNA atomares Silber abgeschieden. Dieses atomare Silber kann in einer nachfolgenden Entwicklungsreaktion wie bei der Schwarzweißphotographie entwickelt werden. In einem zweiten Schritt kann diese DNA mit einer Goldsalzlösung (AuSCN, Hydrochinon)^[41] behandelt werden; dadurch scheiden sich um die Silbernanocluster herum Goldatome ab, bis die DNA am Ende mit einem dünnen Mantel aus metallischem Gold überzogen ist. Die so erzeugten Gold-DNA-Nanodrähte haben sehr gleichförmige Durchmesser, die durch Begrenzung der Entwicklungszeit auf ≤ 10 nm eingestellt werden können. Das Wachstum des Goldmantels um die DNA konnte durch rasterkraftmikroskopische (AFM-)Studien auf Kieselgel- oder Glimmeroberflächen verfolgt werden (Abbildung 4). Mithilfe der CuAAC können auch direkt Goldnanopartikel am Rückgrat von alkinmodifizierten DNA-Produkten abgeschieden werden; dies gelingt durch eine CuAAC mit Goldnanopartikeln, die durch azidmodifizierte Glutathionliganden stabilisiert werden. Auch diese DNA wird durch die Goldnanopartikel sehr gleichmäßig dekoriert.^[42]

Eine Anwendung der CuAAC zur DNA-Markierung wurde kürzlich von Rajski und Weller entwickelt,^[43] basierend auf den Entdeckungen von Weinhold und Mitarbeitern.^[44] Weinhold et al. verwendeten Methyltransferasen (MTasen), die den Transfer aktiverter Methylgruppen vom ubiquitären Cofaktor S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet oder SAM) auf Adenin- oder Cytosinreste in der DNA in-

**Abbildung 3.** Metallabscheidung an PCR-Produkten.**Abbildung 4.** AFM-Aufnahmen der Silber-Gold-Nanodrähte. Das Metall wurde selektiv auf der kohlenhydratmodifizierten DNA abgeschieden.^[41]

nerhalb spezifischer Sequenzen von zwei bis acht Basenpaaren Länge katalysieren.^[45] Ähnlich wie Weinhold et al.^[44] stellten Rajski und Weller einen neuen SAM-Cofaktor **26** her, der von der Methyltransferase M.TaqI anstelle des natürlichen SAM-Cofaktors als Substrat akzeptiert wird (Schema 8).

Dieser neue Cofaktor überträgt allerdings nicht eine einfache Methylgruppe, sondern einen propargylmodifizierten Adeninrest auf den N6-Stickstoffsubstituenten von Adenin in der palindromen Enzymerkennungssequenz 5'-AGCT-3'. Die entsprechende DNA-Sequenz wird so mithilfe des modifizierten Cofaktors und des Enzyms selektiv mit einer Alkinylgruppe am Adeninrest in jeder AGCT-Erkennungseinheit modifiziert. Diese Alkinylgruppe konnte anschließend mit verschiedenen Aziden in einer CuAAC umgesetzt werden. Die Methode ist nicht auf bestimmte DNA-Längen beschränkt und könnte sich deshalb dazu eignen, lange genomische DNA-Stränge mit einer relativ geringen Modifikationsdichte zu erzeugen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) hat die Art und Weise, wie modifizierte Oligonucleotide hergestellt werden, völlig verändert. Es ist jetzt möglich, mithilfe alkinmodifizierter Phosphoramidite alle denkbaren Arten von Molekülen in kleine Oligonucleotide einzufügen. Ein bis drei unterschiedliche Moleküle können, entweder in Lösung oder an der festen Phase direkt während der Oligonucleotidsynthese, an die DNA angeknüpft werden. Mithilfe von alkinmodifizierten Triphosphaten oder der Methyltransferasetechnik gelingt es auch, lange PCR-Fragmente von genomischer DNA mit wenigen oder vielen Alkingruppen auszustatten, die anschließend über eine CuAAC umgesetzt werden können. Es ist erstaunlich, wie viele unter-

schiedliche alkinmodifizierte Basen effizient von den verschiedenen Polymerasen als Substrate akzeptiert werden und dass es sogar möglich ist, im Rahmen einer PCR eine kanonische Base komplett durch eine alkinmodifizierte zu ersetzen. Ebenso überraschend ist es, mit welch hoher Effizienz diese alkinhaltige DNA in der CuAAC umgesetzt werden kann; selbst Hunderte von Alkingruppen werden üblicherweise problemlos transformiert. Viele der durch Klickreaktion modifizierten Oligonucleotide sind anschließend durch einfache Fällung aus Ethanol zu reinigen, wodurch die aufwändige HPLC-Reinigung vermieden werden kann. Verwendungsmöglichkeiten für die alkinmodifizierte DNA bestehen im Einsatz als Hilfsmittel in der molekularen Diagnostik sowie im Aufbau von DNA-Nanomaterialien und Nanostrukturen, die nachfolgend mit Funktionsmodulatoren versehen werden können. Für den DNA-Chemiker, der auf den Gebieten Diagnostik, Medizin oder Nanotechnologie arbeitet, wird die CuAAC nicht mehr wegzudenken sein. Diese Reaktion hat die Synthesemöglichkeiten an DNA enorm erweitert und den Weg für völlig neue Einsatzgebiete der DNA geebnet.

P.M.E.G. und C.T.W. danken dem Cusanuswerk und dem Fonds der Chemischen Industrie für Doktorandenstipendien; A.M. wurde gefördert durch ein EU Marie Curie Training and Mobility Stipendium unter der Nummer MRTN-CT-2003-505086. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für finanzielle Unterstützung (CiPS^M, SFB 749, SFB 486, Leibnizprogramm). Diese Arbeit wurde ferner unterstützt von der BASECLICK GmbH und der BASF.

Eingegangen am 2. Mai 2008

Online veröffentlicht am 22. September 2008

- [1] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Vol. 1, Wiley, New York, **1984**, S. 1–176.
- [2] J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036–1043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018–1025; V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.
- [3] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [4] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [5] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505–4507; H. T. Ten Brink, J. T. Meijer, R. V. Geel, M. Damen, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 686–692.
- [6] A. E. Speers, B. F. Cravett, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535–546.
- [7] T. Liebert, C. Hänsch, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 208–213.
- [8] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- [9] J. A. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165.
- [10] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109–1151; S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003–7008.
- [11] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [12] L. M. Smith, S. Fung, M. W. Hunkapiller, T. J. Hunkapiller, L. E. Hood, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 2399–2412.
- [13] M. Kuwahara, Y. Takahata, A. Shoji, A. N. Ozaki, H. Ozaki, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3735–3738; A. Roychowdhury, H. Illangkoon, C. L. Hendrickson, S. A. Benner, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 489–492; M. Mehedi Masud, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1111–1120.
- [14] I. Géci, V. V. Filichev, E. B. Pedersen, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6379–6386.
- [15] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmiedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1997–2002.
- [16] A. M. Jawalekar, N. Meeuwenoord, J. G. O. Cremers, H. S. Overkleft, G. A. van der Marel, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 287–290.
- [17] T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609–612.
- [18] Z. Li, T. S. Seo, J. Ju, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3143–3146.
- [19] T. S. Seo, X. Bai, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5488–5493; T. S. Seo, X. Bai, D. H. Kim, Q. Meng, S. Shi, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5926–5931.
- [20] N. K. Devaraj, G. P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J. P. Collman, E. T. Kool, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8600–8601.
- [21] S. Mazzini, F. Garcia-Martin, M. Alvira, A. Avino, B. Manning, F. Albericio, R. Eritja, *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 209–218; M. Alvira, R. Eritja, *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 2798–2809; K. Gogoi, M. V. Mane, S. S. Kunte, V. A. Kumar, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e139; M. Humenik, Y. Huang, Y. Wang, M. Sprinzl, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1103–1106.
- [22] B. P. Duckworth, Y. Chen, J. W. Wollack, Y. Sham, J. D. Mueller, T. A. Taton, M. D. Distefano, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8975–8978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8819–8822.
- [23] R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin, C. M. Erben, R. M. Berry, C. F. Schmidt, A. J. Turberfield, *Science* **2005**, *310*, 1661–1665.
- [24] M. Nakane, S. Ichikawa, A. Matsuda, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 189–190.
- [25] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsen, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6859–6864.
- [26] M. Nakane, S. Ichikawa, A. Matsuda, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1842–1851.
- [27] J. Lietard, A. Meyer, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 191–200; A. Meyer, C. Bouillon, S. Vidal, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8867–8871.
- [28] J. Lietard, A. Meyer, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8795–8798.
- [29] A. V. Ustinov, V. V. Dubnyakova, V. A. Korshun, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1467–1473; A. V. Ustinov, V. A. Korshun, *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 1268–1274.
- [30] C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevolot, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700–4701.
- [31] F. Morvan, A. Meyer, A. Jochum, C. Sabin, Y. Chevolot, A. Imbert, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, S. Vidal, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1637–1643.
- [32] Y. Chevolot, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J.-P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2450–2454; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2398–2402.
- [33] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2415–2420.
- [34] 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*, 4262–4265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4184–4187.

- [35] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, S. T. H. Nir, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398–1399.
- [36] J. Gierlich, K. Gutsmiedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486–9494.
- [37] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 535–552; F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodiversity* **2006**, *3*, 509–514; F. Seela, V. R. Sirivolu, P. Chittep, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211–224; F. Seela, V. R. Sirivolu, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 597–601; P. Kocalka, N. K. Andersen, F. Jensen, P. Nielsen, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2106–2116.
- [38] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [39] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3491–3493; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442–3444.
- [40] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, J. Gierlich, T. Carell, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 249–251.
- [41] M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell, *Small* **2007**, *3*, 1049–1055.
- [42] M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem. Commun.* **2008**, 169–171.
- [43] R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2141–2144; R. L. Weller, S. R. Rajski, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 243–245.
- [44] M. Pignot, C. Siethoff, M. Linscheid, E. Weinhold, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3050–3053; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2888–2891.
- [45] G. Pljevaljcic, F. Schmidt, A. J. Scheidig, R. Lurz, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1516–1519.