

**Amphiphile Block-Copolymere und  
eine Affinitäts-Aufreinigung  
für die DNA-kodierte Chemie**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

**M. Sc. Katharina Götte**



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2018 bis Oktober 2022 unter der Anleitung von PD. Dr. Andreas Brunschweiler an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Stefan M. Kast

1. Gutachter: PD. Dr. Andreas Brunschweiler

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

Eingereicht am: 18.10.2022

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2022



Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

**1. Micellar Brønsted Acid Mediated Synthesis of DNA-Tagged Heterocycles**

M. Klika Škopić, K. Götte, C. Gramse, M. Dieter, S. Pospich, S. Raunser, R. Weberskirch, A. Brunschweiler, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10546 - 10555.

**2. Reaction Development for DNA-Encoded Library Technology: From Evolution to Revolution?**

K. Götte, S. Chines, A. Brunschweiler, *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151889 - 151896.

**3. Development of an Automatable Affinity Purification Process for DNA-Encoded Chemistry**

K. Götte, R. Dinter, L. Justen, N. Kockmann, A. Brunschweiler, *ACS Omega* **2022**, *7*, 28369 - 28377.



## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung.....	VII
Abstract .....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Wirkstoffforschung .....	1
1.2. DNA-kodierte chemische Molekülbibliotheken.....	3
1.2.1.Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek .....	3
1.2.2.Selektion einer DNA-kodierten Molekülbibliothek.....	8
1.2.3.Hit-Strukturen aus DNA-kodierten Molekülbibliotheken.....	10
1.2.4.Herausforderungen im Bereich DNA-kodierter Molekülbibliotheken.....	12
1.3. Mizellare Katalyse .....	18
1.4. Säure-katalysierte Reaktionen .....	24
1.4.1.Schutzgruppen .....	24
1.4.2.Povarov-Reaktionen .....	26
1.4.3.Pictet-Spengler-Reaktion .....	31
1.5. Palladium-katalysierte Reaktionen .....	33
2. Zielsetzung .....	37
3. Copolymer-vermittelte Reaktionen an DNA-Konjugaten.....	41
3.1. Verwendete amphiphile Block-Copolymere .....	42
3.1.1.Sulfonsäure-immobilisierte Copolymere.....	43
3.1.2.Palladium-immobilisiertes Copolymer .....	44
3.2. Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion .....	45
3.2.1.Vorausgegangene Experimente <sup>[164]</sup> .....	45
3.2.2.Ergebnisse .....	48
3.2.2.1.Optimierung der Reaktions-Zeit und -Temperatur der Copolymer P2- EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese des DNA- Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin Konjugats DNA-2b .....	48
3.2.2.2.Variation des Olefins in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov- Reaktion.....	50
3.2.2.3.Variation des Amins in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov- Reaktion.....	52

---

3.2.2.4. Variation des DNA-Aldehyd-Konjugates in der Copolymer P2-EA-a- vermittelten Povarov-Reaktion.....	56
3.3. Copolymer-vermittelte Abspaltung der <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl (Boc)- Schutzgruppe .....	58
3.3.1. Vorausgegangene Experimente <sup>[164]</sup> .....	58
3.3.2. Ergebnisse.....	60
3.3.2.1. Variation des Additivs auf die Copolymer P1-BA-b-vermittelte Boc- Entschützung .....	60
3.3.2.2. Variation der Copolymer-Struktur auf die Copolymer-vermittelte Boc- Entschützung .....	62
3.4. Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion .....	64
3.4.1. Etablierung der Pictet-Spengler-Reaktion auf einem DNA-Aldehyd-Konjugat DNA-1g mit Sulfonsäure-funktionalisierten Copolymeren .....	65
3.4.2. Variation der Amine in der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler- Reaktion .....	68
3.4.3. Variation des DNA-Startmaterials in der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion.....	70
3.5. Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung .....	72
3.5.1. Etablierung der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung auf einem DNA-Arylbromid- Konjugat DNA-10a mit Hilfe eines Pd-funktionalisierten Copolymers P3 .....	72
3.5.2. Variation der Arylboronsäure in der Copolymer P3-vermittelten Suzuki- Miyaura-Kreuzkupplung.....	75
4. Aufreinigung von DNA-Konjugaten .....	78
4.1. Design der Affinitäts-Aufreinigung von DNA-Konjugaten .....	78
4.2. Untersuchung verschiedener Trägermaterialien für die Affinitäts-Aufreinigung...	80
4.3. Etablierung des Affinitäts-Aufreinigungs-Verfahrens.....	82
4.4. Optimierung der einzelnen Aufreinigungsschritte .....	85
4.4.1. Optimierung des Elutionsmittels.....	85
4.4.2. Optimierung der Vorbereitung der Agarose-Matrix.....	86
4.4.3. Optimierung der Bedingungen der Hybridisierung.....	88
4.5. Anwendung der Affinitäts-Aufreinigung.....	90
4.5.1. Affinitäts-Aufreinigung von unterschiedlichen DNA-Längen .....	90
4.5.2. Affinitäts-Aufreinigung einer Amidsynthese.....	91
4.5.3. Affinitäts-Aufreinigung der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov- Reaktion .....	93



---

5.	Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek.....	95
5.1.	Design der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL) ..	96
5.2.	Computer-gestützte Auswahl der Molekülbausteine und Generierung der Barcodes .....	98
5.3.	Synthese der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek .....	99
5.3.1.	Chemische Synthese der einzelnen Zyklen der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek .....	99
5.3.1.1.	Zyklus 1 - Synthese von DNA-Aldehyd-Konjugaten .....	100
5.3.1.2.	Zyklus 2.....	105
5.3.1.2.1.	Validierung der ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate und Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion.....	105
5.3.1.2.2.	Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung	109
5.3.1.3.	Zyklus 3 - Derivatisierung der DNA-Konjugate über eine Amidsynthese .....	111
5.3.2.	Kodierung der Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek.....	113
5.4.	Selektionsexperimente der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek mit diversen Proteinen .....	115
6.	Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln.....	121
6.1.	Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln .....	122
6.2.	Verwendete Copolymere P4.....	123
6.3.	Etablierung der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln .....	123
6.4.	Charakterisierung der Copolymer-DNA-Interaktion in organischen Lösungsmitteln .....	126
6.5.	Stabilitätsuntersuchungen der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln.....	129
6.5.1.	Inkubation von Metallsalzen mit DNA-Konjugaten in wässrigen Lösungsmittelgemischen und reinen organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers P4-a .....	130
6.5.2.	Inkubation von organischen Reagenzien mit DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers P4-a .....	132
7.	Zusammenfassung und Ausblick .....	135
8.	Experimenteller Teil .....	143
8.1.	Hilfssoftware .....	143
8.2.	Chemikalien und Lösungen.....	143

---

8.3.	Allgemeine chemische Arbeitstechniken und Geräte .....	144
8.4.	Allgemeine biologische Arbeitstechniken, Materialien und Geräte .....	146
8.5.	Amidsynthese von DNA-Konjugaten .....	149
8.6.	Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion .....	152
8.6.1.	Variation der Reaktionsbedingungen .....	152
8.6.2.	Reaktandenspektrum der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion .....	153
8.7.	Copolymer-vermittelte Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.....	156
8.8.	Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion .....	158
8.8.1.	Variation der Reaktionsbedingungen .....	158
8.8.2.	Reaktandenspektrum der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion .....	159
8.9.	Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung .....	161
8.9.1.	Variation der Reaktionsbedingungen .....	162
8.9.2.	Reaktandenspektrum der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung .....	163
8.10.	Affinitäts-Aufreinigung .....	164
8.10.1.	CuAAC-Reaktion der DNA-12a/b an die Agarose-Matrix .....	165
8.10.2.	CuAAC-Reaktion der DNA-12a/ b an magnetische Kügelchen .....	165
8.10.3.	Optimierter Prozess der Affinitäts-Aufreinigung.....	166
8.10.4.	Etablierung der Affinitäts-Aufreinigung.....	166
8.10.5.	Optimierung der Affinitäts-Aufreinigung .....	168
8.10.6.	Anwendung der Affinitäts-Aufreinigung .....	171
8.11.	Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek .....	173
8.11.1.	Zyklus 1 - Synthese und Kodierung .....	173
8.11.2.	Zyklus 2 - Validierung der ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate und Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion.....	175
8.11.3.	Zyklus 2 - Synthese und Kodierung .....	177
8.11.4.	Zyklus 3 - Synthese und Kodierung .....	179
8.11.5.	Selektionsassay.....	180
8.12.	Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln .....	183

---

8.12.1. Etablierung der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln .....	184
8.12.2. Charakterisierung der Copolymer-DNA-Interaktion in organischen Lösungsmitteln .....	184
9. Verzeichnisse .....	186
9.1. Literaturverzeichnis .....	186
9.2. Abkürzungsverzeichnis .....	196
9.3. Abbildungsverzeichnis.....	199
9.4. Tabellenverzeichnis .....	206
9.5. Schemataverzeichnis .....	210
Anhang .....	212
Danksagung .....	299
Eidesstattliche Versicherung.....	301

---

## Kurzfassung

Die Kombination von molekularbiologischen Methoden, wie der genetischen Kodierung, Selektion, DNA-Amplifikation und DNA-Sequenzierung, mit der kombinatorischen organischen Chemie konnte große Sammlungen an Molekülen, sogenannte DNA-kodierte Bibliotheken, für die Identifikation von bioaktiven Molekülen ermöglichen. Dabei besteht eine große Herausforderung in der nur geringen Abdeckung des chemischen Raumes durch die notwendige Kompatibilität der verwendeten organischen Reaktionen mit dem DNA-Barcode. So können stark saure, oder oxidierende Bedingungen, sowie hohe Temperaturen zu einem Verlust der Integrität der genetischen Kodierung führen, wodurch eine Identifikation von bioaktiven Molekülen erschwert wird. Zudem muss eine hohe Reinheit der Molekülbibliothek vorliegen, um die Identifikation falsch positiver *Hits* in Selektionsassays zu reduzieren.

Um diese Herausforderungen anzugehen, wurden in dieser Arbeit amphiphile Block-Copolymere für die Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek verwendet, sowie eine neue Aufreinigungs-Methode etabliert und angewendet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden amphiphile Block-Copolymere eingesetzt, die in Wasser nanometergroße hydrophobe Reaktionsräume bilden und eine aktive katalytische Einheit tragen. Dadurch sollte der hydrophile DNA-Barcode getrennt von dem reaktiven hydrophoben Reaktionsmedium vorliegen und somit eine Erweiterung des chemischen Raumes ermöglicht werden. Als katalytisch aktive Einheit wurde eine Sulfonsäure immobilisiert, um die Povarov-Reaktion, eine Boc-Entschützung und eine Pictet-Spengler-Reaktion an DNA-Konjugaten zu etablieren. Die Copolymer-vermittelte Povarov Reaktion zur Synthese von DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugaten konnte ohne eine Degradierung des DNA-Stranges erfolgreich mit einem breiten Reaktandenspektrum an aromatischen Aminen und DNA-Aldehyd-Konjugaten durchgeführt werden. Bei der Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung konnte im Vergleich zur Povarov-Reaktion eine Depurinierung detektiert werden. Allerdings konnte diese DNA-Zerstörung durch die Zugabe von MgCl<sub>2</sub> und die Variation der Copolymer-Struktur auf unter 10 % bei einer Produktbildung von 50 % gesenkt werden. Die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion konnte nur mit einem DNA-Aldehyd-Konjugat und dem Tryprophanmethylester erfolgreich durchgeführt werden und war somit nicht für eine Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek geeignet. Um nicht nur Säure-vermittelte Reaktionen durchführen zu können, wurde ein Copolymer mit einem immobilisierten Palladium-Komplex verwendet. In der Copolymer-vermittelten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung konnte ein DNA-Arylbromid mit diversen Boronsäuren das gewünschte Produkt in guten bis sehr guten Umsätzen ohne Degradierung des DNA-Stranges umgesetzt und somit erfolgreich etabliert werden.

Da Proben aus chemischen Reaktionen an DNA-Konjugaten oftmals nicht ausreichend durch die verfügbaren Methoden aufgereinigt werden konnten, wurde im weiteren Verlauf dieser

Arbeit eine neue Aufreinigung entwickelt, basierend auf einer dispersen Festphasenextraktion. Dabei wurde ein DNA-Einzelstrang an eine feste Agarose-Matrix gebunden. An diesen DNA-Einzelstrang konnte ein vollständig komplementärer aufzureinigender Gegenstrang über Watson-Crick-Basenpaarung immobilisiert werden. Kontaminationen konnten somit über einen Filter durch Einsatz verschiedener wässriger und organischer Lösungsmittel entfernt werden, ohne dass der DNA-Doppelstrang denaturiert wurde. Die Elution des aufgereinigten DNA-Einzelstranges erfolgte durch die Inkubation der Matrix mit wässriger Ammoniak-Lösung, welche anschließend rückstandslos entfernt werden konnte. Diese etablierte Affinitäts-Aufreinigung konnte anschließend beispielhaft in einer Amidsynthese und einer Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion angewendet werden und zeigte eine erhöhte Reinheit gegenüber herkömmlichen Aufreinigungs-Methoden.

Schließlich konnte durch die etablierten Copolymer-vermittelten chemischen Reaktionen und der neuen Aufreinigungs-Methode eine 105.288-Mitglieder große DNA-kodierte Molekülbibliothek hergestellt werden. Dafür wurde eine Synthesestrategie entwickelt, die aus alternierenden vier Syntheseschritten und drei enzymatischen Ligationen bestand. In einer kombinatorischen Synthese wurden die kleinen organischen Moleküle über eine Amidsynthese mit 24 Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren, eine Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion mit 41 diversen Aminen, einer anschließenden Boc-Entschützung und einer weiteren Amidsynthese mit 107 diversen Carbonsäuren synthetisiert. Durch die Verwendung der Affinitäts-Aufreinigung konnte eine deutliche Verbesserung der Reinheit, detektiert mit Hilfe der Gel-Elektrophorese, der DNA-kodierten Molekülbibliothek erzielt werden.

Die starke Hydrophilie des DNA-Stranges birgt Einschränkungen in der Wahl des Lösungsmittels und somit der durchzuführenden chemischen Reaktion, da viele Reaktionen nur unter Ausschluss von Wasser erfolgreich ablaufen. Daher sollten in dem letzten Teil der Arbeit nicht-funktionalisierte amphiphile Block-Copolymere eingesetzt werden, um ein Vermischen von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln zu ermöglichen. Eine DNA-Sequenz wurde dafür mit dem Copolymer in Wasser gemischt, getrocknet und anschließend in verschiedenen organischen Lösungsmitteln versucht zu lösen. Dabei konnte unter Verwendung einer Fluorophor-markierten DNA eine homogen verteilte gelbe Färbung in den organischen Lösungsmitteln beobachtet werden, im Vergleich zu einem abgetrennten gelben Pellet ohne die Verwendung des Copolymers. Durch analytische Messmethoden konnte die Bildung von großen Aggregaten bestimmt werden. Durch Stabilitätsuntersuchungen der DNA nach Inkubation mit diversen Metallsalzen und organischen Reagenzien konnte eine positive Wirkung auf die DNA-Stabilität durch die Reduzierung von Wasser beobachtet werden. Die Copolymer-DNA-Interaktion könnte eine neue Herangehensweise für die Durchführung von chemischen Reaktionen an DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln liefern.

## Abstract

The combination of molecular biology methods, such as genetic encoding, selection, DNA amplification and DNA sequencing, with combinatorial organic chemistry could enable large collections of molecules, so-called DNA-encoded libraries, for the identification of bioactive molecules. Here, a major challenge is the limited coverage of the chemical space due to the necessary compatibility of the organic reactions used with the DNA barcode. Thus, strongly acidic, or oxidizing conditions, as well as high temperatures, can lead to a loss of integrity of the genetic encoding, making identification of bioactive molecules difficult. In addition, high purity of the encoded library must be present to reduce the identification of false positive hits in selection assays.

To address these challenges, amphiphilic block copolymers were used in this work for the synthesis of a DNA-encoded compound library, and a new purification method was established and applied. In the first part of this work, amphiphilic block copolymers were used that formed nanometer-sized hydrophobic reaction spaces in water with an active catalytic moiety. This way, the hydrophilic DNA barcode would be present away from the reactive hydrophobic (core) reaction medium and allow the expansion of the chemical space. A sulfonic acid was immobilized as the catalytically active unit to establish the Povarov reaction, a Boc deprotection and a Pictet-Spengler reaction on DNA conjugates. The copolymer-mediated Povarov reaction for the synthesis of DNA-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]quinoline conjugates was successfully carried out without degradation of the DNA strand using a broad reactant scope of aromatic amines and DNA-aldehyde conjugates. For copolymer-mediated Boc deprotection, degradation could be detected due to the lack of buffering effect of the amine. However, this degradation could be reduced to below 10% with 50% product formation by adding MgCl<sub>2</sub> and varying the copolymer structure. The copolymer-mediated Pictet-Spengler reaction could only be successfully performed with one DNA-aldehyde conjugate and the tryptophan methyl ester, and thus was not suitable for the synthesis of a DNA-encoded compound library. In order to perform reactions other than those that are acid-mediated, a copolymer with an immobilized palladium catalyst was used. In the copolymer-mediated Suzuki-Miyaura cross-coupling, a DNA aryl bromide could be reacted with various boronic acids to give the desired product in good to very good conversions without degradation of the DNA strand, and thus could be successfully established.

Since samples from chemical reactions on DNA conjugates often could not be sufficiently purified by the available methods, a new purification method was developed in this work, based on a dispersed solid phase extraction. A DNA single strand was bound to solid agarose beads. A fully complementary counter strand to be purified could be immobilized to this DNA single strand via Watson-Crick base pairing. Contaminants could be removed by washing via a filter using various aqueous and organic solvents without denaturing the DNA double strand.

Elution of the purified DNA single strand was performed by incubating the beads with aqueous ammonia solution, which could subsequently be removed without leaving any residue. This established affinity purification could then be exemplarily applied in an amide coupling reaction and a copolymer-mediated Povarov reaction and showed increased purity compared to conventional purification methods.

By establishing copolymer-mediated chemical reactions and a new purification method, a 105,288-member DNA-encoded molecular library (MiDEL) were produced using four chemical synthesis steps and three enzymatic DNA ligations. The small molecule was synthesized via an amide coupling reaction of 24 aldehyde-functionalized carboxylic acids, a copolymer-mediated Povarov reaction with 41 diverse amines, subsequent Boc deprotection, and another amide coupling reaction with 107 diverse carboxylic acids. The use of affinity purification resulted in a significant improvement in the purity, detected by gel electrophoresis, of the DNA-encoded molecular library.

The strong hydrophilicity of the DNA strand imposes limitations in the choice of solvent and thus the chemical reaction to be carried out, since many reactions are only successful in the absence of water. Therefore, in the last part of the work, non-functionalized amphiphilic block copolymers should be used to allow mixing of DNA conjugates in organic solvents. For this purpose, a DNA sequence was mixed with the amphiphilic block copolymer in water, dried, and then attempted to dissolve in various organic solvents. Using a fluorophore-tagged DNA, a homogeneously distributed yellow staining was observed in the organic solvents, compared to a separated yellow pellet without the use of the copolymer. Analytical measurements determined the formation of large aggregates. Through stability studies of the DNA after incubation with various metal salts and organic reagents, a positive effect on DNA stability was observed due to the reduction of water. Accordingly, this copolymer-DNA interaction may allow chemical reactions to be carried out on DNA conjugates in organic solvents, thus expanding the chemical space.

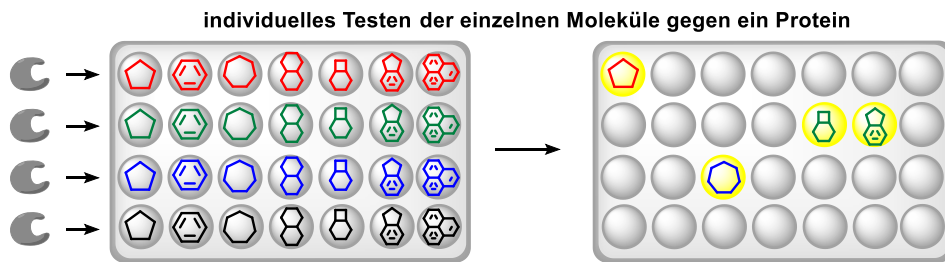


# 1. Einleitung

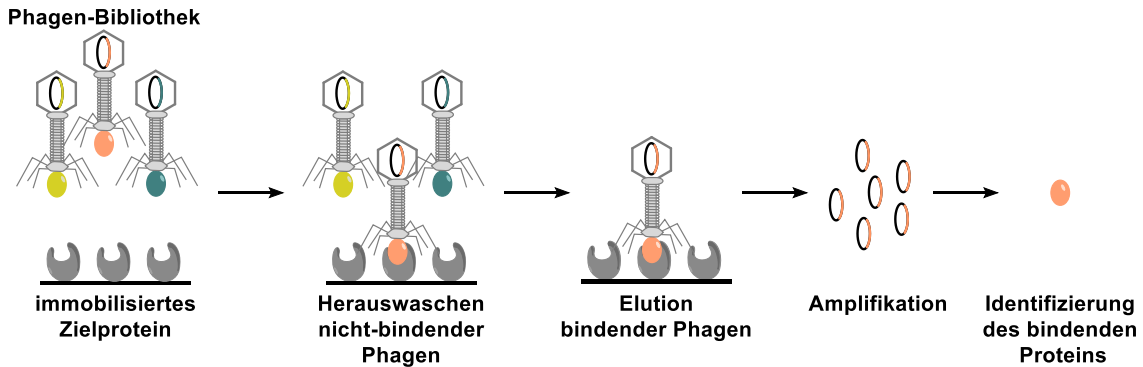
## 1.1 Wirkstoffforschung

Die Wirkstoffforschung beschäftigt sich mit der Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneimittel und ihrer Wirkmechanismen. Der Bedarf an neuen Medikamenten steigt stetig an, was auf eine immer älter werdende Bevölkerung, eine erhöhte Nachfrage nach neuen Medikamenten für Erkrankungen, wie Krebs, Diabetes oder Demenz, sowie eine steigende Resistenzbildung gegen bereits etablierte Arzneimittel, zum Beispiel Antiinfektiva und Chemotherapeutika, zurückzuführen ist. Zugleich wird die Erforschung neuer Medikamente immer anspruchsvoller, da die Wirkmechanismen nicht immer bekannt oder sehr komplex sind.<sup>[1-3]</sup> Ein Wirkstoff-Kandidat, ein bioaktives Molekül, wie zum Beispiel ein Protein, Peptid oder kleines organisches Molekül, muss die richtigen chemischen Eigenschaften besitzen und eine erforderliche Bindungsaffinität zu der Zielstruktur (*target*) aufweisen.<sup>[4]</sup> Dies kann eine reversible oder irreversible Bindung zu dem Wirkstoffziel, zum Beispiel einem pharmakologisch relevanten Protein, sein, wodurch sich dessen Funktion verändern kann.<sup>[4-7]</sup> Um solche bioaktiven Moleküle und die zu adressierenden Zielstrukturen zu identifizieren, werden Screening-Plattformen, wie das Hochdurchsatz-Screening (*high-throughput screening*, HTS), virtuelle Screening oder Fragment-Screening, vor allem von der pharmazeutischen Industrie angewendet.<sup>[8-11]</sup> Bei dem HTS werden chemische Substanzbibliotheken mit bis zu einigen Millionen kleiner organischer Moleküle auf ihre Aktivität gegen biologische Zielstrukturen durch den Einsatz von Automatisierung, miniaturisierten Assays und einer anschließenden Datenanalyse untersucht (**Abbildung 1a**). Die Durchführung eines HTS erfordert eine Infrastruktur, die das Lagern der Millionen kleinen Moleküle, sowie eine einzelne automatische Testung dieser Moleküle ermöglicht, weshalb diese Technologie sehr Kosten- und Zeitaufwändig und somit nur für große pharmazeutische Unternehmen verfügbar ist.<sup>[12,13]</sup> Zudem sind oftmals viele störende Verbindungen (z.B. *pan-assay interference compounds*, PAINS) in solchen Substanzbibliotheken enthalten, welche wiederum zu falsch-positiven Treffern (*Hits*) führen.<sup>[14-16]</sup> Daher besteht die Notwendigkeit nach alternativen Screening-Technologien für die Identifizierung von bioaktiven Molekülen. Eine solche alternative Technologie stellt die Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe des 1985 vorgestellten Phagen-Displays dar (**Abbildung 1b**). Auf der Oberfläche von Bakteriophagen können verschiedene Proteine exprimiert werden. Anschließend kann jedes dieser Proteine kodiert werden, indem eine DNA-Sequenz in die Bakteriophagen eingefügt wird, was die Identifikation einzelner Proteine innerhalb einer großen Bibliothek ermöglicht. Im Gegensatz zum HTS kann daher die gesamte Protein-Bibliothek in einem Experiment gegen ein Zielprotein getestet werden. Dabei wird die Protein-Bibliothek mit einem auf einer Oberfläche immobilisierten Protein gemischt, inkubiert und anschließend werden die nicht-bindenden Proteine herausgewaschen.

a) Hochdurchsatz - Screening



b) Phagen Display



**Abbildung 1:** Screening-Plattformen für die Identifizierung von bioaktiven Molekülen: a) Hochdurchsatz-Screening; b) Phagen-Display.

Die bindende Bakteriophage wird gespalten und die DNA-Sequenz, die das bindende Protein kodiert, kann vervielfältigt und ausgelesen werden.<sup>[17–23]</sup> Diese Vervielfältigung wurde durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) im Jahre 1985 durch *Dr. Kary Banks Mullis* ermöglicht. Dabei kann eine sehr geringe Menge an DNA mittels einer DNA-Polymerase und sich wiederholenden Zyklen an Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation exponentiell vervielfältigt werden.<sup>[24]</sup> In Analogie zu der Methode des Phagen-Displays wurde von *Lerner* und *Brenner* 1992 die Technologie der DNA-kodierten chemischen Substanzbibliothek (*DNA-encoded chemical library*, DEL) vorgestellt. Dabei sollte die Vielfalt an chemischen Verbindungen mit der genetischen Kodierung kombiniert werden, um eine leistungsfähigere und vielseitigere Technologie für die Wirkstoffsuche zu schaffen.<sup>[25,26]</sup> Wie bei dem Phagen-Display, sollte ein kleines Molekül, der Phänotyp, über eine DNA-Markierung, den Genotyp, kodiert werden, wodurch die Möglichkeit besteht, die Moleküle in einer großen Bibliothek zu vereinen (*poolen*) und in einem Selektionsexperiment gegen ein Protein, gebunden an einer Oberfläche, zu testen. Anschließend sollte auch hier die DNA-Sequenz der gebundenen kleinen Moleküle an das Zielprotein vervielfältigt und ausgelesen werden, um das gebundene Molekül, den Hits, zu identifizieren.<sup>[8,26–29]</sup> Diese Idee wurde 1993 von *Janda et al.* und *Gallop et al.* durch die Synthese von Peptidbibliotheken auf einer festen Phase realisiert.<sup>[30,31]</sup>

Dabei wurden Kügelchen (*beads*) mit zwei Linkern versehen, welche mit Hilfe einer kombinatorischen Synthesestrategie mit einem Aminosäurebaustein und einem DNA-Nukleotid modifiziert werden konnten, wodurch eine große Anzahl von Verbindungen erhalten werden konnte.<sup>[30,31]</sup> Durch die im Jahr 1995 entwickelte kombinatorische enzymatische Ligation von DNA-Sequenzen konnte das Molekül über einen Linker direkt an den DNA-Strang angebracht werden und kodiert werden, ohne eine feste Phase zu verwenden.<sup>[32]</sup> Heutzutage wird die Technologie der DNA-kodierten chemischen Substanzbibliotheken sowohl von der pharmazeutischen Industrie als auch von akademischen Arbeitsgruppen verwendet.<sup>[33–36]</sup>

## 1.2 DNA-kodierte chemische Molekülbibliotheken

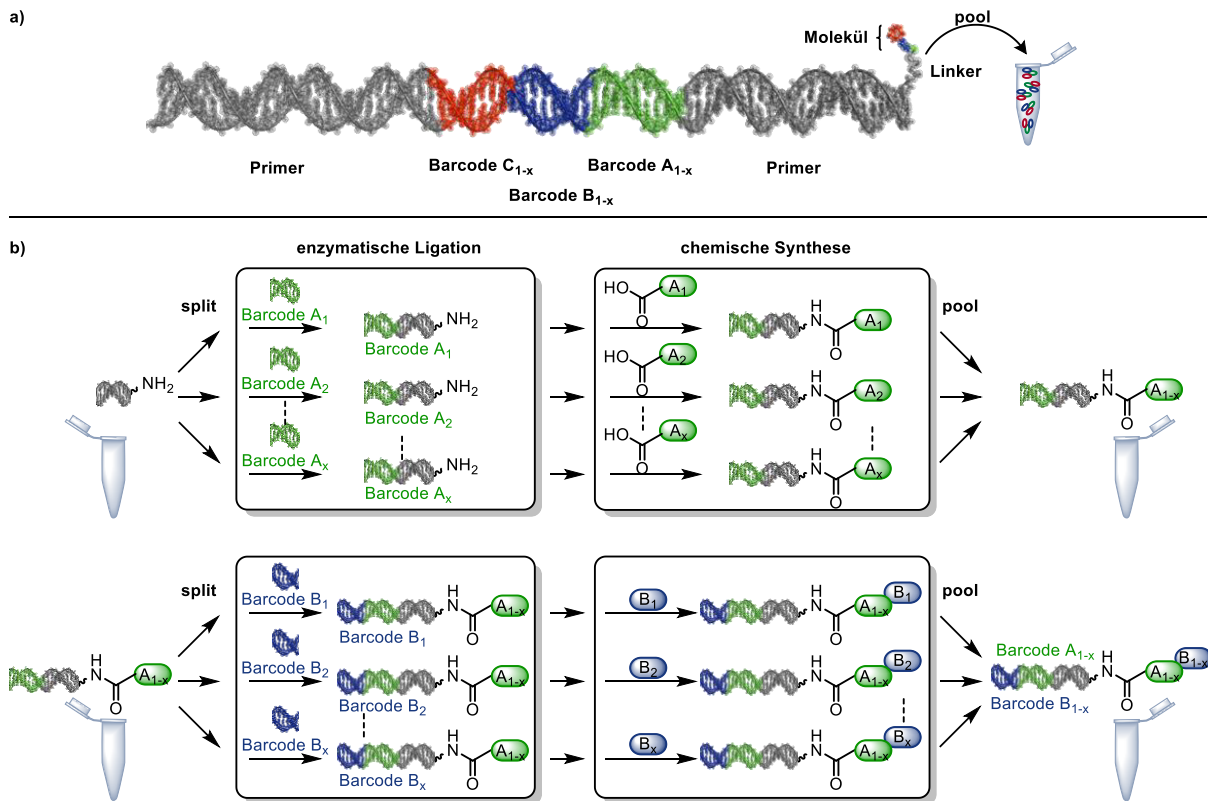
Die von *Lerner* und *Brenner* vorgeschlagene Technologie der DNA-kodierten chemischen Substanzbibliotheken (DEL) hat in den letzten 15 Jahren mehr und mehr an Interesse und Aufmerksamkeit gewonnen. Es wurden von der Industrie als auch von Arbeitsgruppen aus der Akademie neue Synthesemethoden einer Substanzbibliothek, verschiedene Screening-Experimente, sowie auch Methoden für eine effiziente Hit-Validierung vorgestellt, die im Folgenden näher beschrieben werden. Dabei wurden viele Chancen aber auch Herausforderungen dieser Technologie identifiziert.<sup>[8,26]</sup>

### 1.2.1. Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek

Eine DNA-kodierte Substanzbibliothek besteht aus chemisch synthetisierten Molekülen, welche kovalent an einen DNA-Strang gebunden sind. Jeder in der chemischen Synthese verwendete Molekülbaustein wird über einen individuellen DNA-Barcode, bestehend aus unterschiedlichen Abfolgen der vier Nucleobasen, beschrieben (siehe **Abbildung 2a**). Durch diese Markierung der einzelnen Bausteine können die synthetisierten DNA-Molekül-Konjugate in lediglich einem kleinen Reaktionsgefäß gelagert und simultan in einem Screening-Experiment verwendet werden.

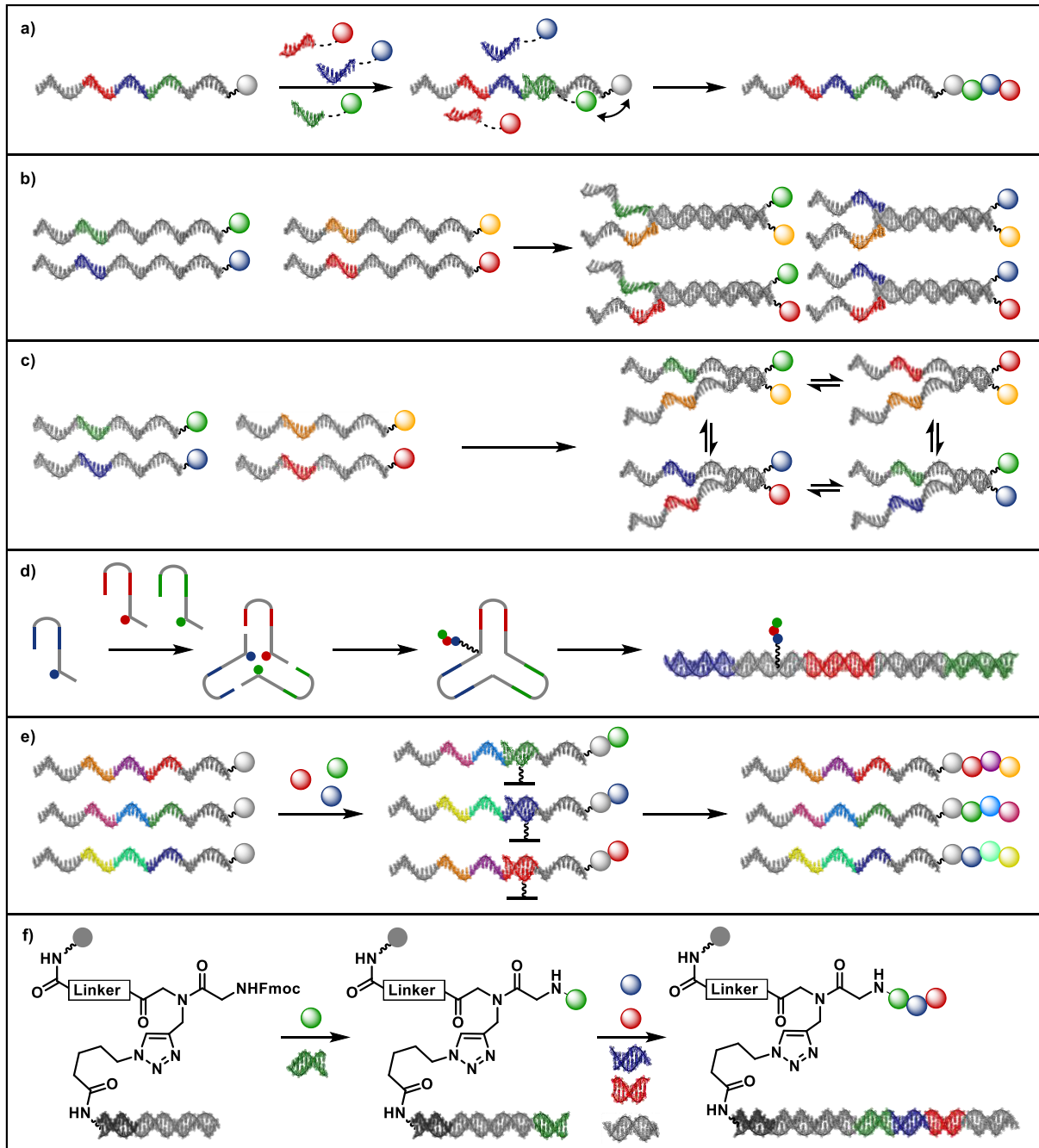
Um eine solche Molekülbibliothek aufzubauen, wurden verschiedenste Techniken, wie die kombinatorische *Split-and-Pool*-Synthese, die *DNA-templated chemistry*<sup>[36–40]</sup>, der *yoctoReactor*<sup>[37,41]</sup>, die *encoded solid-phase chemistry*<sup>[42–44]</sup>, das *DNA-encoded self-assembly (ESAC)*<sup>[45]</sup>, sowie das *DNA-routing*<sup>[46,47]</sup> entwickelt. Die in der Literatur bevorzugte Synthese einer DEL ist die *Split-and-Pool*-Synthese (siehe **Abbildung 2b**).<sup>[26,34,35,48,49]</sup> Dabei beginnt die Synthese in der Regel mit einem kurzen einzel- oder doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid (*headpiece*), welches einen chemischen Linker besitzt, um das kleine Molekül zu binden.<sup>[34,35]</sup> Oftmals wird eine Polyethylenglykol-Kette mit einer endständigen Aminogruppe als Linker verwendet.

## Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek



**Abbildung 2:** Darstellung eines a) DNA-kodierten Moleküls und b) zwei Zyklen der Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek nach dem *Split-and-Pool*-Ansatz mit alternierenden enzymatischen Ligations- und chemischen Syntheseschritten.

Die chemische Synthese und die enzymatische Ligation zum Aufbau des DNA-Barcodes erfolgen anschließend in sich wiederholenden Aufteilen- (*Split*) und Vermischen-Zyklen (*Pool*). Dabei wird das DNA-Startmaterial in so viele Reaktionsgefäße aufgeteilt, wie auch Molekülbausteine verwendet werden sollen. In diesen Reaktionsgefäßen kann anschließend die chemische Synthese durchgeführt werden, wobei der Molekülbaustein an den Linker des DNA-Oligonukleotids bindet. Dieses Zwischenprodukt kann, z.B. durch eine ethanolische Fällung, aufgereinigt werden und für die enzymatische Ligation verwendet werden. Dabei wird der jeweilige Barcode zu dem entsprechenden Molekülbaustein durch die Verwendung von T4 DNA-Ligase an das DNA-Oligonukleotid ligiert. Je nach Kodierstrategie kann eine Ligation über *sticky-ends* von doppelsträngiger DNA oder über eine *Spint*-Ligation von einzelsträngiger DNA erfolgen.<sup>[34,38,50]</sup> Im Anschluss an die Ligation können die kodierten DNA-Produkte vermischt werden. Diese Mischung kann nun für den nächsten Zyklus verwendet werden, wodurch der chemische Raum des kleinen Moleküls über die chemische Synthese erweitert und der dazugehörige DNA-Barcodes mittels einer enzymatischen Ligation verlängert werden kann. Mit dieser Methode kann beispielsweise in drei kombinatorischen Zyklen unter Verwendung von jeweils 100 Molekülbausteinen pro Zyklus eine Bibliotheksgröße von 1.000.000 Mitgliedern über ein exponentielles Wachstum aufgebaut werden.<sup>[35,51]</sup>



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung verschiedener Synthesen einer DNA-kodierten Molekülbibliothek. a) *DNA-templated synthesis*; b) *DNA-encoded self-assembly*; c) *dynamic self-assembly*; d) *yoctoReactor*; e) *DNA-routing*; f) *DNA-encoded solid phase synthesis*.

Die Synthese einer DEL nach dem *DNA-templated*-Verfahren, beruht auf der Verwendung einer einzelsträngigen DNA-Vorlage (*template*), welche bereits zu Beginn der Synthese alle endgültigen Barcodes der Bibliotheksmitglieder enthält (siehe **Abbildung 3a**). Diese DNA-Vorlage enthält ebenfalls eine reaktive Gruppe, an der die chemische Synthese durchgeführt werden kann und die Molekülbausteine angebaut werden können. Die reaktiven Molekülbausteine werden über einen spaltbaren Linker an kurze einzelsträngige DNA-Oligonukleotide gebunden, welche komplementär zu der DNA-Vorlage sind (Anticodon).

Beim Mischen mit den DNA-Vorlagen können die kurzen Molekül-DNA-Oligonukleotide mit dem Vorlagen-DNA-Strang hybridisieren und die reaktiven Molekülbausteine können reagieren. Anschließend kann der Linker zwischen dem Molekülbaustein und dem kurzen DNA-Oligonukleotid gespalten werden, wodurch das Produkt des ersten Syntheszyklus freigesetzt wird und eine weitere funktionelle Gruppe für den nächsten Syntheszyklus entsteht.<sup>[36,38]</sup> Der Vorteil dieser Synthese beruht auf der erhöhten effektiven Molarität der DNA-markierten Molekülbausteine durch die DNA-Hybridisierung.<sup>[52]</sup> Dadurch können gleichzeitig viele unabhängige Reaktionen in einer hochselektiven Weise ablaufen, da nur Produkte miteinander reagieren, welche an komplementäre DNA-Sequenzen gebunden sind.<sup>[53]</sup> Allerdings stellt die Notwendigkeit, für jedes Bibliotheksmitglied eine individuelle DNA-Vorlage herzustellen, eine erhebliche Hürde für die breite Anwendung dar.<sup>[26,48,54]</sup> Eine weitere Technik, die sich die DNA-Hybridisierung zu Nutze macht, ist die *DNA-encoded self-assembly* Synthese (siehe **Abbildung 3b**). Bei dieser Synthesestrategie werden kleine Molekülfragmente gebunden an eine einzelsträngige DNA-Sequenz verwendet. Diese DNA-Sequenz besteht aus einer Hybridisierungsregion und einer Kodierungsregion. Nach einer Vermischung der DNA-Molekül-Konjugate hybridisieren die entsprechenden Regionen auf kombinatorische Weise unabhängig von der kodierenden Region. Bei dieser Synthesestrategie reagieren die Moleküle nicht miteinander, weshalb eine duale Pharmakophor-Substanzbibliothek vorliegt.<sup>[33,48,55]</sup> Das gleiche Prinzip wird ebenfalls bei der *dynamic self-assembly* Molekülbibliothek angewendet (siehe **Abbildung 3c**). Hierbei ist der Hybridisierungsbereich allerdings kürzer und bildet somit instabilere DNA-Doppelstränge aus. Dadurch kommt es zu einem dynamischen Austausch der Molekülfragmente.<sup>[56,57]</sup>

Die *yoctoReactor*-Technologie nutzt ebenfalls die Selbstorganisation von DNA-Oligonukleotiden, um DNA-gebundene Molekülbausteine zusammenzubringen und eine hocheffiziente kombinatorische Synthese zu ermöglichen (siehe **Abbildung 3d**). Dafür werden die Molekülbausteine kovalent über einen spaltbaren Linker (mit Ausnahme von einem nicht-spaltbaren Linker) an ein DNA-Oligonukleotid gebunden. Dieses besteht aus selbstkomplementären spezifisch für den Molekülbaustein kodierenden Regionen und einer nicht variablen Region, welche für die Bildung des *yoctoReactors* verantwortlich ist. Bei der Synthese der Substanzbibliothek werden die DNA-Molekül-Konjugate schrittweise zusammengeführt. Die komplementären Regionen hybridisieren, wodurch eine räumliche Nähe zwischen den Molekülbausteinen entsteht und die chemische Reaktion ablaufen kann. Die beiden DNA-Stränge werden aneinander ligiert. Anschließend kann das Reaktionsgemisch mit Hilfe einer Gel-Aufreinigung von nicht umgesetzten Substraten entfernt werden und die Bindung des spaltbaren Linkers kann gebrochen werden. Durch Wiederholung dieser Schritte kann die Molekülbibliothek aufgebaut werden.<sup>[37,41]</sup>

Die *DNA-routing*-Strategie, entwickelt von *Pehr B. Harbury* und *David Halpin*, kombiniert die DNA-Hybridisierung mit der *Split-and-Pool*-Strategie, unter Verwendung einer festen Phase (siehe **Abbildung 3e**). Es wird ein langes einzelsträngiges DNA-Templat mit kodierenden Regionen und einer reaktiven Gruppe, beispielsweise einem primären Amin, hergestellt. Einzelne kodierende Regionen hybridisieren an komplementäre DNA-Sequenzen, welche kovalent an einer Oberfläche gebunden sind. Dadurch kommt es zu einer Auftrennung des DNA-Templats nach der kodierenden Region. Anschließend können an der reaktiven funktionellen Gruppe die Molekülbausteine gebunden werden. Das DNA-Templat mit dem nun gebundenen Molekül kann von der Oberfläche entfernt werden und steht für den nächsten Syntheszyklus zur Verfügung.<sup>[46,47]</sup>

Basierend darauf wurde die *DNA-encoded solid-phase*-Synthese entwickelt (siehe **Abbildung 3f**). Dabei wurde die parallele Synthese von kleinen Molekülen mit einer enzymatischen Ligation von ungeschützten kodierenden doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden unter Verwendung einer festen Phase kombiniert. An eine feste Phase wurde ein bifunktionaler Linker gebunden, um einerseits die chemische Synthese und andererseits die enzymatische Ligation durchführen zu können.<sup>[42–44]</sup>

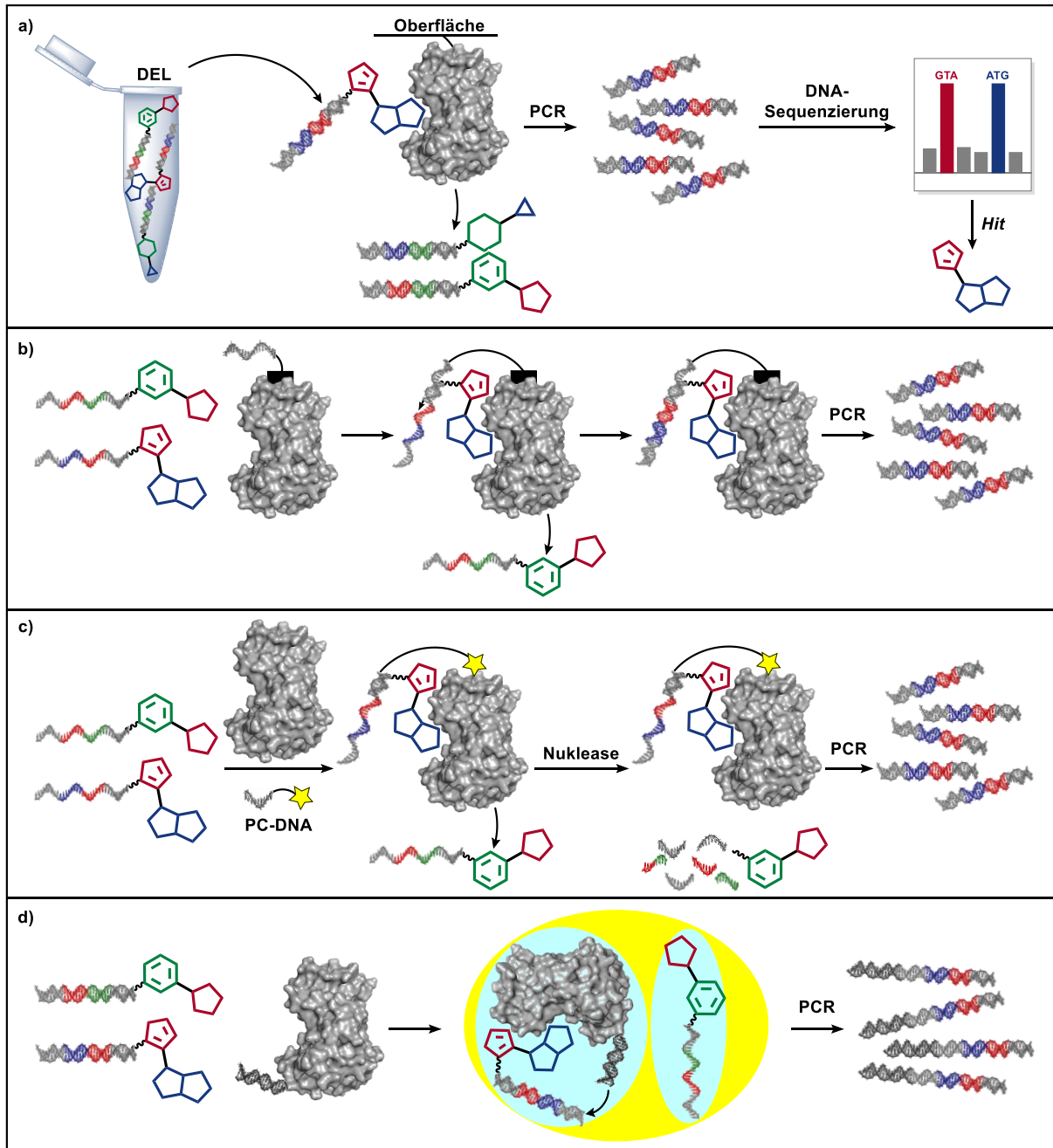
## 1.2.2. Selektion einer DNA-kodierten Molekülbibliothek

Die unterschiedlich hergestellten DNA-kodierten Molekülbibliotheken können gegen Zielstrukturen, z.B. Proteine, zur Selektion von möglichen Bindern getestet werden. Dabei kann die komplette DNA-kodierte Substanzbibliothek in nur einem Experiment gegen ein Protein der Wahl (*protein of interest*, POI) auf die Affinität der einzelnen Bibliotheksmitglieder hin untersucht werden. Das am häufigsten verwendete Selektionsverfahren beruht auf einem Affinitäts-basierten Selektionsassay und verläuft ähnlich wie die Phagen-Display-Technologie (siehe **Abbildung 4a**).<sup>[8,58]</sup> Das Protein der Wahl wird auf einem festen Träger, wie biokompatibles Harz oder magnetische Kügelchen, immobilisiert. Dabei werden die Proteine häufig durch eine Biotinylierung oder eine Polyhistidin-Markierung substituiert, um eine Bindung zu der festen Phase zu ermöglichen.<sup>[59]</sup> Anschließend kann die DNA-kodierte Substanzbibliothek mit dem gebundenen Zielprotein inkubiert werden und Bibliotheksmitglieder können an das Protein binden. Nicht-bindende Moleküle können durch wiederholte Waschschriffe von dem Protein entfernt werden, um so die bindenden Moleküle anzureichern. Diese verbliebenen Bibliotheksmitglieder können anschließend, beispielsweise durch eine Hitzedenaturierung des Zielproteins, eluiert werden. Anschließend können die DNA-Sequenzen über eine Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und sequenziert werden. Die Rohdaten der Sequenzierung werden für alle Barcode-Kombinationen und ihre jeweiligen kodierten Moleküle ausgewertet. So spiegelt die Anzahl der Zählungen eines jeden Bibliotheksmitglieds seine Retention auf dem gebundenen Zielprotein und seine Anreicherung gegenüber dem Hintergrund wider. Die Selektionsergebnisse können anschließend rechnerisch und grafisch ausgewertet werden.<sup>[8,26,28,29]</sup>

Damit die Selektion der DNA-kodierten Substanzbibliothek erfolgreich verläuft, muss die Größe der DEL, sowie die Qualität berücksichtigt werden. Mit zunehmender Bibliotheksgröße sind die einzelnen Mitglieder zunehmend verdünnt, wodurch eine abnehmende Anreicherung erhalten wird. Dadurch können Binder mit einer mittleren und niedrigen Affinität zu dem Zielprotein erschwert entdeckt werden. Des Weiteren führt die Immobilisierung des Zielproteins eventuell zu einer veränderten Konformation, wodurch sich die Bindung der Moleküle an das Zielprotein verändert.<sup>[37,60]</sup> Um diese Nachteile zu minimieren, wurden weitere Verfahren, wie die *interaction-dependent PCR* (IDPCR)<sup>[61]</sup>, das *DNA-programmed affinity labeling* (DPAL)<sup>[62,63]</sup> oder das *binder trap enrichment* (BTE)<sup>[37]</sup> entwickelt.

Bei der *interaction-dependent PCR* (IDPCR) kann die Bindung zwischen komplexen Gemischen von DNA-markierten Zielproteinen und Mitgliedern einer DEL analysiert werden (siehe **Abbildung 4b**). Die Annäherung eines Bibliotheksmitglieds an ein DNA-markiertes Zielprotein führt zur Hybridisierung der DNA-Stränge und zur Bildung einer Haarnadelstruktur, wodurch nach Primerverlängerung und DNA-Amplifizierung sowohl das Bindungsmolekül, als auch das Zielprotein identifiziert werden kann.<sup>[61]</sup>





**Abbildung 4:** Schematische Darstellung verschiedener Selektions-Verfahren zur Identifizierung von *Hit*-Strukturen einer DNA-kodierten Molekülbibliothek gegen ein Protein (hier: PDB-Code: 6QFL).

a) Affinitäts-basierter Selektionsassay; b) *interaction-dependent PCR*; c) *DNA-programmed affinity labeling*; d) *binder trap enrichment*.

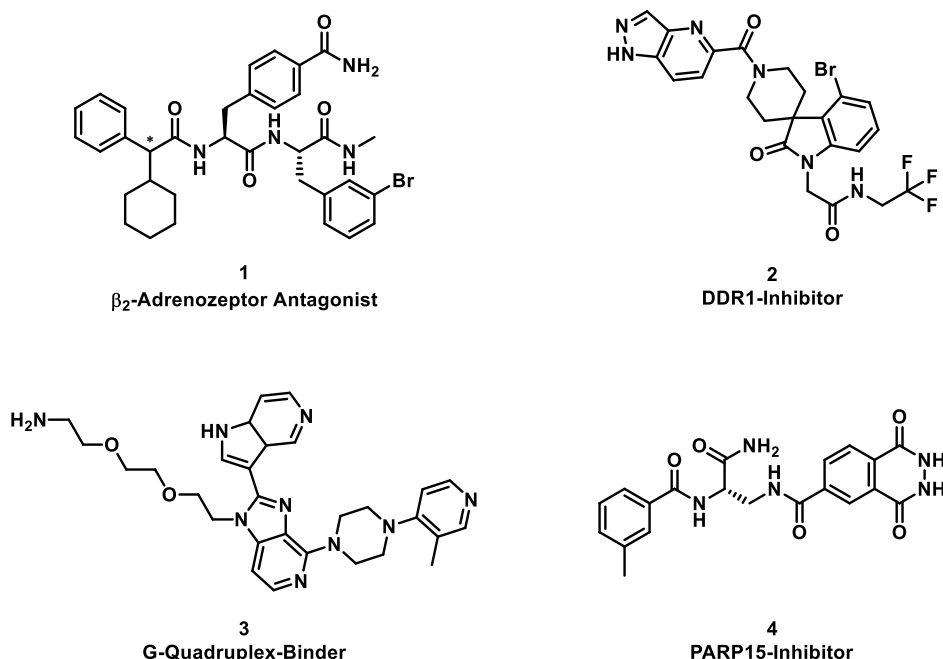
Eine weitere Methode ist das *DNA-programmed affinity labeling* (DPAL), wobei das Zielprotein weder modifiziert noch immobilisiert werden muss (siehe **Abbildung 4c**). Bei diesem Ansatz wird ein DNA-Oligonukleotid mit einer 5'-Azidophenyl-Photovernetzungseinheit (*photocrosslinking-DNA*, PC-DNA) durch eine komplementäre Region mit der Molekülbibliothek hybridisiert. Durch die anschließende Bindung eines dieser Moleküle an das Zielprotein wird die photochemische Gruppe in die Nähe des Proteins gebracht und durch Bestrahlung an ebendieses kovalent gebunden.

Dieser kovalente Komplex kann anschließend durch Gelelektrophorese oder durch einen Nuklease-Verdau von nicht gebundenen Konjugaten isoliert werden, da nur der DNA-Barcode von nicht-gebundenen Konjugaten zerstört wird.<sup>[62]</sup> Durch die photoreaktive Gruppe können schwache Wechselwirkungen zwischen dem DNA-Konjugat und dem Zielprotein stabilisiert und damit auch Mitglieder der Bibliothek mit einer niedrigeren Affinität identifiziert werden.<sup>[63]</sup> Ein weiteres Verfahren ist das *binder trap enrichment* (BTE) (siehe **Abbildung 4d**). Dabei wird das Zielprotein mit einer DNA-Markierung versehen. Die DNA-kodierte Molekülbibliothek wird mit dem DNA-markierten Zielproteinen in einer Wasser-Öl-Emulsion vermischt. Diese Emulsion wird verdünnt, wobei das gebundene DNA-Molekül mit dem Zielprotein in Emulsionströpfchen eingeschlossen wird. Die DNA des Zielproteins wird an die DNA des gebundenen Moleküls der DEL ligiert und kann anschließend über die PCR amplifiziert werden. Über die Sequenzierung des DNA-Stranges kann das gebundene Molekül bestimmt werden.<sup>[37,64]</sup>

Diese verschiedenen Selektionsmethoden werden stetig weiterentwickelt und es werden nicht nur aufgereinigte einzelne Proteinen verwendet, sondern auch *in-vivo*-Experimente durchgeführt.<sup>[65–69]</sup>

### 1.2.3. Hit-Strukturen aus DNA-kodierten Molekülbibliotheken

In den letzten 5 Jahren wurden mehrere Trefferverbindungen, sogenannte *Hits*, durch die Selektion von DNA-kodierten Substanzbibliotheken an Zielstrukturen identifiziert. In diesem Kapitel werden einige Beispiele für *Hit*-Strukturen aus DNA-kodierten Substanzbibliotheken vorgestellt (siehe **Abbildung 5**).



**Abbildung 5:** Beispiele für *Hit*-Strukturen identifiziert aus Selektionsexperimenten von DNA-kodierten Substanzbibliotheken.

Die *Arbeitsgruppe Lefkowitz* entdeckten einen negativen allosterischen Modulator **1** für den  $\beta_2$ -Adrenozeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, durch ein *in-vitro affinity-based* Selektionsassay einer DNA-kodierten Substanzbibliothek von *Nuevolution* (siehe **Abbildung 5**). Dabei wurde die Bindungsstelle des natürlichen Liganden Noradrenalin blockiert, um Verbindungen zu identifizieren, die an eine allosterische Bindungsstelle binden. In der Tat hatte sich gezeigt, dass der Hit an einer allosterischen Bindungsstelle an den Rezeptor bindet und mehrere Rezeptorfunktionen negativ moduliert.<sup>[70]</sup>

*Richter et al.* führten ein DEL-Selektionsexperiment mit der Discoidin Domain Rezeptor 1 (DDR1)-Kinase und einer mehrere Milliarden großen Molekülbibliothek durch. Diese Kinase ist ein wichtiger Rezeptor bei chronischen Nierenerkrankungen. Die gefundene Hit-Struktur **2** wurde optimiert und lieferte einen potenten DDR1-Inhibitor, welcher eine sehr gute Kinom-Selektivität und gute physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften aufweist (siehe **Abbildung 5**).<sup>[71]</sup> DNA-kodierte Bibliotheken mit einer ähnlichen Größe wurden erfolgreich auf synthetischen G-Quadruplex-DNA-Oligonukleotiden getestet und lieferten die Hit-Struktur **3** (siehe **Abbildung 5**). Dabei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei dieser Technologie die Zielstruktur über Proteine hinaus erweitert werden kann.<sup>[72]</sup>

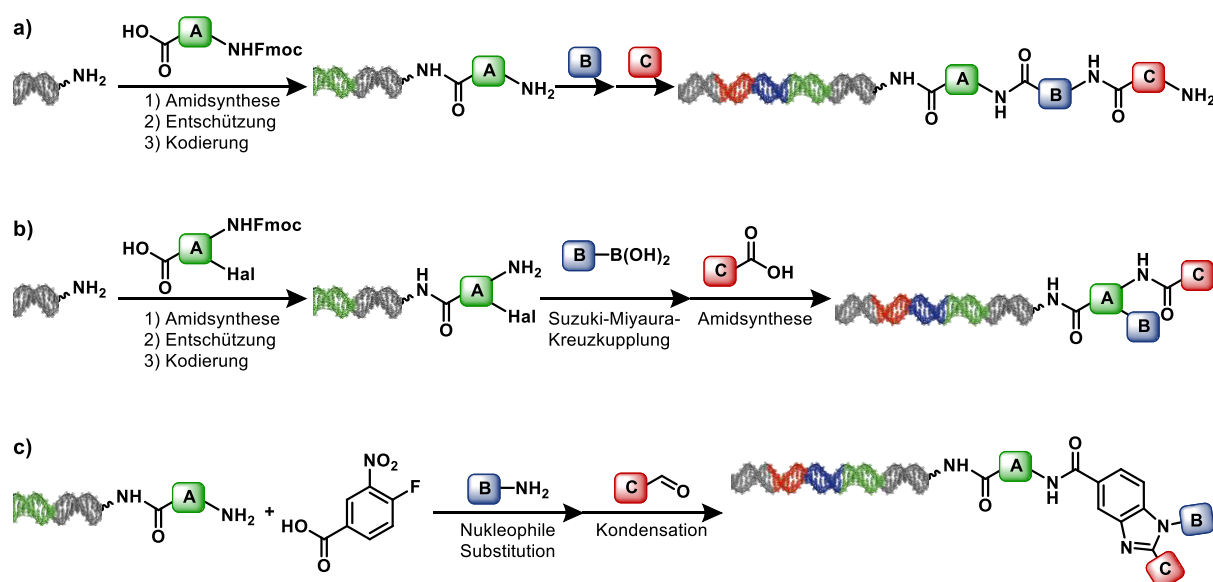
DNA-kodierte Substanzbibliotheken, die in akademischen Einrichtungen synthetisiert werden, sind in der Regel sehr viel kleiner und auf Proteinklassen ausgerichtet. Eine DNA-kodierte Molekülbibliothek mit 58.000 kodierten Mitgliedern wurde von der *Arbeitsgruppe Franzini* für NAD-abhängige Proteine getestet. Sie lieferte unter anderem den PARP15-Inhibitor **4** (siehe **Abbildung 5**).<sup>[73]</sup>

Bis heute wurden allerdings nur wenige der aus DNA-kodierten Bibliotheken stammenden Hit-Strukturen zu klinischen Kandidaten weiterentwickelt.<sup>[74–76]</sup>

## 1.2.4. Herausforderungen im Bereich DNA-kodierter Molekülbibliotheken

Um erfolgreich bioaktive Moleküle aus einem Selektionsexperiment mit einer DNA-kodierten Molekülbibliothek zu identifizieren, ist der erfasste chemische Raum, sowie die Qualität der DEL von großer Bedeutung. Dies ist abhängig von den verwendeten chemischen Reaktionen und der Auswahl der Molekülbausteine während der Bibliothekssynthese.<sup>[27]</sup> Dabei müssen die chemischen Reaktionen während der DEL-Synthese aufgrund der verwendeten DNA-Sequenz wasserträglich, robust gegenüber einem breiten Spektrum an Substraten und gut definierte Produkte mit hohen Umsätzen liefern. Idealerweise sollten dabei leicht verfügbare Ausgangsmaterialien verwendet werden. Dabei müssen die Molekülbausteine für die ersten Syntheseschritte einer DEL bi- oder tri-funktionell sein mit orthogonalen funktionellen Gruppen oder Schutzgruppen, um nach einem Syntheseschritt einen weiteren Synthesesyklus über die weitere vorhandene funktionelle Gruppe anschließen zu können. Der letzte Syntheseschritt erfordert demnach nur monofunktionale Molekülbausteine.

Als chemische Reaktionen werden dabei vor allem Carbonylreaktionen, wie die Bildung von Amidbindungen, reduktive Aminierungen, nukleophile Substitutionen von aromatischen und aliphatischen Halogeniden und  $C(sp^2)$ - $C(sp^2)$ -Kreuzkupplungsreaktionen durchgeführt. Dies liegt vor allem an der breiten Auswahl an Molekülbausteinen, sowie an den milden Reaktionsbedingungen. Dabei ist die Amidsynthese eine der am häufigsten verwendeten Reaktionen der DEL-Synthese, wobei oft auf Fmoc-geschützte natürliche und nicht-natürliche Aminosäuren als Molekülbausteine zurückgegriffen wird (siehe **Abbildung 6a**).<sup>[35,77,78]</sup>



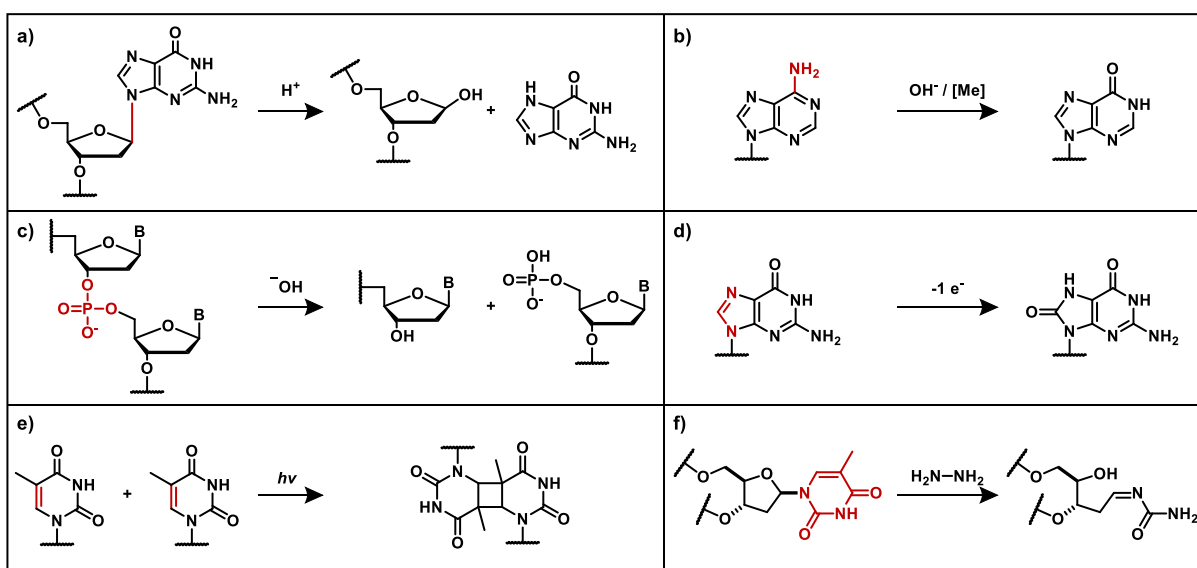
**Abbildung 6:** Darstellung häufig verwendeter chemischer Reaktionen zum Aufbau von DNA-kodierten Substanzbibliotheken (Hal = Halogenid).

Um die strukturelle Diversität einer DEL zu steigern, wurden dicht funktionalisierte Gerüststrukturen als Ausgangspunkte für die DEL-Synthese verwendet.<sup>[79,80]</sup>

Deng *et al.* verwendeten ein trifunktionelles Gerüst mit einem Fmoc-geschützten Amin, einer Carbonsäure und einem Aryliodid. Mit einer anschließenden Palladium-katalysierten Suzuki-Reaktion konnte das Aryliodid mit verschiedenen Boronsäuren zu Biarylen umgesetzt werden und eine etwa 35 Millionen große DEL mit Hilfe der *Split-and-Pool-Synthese* hergestellt werden (siehe **Abbildung 6b**).<sup>[81]</sup>

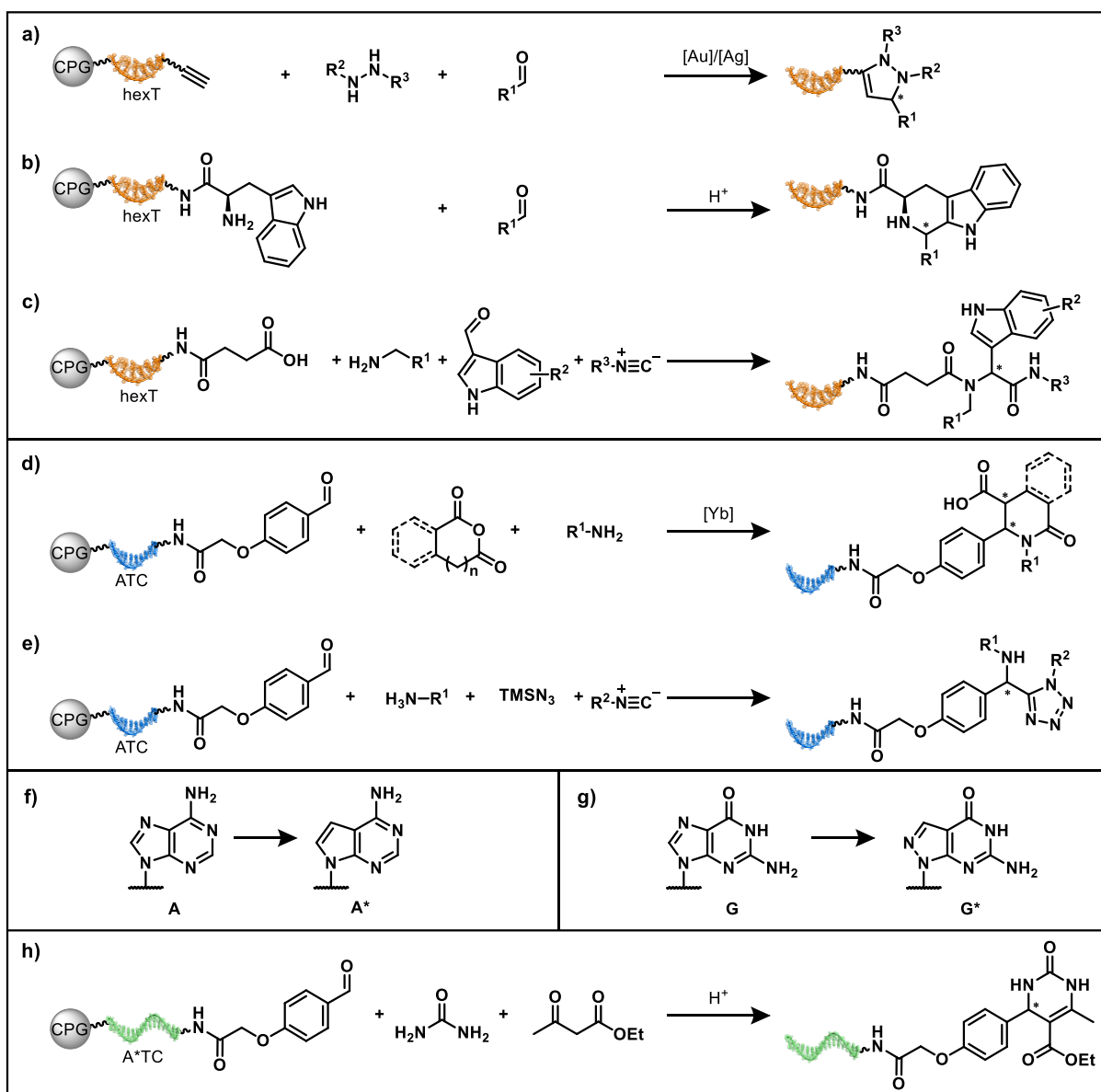
Die Synthese von heterozyklischen Gerüststrukturen an DNA-Konjugaten wurde erstmal von Satz *et al.* beschrieben. Dabei wurde die Synthese von Imidazolinon-, Chinazolinon- und Imidazopyridin-Gerüsten vorgestellt und eine DEL mit einem Benzimidazol-Gerüst aufgebaut (siehe **Abbildung 6c**).<sup>[82,83]</sup> Auch weitere Reaktionen, wie die Diels-Alder-Reaktion<sup>[84]</sup>, eine Zirkonium(IV)-katalysierte Epoxidöffnung<sup>[85]</sup> und eine Ruthenium-katalysierte Ringschlussmetathese<sup>[86]</sup> wurden für die DEL-Synthese vorgestellt.

Bei der Reaktionsentwicklung muss bekanntlich die Reaktivität der DNA berücksichtigt werden. Dabei sind vor allem saure Reaktionsbedingungen zu vermeiden, da ein niedriger pH-Wert zu einer Depurinierung, also einer Abspaltung der Purin-Basen, führt. Dabei erfolgt eine hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen dem N9-Atom der Purin-Base und dem anomeren C1'-Atom der Desoxyribose-Einheit (siehe **Abbildung 7a**).<sup>[87,88]</sup> Sollten Purin-Basen von dem DNA-Barcode während der DEL-Synthese abgespalten worden sein, so liegt der DNA-Barcode nicht mehr intakt vor und es kann zu einem falschen Auslesen der DNA-Sequenz kommen und somit zu einer fälschlich identifizierten Hit-Struktur. Zudem sind höhere Konzentrationen von Metallionen in Kombination mit einer hohen Temperatur für die DNA-Sequenz schädlich, sowie auch die Verwendung von starken Nucleophilen oder Oxidationsmitteln (siehe **Abbildung 7**).<sup>[89-91]</sup>



**Abbildung 7:** Ausgewählte DNA-Degradierungen verursacht durch verschiedene Reaktionsbedingungen. a) Depurinierung; b) Desaminierung; c) Hydrolyse des Phosphatrückgrats; d) Schädigung durch oxidative Radikale; e) Thymin-Dimerisierung; f) nucleophiler Angriff.

In den letzten 10 Jahren wurde nach Methoden gesucht, um die chemische Stabilität der DNA-Barcodes zu steigern und somit neue chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten zu entwickeln und den chemischen Raum von DNA-kodierten Substanzbibliotheken zu erweitern. Die *Arbeitsgruppe Brunschweiler* entwickelte neue chemische Reaktionen auf DNA-Konjugaten, welche kovalent an eine feste Phase (*controlled pore glass*, CPG) gebunden sind. Dabei liegt der DNA-Strang geschützt vor und es können sowohl wässrige Lösungsmittel als auch organische Lösungsmittel verwendet werden. Zudem ist es auch möglich, die chemische Reaktion unter trockenen Bedingungen ablaufen zu lassen. Gestartet wurde dieses Projekt mit der Entwicklung der „hexT“-Adaptersequenz. Dabei handelt es sich um eine DNA-Sequenz, bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden Thymin-Basen. Thymidin stellte sich von allen Nukleotiden als das chemisch stabilste heraus. Durch diese Adapter-Sequenz auf der festen Phase kann ein Zugang zu einer breiten Auswahl an Grundstrukturen in dem ersten Schritt der DEL-Synthese erhalten werden. Es konnte die Synthese von  $\beta$ -Carbolinen, Pyrazolinen und Pyrazolen über Säure- und Gold-katalysierte Reaktionen gezeigt werden (siehe **Abbildung 8a, b**). Anschließend kann das DNA-Produkt von der festen Phase abgespalten werden und über die hexT-Adapter-Sequenz können DNA-Barcodes ligiert werden.<sup>[92,93]</sup> Mit dieser Strategie konnte eine DNA-kodierte Substanzbibliothek auf Basis der Ugi-4-Komponenten-Reaktion hergestellt werden und ein MDM2-Binder, sowie ein TEAD-YAP-Inhibitor entdeckt werden (siehe **Abbildung 8c**).<sup>[94]</sup> Es konnte zudem bei einem Screening mit Metallsalzen und Organokatalysatoren festgestellt werden, dass eine DNA-Sequenz bestehend aus Thymin und Cytosin ähnlich chemisch stabil ist, wie die hexT-Sequenz. Die Guanin-Base war hingegen am labilsten gegenüber diesen Reagenzien.<sup>[95]</sup> Das Wissen über die Reaktivität der Nukleotide wurde in eine Kodierstrategie von einer hexT-Adapter-Sequenz zu einem ATC-Barcode weiterentwickelt und es konnten weitere Reaktionen auf der festen Phase, wie die Castagnoli-Cushman Reaktion und Isocyanid-basierte Multikomponenten-Reaktionen, etabliert werden (siehe **Abbildung 8d, e**).<sup>[96,97]</sup> Da auch hier teilweise eine Degradierung der DNA-Sequenz auftrat, wurden die Basen Adenin und Guanin chemisch zu 7-Deazaadenin (A\*) und 8-Aza-7-Deazaguanin (G\*) modifiziert, um die Depurinierung zu reduzieren (**Abbildung 8f, g**). Die zentralen Prozesse für die Aktivität einer DECL, wie die enzymatische Ligation, die Vervielfältigung mittels PCR, sowie die Sequenzierung der DNA-Sequenz verliefen ähnlich, wie die einer natürlichen DNA-Sequenz. Der modifizierte 3-Basen-DNA-Barcode (A\*TC) wurde erfolgreich für Säure-katalysierte Reaktionen, wie die Pictet-Spengler-Reaktion oder die Biginelli-Reaktion eingesetzt (siehe **Abbildung 8h**).<sup>[98,99]</sup>

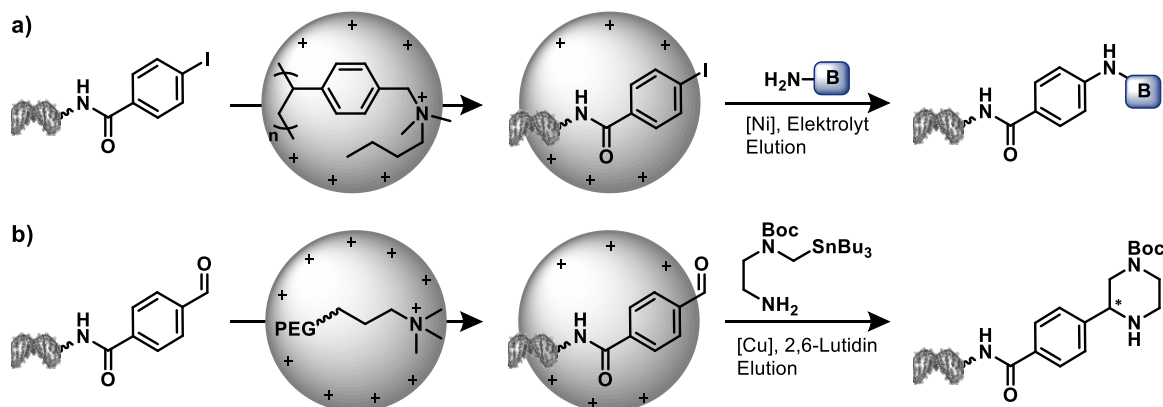


**Abbildung 8:** Auswahl verschiedener chemischer Reaktionen an DNA-Konjugaten gebunden an eine feste Phase (CPG) unter Verwendung verschiedener DNA-Sequenzen.

a) Pyrazolin-Synthese; b) Pictet-Spengler-Reaktion; c) Ugi-4-Komponenten-Reaktion; d) Castagnoli-Cushman-Reaktion; e) Ugi-Azid-4-Komponenten-Reaktion; f) Struktur der Base Adenin (A) und der modifizierten Base 7-Deazaadenin (A\*); g) Struktur der Base Guanin (G) und der modifizierten Base 8-Aza-7-Deazaguanin (G\*); h) Biginelli-Reaktion.

Ein weiterer Ansatz, um neue chemische Reaktionen auf DNA-Startmaterialien zu etablieren, war die reversible Immobilisierung der DNA-Konjugate auf einer festen Phase. Dadurch konnten chemische Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden und somit die Auswahl an chemischen Reaktionen erweitert werden. So konnten *Flood et al.* die DNA reversibel an ein starkes Anionenaustauscherharz aus Polystyrol mit einer quaternären Ammonium-Komponente binden und eine decarboxylierende Kreuzkupplung, eine elektrochemische Aminierung, sowie eine reduktive Aminierung durchführen (siehe **Abbildung 9a**).<sup>[100]</sup>

Ruff *et al.* verwendete einen kationischen unlöslichen Träger auf Polyethylenglykol-Basis, um die DNA-Startmaterialien reversibel zu binden. Dadurch wurde die Synthese von gesättigten Heterozyklen über das Zinn (Sn) Amin-Protokoll (SnAP), sowie eine Metallphotoredox decarboxylierende Kreuzkupplung möglich (siehe **Abbildung 9b**).<sup>[101]</sup>



**Abbildung 9:** Ausgewählte chemische Reaktionen auf DNA-Konjugaten mit einer Immobilisierung der DNA auf Anionenaustauscharzen.

Wie bereits oben erwähnt, spielt nicht nur der chemische Raum eine große Rolle für die erfolgreiche Selektion einer DNA-kodierten Substanzbibliothek, sondern auch die Qualität der DEL. Dabei ist nicht nur die Qualität der Kodierung, wie die Unversehrtheit und Lesbarkeit des DNA-Barcodes, relevant, sondern auch die chemische Qualität, wie die Produktausbeute und die Reinheit nach einer chemischen Reaktion. Ein wichtiger Punkt dabei ist die Aufreinigung von Zwischenprodukten während der DEL-Synthese. Da bei der Durchführung von chemischen Reaktionen auf DNA-Konjugaten häufig große Überschüsse an Reagenzien und Salzen verwendet werden, sollten diese nach der erfolgten Reaktion entfernt werden, um nicht negativ in den nächsten Synthesezyklus, oder Ligationszyklus eingreifen zu können. Auch nicht umgesetzte DNA-Sequenzen nach einer enzymatischen Ligation können im Laufe der DEL-Synthese stören. Die häufigste Aufreinigung, die in der DEL-Gemeinschaft angewendet wird, ist die ethanolische Fällung. Bei der ethanolischen Fällung wird zu der DNA-Probe kaltes Ethanol hinzugegeben und bei niedrigen Temperaturen gelagert (-80 °C). Oft werden auch Salze hinzugefügt, um den Fällungsprozess zu beschleunigen und die Wiedergewinnung an DNA zu erhöhen. Dabei fällt die DNA als weißer Feststoff aus. Die Probe kann anschließend zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet getrocknet werden. Das getrocknete DNA-Pellet kann anschließend in Wasser oder Puffer wieder aufgenommen werden. Die Arbeitsschritte dieser Aufreinigung sind leicht durchzuführen und es ist auf alle DNA-Stränge universell anwendbar. Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch in Ethanol schwer-lösliche Stoffe, wie zum Beispiel Reagenzien aus der durchgeführten Reaktion oder zugesetzte Salze, mit der DNA ausfallen und co-kristallisieren können und somit als Kontamination in die Analytik oder in den nächsten Reaktionsschritt eingetragen werden.<sup>[8,34]</sup>



Die Ausfällung ist ein parallelisierbarer Prozess, welcher aber aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit von Oligonukleotiden in Ethanol-Wasser-Gemischen zu Materialverlusten führen kann.<sup>[102,103]</sup> Darüber hinaus gestaltet sich das Automatisieren der ethanolischen Fällung aufgrund der Kühlung bei -80 °C und der Zentrifugation als schwierig.

Eine weit verbreitete Methode ist auch die Ionenaustauschchromatographie. Dabei bindet die DNA reversibel an eine feste Phase und ermöglicht dadurch eine Entfernung überschüssiger Reagenzien durch einfache Waschschrte über einen Filter. Jedoch werden häufig für die Elution der DNA von der festen Phase hohe Salzkonzentrationen benötigt, die im Anschluss wieder von der eluierten DNA entfernt werden müssen.<sup>[35,77,104]</sup>

Eine weitere häufig verwendete Methode zur Aufreinigung von DNA-Konjugaten ist die Ionenpaar-Chromatographie. Dabei wird eine unpolare stationäre Phase (C18 oder Poly-Divinylnbenzol) verwendet. Die DNA-Probe wird mit einem geeigneten Puffer auf diese stationäre Phase gegeben. Das Phosphat-Rückgrat der DNA bildet ein Ionenpaar mit dem Puffer, wodurch die Molekülbausteine, die an die DNA gebunden sind, ausschlaggebend für die Polarität des DNA-Konjugates sind. Durch die Verwendung von geeigneten Elutionsmitteln, kann die DNA-Probe nach ihrer Polarität eluiert werden. Dies kann sowohl automatisiert mit Hilfe eines HPLC-Systems als auch manuell mit Filtersäulen durchgeführt werden. Die Aufreinigung eines Syntheseschrittes (*Pool*) einer DEL mit Hilfe der Ionenpaar-HPLC erfordert ausreichende Unterschiede in den Retentionszeiten für den Produktpool im Vergleich zu den Ausgangsmaterialien. Dies ist eine Option für den ersten Syntheseschritt in einer DEL-Synthese oder wenn beispielsweise der Produktpool eine Fmoc-Schutzgruppe enthält, um dadurch einen ausreichenden Polaritätsunterschied herzustellen. Allerdings kann eine solche Aufreinigung eines Produktpools einer DEL dazu führen, dass einige Produkte in höheren Konzentrationen vorliegen als andere.<sup>[34,84,105]</sup>

Daher ist nicht nur die Entwicklung von neuen chemischen Reaktionen enorm wichtig für die DEL-Synthese und die anschließende Selektion, sondern auch die Verwendung geeigneter Aufreinigungsmethoden, um die Qualität einer DEL zu steigern.

### 1.3 Mizellare Katalyse

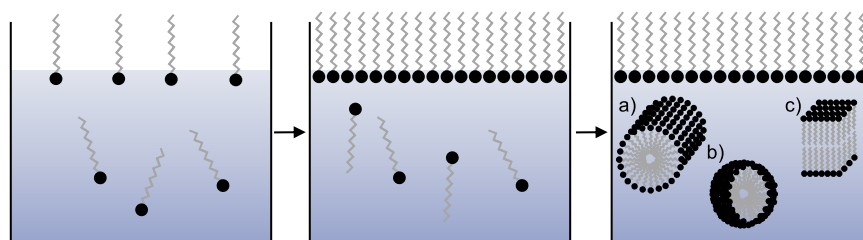
Bei der Katalyse handelt es sich um die Beschleunigung chemischer Reaktionen durch die Absenkung der Aktivierungsenergie. Dies geschieht durch die Verwendung eines Katalysators, eines Stoffes, der die Geschwindigkeit einer Reaktion verändert, ohne im Endprodukt dieser Reaktion zu erscheinen. Dabei wird der Katalysator während der Reaktion nicht verbraucht und kann somit wiederholt eingesetzt werden, wodurch sich die zugegebene Menge an Katalysator drastisch verringern lässt.<sup>[106]</sup> Der Katalysator bildet mit dem Reaktanden einen aktivierten Komplex, dessen Aktivierungsenergie im Vergleich zu dem Reaktanden selbst verringert ist. Als Katalysator kann ein kleines organisches Molekül, wie eine Säure oder eine Base, sowie auch Metalle, Metallsalze oder Enzyme verwendet werden. Dabei kann die Katalyse homogen, heterogen und zum Beispiel biokatalysiert ablaufen. Dabei ist entscheidend, in welcher Phase der Katalysator und das Substrat vorliegen.

Bei der heterogenen Katalyse liegen Katalysator und Substrat in unterschiedlichen Phasen vor. Oft wird der Katalysator als Feststoff verwendet und wird von flüssigen oder gasförmigen Reaktanden umspült, wodurch eine Reaktion an der Oberfläche des Katalysators abläuft. Anschließend kann der Katalysator leicht von den Reaktanden und Produkten abgetrennt werden und wiederverwendet werden. Allerdings müssen häufig harsche Reaktionsbedingungen, wie hohe Temperaturen und Drücke, verwendet werden, wodurch es zu einer verringerten Selektivität und verringerten Lebensdauer des Katalysators führen kann. Ein weiterer Nachteil ist die verringerte Zugänglichkeit des Katalysators.

Bei der homogenen Katalyse liegen der Katalysator und die Substrate in der gleichen Phase vor, wodurch sich eine verbesserte Katalysatorzugänglichkeit ergibt und auch häufig eine höhere Selektivität. Dabei können oft mildere Reaktionsbedingungen eingesetzt werden. Ein entscheidender Nachteil ist allerdings die aufwändige Abtrennung des Katalysators von den Substraten und Produkten.<sup>[107]</sup>

Die Biokatalyse erfolgt hauptsächlich in lebenden Organismen, wobei Enzyme oder auch ganze Zellen als Katalysator dienen. Diese Katalyse kann weder dem homogenen System noch dem heterogenen System zugeordnet werden, da es beide Bereiche kombiniert. Ein weiterer Teilbereich, der die homogene und die heterogene Katalyse kombiniert, ist die mizellare Katalyse. Dabei werden amphiphile Moleküle (Tenside, Detergenzien, Emulgatoren) eingesetzt. Diese bestehen aus einem unpolaren, hydrophoben (altgriechisch: *hýdor* = Wasser; *phóbos* = Furcht) Bereich und einem polaren, hydrophilen (altgriechisch: *hýdor* = Wasser; *phílos* = liebend) Bereich. Die hydrophile Teilstruktur kann starke Wechselwirkungen mit Wasser eingehen und gleichzeitig lagern sich die unpolaren Teilstrukturen zusammen, wodurch sich sphärische Aggregate, sogenannte Mizellen, bilden. Das Aneinanderlagern der hydrophoben Teilbereiche in einem polaren Medium wird auch als hydrophober Effekt bezeichnet.

Dabei ist die Konzentration der amphiphilen Moleküle wichtig (siehe **Abbildung 10**). Bis zu einer gewissen Konzentration, der Mizellbildungskonzentration (*critical micelle concentration, cmc*), befinden sich die einzelnen Ketten der amphiphilen Moleküle an der Oberfläche des polaren Mediums. Wird die Konzentration erhöht, so kommt es zu einer Interaktion der Molekülketten, wobei der hydrophobe Teilbereich das polare Medium meidet. Ist die kritische Mizellbildungskonzentration erreicht, so bevorzugt das thermodynamische Gleichgewicht die Bildung von Mizellen. Dieser Effekt kann beispielsweise über die Oberflächenspannung, die Leitfähigkeit oder die Lichtstreuung beobachtet werden.<sup>[108,109]</sup>

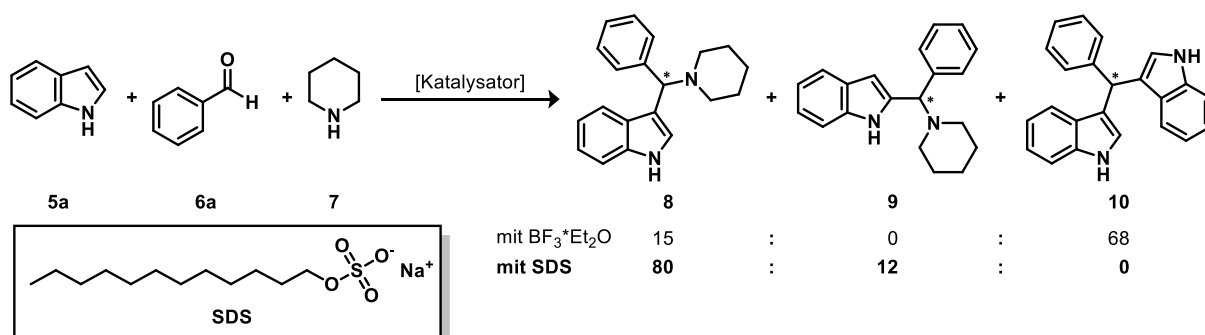


**Abbildung 10:** Verhalten von amphiphilen Molekülen in Wasser in Abhängigkeit von der Konzentration. Links: geringe Konzentration; mittig: Oberfläche voll besetzt durch amphiphile Moleküle; rechts: über der *cmc* kommt es zur Bildung von übergeordneten Strukturen, wie a) wurmartige Aggregate; b) Mizellen; c) Doppelschichten.

Um solche Mizellen für die Katalyse verwenden zu können, kann ein Katalysator entweder innerhalb der Mizelle im unpolaren Bereich gelöst vorliegen oder in dem Mizellenkern immobilisiert werden. Dabei können hydrophobe Substrate in die Mizelle in den unpolaren Bereich diffundieren, wodurch eine räumliche Nähe zu dem vorhandenen Katalysator entsteht. Zudem erhöht sich die Konzentration der Substrate im Inneren der Mizelle, wodurch der Umsatz und die Selektivität verbessert werden können. Außerdem ist durch die Verwendung von Mizellen die Durchführung von Reaktionen in wässrigem Medium möglich, wodurch der Verbrauch an organischen Lösungsmitteln reduziert werden kann. Bei der mizellaren Katalyse können demnach einige Vorteile der homogenen und heterogenen Katalyse genutzt werden.<sup>[110]</sup>

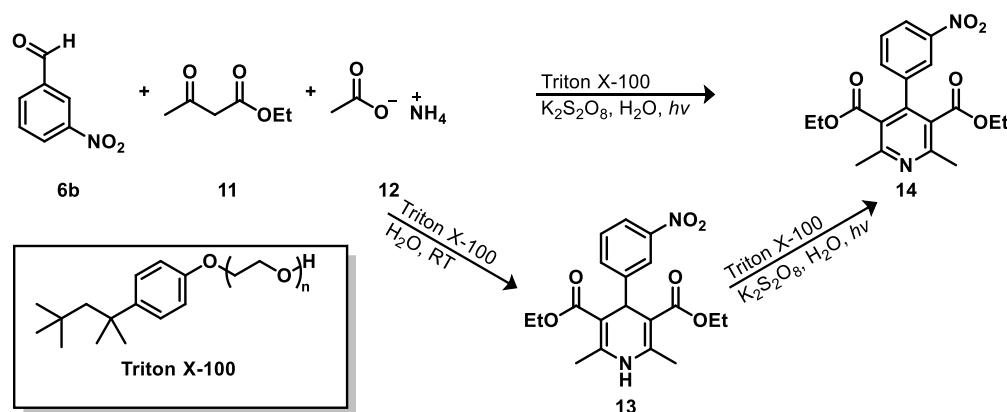
Kationische, anionische und auch nicht-ionische Tenside können solche Mizellen in Wasser bilden. Ein Beispiel für ein anionisches Tensid ist das Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses Tensid wurde für eine Mannich-3-Komponenten-Reaktion eingesetzt (siehe **Schema 1**).

Dabei wurde ein Indol **5a**, ein Aldehyd **6a** und ein Amin **7** mit verschiedenen Brønsted-Säuren zu einem 3-Amino-alkylierten Indol **8** umgesetzt. Ohne das Tensid konnte lediglich das Bis-Indol **10** beobachtet werden und nur in Spuren das gewünschte Produkt **8**. Bei der Verwendung des Tensids konnte das Produkt **8** zu 80 % gebildet werden und nur zu geringen Mengen das Nebenprodukt das 2-Amino-alkylierte Indol **9**. Das Nebenprodukt Bis-Indol **10** konnte nicht beobachtet werden. So konnte mit verschiedenen Indolen, Aldehyden und Aminen die Reaktion mit dem Tensid SDS mit guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden.<sup>[111]</sup>



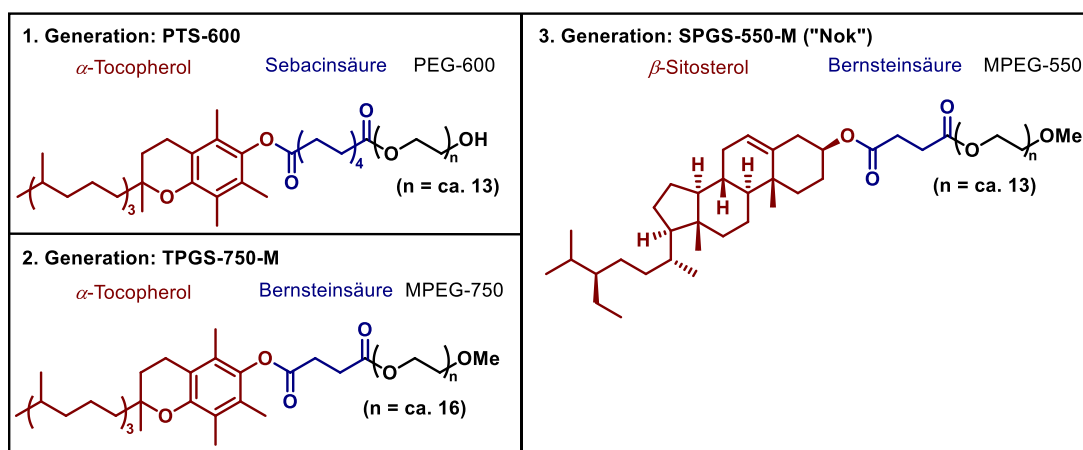
**Schema 1:** Synthese eines 3-Amino alkylierten Indols **8** über die Mannich-3-Komponenten-Reaktion.<sup>[111]</sup>

Das nicht-ionische Tensid Triton X-100 wurde für die Synthese eines 1,4-Dihydropyridins **13** und die Aromatisierung zum Pyridinen **14** verwendet (siehe **Schema 2**). Dabei konnte mit 3-Nitrobenzaldehyd **6b**, Acetessigester **11** und Ammoniumacetat **12** das Produkt **13** zu 96 % gebildet werden. Eine anschließende Aromatisierung zum Pyridin **14** konnte durch die Zugabe von Kaliumperoxodisulfat erreicht werden. Es konnte auch die einstufige Synthese direkt zu dem Pyridin **14** von den Ausgangsmaterialien durchgeführt werden. Dabei konnten die einzelnen Komponenten variiert werden und das gewünschte Produkt mit sehr guten Ausbeuten unter Verwendung des nicht-ionischen Tensids erhalten werden.<sup>[112]</sup>



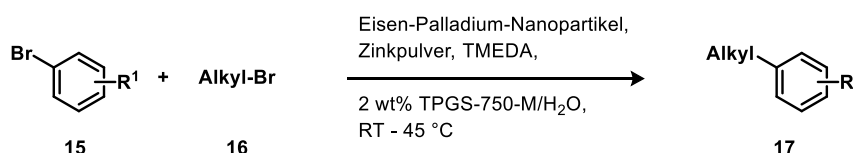
**Schema 2:** Synthese von 1,4-Dihydropyridinen **13** und ihre Aromatisierung zu Pyridinen **14** mit Hilfe des Tensids Triton X-100.<sup>[112]</sup>

Die *Arbeitsgruppe Lipshutz* beschäftigt sich mit dem Design, der Herstellung und der Anwendung von nicht-ionischen Tensiden für die mizellare Katalyse (siehe **Abbildung 11**). Dabei sollten nur geringen Mengen der Tenside benötigt werden, um in Wasser spontan zu aggregieren und Nanoreaktoren zu schaffen. Zudem sollten möglichst umweltverträgliche Materialien für die Synthese dieser Tenside verwendet werden.<sup>[113]</sup>



**Abbildung 11:** Strukturen der nicht-ionischen Tenside der 1. bis 3. Generation entwickelt von *Lipshutz et al.*<sup>[113]</sup>

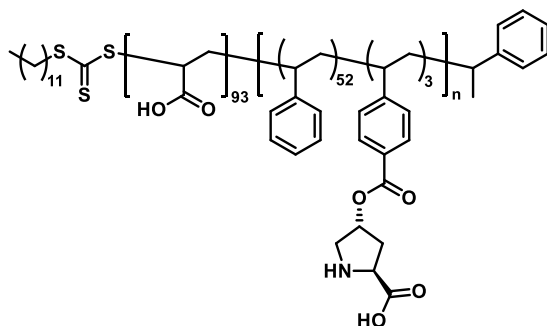
Die erste Generation (PTS-600) besteht aus einem racemischen Vitamin E (hydrophob) und einem Polyethylenglykol (PEG-600, hydrophil) verbunden über eine Sebacinsäure. Dieses Tensid wurde beispielsweise in der Sonogashira-Kreuzkupplung, der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und in der Ringschluss-Metathese in Wasser mit Palladium oder Ruthenium als Katalysator erfolgreich eingesetzt. Dabei formt dieses Tensid wurmförmliche Aggregate. Eine zweite Generation eines nicht-ionischen Tensids wurde entwickelt, um die Synthese zu vereinfachen und präzisere Strukturen zu bilden. Das TPGS-750M enthält, wie die erste Generation, das racemische Vitamin E, welches allerdings über eine Bernsteinsäure mit einer längeren PEG-Einheit mit Methoxygruppe als Endgruppe (MPEG-750) verbunden ist. Dieses Tensid bildet reproduzierbare Mizellen und konnte in den Kreuzkupplungen vergleichbare oder verbesserte Umsätze im Vergleich zu dem PTS-600-Tensid erreichen.<sup>[113,114]</sup> Vor kurzem wurde die Negishi-Kupplung mit diesem Tensid und einem Eisen-Palladium-Nanopartikel als Katalysator in Wasser durchgeführt (siehe **Schema 3**). Dabei konnte die Menge des Palladiums auf 0,25 mol% reduziert werden und trotzdem höhere Umsätze mit einem breiten Reaktandenspektrum erreicht werden, als im Vergleich zu bereits in der Literatur vorgestellten Methoden.<sup>[115]</sup>



**Schema 3:** Palladium-katalysierte Negishi-Kreuzkupplung in Wasser mit Hilfe des Tensids TPGS-750-M.<sup>[115]</sup>

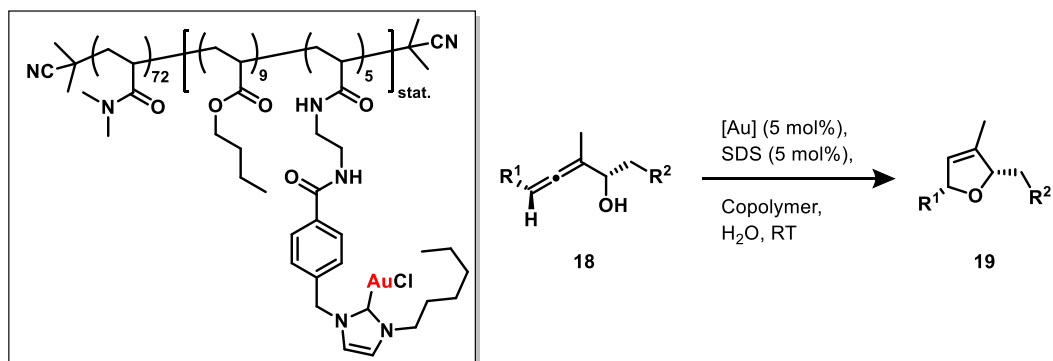
Eine weitere Veränderung zum Tensid „Nok“ (SPGS-550M) enthält das günstigere  $\beta$ -Sitosterin anstelle des Vitamin E und eine etwas kürzere PEG-Einheit (MPEG-550). Auch hiermit konnten diverse Kreuzkupplungen erfolgreich mit vergleichbaren Ergebnissen erzielt werden.<sup>[113,114]</sup>

Bei diesen Tensid-Systemen muss der in der Mizelle gelöste Katalysator, sowie das Tensid selbst im Anschluss an die Reaktion wieder von dem Produkt abgetrennt werden, weshalb eine aufwändige Aufreinigung nötig ist. Um dies zu vereinfachen, immobilisierten *O'Reilly et al.* Katalysatoren kovalent an ein polymeres Trägermaterial. Dieses Block-Copolymer bestand aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Bereich, um weiterhin Mizellen bilden zu können. Dabei wurde der Katalysator in den hydrophoben Bereich kovalent gebunden, um sich nach der Bildung von Mizellen in Wasser im Inneren der Mizelle zu befinden. Für eine asymmetrische Aldolreaktion in Wasser wurde ein amphiphiles Block-Copolymer bestehend aus Polyacrylsäure (hydrophil) und Styrol und einem L-Prolin-funktionalisierten Styrol (hydrophob) über eine RAFT-Polymerisation (*reversible addition-fragmentation chain transfer*, RAFT) aufgebaut (siehe **Abbildung 12**). Mit diesem Block-Copolymer konnte *p*-Nitrobenzaldehyd mit Cyclohexanon zu dem Aldolprodukt mit sehr guten Ausbeuten, einem *anti/syn*-Verhältnis von 99/1 und einer Enantiomerenreinheit bis zu 92 % erreicht werden.<sup>[116]</sup>



**Abbildung 12:** Amphiphiles Block-Copolymer mit immobilisiertem L-Prolin entwickelt von *O'Reilly et al.*<sup>[116]</sup>

*Weberskirch et al.* verwendeten ebenfalls die RAFT-Polymerisation um 15 diverse Gold(I)-funktionalisierte amphiphile Block-Copolymere herzustellen. Der hydrophile Block wurde aus *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) und der hydrophobe Block aus einer Mischung aus *n*-Butylacrylat (BA) und einem Boc-geschützten Aminacrylat aufgebaut. Die Boc-Schutzgruppe wurde entfernt und ein Gold(I)-NHC-Komplex (*N-heterocyclic carbene*, NHC) wurde mit verschiedenen Linkerlängen über eine Amidsynthese an das Block-Copolymer immobilisiert. Diese Block-Copolymere wurden in der Gold(I)-katalysierten Cycloisomerisierung eines Allens **18** zum entsprechenden Dihydrofuran **19** eingesetzt (siehe **Schema 4**). Dabei wurde ersichtlich, dass die Struktur des Blockcopolymers einen großen Einfluss auf die katalytische Aktivität aufweist.<sup>[117]</sup>



**Schema 4:** Gold(I)-katalysierten Cycloisomerisierung eines Allens zum Dihydrofuran mit Hilfe des amphiphilen Gold(I)-NHC-Komplex Block-Copolymers.<sup>[117]</sup>

Durch die RAFT-Polymerisation können Block-Copolymere mit diversen Katalysatoren funktionalisiert werden, um diese funktionalisierten Blockcopolymeren für spezielle Reaktionen in Wasser einsetzen zu können. Für DNA-kodierte Bibliotheken sind Säure- und Palladium-katalysierte Reaktionen von besonderem Interesse, da sie in einer Vielzahl von Reaktionen eingesetzt werden und Zugang zu diversen Strukturen, wie beispielsweise Heterozyklen, bieten.

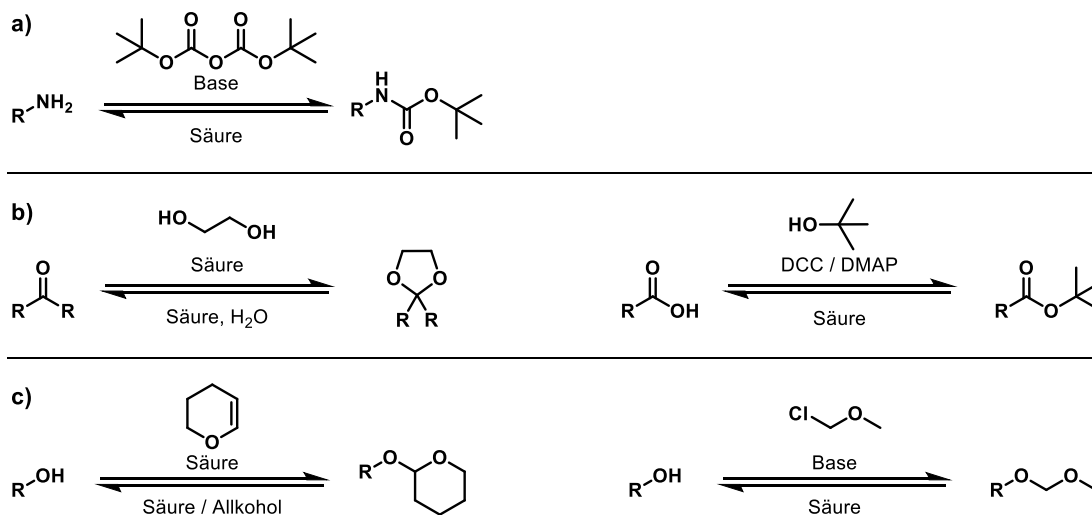
## 1.4 Säure-katalysierte Reaktionen

Die Katalyse mit Hilfe einer Säure findet sich in einer Vielzahl von chemischen Reaktionen wieder. Angefangen bei einer Protonierung, Veresterung oder Entfernung einer Schutzgruppe können Säuren auch die Bildung von komplexen Strukturen wie Indolen, Thiophenen oder Furanen katalysieren. Da Heterozyklen in über 70 % der bioaktiven Moleküle vorkommen, ist die Synthese solcher Strukturen in der medizinischen Chemie besonders wichtig. Sie weisen oftmals ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen der Lipophilie und der Löslichkeit auf, was für die Aufnahme und die Bioverfügbarkeit nötig ist.<sup>[118]</sup>

### 1.4.1. Schutzgruppen

Schutzgruppen sind für die organische Chemie vor allem in mehrstufigen Synthesen oder auch bei der kombinatorischen Chemie essentiell. Die Schutzgruppe wird vorübergehend angebracht, um die Reaktivität zu verändern, so dass die geschützte funktionelle Gruppe unter den synthetischen Bedingungen, denen das Molekül in einem oder mehreren nachfolgenden Schritten ausgesetzt ist, nicht reagiert. Schutzgruppen sollten sich mit quantitativen Ausbeuten an spezifische funktionelle Gruppen anbringen und durch milde Bedingungen wieder selektiv abspalten lassen. Um Schutzgruppen zu verwenden, sind allerdings zwei weitere Syntheseschritte notwendig. Als erstes muss die Schutzgruppe in das Molekül eingebracht werden, um die geschützte Spezies zu erzeugen und anschließend muss die Schutzgruppe wieder entfernt werden, um die funktionelle Gruppe für den nächsten Syntheseschritt wieder freizugeben. Die Wahl der Schutzgruppe ist dabei enorm wichtig, um eine angemessene Stabilität während aller Syntheseschritte des Zwischenproduktes zu gewährleisten. Zudem dürfen die Bedingungen für die Schutzgruppeneinführungs- und Entschützungsreaktion und die Art der Schutzgruppe nicht zu ungewollte Nebenreaktionen am Zielmolekül führen. Für eine funktionelle Gruppe können mehrere Schutzgruppen, die sich in ihrer Stabilität und den Bedingungen für die Schützung und Entschützung unterscheiden, eingesetzt werden. Wenn in einem Molekül mehr als eine funktionelle Gruppe desselben Typs vorhanden ist, so können kleine Unterschiede in der Reaktivität, beispielsweise durch sterische Effekte, dazu beitragen, dass nur eine funktionelle Gruppe selektiv geschützt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zwei ähnliche oder identische funktionelle Gruppen mit unterschiedlichen Schutzgruppe zu schützen, um je nach den Bedingungen selektiv nur eine funktionelle Gruppe wieder freizugeben. Dabei werden die Schutzgruppen auch als orthogonale Schutzgruppen bezeichnet. Hierbei kann beispielsweise eine Boc-geschützte Amino-Gruppe in sauren Medien entschützt werden und eine Fmoc-geschützte Amino-Gruppe unter basischen Bedingungen. Weitere Schutzgruppen, die sich unter sauren Bedingungen abspalten lassen, sind in **Abbildung 13** aufgeführt.<sup>[119,120]</sup>



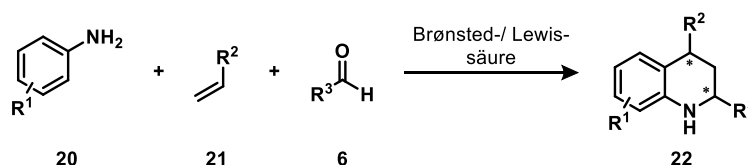


**Abbildung 13:** Auswahl von Säure-lablen Schutzgruppen für verschiedene funktionelle Gruppen. a) Amine; b) Carbonylgruppen; c) Alkohole.

Wie bereits erwähnt, verhindert die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe die ungewollte Reaktion von freien Aminen. Diese Schutzgruppe wird oftmals für den Aufbau von Peptiden in der Festphasensynthese verwendet. Dabei kann das Amin unter Verwendung von Di-*tert*-butyldicarbonat unter basischen Bedingungen geschützt werden. Die Abspaltung erfolgt unter sauren Bedingungen, wie HCl in EtOAc oder TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Carbonylgruppen lassen sich beispielsweise über Säure-labile Acetale oder Ester schützen. Alkohole können mit der Methoxymethyl (MOM)- oder Tetrahydropyranyl (THP)-Schutzgruppe als Ether über die Williamson-Ethersynthese blockiert und säurekatalytisch wieder freigegeben werden. Eine Schutzgruppe, die säurekatalytisch gebildet und auch abgespalten wird, ist der Schutz von 1,2- und 1,3-Diolen über Acetale.<sup>[119,120]</sup>

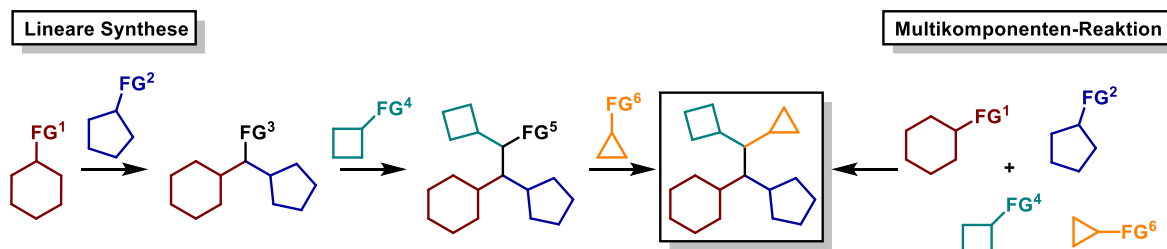
### 1.4.2. Povarov-Reaktionen

Bei der Povarov-Reaktion handelt es sich um eine Säure-katalysierte Zwei- oder Drei-Komponenten Reaktion zu einem 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin **22**. Bei der Zwei-Komponenten Reaktion reagiert ein *N*-Arylimin mit einem elektronenreichen Dienophil **21**. Bei der Drei-Komponenten Reaktion wird das *N*-Arylimin *in-situ* durch eine Kondensation eines Anilins **20** und eines Aldehyds **6** gebildet (siehe **Schema 5**).



**Schema 5:** Säure-katalysierte Povarov-Reaktion eines aromatischen Amins **20**, eines Olefins **21** und eines Aldehyds **6** zur Bildung eines 1,2,3,4-Tetrahydrochinolins **22**.

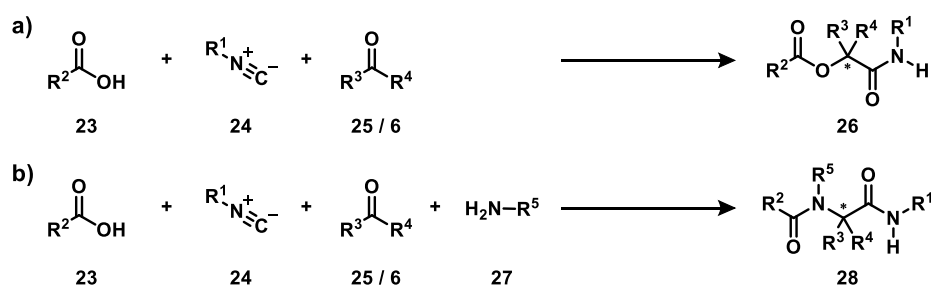
Da es sich hierbei um mehrere Komponenten handelt, gehört die Povarov-Reaktion zu den Multikomponenten-Reaktionen. Diese werden auch als Eintopf-Reaktionen bezeichnet, da sie effizient in einem einzelnen Syntheseschritt ablaufen und somit eine Aufreinigung der Zwischenprodukte im Vergleich zu einer schrittweisen Synthese entfällt (siehe **Schema 6**). Zudem verlaufen diese Reaktionen häufig atomökonomisch ab, da sich die meisten Atome der Startmaterialien im Anschluss an die Reaktion in dem gebildeten Produkt befinden. Die einzelnen Komponenten können meist einfach ausgetauscht werden, wodurch sich die Diversität der Produkte rasch erhöht. Somit sind Multikomponenten-Reaktionen sehr gut geeignet für den Aufbau von Substanzbibliotheken.



**Schema 6:** Gegenüberstellung der linearen Synthese und der Multikomponenten-Reaktion.

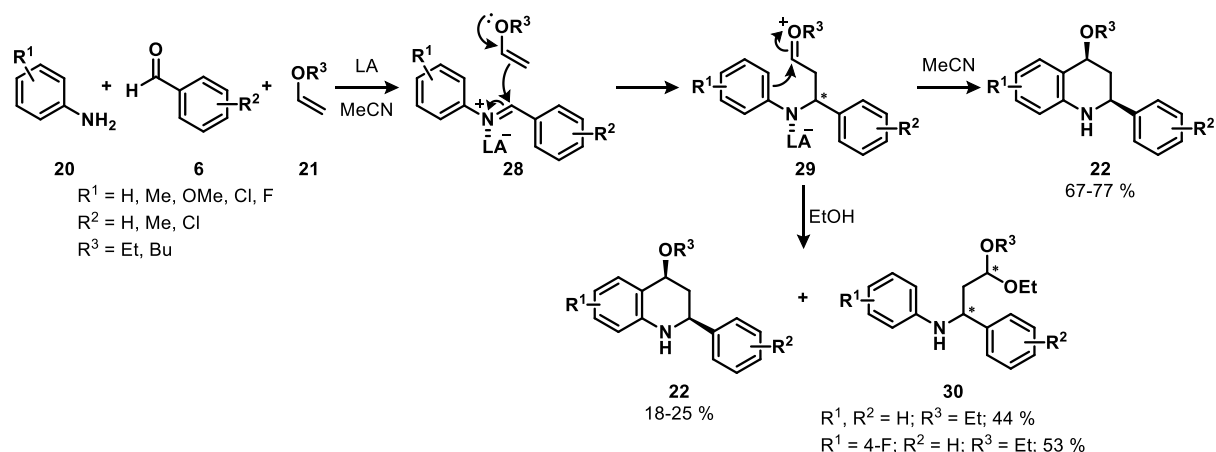
Multikomponenten-Reaktionen lassen sich in Isocyanid-basiert und nicht-Isocyanid-basierte Reaktionen unterteilen. Die wichtigsten Isocyanid-basierten MCRs sind die Passerini-3-Komponenten- und die Ugi-4-Komponenten-Reaktion (siehe **Schema 7**). *Mario Passerini* entwickelte im Jahr 1921 die Reaktion beschreibt die Reaktion von Isocyaniden **24**, Carbonsäuren **23** und Aldehyden **6** oder Ketonen **25** zu  $\alpha$ -Acylcarboxamiden **26**. Die von *Ivar Ugi* im Jahre 1959 vorgestellte Ugi-Reaktion umfasst die Bildung von dipeptidischen Strukturen **28** unter Verwendung von Isocyaniden **24**, Carbonsäuren **23**, Ketonen **25** oder Aldehyden **6** und primären Aminen **27**.<sup>[121,122]</sup>

Von dieser Reaktionen wurden schon viele Abwandlungen, wie die Ugi-Azid-Vier-Komponenten-Reaktion, und Kombinationen, wie die Ugi-Diels-Alder oder die Ugi-Smiles Reaktion, beschrieben.<sup>[123–125]</sup>



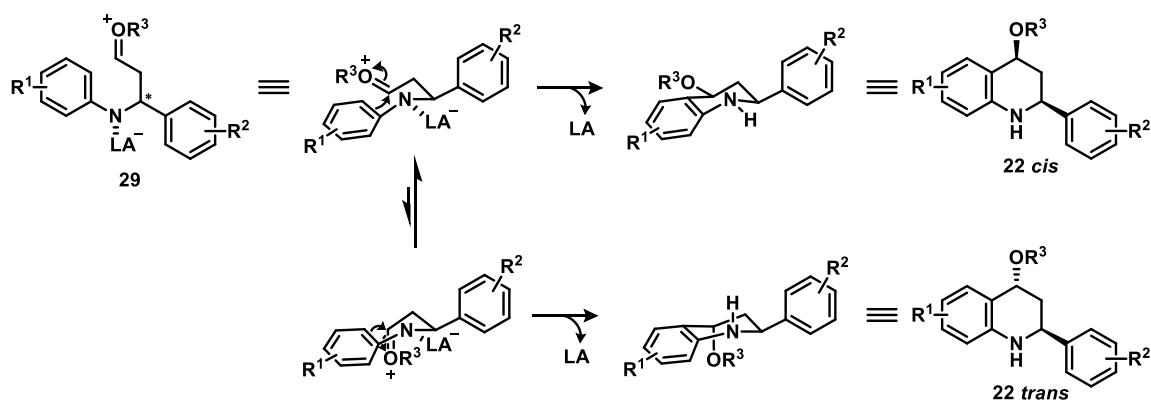
**Schema 7:** Darstellung der Isocyanid-basierten a) Passerini-3-Komponenten-Reaktion und b) Ugi-4-Komponenten-Reaktion.

Eine Säure-katalysierte nicht-Isocyanid-basierte Multikomponenten-Reaktion ist die Povarov-Reaktion, auch *aza*-Diels-Alder-Reaktion genannt (siehe **Schema 5**). Dabei kann aus einem Anilin **20**, einem Aldehyd **6** und einem Olefin **21** das Tetrahydrochinolin **22** entstehen. Durch Kondensation des Aldehyds **6** mit dem Anilin **20** entsteht das aromatische Imin (Dien) **28**. Dieses Imin wird durch die Säure aktiviert und reagiert mit der Doppelbindung des Alkens, wobei das Tetrahydrochinolin **22** gebildet wird. Dabei wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen: eine konzertierte [2+4]-Cycloaddition oder ein sequenziell-ablaufender Mannich-Typ-Mechanismus. *Sridharan et al.* konnten durch gezieltes Abfangen der Zwischenprodukte **28** einen schrittweisen Mechanismus über ein kationisches Intermediat bei der Cerammoniumnitrat-katalysierten Povarov-Reaktion zeigen.<sup>[126–128]</sup>



**Schema 8:** Postulierter schrittweiser Mechanismus der Lewis-Säure (LA)-katalysierten Povarov-Reaktion mit dem gezielten Abfangen der Zwischenprodukte **28** mit Ethanol.

Dabei erfolgt ein elektrophiler Angriff des Olefins **21** an das aktivierte Iminiumion **28**, wodurch die Oxonium-Spezies **29** gebildet wird. Anschließend erfolgt eine intramolekulare elektrophile Substitution und das Tetrahydrochinolin **22** entsteht. Wird die Povarov-Reaktion in Ethanol, einem nukleophilen Lösungsmittel, durchgeführt, so bildet sich ein Acetal **30**, wodurch der schrittweise Mechanismus bevorzugt ablaufen kann (siehe **Schema 8**).<sup>[126–130]</sup>

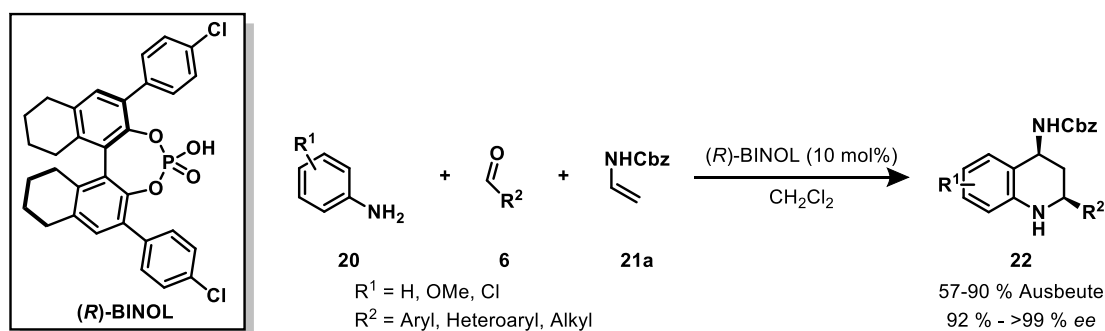


**Schema 9:** Darstellung der möglichen Diastereomere der Lewis-Säure (LA)-katalysierten Povarov-Reaktion mit azyklischen Vinylethern.

Bei der Povarov-Reaktion mit azyklischen Vinylethern werden in einem Schritt zwei Stereozentren gebildet, die aufgrund der Anordnung der Substituenten des Aldehyds **6** und des Olefins **21** überwiegend *cis* zueinanderstehen (siehe **Schema 9**). Dabei kommt es zu einer minimalen Interaktion der sterisch anspruchsvollen Gruppen und den axialen Protonen des sesselförmigen Übergangszustands. Bei zyklischen Vinylethern werden keine Diastereomere bevorzugt gebildet.<sup>[126,131]</sup>

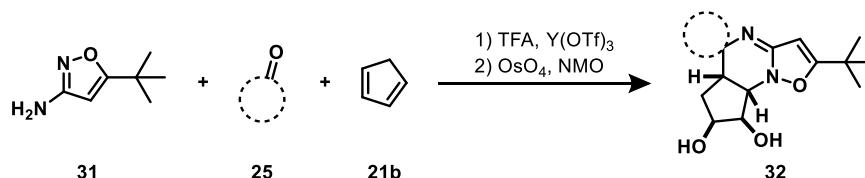
Die Povarov-Reaktion verläuft meist unter milden Reaktionsbedingungen, wobei oft eine thermische Aktivierung erforderlich ist. Dabei können sowohl Lewis- als auch Brønsted-Säuren verwendet werden, um das Imin zu aktivieren und so die Reaktion zu katalysieren.

Für eine enantioselektive Reaktion können bestimmte Säuren, wie beispielsweise ein BINOL-Lanthanoid-Komplex<sup>[132]</sup>, einen Aminodiol-Titan(IV)-Komplex<sup>[133]</sup> oder eine chirale Brønsted-Säuren<sup>[133,134]</sup> verwendet werden. *Dagousset et al.* verwendeten eine (*R*)-BINOL-basierte chirale Phosphorsäure für die Katalyse von verschiedenen substituierten Anilinen **20**, aromatischen, sowie aliphatischen Aldehyden **6** und azyklischen Carbamaten **21a** zu substituierten Tetrahydrochinolinen **22**. Dabei konnten hohe Ausbeuten mit einer Diastereoselektivität von über 95 % und einer fast vollständigen Enantioselektivität erreicht werden (siehe **Schema 10**).<sup>[134]</sup>



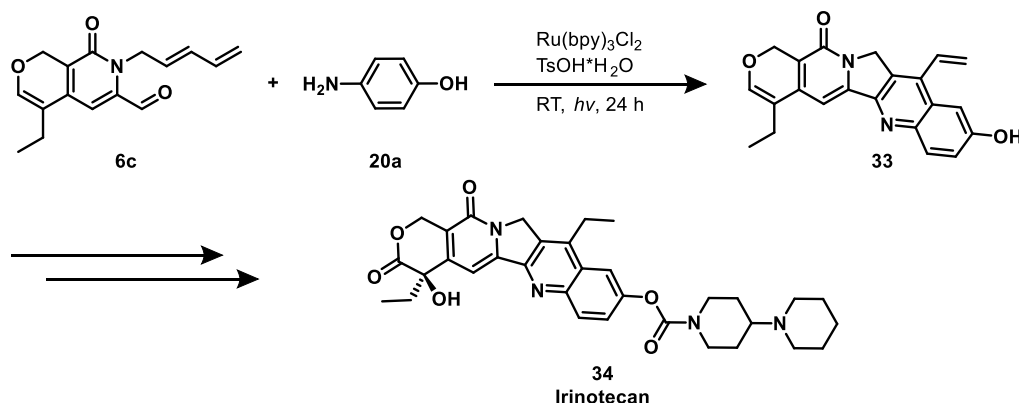
**Schema 10:** (*R*)-BINOL-katalysierte Povarov-Reaktion für die enantioselektive Synthese eines Tetrahydrochinolins.<sup>[134]</sup>

Bei der Povarov-Reaktion können die einzelnen Komponenten variiert werden, wodurch ein großes Produktspektrum mit nur einer Reaktion erhalten werden kann. Es können sowohl aromatische als auch aliphatische Aldehyde verwendet werden. Zudem konnten *Llona-Minguez et al.* zyklische Ketone **25** verwenden für die Synthese von Spiroaddukten **32** (siehe **Schema 11**).<sup>[135]</sup>



**Schema 11:** Synthese von spiro-heterozyklische Strukturen **32** durch die Verwendung von zyklischen Ketonen **25** in der Säure-katalysierten Povarov-Reaktion.<sup>[135]</sup>

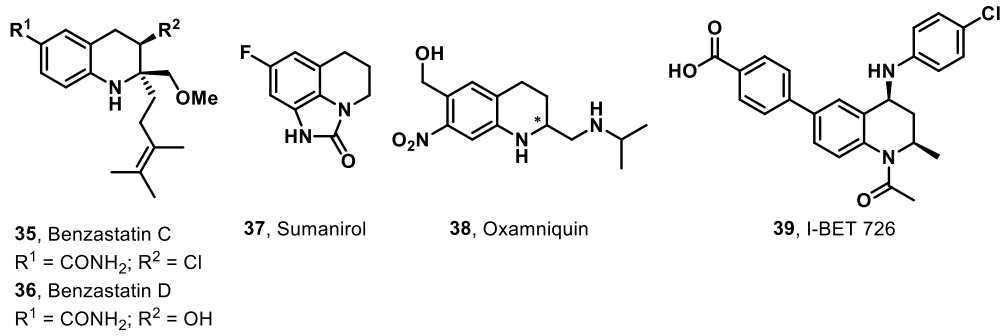
Die Povarov-Reaktion toleriert zudem ein großes Spektrum an substituierten Anilinen mit sehr unterschiedlichen sterischen als auch elektronischen Eigenschaften. Für das Dienophil können eine Vielzahl von Vinylethern, Silylenolethern, Enaminen, Vinylamiden, Alkenen und Alkinen verwendet werden. Darüber hinaus gibt es viele intramolekulare Varianten der Povarov-Reaktion zur Synthese von polyzyklischen Verbindungen. *Dong et al.* kombinierten eine Photoredox-Reaktion mit der Povarov-Reaktion für die Synthese von Indolizino[1,2-*b*]quinolin-9(11*H*)-on **33**, einen Vorläufer für den Arzneistoff Irinotecan **34** (siehe **Schema 12**).<sup>[136]</sup>



**Schema 12:** Intramolekulare Povarov-Reaktion für die Synthese des Vorläufers **33** des Arzneistoffes Irinotecan **34**.<sup>[136]</sup>

Das durch die Povarov-Reaktion gebildete Tetrahydrochinolin-Gerüst kann in einer Vielzahl von Naturprodukten und pharmazeutischen Wirkstoffen wiedergefunden werden. Die Reaktandenbreite der Povarov-Reaktion, sowie auch die Möglichkeit der chemischen Modifizierung des Tetrahydrochinolin-Grundgerüsts sind wichtige Methoden für das Design von neuen Arzneimitteln. Einige Beispiele für bioaktive Tetrahydrochinolin-Derivate sind in **Abbildung 14** dargestellt. Die Alkaloide Benzastatin C **35** und D **36** konnten aus *Streptomyces sp.* isoliert werden und zeigen eine inhibitorische Aktivität gegen Glutamat-Toxizität und Lipidperoxidation.<sup>[137,138]</sup>

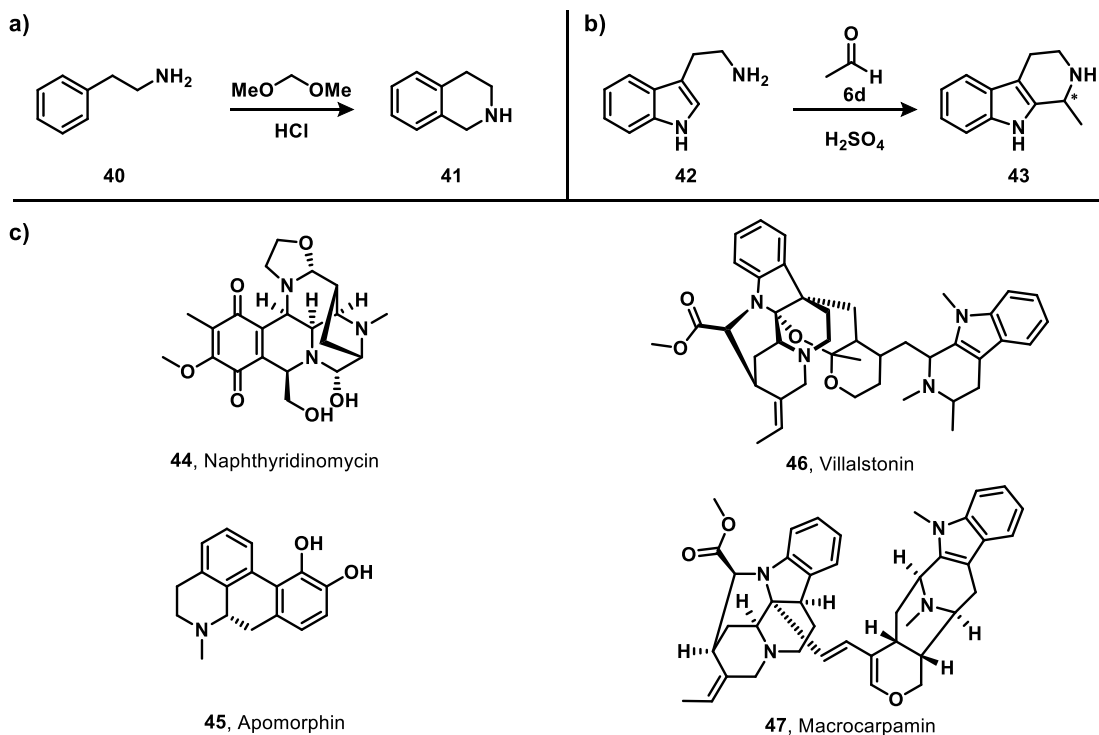
Sumanriole **37** ist ein selektiver Dopamin-D2-Rezeptor-Agonist, der ursprünglich für die Behandlung der Parkinson-Krankheit entwickelt wurde.<sup>[139]</sup> Oxamniquin **38**, ein oral einzunehmendes Anthelminthikum, wurde zur Behandlung der Bilharziose, einer vernachlässigten Tropenkrankheit, eingesetzt.<sup>[140]</sup> Der Bromodomain-Inhibitor I-BET 726 **39** hat eine antiproliferative und entzündungshemmende Wirkung.<sup>[141]</sup>



**Abbildung 14:** Beispiele für bioaktive Tetrahydrochinolin-Derivate.

### 1.4.3. Pictet-Spengler-Reaktion

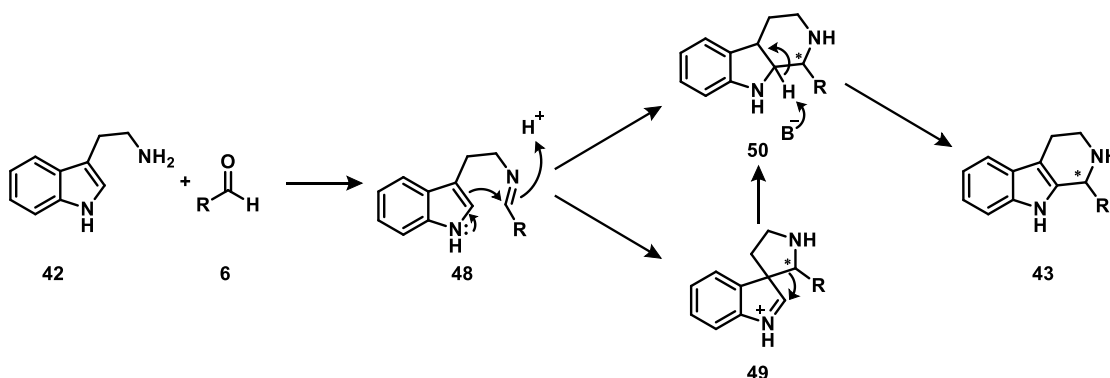
Eine weitere Säure-katalysierte Reaktion zum Aufbau von Heterozyklen ist die Pictet-Spengler Reaktion. *Arnè Pictet* und *Theodor Spengler* erhitzen  $\beta$ -Phenylethylamin **40** mit Dimethoxymethan in Anwesenheit von HCl. Dabei entstand ein 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin **41**. Etwa 20 Jahre später ersetzten *Tatsui et al.* das  $\beta$ -Phenylethylamin durch Tryptamin **42** und erhielten ein 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin **43** (siehe **Abbildung 15a, b**). Beides sind privilegierte Gerüststrukturen, die in vielen natürlich vorkommenden Isochinolin- und Indol-Alkaloiden auftreten und eine wichtige physiologische und therapeutische Bedeutung besitzen. Antitumor-Antibiotika, die aus verschiedenen natürlichen Quellen extrahiert wurden, haben seit über 5 Jahrzehnten große Aufmerksamkeit erregt, angefangen mit der Isolierung von Naphthyridinomycin **44** im Jahr 1974.<sup>[142,143]</sup> Zudem gibt es viele in der Klinik verwendete Arzneimittel, die ein Tetrahydroisochinolin-Grundgerüst enthalten, wie der D1- und D2-Rezeptor-Agonist Apomorphin **45** zur Behandlung der Parkinson-Krankheit.<sup>[143,144]</sup> *Wright et al.* zeigten die Extraktion von Villalstonin **46** und Macrocarpamin **47** aus *Alstonia angustifolia* und konnten eine Wirkung gegen Malaria und Amöben feststellen (siehe **Abbildung 15c**).<sup>[145]</sup>



**Abbildung 15:** Säure-katalysierte Pictet-Spengler-Reaktion zur Bildung von a) Tetrahydroisochinolin **41** und b) Tetrahydro- $\beta$ -carbolin **43**, sowie c) bioaktive Moleküle mit diesen Strukturmotiven.

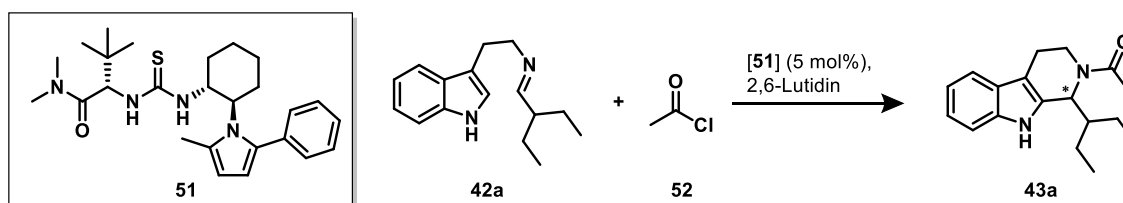
Die Pictet-Spengler-Reaktion startet mit der Bildung des Iminiumions **48**, gefolgt von einem nukleophilen Angriff durch die Arylgruppe (siehe **Schema 13**). Dadurch erfolgt die Zyklisierung. Der Angriff auf das Iminiumion erfolgt entweder direkt an Position 2 oder an Position 3 des Indols, wodurch ein Spiroindolenin **49** entsteht.<sup>[146]</sup> Durch eine Isotopenmarkierung konnte das Spiro-Zwischenprodukt **49** identifiziert werden.

Die Bildung dieses Zwischenproduktes ist schnell und reversibel. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist allerdings die Bildung des Pentahydro- $\beta$ -Carbolin-Carbonium-Ions **50**. Es konnte aber nicht geklärt werden, ob die Bildung dieses Carbonium-Ions **50** durch die Umlagerung des Spiro-Zwischenproduktes **49** oder durch den direkten Angriff auf Position 2 des Indols **48** erfolgt.<sup>[147,148]</sup>



**Schema 13:** Mechanismus der Säure-katalysierten Pictet-Spengler-Reaktion zur Bildung eines Tetrahydro- $\beta$ -carbolins **43**.

Für die Pictet-Spengler-Reaktion können ebenfalls Lewis-Säuren, als auch Brønsted-Säuren verwendet werden. Für die erste enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktion wurde ein chiraler Thioharnstoff-Katalysator **51** eingesetzt. *Jacobsen* und *Taylor* erhöhten die Reaktivität des Imins durch die Erzeugung eines *N*-Acyliminium-Ions. Dabei konnte nach einiger Entwicklung des Katalysators eine Ausbeute von 70 % zum *N* $\beta$ -Acetyltetrahydro- $\beta$ -carbolin **43a** mit einer Enantioselektivität von 93 % erhalten werden (siehe **Schema 14**).<sup>[149]</sup>



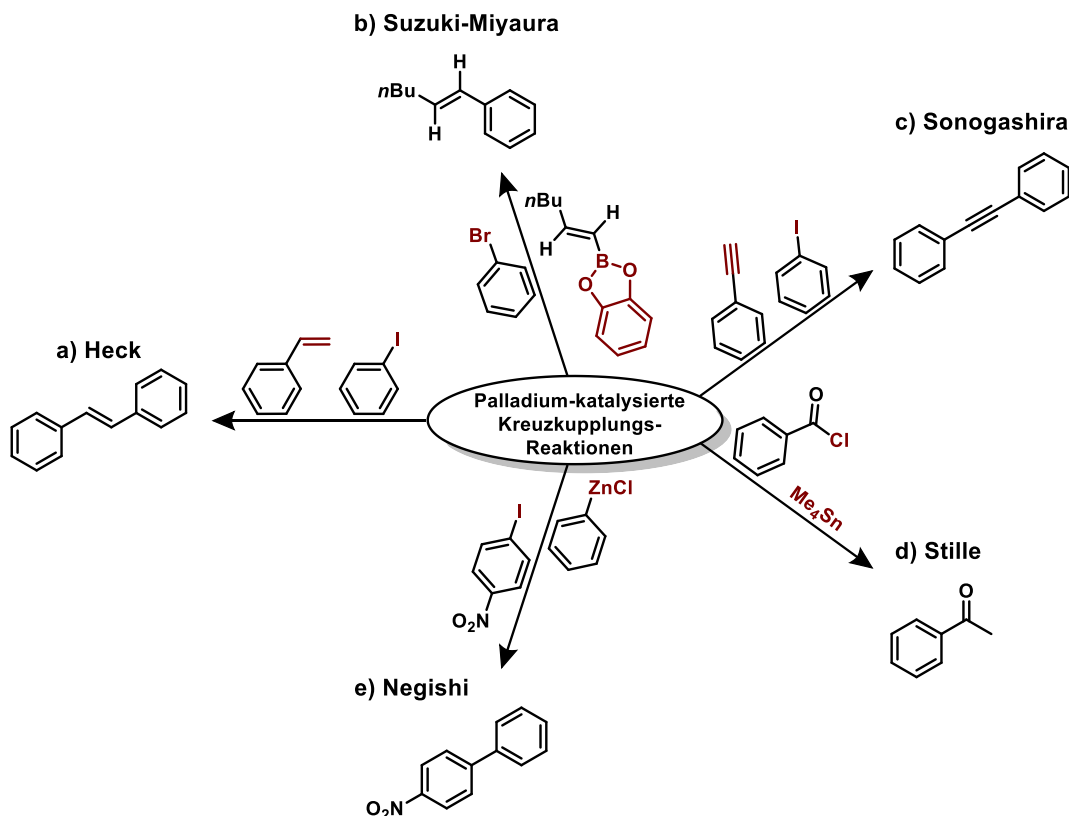
**Schema 14:** Enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktion unter Verwendung eines Thioharnstoff-Katalysators.<sup>[149]</sup>

Dadurch, dass die einzelnen Komponenten der Pictet-Spengler-Reaktion ausgetauscht werden können, fand diese Reaktion vielfach Beachtung für die Synthese von kombinatorischen Molekülbibliotheken. So konnte die Reaktion mit *N*-alkylierten, -acylierten oder -sulfonylierten Derivaten des Phenylethylamins, sowie mit verschiedenen substituierten Tryptaminen durchgeführt werden. Auch die Aldehyd-Komponente konnte unter Verwendung von Acetalen, Enolethern, Hemiaminolen, Aminonitrilen, sowie auch Ketonen variiert werden.<sup>[150,151]</sup>



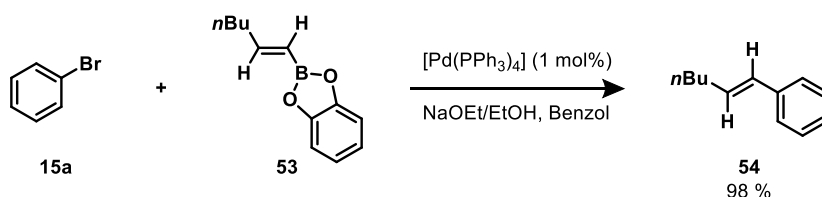
## 1.5 Palladium-katalysierte Reaktionen

Durch die Entwicklung von Palladium-katalysierten C-C-Bindungsreaktionen durch *Richard Heck*, *Ei-ichi Negishi* und *Akira Suzuki* wurden Übergangsmetallkatalysierte Kupplungen in den letzten drei Jahrzehnten zu einem zuverlässigen und unverzichtbaren Werkzeug für die Synthese von Naturstoffen und Arzneimitteln. Zahlreiche dieser Synthesen enthalten einen wichtigen Schlüsselschritt, der aus metallkatalysierten Kreuzkupplungsreaktionen besteht. Diese Reaktionen ermöglichen den Zugang zu immer komplexeren bioaktiven Molekülen. Zudem hat die Katalyse mit Metallen wie Pd, Ni, Cu, Zn, Co, Rh, Ru und Mo die Synthese vieler bereits auf dem Markt befindlichen Arzneimittel vereinfacht. Besonders Palladium-katalysierte Reaktionen werden häufig erfolgreich eingesetzt, da die spezifische Kupplung von Substraten mit geringer Reaktivität und das meist bei geringeren Reaktionstemperaturen ermöglicht wird. Zudem werden häufig höhere Umsätze mit Palladium als Katalysator erreicht. Häufig angewendete Palladium-katalysierte Reaktionen sind die Heck-, Suzuki-Miyaura-, Sonogashira-, Stille- und die Negishi-Kreuzkupplung, sowie die decarboxylative Kreuzkupplung, carbonylative Kreuzkupplung, C-N-Bindungsbildungs-Kreuzkupplung und die  $\alpha$ -Arylierung von Enolaten (siehe **Abbildung 16**).<sup>[152–155]</sup>



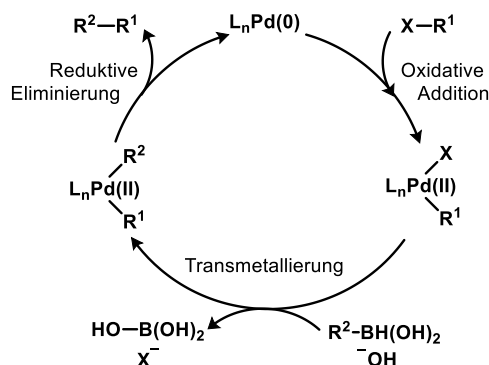
**Abbildung 16:** Darstellung häufig verwendeter Palladium-katalysierter Kreuzkupplungs-Reaktionen. a) Heck-Kreuzkupplung; b) Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung; c) Sonogashira-Kreuzkupplung; d) Stille-Kreuzkupplung; e) Negishi-Kreuzkupplung.

Akira Suzuki und Norio Miyaura stellten im Jahre 1979 die Kupplungsreaktion von Alkenylboranen **53** mit Arylhalogeniden **15a** katalysiert durch  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  und eine Base vor. Dabei konnten stereoselektiv arylierte Alkene **54** hergestellt werden (siehe **Schema 15**).<sup>[156]</sup>



**Schema 15:** Stereoselektive Synthese von arylierten Alkenen **54** über die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung von Alkenylboranen **53** und Arylhalogeniden **15a**.<sup>[156]</sup>

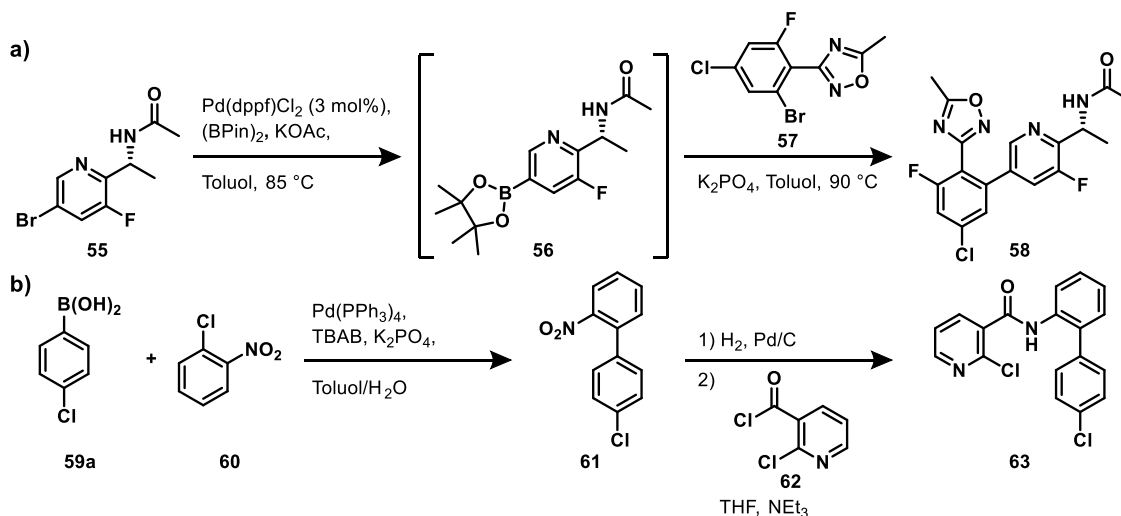
Allgemein handelt es sich bei der Suzuki-Miyaura-Reaktion um die Kreuzkupplung zwischen einem bororganischen Reagenz, wie Boronsäuren, Boranen, Boronsäureestern und Boratkomplexen und einem Organohalogenid, z.B. einem Arylhalogenid, einem Alkylhalogenid oder einem Alkenyltriflat, oder Arylsulfonat.<sup>[152]</sup> Der Mechanismus verläuft in drei Schritten: einer oxidativen Addition, einer Transmetallierung und einer reduktiven Eliminierung (siehe **Abbildung 17**).



**Abbildung 17:** Darstellung des katalytischen Zyklus der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit den drei Schritten: oxidative Addition; Transmetallierung; reduktive Eliminierung.

Bei der oxidativen Addition wird die Bindung zwischen dem Heteroatom X und der organischen  $\text{R}^1$ -Gruppe gespalten und beide Gruppen addieren an den  $\text{Pd}(0)$ -Komplex, wobei zwei neue Bindungen am Pd-Komplex gebildet werden. Dabei kommt es zu einer Oxidation des Palladiums von der Oxidationsstufe 0 zu der Oxidationsstufe II. Die Geschwindigkeit der Reaktion hängt unter anderem von der Stärke der  $\text{R}^1\text{-X}$ -Bindung ab, wobei Iodid als Heteroatom X oftmals am reaktivsten ist gefolgt von Bromid und Triflat. Zudem begünstigen elektronenziehende Gruppen am Aromaten  $\text{R}^1$  die oxidative Addition. Bei der Transmetallierung wird die organische Gruppe  $\text{R}^2$  des bororganischen Reagenzes mit dem Heteroatom X am Metallkomplex ausgetauscht. Dieser Schritt geschieht in Anwesenheit einer Base. Der letzte Schritt ist die reduktive Eliminierung. Dabei wird die Bindung zwischen den organischen Gruppen  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  gebildet und das gewünschte Biaryl entsteht. Gleichzeitig wird das Metall von  $\text{Pd}(II)$  auf  $\text{Pd}(0)$  reduziert und der aktive Katalysator regeneriert, womit er für den nächsten Zyklus wieder zur Verfügung steht.

Die Pd(0)-Spezies, wie beispielsweise Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Pd(dba)<sub>2</sub> oder Pd(tBu<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>, kann direkt zu der Reaktion hinzugegeben werden. Als Alternative kann eine Pd(II)-Spezies, wie Pd(OAc)<sub>2</sub>, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> oder PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, zu der Reaktion gegeben und *in situ* zu der aktiven Spezies Pd(0) reduziert werden. Der Vorteil ist, dass Pd(II)-Spezies stabiler im Vergleich zu der Pd(0)-Spezies sind, allerdings auch oftmals weniger reaktiv.<sup>[157]</sup> Die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung zeichnet sich durch milde Reaktionsbedingungen, die breite Kompatibilität mit funktionellen Gruppen und die kommerzielle Verfügbarkeit vieler Boronsäuren aus. Daher etablierte sich die Suzuki-Reaktion zu der effizientesten Methode zur Bildung von Aryl-Aryl-Bindungen und wird routinemäßig in der pharmazeutischen Industrie angewendet.<sup>[152–154]</sup> Die *Firma Merck* stellte die Synthese eines Bradykinin-1-Antagonisten **58** im Maßstab von mehreren Kilogramm vor (siehe **Schema 16a**). Dabei wurde das Brompyridylamid **55** mit dem Pd-Komplex Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, dem Bororganischen Reagenz (BPin)<sub>2</sub> und der Base KOAc in Toluol zu dem B(Pin)-Ester **56** umgesetzt. Anschließend wurde das Oxadiazolbromid **57** mit der Base Kaliumphosphat hinzugegeben, wodurch das Produkt **58** mit 78 % Ausbeute gewonnen werden konnte. Bei dieser Reaktion konnte die Kompatibilität mit verschiedenen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise den heterozyklischen Ringen, der Amidgruppe am Boronat, sowie den Fluor- und Chlor-Substituenten am Oxadiazol, veranschaulicht werden.<sup>[158]</sup>



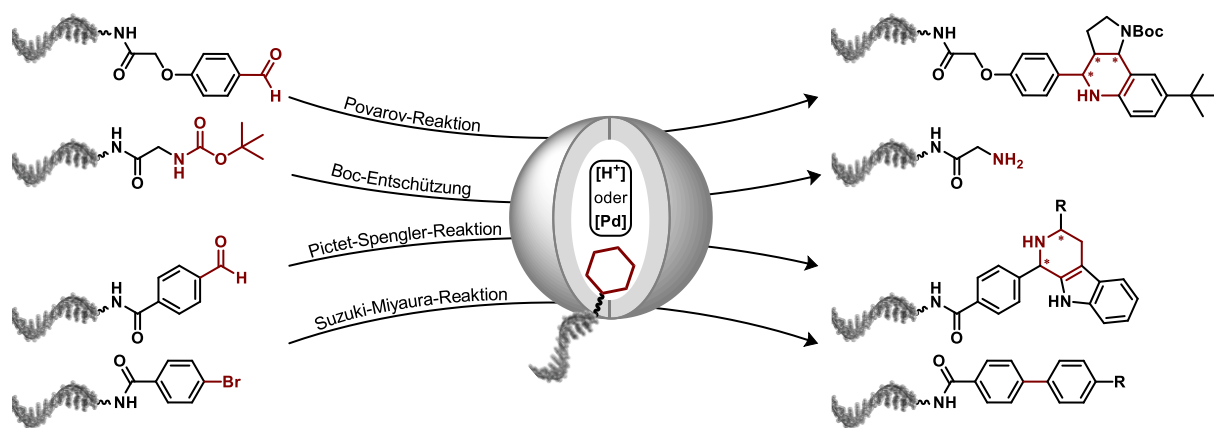
**Schema 16:** Synthese eines a) Bradykinin-1-Antagonisten **58** und b) des Fungizids Boscalid **63** über die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung.<sup>[154,158]</sup>

Auch bei der Synthese von Agrochemikalien findet die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung vielfältige Anwendung. Ein bekanntes Beispiel ist die Synthese des Fungizids Boscalid **63** (siehe **Schema 16b**). Dabei reagiert die 4-Chlorphenylboronsäure **59a** mit 1-Chlor-2-nitrobenzol **60** in der Suzuki-Miyaura-Reaktion unter Verwendung des Katalysators Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> mit dem Phasentransferkatalysator Tetrabutylammoniumbromid (TBAB). Dabei entsteht das Nitrobiphenyl-Zwischenprodukt **61**, welches anschließend zum Anilin reduziert wird und in einer Kondensationsreaktion mit 2-Chlornicotinoylchlorid **62** das gewünschte Produkt Boscalid **63** bildet.<sup>[154]</sup>



## 2. Zielsetzung

Das Ziel der Wirkstoffforschung ist die Suche nach bioaktiven Molekülen und ihre Entwicklung zu Arzneimitteln. Zur Identifikation solcher bioaktiven Moleküle und deren Zielstruktur werden verschiedene Screening-Technologien, wie das Hochdurchsatz-Screening, angewendet. DNA-kodierte Substanzbibliotheken haben sich als eine attraktive Screeningtechnologie auch für kleinere Unternehmen oder für Forschungsgruppen in der Akademie etabliert, um kostengünstig und zeitsparend bioaktive Moleküle zu identifizieren. Bei diesen Substanzbibliotheken wird ein kleines organisches Molekül über einen Linker an eine DNA-Sequenz kovalent gebunden. Dabei wird das kleine organische Molekül aus verschiedenen Molekülbausteinen über chemische Reaktionen aufgebaut. Jeder verwendete Molekülbaustein wird durch einen spezifischen DNA-Barcode, bestehend aus einer unterschiedlichen Reihenfolge der vier Nucleobasen, beschrieben. Durch die Anwesenheit des DNA-Barcodes ergeben sich einige Einschränkungen für die chemische Synthese des kleinen organischen Moleküls. So muss die verwendete Reaktion in Wasser als Co-Lösungsmittel ablaufen. Zudem dürfen keine stark sauren, oder oxidierenden Bedingungen, sowie hohe Temperaturen verwendet werden, da dies zu einer Zerstörung des DNA-Barcodes führen kann, sodass das kleine organische Molekül nicht mehr identifiziert werden kann. Diese Limitierungen resultieren in Substanzbibliotheken, die nur einen geringen Teil des chemischen Raumes abdecken und demnach strukturell sehr ähnliche Moleküle enthalten. Im Laufe dieser Arbeit sollten amphiphile Block-Copolymere für die Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek verwendet werden und eine neue Aufreinigungs-Methode etabliert und angewendet werden. Dadurch sollten einige Herausforderungen, wie die notwendige Kompatibilität der verwendeten organischen Reaktionen mit dem DNA-Barcode, sowie die erforderliche Reinheit einer Molekülbibliothek, reduziert werden. Dafür sollten zunächst Copolymer-vermittelte chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten etabliert werden.

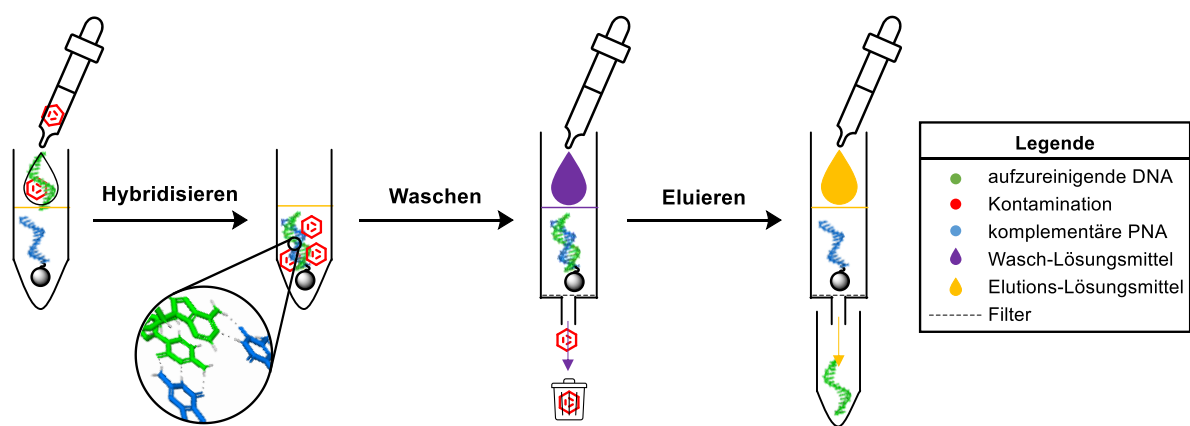


**Abbildung 18:** Säure- und Palladium-vermittelte Reaktionen an DNA-Konjugaten durch die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren.

Dabei sollten amphiphile Block-Copolymere, bestehend aus einem hydrophilen und hydrophoben Abschnitt, sowie einer katalytisch aktiven Einheit, wie einer Sulfonsäure und einem Palladium-Katalysator, verwendet werden. Diese Block-Copolymere sollten ab einer kritischen Mizellbildungskonzentration nanometergroße in hydrophil- und hydrophob-abgetrennte Reaktionsräume bilden. Darin sollten organische Reagenzien und das kovalent an die DNA gebundene Molekül vorliegen, welche durch den verwendeten Katalysator miteinander zur Reaktion gebracht werden. Der DNA-Strang sollte dabei in dem hydrophilen Medium vorliegen, was die Integrität des DNA-Stranges erhalten sollte. In dieser Arbeit sollte, basierend auf einer vorausgegangenen Masterarbeit, die Etablierung von Copolymer-vermittelten Reaktionen an DNA-Konjugaten fortgeführt werden (siehe **Abbildung 18**). Dabei sollte das Substratspektrum der Säure-vermittelten Povarov-Reaktion zur Bildung von DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugaten untersucht werden. Es sollten die drei Komponenten dieser Reaktion, das Olefin, das Amin, sowie der DNA-gebundene Aldehyd, variiert werden. Dafür sollten speziell Olefine mit einem *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschützten Amin getestet werden, um in einer nachfolgenden Boc-Entschützung ein freies Amin für einen weiteren Synthesesyklus zu erzeugen. Dafür sollte die Säure-vermittelte Abspaltung der Boc-Schutzgruppe eines geschützten Glycin-DNA-Konjugats mit Hilfe von verschiedenen Copolymeren und Additiven optimiert werden. Dabei sollten Copolymere verwendet werden, die sich in der Positionierung der Sulfonsäure (im Kern oder in der Hülle des Copolymers) unterscheiden. Somit sollte der Einfluss der Sulfonsäure-Positionierung auf die Boc-Entschützung bestimmt werden. Des Weiteren sollte eine Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion zur Bildung von DNA- $\beta$ -Carbolin-Konjugaten etabliert werden. Dafür sollten ebenfalls verschiedene Sulfonsäure-immobilisierte Copolymere verwendet werden. Bei einer erfolgreichen Etablierung und Optimierung der Reaktion sollte das Substratspektrum durch die Variation der Amin-Komponente und der Aldehyd-Komponente untersucht werden. Um die Anwendbarkeit der Copolymer-vermittelten Reaktionen an DNA-Konjugaten nicht nur auf Säure-vermittelte Reaktionen zu beschränken, sollte ein Copolymer mit einem immobilisierten Palladium-Komplex in einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung verwendet werden. Dazu sollte die Reaktion auf einem DNA-Arylbromid Startmaterial unter Veränderung der Base und der Copolymer-Konzentration optimiert werden und anschließend das Substratspektrum durch die Variation der Boronsäuren getestet werden.

Da allerdings nicht nur der chemische Raum, sondern auch die Lesbarkeit des DNA-Barcodes und die Reinheit der Molekülbibliothek nach einer chemischen Reaktion, für die erfolgreiche biologische Anwendung von großer Bedeutung ist, sollte in dieser Arbeit eine neue Aufreinigungs-Methode für die DNA-kodierte Chemie etabliert werden (siehe **Abbildung 19**).

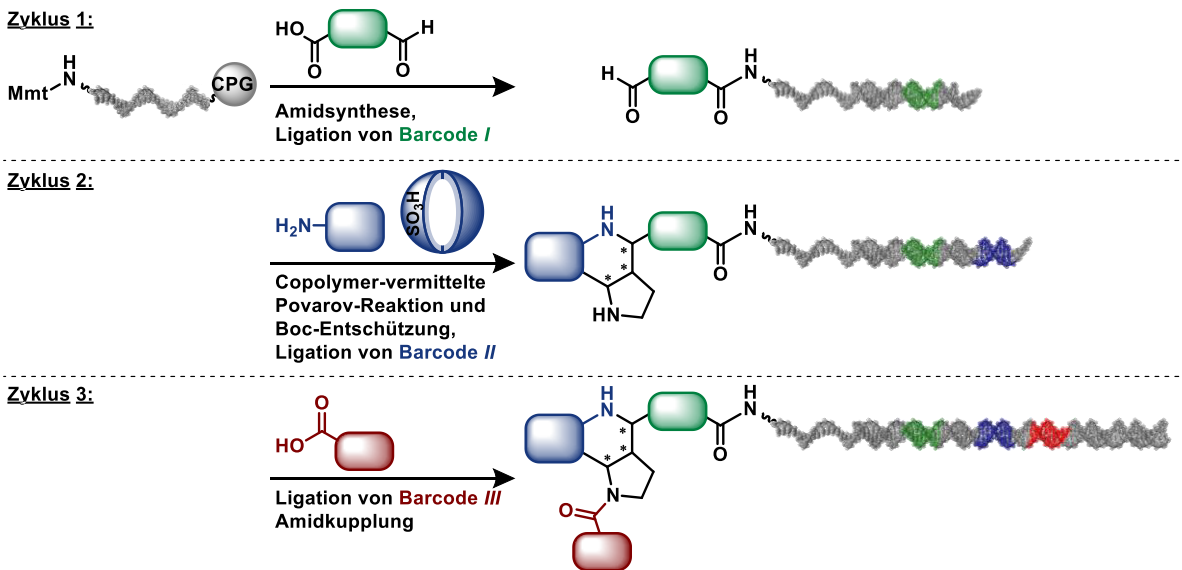
Dabei sollten möglichst unterschiedlich polare Reagenzien entfernt werden, eine hohe Wiedergewinnung der aufgereinigten DNA erhalten werden, keine Kontaminationen durch Salze oder Elutionsmittel eingebracht werden und die Methode möglichst ohne großen Aufwand auf verschiedene DEL-Designs angewendet werden können. Für die Entwicklung dieser Aufreinigungsmethode soll die selektive Watson-Crick-Basenpaarung genutzt werden, die sequenzielle Waschschrte überstehen soll und final wieder gebrochen werden kann. Dafür sollte ein PNA-Einzelstrang an eine feste Phase immobilisiert werden, welcher komplementär zum aufzureinigenden DNA-Konjugate ist. So sollten überschüssige Reagenzien aus den chemischen Reaktionen entfernt werden können und somit zu einer erhöhten Reinheit einer DNA-kodierten Substanzbibliothek führen.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung einer Affinitäts-Aufreinigung von DNA-Einzelsträngen.

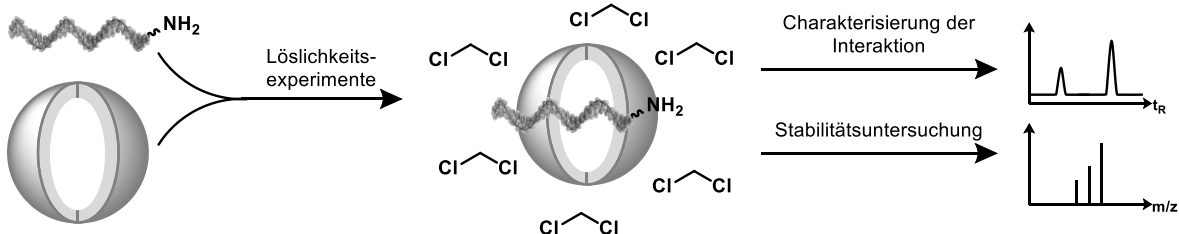
Sollte die Etablierung der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit anschließender Boc-Entschützung, sowie die Etablierung einer neuen Aufreinigungsmethode erfolgreich verlaufen, so sollten diese Konzepte anschließend für die Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek kombiniert verwendet werden (siehe **Abbildung 20**).

Dafür sollte eine Synthesestrategie, aus alternierenden Syntheseschritten und enzymatischen Ligationen, entwickelt werden. In einer kombinatorischen Synthese sollte das kleine organische Molekül über eine Amidsynthese mit Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren, eine Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion mit diversen Aminen, einer anschließenden Boc-Entschützung und einer weiteren Amidsynthese mit diversen Carbonsäuren synthetisiert werden. Durch die enzymatische Ligation der Barcodes und der Affinitäts-Aufreinigung nach den jeweiligen Syntheseschritten sollte eine DNA-kodierte Molekülbibliothek mit etwa 100.000 Bibliotheksmitgliedern synthetisiert werden und anschließend in Selektionsexperimenten getestet werden.



**Abbildung 20:** Design für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek unter Verwendung der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung.

Da für die Mizelläre Katalyse Wasser als Lösungsmittel oder Co-Lösungsmittel verwendet wird und es dadurch noch immer zu Einschränkungen bezüglich der Wahl der chemischen Reaktionen für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek führt, sollte eine Strategie entwickelt werden, um Wasser als Lösungsmittel zu vermeiden. Dabei sollten die amphiphilen Block-Copolymere jedoch ohne die immobilisierte katalytische Einheit verwendet werden. Durch die Interaktion des Copolymers mit dem DNA-Strang sollte versucht werden, die DNA in organischen Lösungsmitteln zu lösen (siehe **Abbildung 21**).



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung für die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren für DNA-Konjugate in organischen Lösungsmitteln.

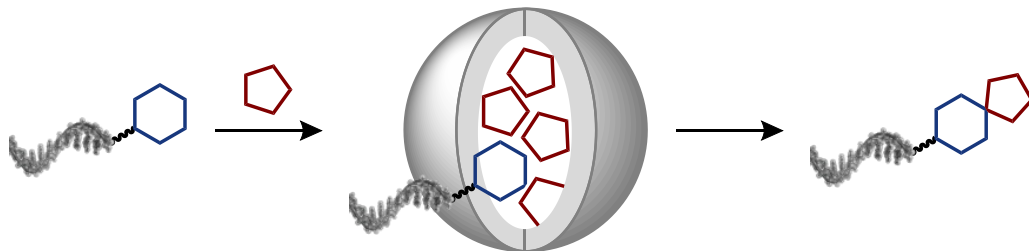
Dies sollte durch Verwendung von Fluorophoren gebunden an einen DNA-Einzelstrang visuell sichtbar gemacht werden. Zudem sollte die Interaktion der DNA mit dem Copolymer über diverse analytische Methoden untersucht werden. Um dieses System für die Entwicklung neuer chemischer Reaktionen auf DNA-Konjugaten anzuwenden, sollte die Stabilität dieses DNA-Copolymer-Komplexes gegenüber verschiedenen Metallsalzen und organischen Reagenzien in organischen Lösungsmitteln bestimmt werden und mit der Stabilität der DNA in wässrigen Lösungsmitteln, sowie ohne die Verwendung des Copolymers verglichen werden.



### 3. Copolymer-vermittelte Reaktionen an DNA-Konjugaten

DNA-kodierte Bibliotheken bieten die Möglichkeit, eine große Anzahl von Molekülen effizient zu handhaben und die Bindung an Proteine zielgerichtet zu testen. Allerdings besteht eine große Herausforderung für die Entwicklung neuer Synthesemethoden, da diese mit dem DNA-Barcode kompatibel sein müssen. Dazu gehören Reaktionen, die mit Wasser als Co-Lösungsmittel ablaufen, sowie hohe Ausbeuten mit möglichst geringem Nebenprodukt-Anteil liefern. Dies ist besonders wichtig, da im Laufe einer Molekülbibliothekssynthese die Mitglieder nicht einzeln aufgereinigt werden können. Zudem sollte für jede Reaktion ein breites Spektrum an leicht verfügbaren Ausgangsmaterialien vorhanden sein. Für die erfolgreiche Synthese einer DEL muss der kodierte DNA-Strang während der Bibliotheksynthese intakt bleiben. Daraus folgt, dass harsche Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel die Verwendung von starken Säuren, Oxidationsmitteln oder hohe Temperaturen, zu vermeiden sind. Die Entwicklung von neuen Synthesemethoden ist daher ein unverzichtbarer Prozess, um den chemischen Raum für DNA-kodierte Bibliotheken zu erweitern.<sup>[8,28,29]</sup>

Um diese Herausforderungen anzugehen, wurde in der *Arbeitsgruppe Brunschweiger* die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren für die Synthese an DNA-Konjugaten untersucht.<sup>[159–161]</sup> Amphiphile Block-Copolymere bestehen aus einem hydrophilen und hydrophoben Abschnitt und bilden ab einer kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) nanometergroße Mizellen.<sup>[108,109]</sup> Dadurch findet eine Abtrennung des hydrophilen und hydrophoben Raumes statt, wodurch sich Nanoreaktoren bilden. In diesen Reaktoren können Chemikalien gelöst, die Aktivierungsenergie herabgesetzt und somit die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert werden.<sup>[108–110]</sup>



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung einer Copolymer-vermittelten Reaktion an DNA-Konjugaten.

Für die DNA-kodierte Synthese bietet dieses System den Vorteil, dass eine Reaktion in Wasser durchgeführt werden kann, sowie eine Abtrennung des reaktiven Mediums zu dem DNA-Strang erfolgen kann, wodurch der DNA-Strang möglichst intakt bleibt (siehe **Abbildung 22**). Um diese Copolymer-DNA-Wechselwirkung zu untersuchen, wurden verschiedenste Messungen, wie z.B. SAXS-, Zirkulardichroismus-, UV-Vis- und Fluoreszenzlöschungsexperimente, durchgeführt. Dabei konnte eine starke Wechselwirkung der DNA mit den durch das Copolymer in Wasser gebildeten Mizellen bestimmt werden.<sup>[161]</sup>

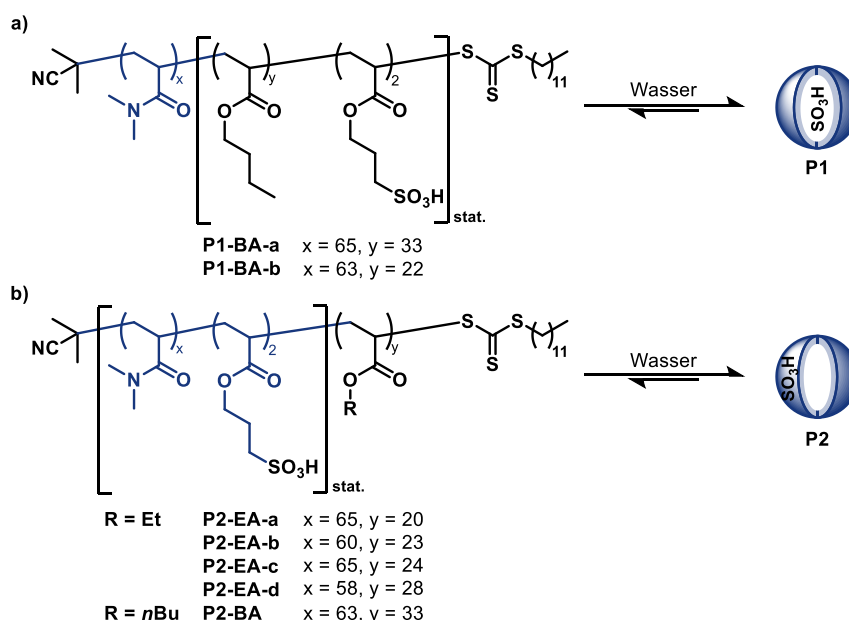
Das Konzept der Mizellen-vermittelten Synthese auf DNA-Konjugaten wurde von der *Arbeitsgruppe Waring* aufgegriffen. Dabei wurde das kommerziell erhältliche Tensid TPGS-750-M, entwickelt von *Lipshutz et al.*, in einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung an DNA-Konjugaten mit verschiedenen Bororganischen Verbindungen, Basen und einem Palladium-Katalysator verwendet. Es konnte mit einem breiten Reaktandenspektrum die gewünschten DNA-Biaryl-Produkte mit einer sehr geringen DNA-Degradierung erhalten werden.<sup>[162,163]</sup> In einer vorausgegangenen Masterarbeit<sup>[164]</sup> und in dieser vorliegenden Arbeit sollte die Anwendung von Katalysator-immobilisierten Copolymeren für die DNA-kodierte Synthese getestet werden. Dafür wurden Säure-immobilisierte Copolymere und ein Pd-immobilisiertes Copolymer verwendet. In den folgenden Kapiteln wird die Synthese der verwendeten Copolymere, sowie deren Anwendung in der Povarov-Reaktion, der Boc-Entschützung, der Pictet-Spengler-Reaktion und der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung untersucht.

### 3.1 Verwendete amphiphile Block-Copolymere

In dieser Arbeit wurden verschiedene Sulfonsäure-immobilisierte Copolymere, sowie ein Palladium-immobilisiertes Copolymer verwendet. Diese Copolymere wurden von *Dr. Christian Gramse* aus der *Arbeitsgruppe Weberskirch* hergestellt. Die Darstellung erfolgte über die RAFT-Polymerisation (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*, RAFT) nach *Laschewsky et al.*<sup>[165]</sup> Dabei handelt es sich um eine kontrollierte radikalische Polymerisation, die nach den folgenden Schritten abläuft: Initiierung, reversibler Kettentransfer, Reinitiierung, Kettengleichgewicht, Terminierung. Dabei werden sogenannte RAFT-Reagenzien (Dithioesterkomponenten) verwendet. Diese binden reversibel an die wachsenden radikalischen Polymerketten, wodurch eine Kontrolle der molaren Masse und dementsprechend auch des Polymerisationsgrades ermöglicht wird. Der Polymerisationsgrad  $dp$  bezeichnet dabei die Anzahl der Grundbausteine (Monomere) in einem Polymer-Molekül. Zudem resultiert diese Polymerisation in einer geringen Dispersität  $D$ , sowie in bekannten Endgruppen.<sup>[166]</sup> Die in dieser Arbeit verwendeten Copolymere wurden über Acrylate als Grundbausteine (Monomere) aufgebaut. Dabei wurde als erstes der hydrophile Polymerblock, bestehend aus dem Monomer *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA), und anschließend der hydrophobe Polymerblock mit unterschiedlichen Monomeren aufgebaut. Für die katalytisch-aktive Einheit wurden spezielle Acrylat-Monomere in die Copolymere eingefügt, um diese nachträglich zu funktionalisieren. Dabei konnte die katalytisch-aktive Einheit entweder in dem hydrophoben Kern oder in der hydrophilen Hülle eingebaut werden. Zudem konnte die Polarität des Mizellenkerns durch die Wahl der Acrylat-Monomere variiert werden, sowie auch die Anzahl der einzelnen Monomere (Polymerisationsgrad) in dem Kern und der Hülle des Copolymers.

### 3.1.1. Sulfonsäure-immobilisierte Copolymere

Für Säure-vermittelte Reaktionen wurden Copolymere hergestellt, welche mit einer Sulfonsäure immobilisiert wurden. Diese kann variabel im hydrophoben Kern (**P1**) oder in der hydrophilen Hülle (**P2**) immobilisiert werden. Dabei wurde als katalytisch-aktives Monomer das 3-Sulfopropylacrylat Kaliumsalz (SPAK) verwendet. Nach der erfolgten radikalischen Polymerisation wurde das Copolymer über einen sauren Ionenaustauscher (Amberlyst® 15) geleitet, um die Sulfonsäure zu erhalten. Die Eigenschaften der Copolymere können über verschiedene Parameter kontrolliert werden. Um den hydrophoben Copolymerblock aufzubauen, wurden Acrylate mit verschiedenen langen Alkylketten verwendet. Somit konnte die Polarität des Mizellenkerns von Methylmethacrylat (MMA,  $\log P = 1,34$ ) bis hin zu *n*-Dodecylacrylat (DD,  $\log P = 4,64$ ) eingestellt werden. Eine weitere Variation liegt in dem Polymerisationsgrad *dp*. Dabei konnte das Verhältnis zwischen dem hydrophilen und dem hydrophoben Copolymerblock verändert werden.<sup>[161]</sup>

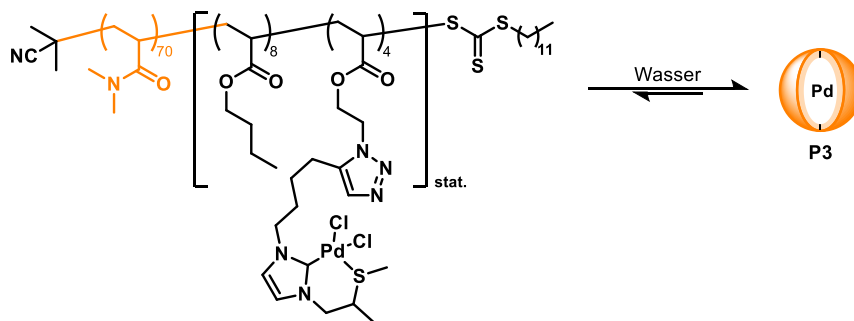


**Abbildung 23:** Copolymerstrukturen und schematische Darstellung der Sulfonsäure-immobilisierten Copolymere. a) Allgemeine Struktur der Copolymerreihe **P1** mit immobilisierter Sulfonsäure im Kern; b) Allgemeine Struktur der Copolymerreihe **P2** mit immobilisierter Sulfonsäure in der Hülle.

Die in dieser Arbeit verwendeten Copolymere sind in **Abbildung 23** dargestellt. Es wurden die Monomere *n*-Butylacrylat (BA), sowie Ethylacrylat (EA) für die Darstellung des hydrophoben Copolymerblocks verwendet. Dabei wurde der Polymerisationsgrad des hydrophilen Polymerblocks (*x*) möglichst konstant gehalten und nur der Polymerisationsgrad des hydrophoben Bausteines (*y*) variiert. Diese Copolymere wurden für Säure-vermittelte Reaktionen, wie z.B. die Povarov-Reaktion, die Boc-Entschützung und die Pictet-Spengler-Reaktion, verwendet.

### 3.1.2. Palladium-immobilisiertes Copolymer

Um das Reaktionsspektrum von Copolymer-vermittelten Reaktionen zu erweitern, wurde ein Palladium-immobilisiertes Copolymer synthetisiert. Dieses bestand aus *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) als hydrophiles Monomer und *n*-Butylacrylat (BA) und Azidoethylacrylat als hydrophobe Monomere. Das Azid-funktionalisierte, eingebaute Monomer konnte in einem zusätzlichen Syntheseschritt über eine Ruthenium-vermittelte Click-Reaktion mit einem Pd-NHC-Komplex funktionalisiert werden (siehe **Abbildung 24**). N-heterozyklische Carbene (NHC) sind elektronenreiche, sterisch gehinderte Liganden und haben sich in der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung von heterozyklischen Systemen als sehr effektiv erwiesen.<sup>[157]</sup> Das erhaltene Pd-funktionalisierte Copolymer **P3** bildete in Wasser etwa 15 nm große Mizellen und wurde für die Entwicklung einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung verwendet.



**Abbildung 24:** Copolymerstruktur und schematische Darstellung des Palladium-immobilisierten Copolymers **P3**.

## 3.2 Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion

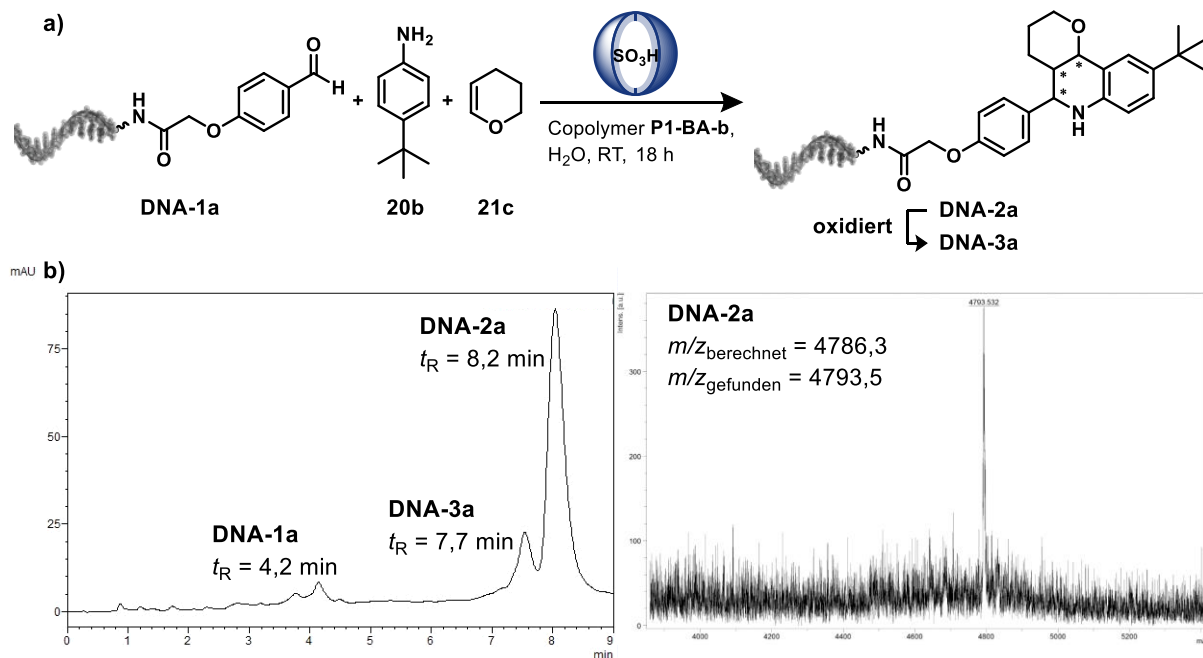
Die Säure-katalysierte Povarov-Reaktion von Aldehyden, Anilinen und elektronenreichen Olefinen ermöglicht einen schnellen Zugang zu Tetrahydrochinolinen, welches ein wichtiges Grundgerüst in der Wirkstoffforschung darstellt. So kann dieses Grundgerüst zum Beispiel in den Naturstoffen Martinellin und Martinellinsäure gefunden werden, oder auch in vielen bioaktiven Molekülen.<sup>[167,168]</sup> Aus diesem Grund wurde die Säure-katalysierte Povarov-Reaktion in der *Arbeitsgruppe Brunschweiler* erfolgreich auf einem an der festen Phase (CPG) gebundenen DNA-Aldehyd-Konjugat überführt. Es wurde gezeigt, dass die Stabilität der DNA gegenüber Säuren durch die feste Phase deutlich gesteigert werden kann, im Vergleich zu einem DNA-Strang in Lösung. Dies resultiert aus den mit Schutzgruppen geschützten Nucleobasen. Durch die erhöhte Stabilität der Nucleobasen konnten verschiedene, normalerweise DNA-schädigende, Reaktionen, darunter auch die Povarov-Reaktion, etabliert werden.<sup>[95]</sup> Da bei der Synthese einer DEL mit Hilfe der festen Phase die Kodierstrategie variiert werden muss, sollte die Povarov-Reaktion unter Verwendung von Copolymeren in Lösung versucht werden. In einer vorausgegangenen Masterarbeit wurde die Povarov-Reaktion auf einem DNA-Konjugat unter Verwendung eines amphiphilen Blockcopolymeres mit immobilisierter Sulfonsäure entwickelt.<sup>[164]</sup>

### 3.2.1. Vorausgegangene Experimente<sup>[164]</sup>

Für die Povarov-Reaktion wurde in ersten Experimenten die 2-(4-Formylphenoxy)essigsäure **64a** über eine Amidsynthese an eine C6-Aminolinker modifizierte 14mer-DNA gekoppelt. Das synthetisierte DNA-Konjugat **DNA-1a** wurde mit Hilfe der MALDI-MS auf die Produktidentität und mit der analytischen HPLC auf die Reinheit untersucht.

Anschließend wurde das DNA-Konjugat mit der Aldehyd-Funktionalität **DNA-1a** mit dem amphiphilen Blockcopolymer **P1-BA-b**, 4-*tert*-Butylanilin **20b** und 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** in Wasser über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (siehe **Abbildung 25a**). Dabei wurde die Konzentration und die Äquivalente des Copolymeres **P1-BA-b**, sowie die Äquivalente des Anilins **20b** und des Olefins **21c** variiert. Mit einer Konzentration von 0,5 mM und 50 Äquivalenten des Copolymeres und 2000 Äquivalenten an Anilin und Olefin konnte das Tetrahydrochinolin-DNA-Konjugat **DNA-2a** mit einem Umsatz von 90 % gebildet werden. Die Produktbildung konnte mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS beobachtet werden (siehe **Abbildung 25b**). In dem HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches konnte ein Peak bei etwa 8,2 min mit einem früher eluierenden Nebenprodukt gemessen werden. Das Povarov-Produkt und das früher eluierende Nebenprodukt konnten über eine Referenzprobe anhand der Retentionszeit bestimmt werden und das Nebenprodukt konnte als das oxidierte Povarov-Produkt, das 3,4-Dihydro-2*H*-pyrano[3,2-*c*]chinolin **DNA-3a**, identifiziert werden.<sup>[159]</sup>

Bei der Referenzprobe handelte es sich um das synthetisierte Molekül (das Tetrahydrochinolin, sowie das Dihydrochinolin), welches über die NMR-Spektroskopie und die Massenspektrometrie analysiert wurde und anschließend über eine Amidsynthese an einen DNA-Einzelstrang gekoppelt wurde.



**Abbildung 25:** Synthese des DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrano[3,2-*c*]chinolin-Konjugats **DNA-2a**.

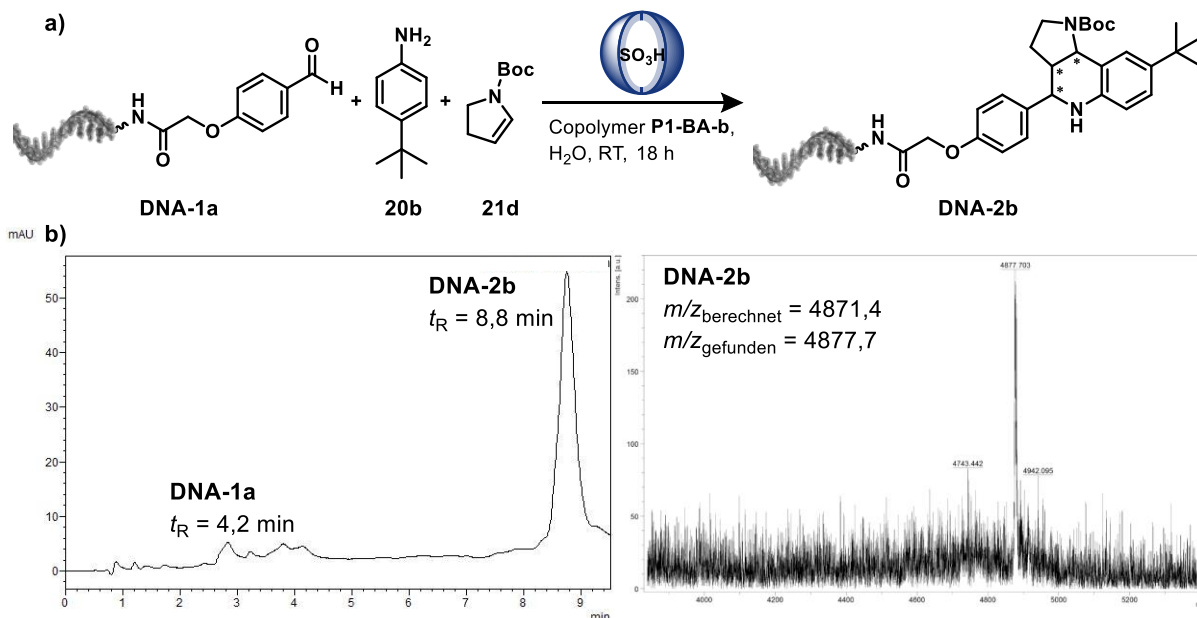
a) Reaktionsschema der Povarov-Reaktion. Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** (2000 Äquiv.), 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** (2000 Äquiv.) und Copolymer **P1-BA-b** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt; b) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts).<sup>[164]</sup>

Da das Anilin **20b** und Olefin **21c** in Wasser nicht löslich sind, wurde die Verwendung von Co-Lösungsmittel getestet. Dabei konnte eine gleichbleibende Produktbildung bei der Verwendung von 5 Vol-% EtOAc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder THF beobachtet werden.

Um die Povarov-Reaktion für eine DEL-Synthese verwenden zu können, musste die Robustheit der Reaktion in Bezug auf die Diversität der Reaktanden geprüft werden. Dazu wurden 20 verschiedenen Aniline **20** mit dem DNA-Konjugat **DNA-1a** und dem 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** umgesetzt und analysiert. Dabei wurden Aniline mit Substituenten in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position, sowie auch trisubstituierte Aniline getestet. Da vermutet wurde, dass diese Aniline unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen, wurden härtere Reaktionsbedingungen, wie 8000 Äquiv. der Reaktanten **20** und **21c** und eine Reaktionstemperatur von 40 °C, verwendet. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine sterisch anspruchsvolle Gruppe an *ortho*-Position zu einer verminderten Produktbildung führt. Bei Reaktionen mit Substituenten in *meta*-Position wurden Umsätze von 10 % bis 90 % erhalten, wobei kein Trend festgestellt werden konnte, ob elektronenschiebende oder -ziehende Gruppen für die Reaktion von Vorteil sind.

Bei *para*-substituierten Anilinen konnte ein Umsatz von 20 % bis 70 % bestimmt werden, wobei Aniline mit einer elektronenschiebenden Gruppe einen höheren Umsatz ergaben.

Auch konnte die Povarov-Reaktion mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** anstelle des 3,4-Dihydro-2*H*-pyrans **21c** erfolgreich durchgeführt werden (siehe **Abbildung 26**).



**Abbildung 26:** Synthese des DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugats **DNA-2b**.

a) Reaktionsschema der Povarov-Reaktion. Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** (2000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (2000 Äquiv.) und Copolymer **P1-BA-b** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt; b) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts).<sup>[164]</sup>

Die Studien zur Blockcopolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fortgeführt, da dieser Molekülbaustein einen weiteren Syntheseyklus über die Boc-geschützte Aminogruppe ermöglicht und somit eine Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek durchführbar ist.

### 3.2.2. Ergebnisse

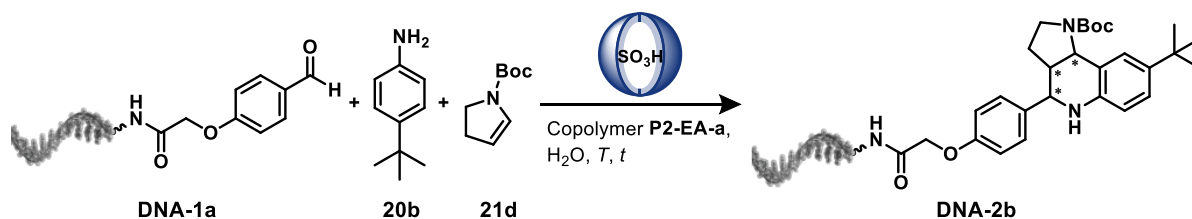
Die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion konnte in der vorausgegangenen Master-Arbeit<sup>[164]</sup> erfolgreich etabliert werden und soll nun für eine DEL-Synthese in Betracht gezogen und weiter entwickelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Povarov-Reaktion das Copolymer **P2-EA-a** verwendet, da sich in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt hatte, dass eine Positionierung der Sulfonsäure in der Hülle bei dieser Reaktion zu höheren Umsätzen führt.<sup>[161]</sup> Die Povarov-Reaktion soll im zweiten Syntheseschritt einer DEL-Synthese eingesetzt werden. Um die erhaltenen Povarov-Produkte weiter zu diversifizieren, muss für den dritten Syntheseschritt anschließend eine weitere funktionelle Gruppe zur Verfügung stehen. Dafür wurde die Reaktionskinetik der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** analysiert. Zudem wurden in dieser vorliegenden Arbeit verschiedene Olefine mit tert-Butyloxycarbonyl (Boc) geschützten Aminen, als zusätzliche funktionelle Gruppe, in der Copolymer **P2-EA-a** vermittelten Povarov-Reaktion getestet, sowie der an die DNA-gekoppelte Aldehyd, sowie die Amin-Komponente, variiert. Anschließend sollte die Boc-Schutzgruppe abgespalten und ein freies Amin erhalten werden, welches für den nächsten Synthesesyklus zur Verfügung steht.

#### 3.2.2.1. Optimierung der Reaktions-Zeit und -Temperatur der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese des DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugats **DNA-2b**

Anschließend an die zuvor erfolgreich durchgeführte Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion mit *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** soll diese Reaktion näher beleuchtet werden. Dafür wurden die Reaktionszeit und die Temperatur für die Synthese des DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugats **DNA-2b** optimiert. In einer ersten Testreihe wurde das DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a** mit dem 4-*tert*-Butylanilin **20b**, dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** und dem Copolymer **P2-EA-a** bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 40 °C, 50 °C und 60 °C) geschüttelt und bei verschiedenen Reaktionszeiten (30 min, 1 h, 2 h, 4 h) gestoppt (siehe **Schema 17**). Die Analyse bezüglich der Bildung von **DNA-2b** erfolgte mit Hilfe der analytischen HPLC (siehe **Abbildung 27**, **Anhang Abbildung 60 - 63**). Zudem wurde die Produktbildung bei 25 °C und 40 °C mit der Reaktionskinetik der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** verglichen. Für die Reaktion mit Dihydropyrrol **21d** konnte bei 25 °C (siehe **Abbildung 27**, Viereck, durchgezogene schwarze Linie) bereits nach 30 min 70 % des Produktes **DNA-2b** erhalten und nach 4 h ein vollständiger Umsatz des Startmaterials beobachtet werden.



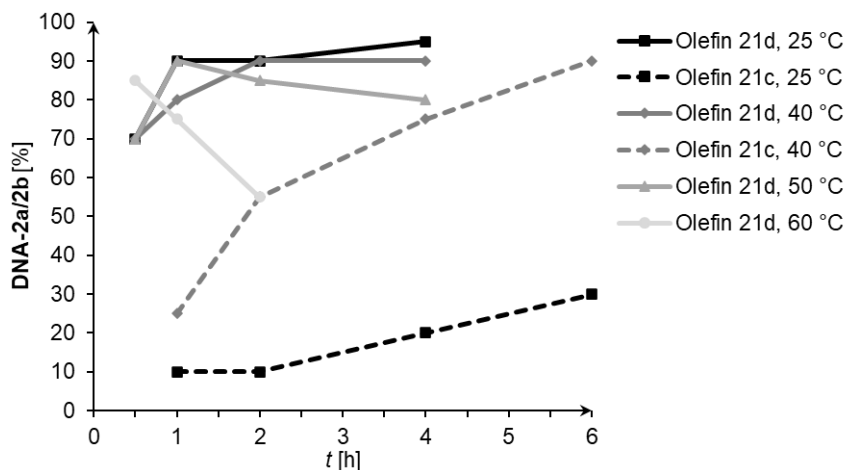
Optimierung der Reaktions-Zeit und -Temperatur der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese des DNA-Tetrahydro-1H-pyrrolo[3,2-c]chinolin Konjugats DNA-2b



**Schema 17:** Optimierung der Reaktions-Zeit und -Temperatur der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese des DNA-Tetrahydro-1H-pyrrolo[3,2-c]chinolin Konjugats **DNA-2b**.

Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** (2000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol **21d** (2000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten geschüttelt.

Im Vergleich dazu konnte bei der Reaktion mit Olefin **21c** nach 6 h erst ein Umsatz von 30 % erhalten werden (siehe **Abbildung 27**, Viereck, gestrichelte schwarze Linie). Bei 40 °C konnte mit Olefin **21d** bereits nach 2 h ein vollständiger Umsatz zu dem Produkt **DNA-2b** erhalten werden und dieser Umsatz blieb auch bis zu einer Reaktionszeit von 18 h erhalten (siehe **Abbildung 27**, Raute, durchgezogene dunkelgraue Linie, **Tabelle 1**, Eintrag 1). Mit Olefin **21c** konnte bei 40 °C ein vollständiger Umsatz zu **DNA-2a** nach 6 h erhalten werden (siehe **Abbildung 27**, Raute, gestrichelte dunkelgraue Linie). Aus diesem Vergleich wird deutlich, dass die Reaktion mit *N*-Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol **21d** deutlich schneller abläuft und somit dieses Olefin eine erhöhte Reaktivität in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion gegenüber dem Olefin **21c** aufweist.



**Abbildung 27:** Produktbildungs-Zeit-Diagramm der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion bei verschiedenen Reaktionstemperaturen und mit Verwendung von Olefin **21d** (durchgezogene Linie) gegenüber Olefin **21c** (gestrichelte Linie)<sup>[164]</sup>.

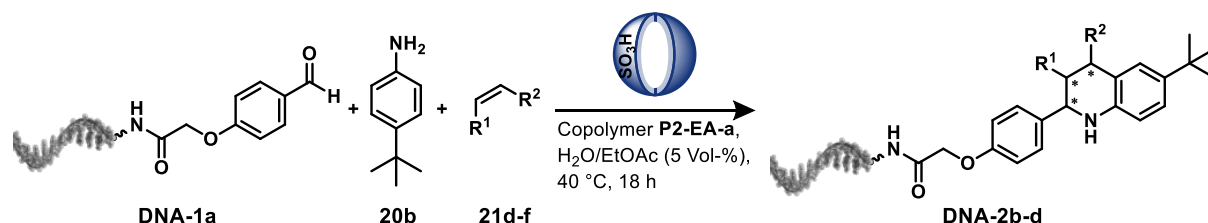
Bei einer weiteren Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C kann bereits nach 1 h ein vollständiger Umsatz zu Produkt **DNA-2b** erhalten werden (siehe **Abbildung 27**, Dreieck, durchgezogene graue Linie). Allerdings kann hier bei längerer Reaktionszeit eine Degradierung der DNA beobachtet werden. Gleiches kann auch bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur auf 60 °C, allerdings schon bei kürzeren Reaktionszeiten, beobachtet werden (siehe **Abbildung 27**, Kreis, durchgezogene hellgraue Linie).

Für eine DEL-Synthese werden Moleküle mit unterschiedlichster Reaktivität verwendet. Eine erhöhte Temperatur bei gleichzeitig längerer Reaktionszeit begünstigt die Produktbildung bei der Verwendung von Molekülen mit geringerer Reaktivität. Daher wurde für weitere Experimente eine Temperatur von 40 °C gewählt, da hierbei auch bei längeren Reaktionszeiten die DNA stabil blieb und bereits ein vollständiger Umsatz bei kurzen Reaktionszeiten (2 h) erhalten werden konnte.

### 3.2.2.2. Variation des Olefins in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

Die Povarov-Reaktion ist eine Multikomponenten-Reaktion, in der die einzelnen Komponenten variiert werden können. In diesem Kapitel wird das Substratspektrum des elektronenreichen Olefins mit absplaltbarer Boc-Schutzgruppe getestet. Bisher wurde die Reaktion mit dem 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** etabliert, sowie mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** untersucht.<sup>[164]</sup> Im Folgenden wurden das *tert*-Butylvinylcarbammat **21e** und das *N*-Boc-Allylamin **21f** in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion getestet (siehe **Tabelle 1**). Dafür wurde das DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a** mit dem 4-*tert*-Butylanilin **20b**, den Olefinen **21d - f** und dem Copolymer **P2-EA-a** bei 40 °C über Nacht geschüttelt und anschließend mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS (siehe **Anhang Abbildung 64**) analysiert.

**Tabelle 1:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion an **DNA-1a** durch Einsatz verschiedener Olefine **21d - f**.<sup>a</sup>



Eintrag	Olefin	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	<b>21d</b> 	<b>DNA-2b</b>	> 90	4871,5 4870,9
2	<b>21e</b> 	<b>DNA-2c</b>	20	4845,5 4845,6
3	<b>21f</b> 	<b>DNA-2d</b>	n.d.	4859,5 n.d.

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit Anilin **20b** (2000 Äquiv.), Olefin (2000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und 5 Vol-% EtOAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. n.d. = nicht detektiert.

Dabei konnte für die Reaktion mit *tert*-Butylvinylcarbammat **21e** nur ein Umsatz von etwa 20 % erhalten werden (siehe **Tabelle 1**, Eintrag 2). In der MALDI-MS konnte kein Startmaterial mehr beobachtet werden.

Dafür konnte aber neben dem Produkt-Signal ein nicht identifiziertes Nebenprodukt mit der Masse von 4727,2 g/mol bestimmt werden. Bei der Reaktion mit *N*-Boc-Allylamin **21f** konnte das Produkt **DNA-2d** nicht detektiert werden (siehe **Tabelle 1**, Eintrag 3). Es konnte lediglich das Startmaterial **DNA-1a** wiedergewonnen werden. In diesem Fall fehlte die elektronenschiebende Gruppe (hier das Stickstoff-Atom) in direkter Nachbarschaft zu der Doppelbindung, weshalb die Doppelbindung eine geringere Reaktivität aufweist und somit der nukleophile Angriff auf das Imin abgeschwächt sein könnte.<sup>[169,170]</sup> Da die Copolymer **P2-EA-a**-vermittelte Povarov-Reaktion nur mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** mit einer hohen Ausbeute und ohne Nebenprodukte (siehe **Tabelle 1**, Eintrag 1) ablief, wurde im weiteren Verlauf ausschließlich Olefin **21d** weiter betrachtet.

### 3.2.2.3. Variation des Amins in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

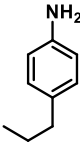
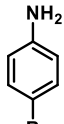
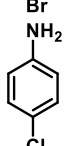
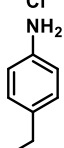
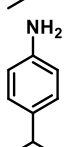
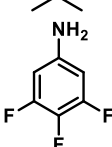
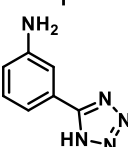
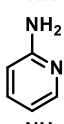
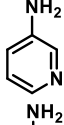
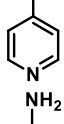
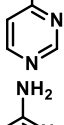
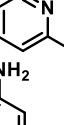
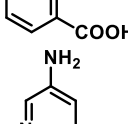
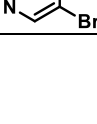
Die zweite Komponente, die in der Povarov-Reaktion variiert werden kann, ist das aromatische Amin. In der vorausgegangenen Arbeit wurde bereits das Anilin in der Copolymer **P1-BA-b**-vermittelten Povarov-Reaktion unter Verwendung des 3,4-Dihydro-2*H*-pyrans **21c** und des DNA-Aldehyd-Konjugates **DNA-1a** untersucht. Dabei konnten von 20 verschiedenen substituierten Anilinen moderate bis gute Umsätze zu DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrano[3,2-*c*]chinolin-Konjugaten **DNA-2** erhalten werden.<sup>[164]</sup> In dieser Arbeit sollte nun die Produktbildung verschiedener Arylamine **20b - ad** untersucht werden (siehe **Tabelle 2**).<sup>[135,171]</sup> Für diese Experimente wurde das DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a** mit den verschiedenen Aminen **20b - ad**, dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** und dem Copolymer **P2-EA-a** bei 40 °C über Nacht geschüttelt und anschließend mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS (siehe **Anhang Abbildung 65**) analysiert. Alle unterschiedlich substituierten Aniline **20b - l** konnten mit einem vollständigen Umsatz zu den gewünschten Produkten reagieren und es konnten keine Nebenprodukte festgestellt werden. Dabei konnte sowohl das nicht-substituierte Anilin **20c** (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 2), als auch das Anilin **20d** mit einer sterisch anspruchsvollen Gruppe in *ortho*-Position (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 3) vollständig umgesetzt werden. Dies hat bei der Reaktion mit 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** nur zu einem Umsatz von 25 % geführt.

**Tabelle 2:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion an **DNA-1a** durch Einsatz verschiedener aromatischer Amine **20b - ad** zur Bildung von DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin-Konjugaten **DNA-2b, -2e - af**.<sup>a</sup>

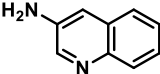

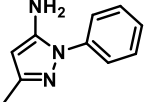
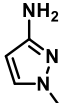
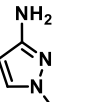
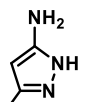
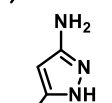
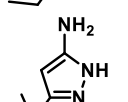
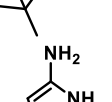
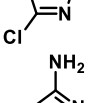
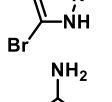
DNA-1a + 20b-ad + 21d  $\xrightarrow[\text{Copolymer P2-EA-a, H}_2\text{O/EtOAc (5 Vol-%), 40 }^\circ\text{C, 18 h}]{\text{SO}_3\text{H}}$  DNA-2b, -2e-af

Eintrag	Anilin	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	<b>20b</b> 	<b>DNA-2b</b>	> 90	4871,5 4867,7
2	<b>20c</b> 	<b>DNA-2e</b>	> 90	4815,3 4816,1
3	<b>20d</b> 	<b>DNA-2f</b>	> 90	4905,4 4906,3
4	<b>20e</b> 	<b>DNA-2g</b>	> 90	4851,3 4853,0

Fortsetzung Tabelle 2

5	20f		DNA-2h	> 90	4857,4 4859,4
6	20g		DNA-2i	> 90	4894,2 4894,1
7	20h		DNA-2j	> 90	4849,7 4849,7
8	20i		DNA-2k	> 90	4843,3 4843,3
9	20j		DNA-2l	> 90	4857,4 4858,9
10	20k		DNA-2m	> 90	4869,3 4870,0
11	20l		DNA-2n	> 90	4883,4 4881,8
12	20m		DNA-2o	n.d.	4816,4 n.d.
13	20n		DNA-2p	n.d.	4816,4 n.d.
14	20o		DNA-2q	n.d.	4816,4 n.d.
15	20p		DNA-2r	n.d.	4817,4 n.d.
16	20q		DNA-2s	n.d.	4830,4 n.d.
17	20r		DNA-2t	n.d.	4860,4 n.d.
18	20s		DNA-2u	35	4895,3 4893,9

Fortsetzung Tabelle 2

19	20t		DNA-2v	75	4866,5 4862,8
20	20u		DNA-2w	n.d.	4819,4 n.d.
21	20v		DNA-2x	> 90	4895,5 4898,5
22	20w		DNA-2y	> 90	4819,4 4819,9
23	20x		DNA-2z	> 90	4833,4 4832,2
24	20y		DNA-2aa	n.d.	4819,4 n.d.
25	20z		DNA-2ab	25	4833,4 4833,3
26	20aa		DNA-2ac	> 90	4861,5 4860,6
27	20ab		DNA-2ad	25	4839,8 4839,0
28	20ac		DNA-2ae	n.d.	4884,3 n.d.
29	20ad		DNA-2af	20	4821,4 4821,1

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit Anilin (2000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (2000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und 5 Vol-% EtOAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. n.d. = nicht detektiert.

Bei Substituenten in *para*-Position konnte kein Trend bestimmt werden, ob eine elektronenziehende (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 6-7), oder elektronenschiebende (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 1, 5, 8, 9) Gruppe von Vorteil für die Povarov-Reaktion ist. Auch das Anilin **20i** mit einem Substituenten in *meta*-Position konnte vollständig umgesetzt werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 11). Ebenso konnten auch di- und tri-substituierte Aniline **20e** und **20k** vollständig das gewünschte Produkt bilden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 4, 10).

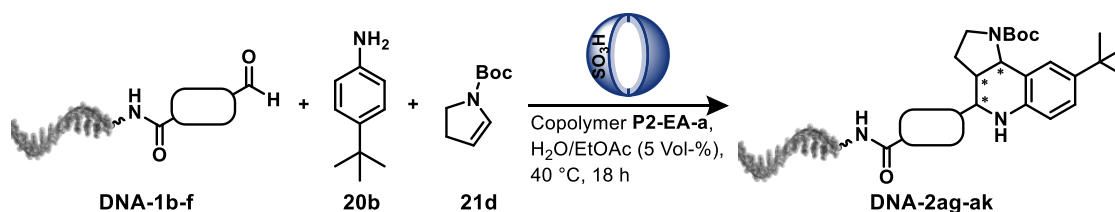
Für die Aminopyridine konnte bis auf das 3-Amino-5-Bromopyridin **20s** und das 3-Aminoquinolin **20t** keine Produktbildung beobachtet werden. Die Position der Amino-Gruppe (2-, 3-, 4-Aminopyridin) hatte keine Auswirkung auf die Produktbildung. Es konnte jeweils nur das Startmaterial **DNA-1a** detektiert werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 12-14). Auch das Aminopyrimidin **20p** lieferte nicht das gewünschte Produkt, sondern nur das wiedergewonnene Startmaterial **DNA-1a** (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 15). Dahingegen konnte für 3-Amino-5-Bromopyridin **20s** neben dem Startmaterial **DNA-1a** ein Umsatz zu dem Produkt **DNA-2u** von etwa 35 % bestimmt werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 18). Ein Austausch des Brom-Substituenten gegen eine Methyl- (**20q**) oder eine Carboxy-Gruppe (**20r**) führte zu keiner Produktbildung (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 16, 17). Anschließend wurde das 3-Aminoquinolin **20t** getestet. Hierbei konnte die gewünschte Masse des Produktes **DNA-2v** detektiert werden und ein Umsatz von etwa 75 % bestimmt werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 19). Als nächstes wurden verschieden substituierte Aminopyrazole in der Povarov-Reaktion getestet. Dabei konnte für die Amine **20v - x** und **20aa** ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt erhalten werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 21-23, 26). Dabei handelte es sich um drei di-substituierte Pyrazole mit Methyl- (**20w**), Ethyl- (**20x**) und *tert*-Butyl-Substituenten (**20aa**), sowie um ein dreifach-substituiertes Pyrazol mit einer Methyl-Gruppe und einer sterisch anspruchsvollen Phenyl-Gruppe (**20v**). Einen Umsatz von etwa 20 % - 25 % konnte mit den Aminopyrazolen **20z**, **20ab** und **20ad** erreicht werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 25, 27, 29). Hierbei handelte es sich um drei di-substituierte Pyrazole mit einer Ethyl- (**20z**), Chlor- (**20ab**) und Hydroxyl-Gruppe (**20ad**) an der Position 3. Ein Austausch dieses Substituenten gegen eine Methyl- (**20y**) oder Bromo-Gruppe (**20ac**) resultierte in keiner Produktbildung (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 24, 28). Auch für das 5-Amino-1-Methylpyrazol **20u** konnte kein Umsatz zu dem gewünschten Produkt bestimmt werden (siehe **Tabelle 2**, Eintrag 20).

Die Copolymer **P2-EA-a**-vermittelte Povarov-Reaktion lieferte mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrols **21d** im Vergleich zu dem 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** insgesamt höhere Umsätze mit den verschieden substituierten Anilinen. Es konnte bei allen Anilinen **20b - l** ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt beobachtet werden. Bei der Verwendung von Aminopyridinen konnte insgesamt nur das Aminopyridin **20s** zur Reaktion gebracht werden. Bei den verschieden substituierten Aminopyrazolen konnte kein Trend bestimmt werden, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Allerdings konnten die Aminopyrazole **20v - x** und **20aa** erfolgreich mit vollständigem Umsatz in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Reaktion umgesetzt werden und für eine DEL-Synthese in Betracht gezogen werden.

### 3.2.2.4. Variation des DNA-Aldehyd-Konjugates in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

Die dritte Komponente der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion ist der Aldehyd. Um über die Povarov-Reaktion ein exponentielles Wachstum der Molekülanzahl für den Aufbau einer DEL zu ermöglichen, müssen im ersten Synthesesyklus verschiedene Aldehyde an die DNA gekoppelt werden. Diese werden in dem nächsten Synthesesyklus mit einem möglichst hohen Umsatz in der Povarov-Reaktion mit verschiedenen Anilinen kombiniert. Um die Reaktivität der Aldehyde zu testen, wurden fünf Carbonsäure-funktionalisierte Aldehyde **64b - f** über eine Amidsynthese an eine C6-Aminolinker-modifizierte DNA gebunden (siehe **Anhang Abbildung 59**). Diese DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-1b - f** wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt und anschließend mit 4-*tert*-Butylanilin **20b**, *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** und Copolymer **P2-EA-a** bei 40 °C über Nacht geschüttelt (siehe **Tabelle 3**).

**Tabelle 3:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion durch Einsatz verschiedener DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-1b - f**.<sup>a</sup>



Eintrag	DNA-Aldehyd-Konjugat	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	<b>DNA-1b</b> 	<b>DNA-2ag</b>	> 90	4871,5 4870,9
2	<b>DNA-1c</b> 	<b>DNA-2ah</b>	25	4964,8 4964,3
3	<b>DNA-1d</b> 	<b>DNA-2ai</b>	> 90	4894,7 4894,0
4	<b>DNA-1e</b> 	<b>DNA-2aj</b>	> 90	4915,7 4914,9
5	<b>DNA-1f</b> 	<b>DNA-2ak</b>	20	4908,7 4908,9

<sup>a</sup> Das DNA-Aldehyd-Konjugat (500 pmol) wurde mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** (8000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol-**21d** (8000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und 5 Vol-% EtOAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen.



Die erhaltenen Produkte wurden mit der analytischen HPLC und der MALDI-MS (siehe **Anhang Abbildung 66**) analysiert. Folgende Carbonsäure-funktionalisierten Aldehyde wurden in der Povarov-Reaktion getestet: zwei unterschiedlich substituierte Benzaldehyde (siehe **Tabelle 3**, Eintrag 1, 4), zwei Indol- (siehe **Tabelle 3**, Eintrag 3, 5) und ein Pyrrol-Strukturmotiv (siehe **Tabelle 3**, Eintrag 2).

Bei der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit den Benzaldehyden **DNA-1b** und **DNA-1e** konnte ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt beobachtet werden (siehe **Tabelle 3**, Eintrag 1, 4). Lediglich bei der Reaktion mit dem DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1e** konnten Spuren des oxidierten Startmaterials in der MALDI-MS detektiert werden. Bei der Reaktion mit den Aldehyd-funktionalisierten Indolen konnte mit **DNA-1d** ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt bestimmt werden, wohingegen die Reaktion mit **DNA-1f** nur zu etwa 20 % zu dem gewünschten Produkt ablief (siehe **Tabelle 3**, Eintrag 3, 5). Bei dieser Reaktion konnte noch das Startmaterial **DNA-1f**, sowie ein nicht-identifiziertes Nebenprodukt mit einer Masse von 4751,4 g/mol detektiert werden. Der Unterschied der beiden Indole liegt ausschließlich in der Methylgruppe an Position 2, welche scheinbar eine große Auswirkung auf die Reaktivität des Aldehydes ausübt. Das DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1c** mit dem Pyrrol-Strukturmotiv lieferte das gewünschte Produkt zu etwas 25 %. Hierbei konnte in der MALDI-MS kein Startmaterial **DNA-1c**, sondern ein starkes Signal für das oxidierte Startmaterial mit einer Masse von 4678,6 g/mol beobachtet werden. Daraus folgt, dass der für die Reaktion benötigte Aldehyd nicht mehr vorliegt und somit die Copolymer **P2-EA-a**-vermittelte Povarov-Reaktion nicht weiter ablaufen konnte. Diese Oxidation konnte allerdings schon nach der Abspaltung des DNA-Aldehyd-Konjugates von der festen Phase und auch nach der präparativen HPLC-Aufreinigung beobachtet werden, weshalb auch hier von einem vollständigen Umsatz des Aldehydes ausgegangen werden kann.

Insgesamt konnte die Copolymer **P2-EA-a**-vermittelte Povarov-Reaktion unter Verwendung von *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** mit vielen verschiedenen substituierten Anilinen und auch einigen Aminopyrazolen, sowie auch auf verschiedenen DNA-Aldehyd-Konjugaten, inklusive Indol- und Pyrrol-Strukturmotiv, erfolgreich durchgeführt werden. Somit ist die Reaktion für eine DEL-Synthese geeignet, da sie ein breites Spektrum an Reaktanden abdeckt und mit hohen Ausbeuten und geringen Nebenprodukten abläuft. Um anschließend einen weiteren Syntheszyklus durchführen zu können, wurde nachfolgend die Boc-Entschützung mit Hilfe verschiedener Copolymere untersucht.

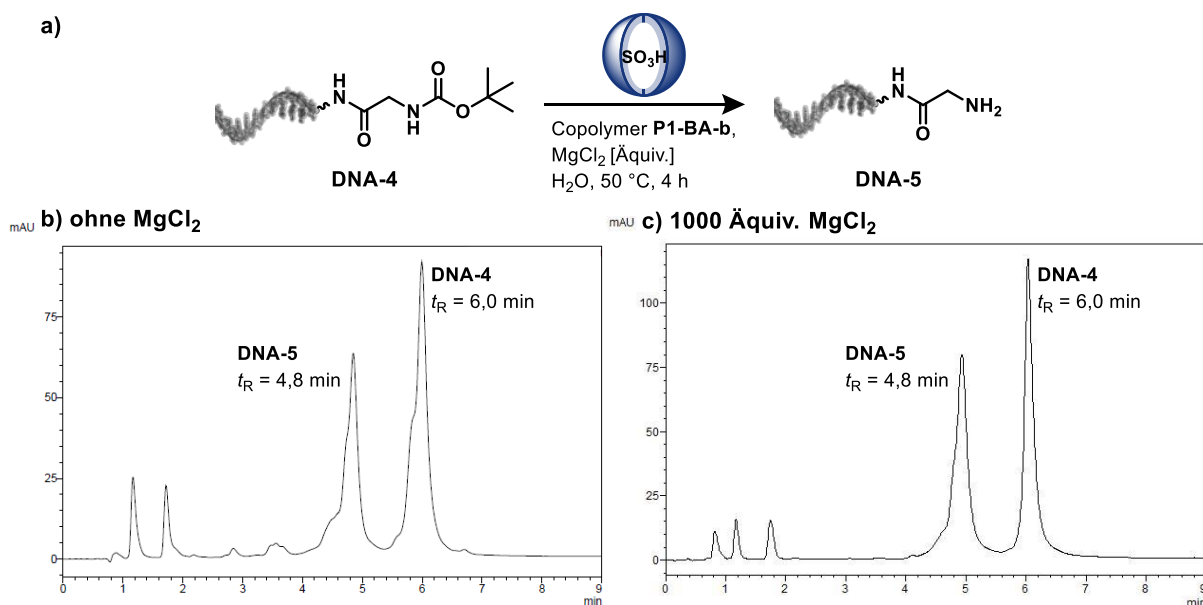
### 3.3 Copolymer-vermittelte Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe

Ein *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Substituent wird an freie Amine eingeführt, um diese vor einer ungewollten Reaktion zu schützen und wird häufig für den Aufbau von Peptiden in der Festphasensynthese eingesetzt. Ein freies Amin kann mit Di-*tert*-butyldicarbonat in einer Basen-katalysierten Reaktion geschützt und in einer Säure-katalysierten Reaktion wieder entschützt werden. Die Verwendung von Schutzgruppen während einer DEL-Synthese ist wichtig, um nach Abspaltung eine neue funktionelle Gruppe für den nächsten Syntheseschritt zu erhalten und somit den nächsten Molekülbaustein einbringen zu können. Aus diesem Grund wurde in einer vorausgegangenen Masterarbeit mit der Etablierung der Boc-Entschützung auf einem DNA-Konjugat unter Verwendung eines amphiphilen Blockcopolymers mit immobilisierter Sulfonsäure begonnen.

#### 3.3.1. Vorausgegangene Experimente<sup>[164]</sup>

Für die Etablierung der Abspaltung einer *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe wurde ein mit Boc-geschütztes Glycin **65a** über eine Amidsynthese an eine C6-Aminolinker modifizierte 14mer-DNA gebunden und das DNA-Konjugat **DNA-4** erhalten (**Anhang Abbildung 67**).

Die **DNA-4** wurde anschließend mit dem zuvor beschriebenen Blockcopolymer **P1-BA-b** mit verschiedenen Konzentrationen, Äquivalenten und Reaktionszeiten bei 50 °C inkubiert (siehe **Abbildung 28a**).



**Abbildung 28:** Boc-Entschützung von DNA-Konjugat **DNA-4** mit dem Blockcopolymer **P1-BA-b** in Wasser mit und ohne MgCl<sub>2</sub>.

a) Reaktionsschema der Boc-Entschützung. b) HPLC-Chromatogramm der Boc-Entschützung von DNA-Konjugat **DNA-4** (500 pmol) mit Copolymer **P1-BA-b** (12,5 Äquiv.,  $c = 0,5 \text{ mM}$ ) bei 50 °C, 4 h in Wasser; a) HPLC-Chromatogramm der Boc-Entschützung von DNA-Konjugat **DNA-4** (500 pmol) mit Copolymer **P1-BA-b** (12,5 Äquiv.,  $c = 1,5 \text{ mM}$ ) und MgCl<sub>2</sub> (1000 Äquiv.) bei 50 °C, 4 h in Wasser.<sup>[164]</sup>

Dabei konnte als bester Kompromiss zwischen Produktbildung und Depurinierung nach vier Stunden Reaktionszeit mit 12,5 Äquivalenten an Copolymer **P1-BA-b** und einer Konzentration von 0,5 mM das Produkt-Konjugat **DNA-5** mit 20 % erhalten werden. In dem HPLC-Chromatogramm konnte aber trotz Verwendung des Copolymers **P1-BA-b** eine starke Depurinierung anhand der Peaks bei 1-2 min und der früher eluierenden Nebenprodukte des Start- und Produkt-Konjugates **DNA-4** und **DNA-5** beobachtet werden (siehe **Abbildung 28b**). Um die DNA zu stabilisieren, wurde die Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  getestet. Dabei konnte mit steigender Konzentration an  $\text{MgCl}_2$  eine Abnahme der Depurinierung, sowie eine gleichzeitige Senkung des Umsatzes zu dem Produkt-Konjugat **DNA-5** beobachtet werden. Mit 1000 Äquivalenten an  $\text{MgCl}_2$  konnte das Produkt-Konjugat **DNA-5** mit 35 % mit einer Depurinierung von 20 % erhalten werden (siehe **Abbildung 28c**).

Die Studien zur Blockcopolymer-vermittelten Boc-Entschützung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fortgeführt.

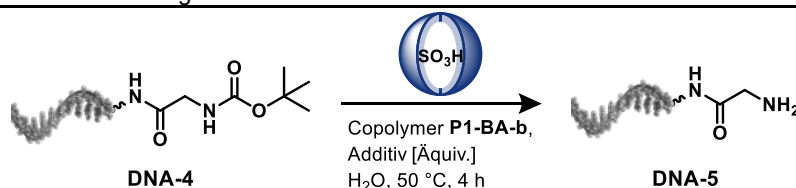
### 3.3.2. Ergebnisse

Die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung eines Glycin-DNA-Konjugats **DNA-4** konnte in der vorausgegangenen Master-Arbeit<sup>[164]</sup> erfolgreich durchgeführt werden und soll nun für eine DEL-Synthese in Betracht gezogen und dafür weiter entwickelt werden. Bisher konnte durch den Einsatz von  $MgCl_2$  die Depurinierung der **DNA-4** auf 20 % gesenkt werden und das entschützte Glycin **DNA-5** zu 35 % erhalten werden.<sup>[164]</sup> Allerdings wurde durch den  $MgCl_2$ -Zusatz auch die Entschützung gehemmt, weshalb in dieser Arbeit dieses Additiv variiert wurde. Auch wurden verschiedene Copolymere verwendet, um den Einfluss der Copolymer-Struktur auf die Boc-Entschützung zu analysieren. Alle Optimierungen wurden mit **DNA-4** durchgeführt.

#### 3.3.2.1. Variation des Additivs auf die Copolymer P1-BA-b-vermittelte Boc-Entschützung

Bei den in der vorausgegangenen Arbeit durchgeführten Experimenten konnte ohne die Verwendung eines Additivs das Boc-entschützte Produkt **DNA-5** mit etwa 20 % gebildet werden. Allerdings wurde hierbei eine Depurinierung von etwa 50 % festgestellt. Es ist bekannt, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der DNA ausübt. Dabei steigt die Schmelztemperatur der DNA mit zunehmender  $Mg^{2+}$ -Ionen-Konzentration an. Dies soll durch die Abnahme der elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ-geladenen Phosphatgruppen nach Bindung der positiv-geladenen Mg-Ionen hervorgerufen werden.<sup>[172-174]</sup> Dieser Effekt wurde sich in der vorausgegangenen Arbeit zu Nutze gemacht und es konnte mit härteren Reaktionsbedingungen und nach Zugabe von 1000 Äquivalenten das Produkt-Konjugat **DNA-5** mit 35 % und einer Depurinierung von 20 % erhalten werden. Die DNA war somit nach Zugabe des Additivs stabiler, allerdings wurde auch die Produktbildung reduziert. Daher sollte nun ein anderes Additiv gefunden werden, das die Stabilität der DNA erhöht und gleichzeitig die Produktbildung fördert. Dafür wurde die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion aus **Kapitel 3.2** näher betrachtet. Bei dieser Reaktion konnte keine Depurinierung der DNA beobachtet werden, obwohl gleiche Mengen an Copolymer **P1-BA-b** und auch erhöhte Temperaturen für längere Zeit verwendet wurden. Dies könnte auf die Verwendung von Anilinen bei der Reaktion zurückzuführen sein. Aniline sind schwache Basen und könnten somit die Stärke der immobilisierten Sulfonsäure abschwächen. Diese puffernde Wirkung sollte nun auch in der Copolymer **P1-BA-b**-vermittelten Boc-Entschützung getestet werden (siehe **Tabelle 4**).

Dazu wurde die **DNA-4** mit Copolymer **P1-BA-b** mit variierten Äquivalenten und 4-*tert*-Butylanilin **20b** oder  $MgCl_2$  für vier Stunden bei 50 °C inkubiert. Die erhaltenen Produkte wurden mit der analytischen HPLC (siehe **Anhang Abbildung 68, 69**) und der MALDI-MS analysiert.

**Tabelle 4:** Untersuchung des Einflusses des Additives auf die Produktbildung und Degradierung der Copolymer **P1-BA-b**-vermittelten Boc-Entschützung der **DNA-4**.


Eintrag	Copolymer [Äquiv.]	Additiv	Additiv [Äquiv.]	Umsatz [%] <sup>b</sup>	Depurinierung [%] <sup>c</sup>
1	25	-	-	20	45
2	25	4- <i>tert</i> -Butylanilin <b>20b</b>	25	20	20
3	25	MgCl <sub>2</sub>	1000	30	< 10
4	50	-	-	20	50
5	50	4- <i>tert</i> -Butylanilin <b>20b</b>	50	20	20
6	50	MgCl <sub>2</sub>	1000	10	< 10

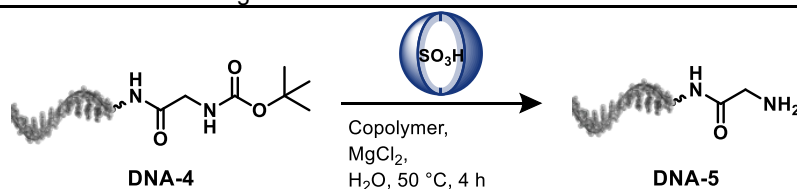
<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-4** (500 pmol) wurde mit Additiv und Copolymer **P1-BA-b** (0,5 mM) in Wasser bei 50 °C für 4 h geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) bestimmt. <sup>c</sup> Die Degradierung wurde mit Hilfe der Fläche der früher eluierenden Nebenprodukte und der Fläche der Signale zwischen  $t_R = 1 - 2$  min im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) bestimmt.

Das Copolymer **P1-BA-b**, sowie auch 4-*tert*-Butylanilin **20b**, wurden mit jeweils 25 (siehe **Tabelle 4**, Eintrag 1 - 3) und 50 Äquivalenten (siehe **Tabelle 4**, Eintrag 4 - 6) verwendet. Die Konzentration des Copolymers wurde dabei konstant gehalten. Die Ergebnisse zeigten, dass die Verwendung eines Additives die Bildung des Produktes nicht erhöht. So wurde mit und ohne Additiv das Produkt **DNA-5** zu etwa 20 % gebildet. Allerdings konnte die Depurinierung deutlich reduziert werden. So lag die DNA-Zerstörung ohne Additiv bei 45 % (siehe **Tabelle 4**, Eintrag 1) und konnte mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** auf 20 % reduziert werden (siehe **Tabelle 4**, Eintrag 2). Durch die Verwendung von MgCl<sub>2</sub> konnte sogar eine Depurinierung der DNA von unter 10 % erreicht werden (siehe **Tabelle 4**, Eintrag 3). Dabei hatte die Variation der Äquivalente keinen Einfluss auf die Produktbildung und Depurinierung (siehe **Tabelle 4**, Eintrag 4 - 6). Daraus folgt, dass 4-*tert*-Butylanilin **20b** als Additiv in der Boc-Entschützung eingesetzt werden kann, was die DNA-Zerstörung reduziert. Allerdings war der puffernde Effekt nicht stark genug, sodass weiterhin Depurinierungsprodukte beobachtet wurden. Im Vergleich dazu erwies sich MgCl<sub>2</sub> als besseres Additiv für die Boc-Entschützung.

### 3.3.2.2. Variation der Copolymer-Struktur auf die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung

Da die Verwendung von 4-*tert*-Butylanilin **20b** als Additiv keine Verbesserung der Produktbildung und Depurinierung in der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung geliefert hatte, wurde nun der Einfluss von unterschiedlichen Copolymer-Strukturen untersucht. Es wurden zwei Copolymere mit einer immobilisierten Sulfonsäure im Kern (**P1-BA-a/b**), sowie fünf Copolymere mit einer immobilisierten Sulfonsäure in der Hülle (**P2-EA-a-d** und **P2-BA**) eingesetzt. Diese Copolymere wurden jeweils mit 25 und 50 Äquivalenten verwendet. Die Konzentration des Copolymers wurde dabei konstant gehalten (siehe **Tabelle 5**). Die erhaltenen Produkte wurden mit der analytischen HPLC (siehe **Anhang Abbildung 70**) und der MALDI-MS analysiert.

**Tabelle 5:** Untersuchung des Einflusses der Copolymer-Struktur auf die Produktbildung und Depurinierung der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung der **DNA-4**.



Eintrag	Copolymer	Copolymer [Äquiv.]	Umsatz [%] <sup>b</sup>	Depurinierung [%] <sup>c</sup>
1	<b>P1-BA-a</b>	25	20	< 10
2		50	25	< 10
3	<b>P1-BA-b</b>	25	30	< 10
4		50	10	< 10
5	<b>P2-EA-a</b>	25	25	< 10
6		50	25	< 10
7	<b>P2-EA-b</b>	25	40	20
8		50	35	15
9	<b>P2-EA-c</b>	25	45	< 10
10		50	35	10
11	<b>P2-EA-d</b>	25	50	< 10
12		50	40	10
13	<b>P2-BA</b>	25	20	< 10
14		50	20	< 10

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-4** (500 pmol) wurde mit MgCl<sub>2</sub> (1000 Äquiv.) und Copolymer (0,5 mM) in Wasser bei 50 °C für 4 h geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) bestimmt. <sup>c</sup> Die Degradierung wurde mit Hilfe der Fläche der früher eluierenden Nebenprodukte und der Fläche der Signale zwischen  $t_R = 1 - 2$  min im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) bestimmt.

Bei Verwendung der Copolymere mit immobilisierter Sulfonsäure im Kern (**P1-BA-a/b**) konnte das entschützte DNA-Amin-Konjugat **DNA-5** zu 20-30 % gebildet und eine Depurinierung von unter 10 % erreicht werden. Der Unterschied der beiden Copolymere bestand in dem Polymerisationsgrad  $dp$  des hydrophoben Monomers. Das Copolymer **P1-BA-a** wies einen größeren hydrophoben Kern auf, als das Copolymer **P1-BA-b**. Ein Trend des unterschiedlichen Polymerisationsgrades auf die Produktbildung konnte nicht festgestellt werden. Bei Copolymer **P1-BA-a** stieg die Produktbildung von 20 % auf 25 % bei Erhöhung der Äquivalente an (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 1, 2). Mit Copolymer **P1-BA-b** konnte das Produkt **DNA-5** zu 30 % erhalten werden. Wobei eine Erhöhung der Äquivalente zu einer Absenkung der Produktbildung auf 10 % führte (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 3, 4). Wird die Position der Sulfonsäure im Copolymer verglichen (**P1-BA-a** mit **P2-BA**), so konnte ebenfalls eine Produktbildung von 20 % und eine Depurinierung von unter 10 % erhalten werden (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 13, 14). Hier konnte somit kein Unterschied bei der Position der Sulfonsäure bestimmt werden.

Im Vergleich zu Copolymer **P2-BA** enthielten die Copolymere **P2-EA** Ethylacrylat als hydrophobes Monomer. Dadurch konnte die Polarität des Kerns der Copolymere verändert werden. Insgesamt konnten mit den Copolymer **P2-EA** (mit Ausnahme von **P2-EA-a**) höhere Umsätze zu dem gewünschten Produkt erhalten werden, als mit den Copolymeren **P2-BA**. Daraus folgt, dass ein hydrophilerer Kern der Copolymere die Produktbildung zu fördern scheint.

Anschließend wurde der Polymerisationsgrad  $dp$  dieser Copolymer-Reihe **P2-EA** untersucht. Dabei nahm der hydrophobe Kern mit zunehmender Menge an Ethylacrylat-Monomeren zu (**P2-EA-a < P2-EA-b < P2-EA-c < P2-EA-d**). Bei der Reaktion mit dem Copolymer mit dem kleinsten hydrophoben Kern (**P2-EA-a**) konnte eine Produktbildung von 25 % und einer Depurinierung unter 10 % erhalten werden (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 5). Mit zunehmender Größe des hydrophoben Kerns der Copolymere nahm auch die Bildung des gewünschten Produktes zu (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 5, 7, 9, 11). Dabei konnte mit dem Copolymer mit dem größten hydrophoben Kern (**P2-EA-d**) das Produkt **DNA-5** zu 50 % gebildet werden und dabei blieb die Depurinierung unter 10 % (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 11). Eine Erhöhung der Äquivalente der Copolymere **P2-EA** führte zu einer leichten Abnahme der Umsätze zum gewünschten Produkt, sowie einer leichten Erhöhung der Zerstörung der DNA (siehe **Tabelle 5**, Eintrag 6, 8, 10, 12).

Somit konnte durch Variation der Copolymer-Struktur die Produktbildung auf 50 % gesteigert werden, bei gleichzeitig geringer Depurinierung unter 10 %. Dies konnte durch die Verwendung des Copolymers **P2-EA-d**, welches eine immobilisierte Sulfonsäure in der Hülle und einen großen hydrophoben Kern mit Ethylacrylat enthält, mit 25 Äquivalenten erreicht werden.

### 3.4 Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion

Bei der Pictet-Spengler-Reaktion handelt es sich um eine Säure-katalysierte Kondensationsreaktion eines Aldehydes und einesamins zur Bildung von Alkaloid-Gerüsten, wie z.B.  $\beta$ -Carbolinen. Alkaloide sind eine wichtige Klasse von Naturprodukten, welche von einer großen Vielfalt an Organismen produziert werden und somit in der Natur weit verbreitet vorliegen. Sie weisen ein breites Spektrum an biologischer Aktivität auf und finden somit zahlreiche Anwendungen in der Medizin, wie beispielsweise der zugelassene blutdrucksenkende Wirkstoff Ajmalicin. Daher ist die Synthese dieser Naturstoffe von großem Interesse.<sup>[151]</sup> Die Brønsted-Säure-katalysierte Pictet-Spengler-Reaktion wurde bereits in der *Arbeitsgruppe Brunschweiler* mit Hexathymidin-DNA-Konjugaten (hexT), gebunden an eine feste Phase (CPG), etabliert. Dafür wurde Tryptophan an die DNA gebunden und mit verschiedenen Aldehyden und 2 % TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zu den gewünschten hexT- $\beta$ -Carbolin-Konjugaten umgesetzt.<sup>[92]</sup> Diese Synthese konnte anschließend auch auf einem CPG-gebundenen DNA-Strang erweitert werden, welcher beide Pyrimidin-Basen (Thymin und Cytosin) enthält.<sup>[93]</sup> Einer weitere Variation des DNA-Stranges, gebunden an CPG, hin zu Adenin- (ATC) und Adenin- und Guanin-enthaltender DNA (ATGC) führte zu sehr geringen Ausbeuten und einer starken Degradierung der DNA.<sup>[96]</sup> Erste eine Veränderung der Basen Adenin und Guanin in 7-Deazaadenin und 8-Aza-7-deazaguanin ermöglichten die Säure-katalysierte Pictet-Spengler-Reaktion mit hohen Ausbeuten und geringer Degradierung zu den gewünschten  $\beta$ -Carbolin-Konjugaten.<sup>[98,99]</sup>

In dieser Arbeit sollte nun die Pictet-Spengler-Reaktion mit Hilfe eines Sulfonsäure-immobilisierten Copolymers in Lösung getestet werden. Dafür sollten geeignete Bedingungen etabliert werden, um ein DNA-Konjugat mit einer Variation an Aminen oder Aldehyden mit einem Copolymer zu den gewünschten  $\beta$ -Carbolin-Konjugaten umzusetzen.



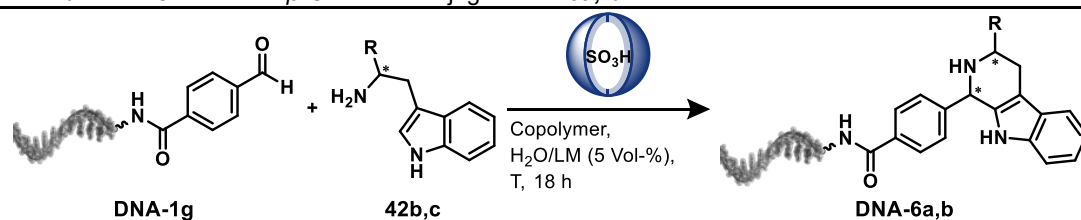
### 3.4.1. Etablierung der Pictet-Spengler-Reaktion auf einem DNA-Aldehyd-Konjugat DNA-1g mit Sulfonsäure-funktionalisierten Copolymeren

Für die Etablierung der Pictet-Spengler-Reaktion wurde ein Carbonsäure-funktionalisierter Aldehyd **64g** über eine Amidsynthese an eine C6-Aminolinker-modifizierte 14 Nucleobasen lange DNA gebunden und mit Hilfe der MALDI-MS auf die Produktidentität und der analytischen HPLC auf Reinheit geprüft (siehe **Anhang Abbildung 71**). Es wurden Tryptamin **42b** und Tryptophanmethylester **42c** (8000 Äquiv.) mit zwei Copolymeren **P1-/P2-BA** in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 mM, 0,25 mM) mit dem DNA-Konjugat **DNA-1g** bei 25 °C und 50 °C über Nacht geschüttelt (siehe **Tabelle 6**). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert und die wässrige Phase verdampft. Nach dieser Aufreinigung wurde eine zweifache ethanolische Fällung durchgeführt, um Überschüsse der Amine zu entfernen. Die Proben konnten trotz der aufwändigen Aufreinigung nur mit Hilfe der MALDI-MS analysiert werden, da Kontaminationen der Amine die HPLC-Chromatographie störten. Daher wurde im Folgenden ein Umsatzbereich ausschließlich anhand der Intensität der Signale der MALDI-MS-Spektren bestimmt (siehe **Anhang Abbildung 72 - 74**).

Bei der Verwendung von Tryptamin **42b** und des Copolymers **P1-BA-a** konnte mit einer Konzentration von 0,5 mM und den Temperaturen 25 °C und 40 °C in den MALDI-MS-Spektren das Startmaterial **DNA-1g** mit einer Masse von 4541,3 g/mol, sowie ein Nebenprodukt mit einer Masse von 4700,4 g/mol beobachtet werden (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 1, 2). Bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C konnte der Umsatz zum Nebenprodukt erhöht werden. Durch eine Erhöhung der Copolymer-Konzentration auf 1 mM konnte nur noch das Startmaterial **DNA-1g** in den MALDI-MS-Spektren detektiert werden. Wurde das Copolymer mit immobilisierter Sulfonsäure in der hydrophilen Hülle (**P2-BA**) verwendet, so konnte nur bei einer Konzentration von 0,5 mM und einer Reaktionstemperatur von 40 °C das Nebenprodukt neben dem Startmaterial **DNA-1g** beobachtet werden (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 5 - 8). Da mit Tryptamin **42b** das gewünschte Produkt nicht erhalten werden konnte, wurde Tryptophanmethylester **42c** mit dem Copolymer **P1-BA-a** bei 40 °C verwendet (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 9). Dabei konnte die gewünschte Masse von 4741,3 g/mol in dem MALDI-MS-Spektrum detektiert werden und es konnte ein Umsatz von 30 - 60 % berechnet werden.

## Etablierung der Pictet-Spengler-Reaktion auf einem DNA-Aldehyd-Konjugat DNA-1g mit Sulfonsäure-funktionalisierten Copolymeren

**Tabelle 6:** Optimierung der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an **DNA-1g** mit zwei verschiedenen Aminen **42b** und **42c** zum DNA- $\beta$ -Carbolin-Konjugat **DNA-6a, b**.<sup>a</sup>



Eintrag	Copolymer	C <sub>Copolymer</sub> [mM]	R	C <sub>Amin</sub> [mM]	T [°C]	Lösungsmittel	Umsatz [%] <sup>b</sup>
1	<b>P1-BA-a</b>	0,5	-H	160	25	EtOAc	n.d.
2		0,5	-H	160	40	EtOAc	n.d.
3		1,0	-H	320	25	EtOAc	n.d.
4		1,0	-H	320	40	EtOAc	n.d.
5	<b>P2-BA</b>	0,5	-H	160	25	EtOAc	n.d.
6		0,5	-H	160	40	EtOAc	n.d.
7		1,0	-H	320	25	EtOAc	n.d.
8		1,0	-H	320	40	EtOAc	n.d.
9	<b>P1-BA-a</b>	0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	EtOAc	30 - 60
10		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	DMF	> 60
11		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 - 60
12		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	MeOH	30 - 60
13		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	THF	30 - 60
14		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	MeCN	30 - 60
15		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	1,2-DCE	n.d.
16		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	1,4-Dioxan	n.d.
17		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	DMSO	> 60
18		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	40	HFIP	< 30
19	<b>P1-BA-a</b>	0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	25	DMSO	n.d.
20		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	160	50	DMSO	30 - 60
21	<b>P1-BA-a</b>	0,5	-COOCH <sub>3</sub>	80	40	DMSO	< 30
22		0,5	-COOCH <sub>3</sub>	80	40	DMAc	< 30

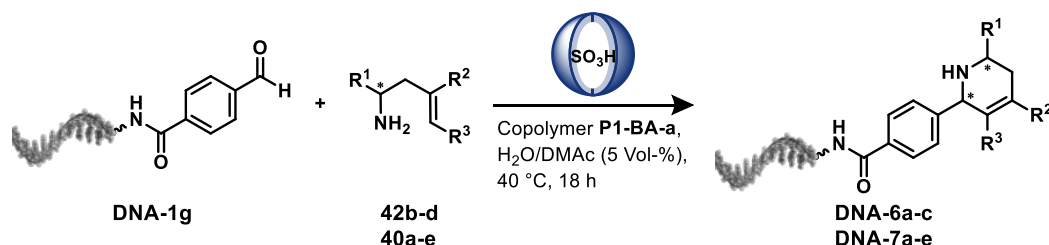
<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-1g** (500 pmol) wurde mit dem Amin (x mM) und Copolymer (x mM) in Wasser und 5 Vol-% Lösungsmittel (LM) bei x°C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Intensität des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im MALDI-MS-Spektrum bestimmt. n.d. = nicht detektiert.

Um den Umsatz in der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion zu steigern, wurde zunächst das Co-Lösungsmittel variiert. Der höchste Umsatz von > 60 % zum gewünschten  $\beta$ -Carbolin-Konjugat **DNA-6b** konnte mit DMF und DMSO als Co-Lösungsmittel erreicht werden (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 10, 17). Mit den Co-Lösungsmitteln 1,2-Dichlorethan und 1,4-Dioxan konnte das gewünschte Produkt nur in Spuren in den MALDI-MS-Spektren nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 15, 16). Mit den restlichen Co-Lösungsmitteln ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH, THF, MeCN und HFIP) konnten moderate bis gute Umsätze von 30 - 60 % der **DNA-6b** bestimmt werden (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 11 - 14, 18). Da das MALDI-MS-Spektrum mit dem Co-Lösungsmittel DMSO weniger Signale von Nebenprodukten aufwies, wurde im Anschluss die Reaktionstemperatur mit DMSO als Co-Lösungsmittel auf 25 °C reduziert und auf 50 °C erhöht (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 19, 20). Bei einer Reaktion bei Raumtemperatur konnte das gewünschte Produkt in dem MALDI-MS-Spektrum nicht detektiert werden, sondern nur das Startmaterial **DNA-1g** wiedergewonnen werden. Durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C konnte das Produkt nur noch zu 30 - 60 % erhalten werden. Dabei konnte eine deutliche Reduzierung der DNA-Menge beobachtet werden, wodurch eine Reaktionstemperatur von 40 °C als optimal angesehen werden konnte. Darauffolgend wurden die Äquivalente des Tryptophanmethylesters **42c** auf 4000 Äquivalente reduziert. Dazu wurde neben dem Co-Lösungsmittel DMSO auch *N,N*-Dimethylacetamid (DMAc) verwendet (siehe **Tabelle 6**, Eintrag 21, 22). Durch die Reduzierung der Äquivalente des Amins **42c** wurde ebenfalls der Umsatz zu dem gewünschten Produkt auf unter 30 % reduziert. Die Reaktion mit dem Co-Lösungsmittel DMAc lieferte ebenfalls einen Umsatz von unter 30 %, wobei die MALDI-MS-Spektren allerdings weniger Nebenprodukt-Signale zeigten, wodurch anschließend DMAc als Co-Lösungsmittel verwendet wurde. Somit wurde das Copolymer **P1-BA-a** mit einer Konzentration von 0,5 mM, 8000 Äquivalente des Amins, sowie DMAc als Co-Lösungsmittel bei 40 °C über Nacht als beste Reaktionsbedingungen für die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion bestimmt.

### 3.4.2. Variation der Amine in der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion

Um die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion in einer DEL anwenden zu können, muss ein breites Reaktandenspektrum vorhanden sein und gute Ausbeuten mit wenigen Nebenprodukten erhalten werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Amin-Komponente variiert. Dazu wurden acht verschiedene Amine mit dem DNA-Konjugat **DNA-1g** und Copolymer **P1-BA-a** bei 40 °C über Nacht in Wasser/DMAc geschüttelt. Es wurden drei verschieden substituierte Tryptamine **42b - d** zur Bildung von DNA- $\beta$ -Carbolin-Konjugaten **DNA-6a - c**, sowie fünf verschieden substituierte Phenylethylamine **40a - e** zur Bildung von DNA-Tetrahydroisochinolin-Konjugaten **DNA-7a - e** getestet (siehe **Tabelle 7**). Die erhaltenen Produkte wurden mit der MALDI-MS analysiert (siehe **Anhang Abbildung 75**).

**Tabelle 7:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P1-BA-a**-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an **DNA-1g** durch Einsatz verschiedener Amine **42b - d** und **40a - e**.<sup>a</sup>



Eintrag	Amin	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	<b>42b</b> 	<b>DNA-6a</b>	n.d.	4683,3 n.d.
2	<b>42c</b> 	<b>DNA-6b</b>	> 60	4741,3 4748,9
3	<b>42d</b> 	<b>DNA-6c</b>	< 30 30 - 60 <sup>d</sup>	4727,3 4728,5
4	<b>40a</b> 	<b>DNA-7a</b>	n.d.	4644,2 n.d.
5	<b>40b</b> 	<b>DNA-7b</b>	n.d.	4662,3 n.d.
6	<b>40c</b> 	<b>DNA-7c</b>	n.d.	4660,2 n.d.
7	<b>40d</b> 	<b>DNA-7d</b>	n.d.	4674,2 n.d.
8	<b>40e</b> 	<b>DNA-7e</b>	n.d.	4704,2 n.d.

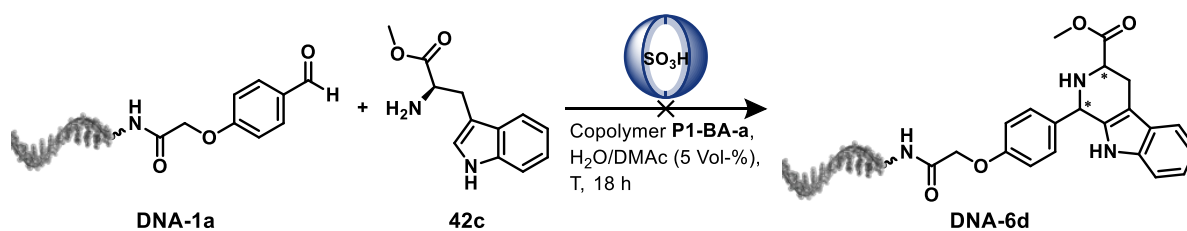
<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-1g** (500 pmol) wurde mit dem Amin (160 mM) und Copolymer **P1-BA-a** (0,5 mM) in Wasser und DMAc (5 Vol-%) bei 40 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Intensität des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im MALDI-MS-Spektrum bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. <sup>d</sup> Nach 4 Tagen Reaktionszeit. n.d. = nicht detektiert.

Mit Tryptamin **42b** konnte, wie bereits oben beschrieben, nur das Startmaterial **DNA-1g** zurückgewonnen werden, sowie ein nicht-identifiziertes Nebenprodukt gebildet werden (siehe **Tabelle 7**, Eintrag 1). Bei der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion mit dem geschützten, sowie auch ungeschützten Tryptophan **42c** und **42d** konnte jeweils das gewünschte Produkt **DNA-6b** und **DNA-6c** detektiert werden (siehe **Tabelle 7**, Eintrag 2, 3). Die Reaktion mit dem Tryptophanmethylester **42c** lieferte das  $\beta$ -Carbolin-Konjugat **DNA-6b** mit über 60 % Umsatz, wohingegen die Reaktion mit dem ungeschützten Tryptophan **42d** das Produkt **DNA-6c** nur zu unter 30 % beobachtet werden konnte. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf vier Tage konnte anschließend ein Umsatz zum gewünschten Produkt mit etwa 30 - 60 % bestimmt werden. Allerdings wurde hierbei auch ein sehr dominantes Signal bei einer Masse von 4681,5 g/mol detektiert, welches dem Produkt-Konjugat nach einer Decarboxylierung entsprechen könnte. Die Verwendung von Phenylethylaminen **40a - e** in der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion führte zu keiner Produktbildung. Weder mit dem nicht-substituierte Phenylethylamin **40a** (siehe **Tabelle 7**, Eintrag 4), noch mit elektronenziehenden (siehe **Tabelle 7**, Eintrag 5, 6) oder -schiebenden Gruppen (siehe **Tabelle 7**, Eintrag 7, 8) konnte das Tetrahydroisochinolin-Konjugat **DNA-7a - e** erhalten werden. Auch nach einer Reaktionszeit von vier Tagen konnte lediglich das Startmaterial detektiert werden.

Insgesamt konnte mit zwei der acht Amine das gewünschte Produkt in der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion erhalten werden und darunter das geschützte Tryptophan mit guten Ausbeuten und geringen Nebenprodukten. Daher wurde im nächsten Schritt das DNA-Startmaterial verändert.

### 3.4.3. Variation des DNA-Startmaterials in der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion

Bei einer Verwendung der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion in einer DEL-Synthese sollten verschiedene Aldehyde, gekoppelt an die DNA, zur Reaktion gebracht werden. Dazu wurde **DNA-1a**-Konjugat mit Tryptophanmethylester **42c** und Copolymer **P1-BA-a** in Wasser und DMAc (5 Vol-%) bei 25 °C, 40 °C und 50 °C über Nacht geschüttelt (siehe **Schema 18**). Die erhaltenen Produkte wurden mit der MALDI-MS analysiert (siehe **Anhang Abbildung 76**).



**Schema 18:** Reaktionsschema der Pictet-Spengler-Reaktion mit dem DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a** und Tryptophanmethylester **42c**.

Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit Tryptophanmethylester **42c** (8000 Äquiv.) und Copolymer **P1-BA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und DMAc (5 Vol-%) bei 24 °C, 40 °C und 50 °C über Nacht geschüttelt.

Leider konnte mit diesem Aldehyd auf der DNA die Copolymer **P1-BA-a**-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion nicht erfolgreich durchgeführt werden. In den MALDI-MS-Spektren konnte lediglich das DNA-Startmaterial **DNA-1a** mit einer Masse von 4571,3 g/mol detektiert werden. Somit konnte die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion nur mit einem Aldehyd auf der DNA und nur mit dem Tryptophanmethylester **42c** mit guten Umsätzen und geringen Nebenprodukten zu dem  $\beta$ -Carbolin-Konjugat **DNA-6b** umgesetzt werden.

Daher wurde anschließend versucht, das Tryptophan an die DNA zu koppeln und die Pictet-Spengler-Reaktion durch Zugabe der Aldehyde durchzuführen. Dazu wurde das Fmoc-geschützte Tryptophan **66a** über eine Amidsynthese an die DNA gebunden und die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten. Das aufgereinigte DNA-Konjugat **DNA-8a** wurde mit der analytischen HPLC auf die Reinheit und mit der MALDI-MS-Analyse auf die Produktidentität überprüft. Die **DNA-8a** wurde nun mit verschiedenen Aldehyden **6a**, **6d - h** und Copolymer **P1-BA-a** in Wasser und DMAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt. Die Produktbildung wurde mit Hilfe der MALDI-MS-Analyse untersucht. Unter den zugegebenen Aldehyden wurden zwei aliphatische Aldehyde (**6d**, **6e**) und vier aromatische Aldehyde (**6a**, **6f - h**) mit elektronenschiebenden und -ziehenden Substituenten verwendet (siehe **Tabelle 8**). Die erhaltenen Produkte wurden mit der MALDI-MS analysiert (siehe **Anhang Abbildung 77**).

**Tabelle 8:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P1-BA-a**-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an **DNA-8a** durch Einsatz verschiedener Aldehyde **6a, 6d - h**.<sup>a</sup>

Eintrag	Aldehyd	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	<b>6d</b> 	<b>DNA-9a</b>	n.d.	4621,3 n.d.
2	<b>6e</b> 	<b>DNA-9b</b>	n.d.	4649,3 n.d.
3	<b>6a</b> 	<b>DNA-9c</b>	n.d.	4683,3 n.d.
4	<b>6f</b> 	<b>DNA-9d</b>	n.d.	4729,4 n.d.
5	<b>6g</b> 	<b>DNA-9e</b>	n.d.	4762,2 n.d.
6	<b>6h</b> 	<b>DNA-9f</b>	n.d.	4717,8 n.d.

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-8a** (500 pmol) wurde mit dem Aldehyd (160 mM) und Copolymer **P1-BA-a** (0,5 mM) in Wasser und DMAc (5 Vol-%) bei 40°C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Intensität des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im MALDI-MS-Spektrum bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. n.d. = nicht detektiert.

Es konnte keiner der Aldehyde in der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion umgesetzt werden. Es konnte lediglich das Startmaterial **DNA-8a** mit einer Masse von 4595,2 g/mol bestimmt werden. Des Weiteren kam es bei diesen Reaktionen zu einer Zerstörung der DNA. Es konnte deutlich die Masse des DNA-Startmaterials **DNA-8a** nach Abzug einer Nukleinbase Adenin (4462,3 g/mol) detektiert werden. Da diese Depurinierung bei der Pictet-Spengler-Reaktion mit dem an die DNA gekoppelten Aldehyd nicht aufgetreten war, könnte dies durch die fehlende puffernde Wirkung des Amins erklärt werden.

Insgesamt konnte die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion nur mit einem DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1g** und nur mit einem Amin **42c** erfolgreich durchgeführt werden, wodurch diese Reaktion nicht für eine DEL-Synthese geeignet ist.

### 3.5 Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung

Da die Anwendbarkeit der Copolymer-vermittelten Reaktionen nicht nur auf Säure-vermittelte Reaktionen beschränkt bleiben sollte, sollte das Spektrum Copolymer-vermittelter DNA-markierter Chemie auf die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung erweitert werden. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Übergangsmetall-katalysierte C-C-Bindungsbildungsreaktion mit einer Organoboran-Verbindung und einem Halogenaromaten. Sie spielt aufgrund des breiten Reaktandenspektrums und ihrer Robustheit eine prominente Rolle in der medizinischen Chemie, zum Beispiel bei der Synthese von Narciclasin, einem Anti-Tumor Alkaloid.<sup>[175]</sup> Aus diesem Grund findet die Suzuki-Miyaura-Reaktion schon vielfach Anwendung in der DNA-kodierten Chemie.<sup>[162,176–179]</sup> Trotz der oft beschriebenen milden Reaktionsbedingungen dieser Reaktion konnte bestimmt werden, dass Palladium-Ionen die DNA schädigen können.<sup>[95]</sup> Daher sollten geeignete Bedingungen etabliert werden, um ein DNA-gekoppeltes Arylbromid **DNA-10a** mit einer Variation an Boronsäuren **59** mit einem Palladium-modifizierten Copolymer **P3** umzusetzen ohne eine Degradierung der DNA hervorzurufen.

#### 3.5.1. Etablierung der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung auf einem DNA-Arylbromid-Konjugat **DNA-10a** mit Hilfe eines Pd-funktionalisierten Copolymers **P3**

Für die Etablierung der Suzuki-Miyaura-Reaktion wurde eine 4-Brombenzoesäure **15b** über eine Amidsynthese an eine C6-Aminolinker-modifizierte 14 Nucleobasen lange DNA gebunden und mit Hilfe der MALDI-MS auf die Produktidentität und der analytischen HPLC auf Reinheit geprüft (siehe **Abbildung 29a**). Das DNA-gekoppelte Arylbromid **DNA-10a** wurde mit Trifluoromethylboronsäure **59b** oder Phenylboronsäure **59c** (8000 Äquiv.) mit unterschiedlichen Basen (KF, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 250 Äquiv.) und verschiedenen Copolymer **P3**-Konzentrationen (0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM) bei 50 °C über Nacht geschüttelt (siehe **Tabelle 9**). Anschließend wurde eine 1,3,5-Triazin-2,4,6-trithiol Trinatriumsalz-Lösung (TMT-Lösung) verwendet, um das Copolymer **P3** aus der Reaktionslösung zu entfernen. Das TMT hat freie Thiole als funktionelle Gruppe, welche in der Lage sind, Palladium aus Lösungen zu binden und anschließend als dunkler Feststoff auszufallen. Nach dieser Aufreinigung wurde eine ethanolische Fällung durchgeführt, um Überschüsse der Boronsäure zu entfernen. Die aufgereinigte Reaktionsmischung wurden mit Hilfe der MALDI-MS und der analytischen HPLC analysiert (siehe **Anhang Abbildung 79**).



Etablierung der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung auf einem DNA-Arylbromid-Konjugat DNA-10a mit Hilfe eines Pd-funktionalisierten Copolymers P3

**Tabelle 9:** Optimierung der Copolymer **P3**-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion an einem DNA-Arylbromid **DNA-10a** mit zwei verschiedenen Boronsäuren **59b, c** zum DNA-Biphenyl-Konjugat **DNA-11a, b**.<sup>a</sup>

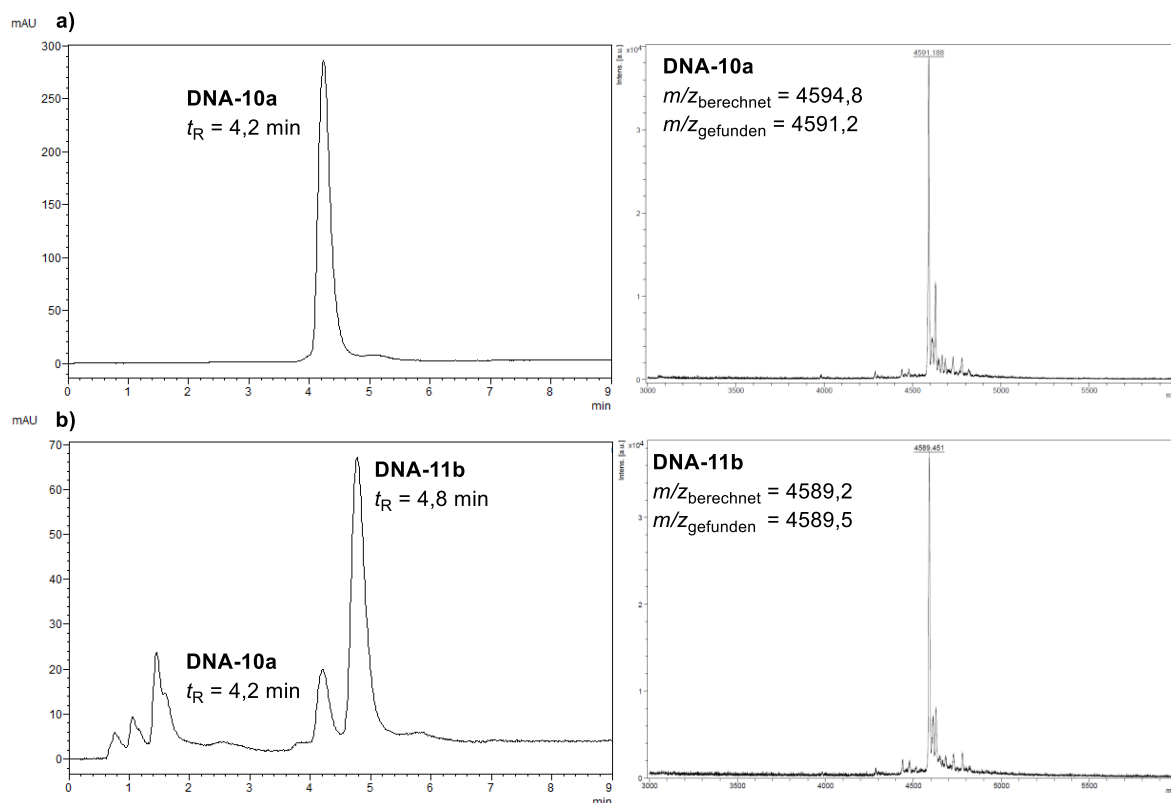
Eintrag	C <sub>Copolymer P3</sub> [mM]	Base	R	Umsatz [%] <sup>b</sup>
1	0,5	KF	-CF <sub>3</sub>	15
2	0,5	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	45
3	0,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	50
4	0,25	KF	-CF <sub>3</sub>	45
5	0,25	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	50
6	0,25	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	50
7	0,125	KF	-CF <sub>3</sub>	25
8	0,125	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	40
9	0,125	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	30
10	-	KF	-CF <sub>3</sub>	n.d.
11	0,25	KF	-H	80
12	0,25	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-H	> 95
13	0,25	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-H	> 95

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-10a** (1 nmol) wurde mit Boronsäure (8000 Äquiv.), Base (250 Äquiv.) und Copolymer **P3** (x mM) in Wasser und EtOAc (5 Vol-%) bei 50 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) bestimmt. n.d. = nicht detektiert.

Mit der Trifluoromethylboronsäure **59b** konnte mit einer Copolymer-Konzentration von 0,125 mM mit allen Basen ein Umsatz zum gewünschten Produkt **DNA-11a** von 25 - 40 % erhalten werden (siehe **Tabelle 9**, Eintrag 7-9). Dies konnte durch eine Erhöhung der Copolymer **P3**-Konzentration auf 0,25 mM auf 45 - 50 % gesteigert werden (siehe **Tabelle 9**, Eintrag 4-6). Dabei konnte in dem HPLC-Chromatogramm als auch in dem MALDI-MS-Spektrum eindeutig das Startmaterial **DNA-10a** ( $t_R = 4,2$  min; 4594,8 g/mol) und das Produkt **DNA-11a** ( $t_R = 5,9$  min; 4660,7 g/mol) der Reaktion mit KF beobachtet werden. In dem MALDI-MS-Spektrum konnten zudem noch Kalium-Addukte detektiert werden. Eine weitere Zunahme der Copolymer-Konzentration führte zu keiner erneuten Umsatzsteigerung zum Produktkonjugat **DNA-11a** (**Tabelle 9**, Eintrag 1-3). Mit der Phenylboronsäure **59c** konnte ein vollständiger Umsatz zum Produktkonjugat **DNA-11b** mit den Basen Cäsiumcarbonat (**Tabelle 9**, Eintrag 12) und Kaliumcarbonat (**Tabelle 9**, Eintrag 13) erhalten werden. Mit Kaliumfluorid konnte ein Umsatz von etwa 80 % erhalten werden (**Tabelle 9**, Eintrag 11, **Abbildung 29b**).

## Etablierung der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung auf einem DNA-Arylbromid-Konjugat DNA-10a mit Hilfe eines Pd-funktionalisierten Copolymers P3

Bei dieser Reaktion konnte das Startmaterial in dem MALDI-MS-Spektrum nicht detektiert werden, da der Massenunterschied zwischen dem Startmaterial **DNA-10a** und dem Produkt-Konjugat **DNA-11b** mit nur 1 g/mol nicht möglich zu detektieren ist. In dem HPLC-Chromatogramm konnte allerdings das Startmaterial **DNA-10a** ( $t_R = 4,2$  min) von dem Produkt **DNA-11b** ( $t_R = 4,8$  min) unterschieden werden. Es wurde zudem eine Kontrollreaktion durchgeführt, in der das Copolymer **P3** nicht zu der Reaktionsmischung zugegeben wurde. Hier konnte kein Umsatz zu dem gewünschten Produkt **DNA-11a** beobachtet werden (Tabelle 9, Eintrag 10).



**Abbildung 29:** HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) a) des Startmaterials **DNA-10a** und b) der Reaktionsmischung Tabelle 9 Eintrag 11 der Copolymer **P3**-vermittelten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung.

Mit allen getesteten Reaktionsbedingungen konnte das Produkt-Konjugat ohne Degradierung der DNA gebildet werden. Als beste Reaktionsbedingung wurde eine Copolymer **P3**-Konzentration von 0,25 mM und die Base Kaliumcarbonat gewählt.

### 3.5.2. Variation der Arylboronsäure in der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung

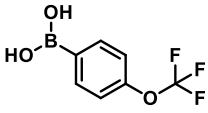
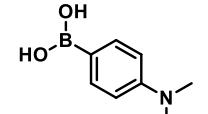
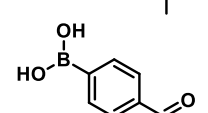
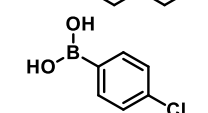
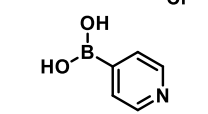
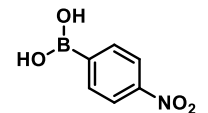
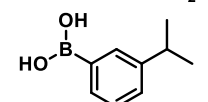
Um die Copolymer **P3**-vermittelte Suzuki-Miyaura-Reaktion in einer DEL-Synthese anwenden zu können, muss das Spektrum der Reaktanden untersucht werden. Dazu wurden 13 verschieden substituierte Arylboronsäuren **59a - m** in der Copolymer **P3**-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion getestet (siehe **Tabelle 10**). Dabei wurden Arylboronsäuren mit Substituenten in *meta*- und *para*-Position, sowie auch disubstituierte Arylboronsäuren und eine 4-Pyridinylboronsäure getestet. Das DNA-Arylbromid-Konjugat **DNA-10a** wurde mit den verschiedenen Boronsäuren, dem Copolymer **P3** und Kaliumcarbonat über Nacht bei 50 °C geschüttelt. Dabei wurden die in dem vorherigen Kapitel optimierten Reaktionsbedingungen von Reaktion Eintrag 13 verwendet (siehe **Tabelle 9**). Anschließend wurden die Reaktionsmischung, wie in **Kapitel 3.5.1** beschrieben, aufgereinigt und mit der analytischen HPLC und der MALDI-MS (siehe **Anhang Abbildung 80**) analysiert.

**Tabelle 10:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P3**-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion an **DNA-10a** durch Einsatz verschiedener Boronsäuren **59a - m**.<sup>a</sup>

DNA-10a + 59a-m  $\xrightarrow[\text{Copolymer P3, K}_2\text{CO}_3, \text{H}_2\text{O/EtOAc (5 Vol-\%), 50\text{ }^\circ\text{C, 18 h}]{\text{Pd}}$  DNA-11a-m

Eintrag	Boronsäure	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z_{\text{berechnet}}$ $m/z_{\text{gefunden}}$ <sup>c</sup>
1	<b>59c</b> 	<b>DNA-11b</b>	> 90	4589,2 4590,7
2	<b>59b</b> 	<b>DNA-11a</b>	50	4657,2 4658,2
3	<b>59d</b> 	<b>DNA-11c</b>	15	4614,2 4613,2
4	<b>59e</b> 	<b>DNA-11d</b>	> 90	4617,3 4618,2
5	<b>59f</b> 	<b>DNA-11e</b>	> 90	4603,3 4604,2
6	<b>59g</b> 	<b>DNA-11f</b>	< 10	4667,3 4667,3

Fortsetzung Tabelle 10

7	59h		DNA-11g	70	4673,2 4673,6
8	59i		DNA-11h	15	4632,3 4633,2
9	59j		DNA-11i	30	4617,2 4616,7
10	59a		DNA-11j	85	4623,7 4622,2
11	59k		DNA-11k	> 90	4590,2 4590,9
12	59l		DNA-11l	n.d.	4634,2 n.d.
13	59m		DNA-11m	> 90	4631,3 4631,1

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-10a** (1 nmol) wurde mit Boronsäure (8000 Äquiv.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (250 Äquiv.) und Copolymer **P3** (0,25 mM) in Wasser und EtOAc (5 Vol-%) bei 50 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. n.d. = nicht detektiert.

Zu keinem oder nur sehr geringem Umsatz kam es bei den Boronsäuren **59g** und **59l** (siehe **Tabelle 10**, Eintrag 6, 12). Beide Arylboronsäuren haben einen elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position. Diese sind somit weniger nukleophil und die Transmetallierung erfolgt langsamer als bei elektronen-neutralen oder -reichen Arylboronsäuren. Elektronenarme Arylboronsäuren sind ebenfalls anfälliger für Homokupplungen, sowie Protodeboronierungen.<sup>[180–182]</sup> Dieser Effekt konnte ebenfalls bei den Arylboronsäuren Eintrag **59b**, **59d**, **59i** und **59j** beobachtet werden (siehe **Tabelle 10**, Eintrag 2, 3, 8, 9). Dort konnte eine Produktbildung von 15 – 50 % bestimmt werden. Dem entgegen steht allerdings die 4-Chlorophenylboronsäure **59a**, für welche ein Produktumsatz von 85 % erhalten werden konnte (siehe **Tabelle 10**, Eintrag 10). Für Boronsäuren mit elektronenschiebenden Gruppen, wie z.B. Methyl- (**59f**), Dimethyl- (**59e**) und Isopropyl- (**59m**), konnte jeweils ein vollständiger Umsatz zum gewünschten Produktkonjugat beobachtet werden (siehe **Tabelle 10**, Eintrag 4, 5, 13). Dabei spielte die Position des Substituenten (*para* und *meta*), sowie die Anzahl der Substituenten keine Rolle bei der Produktbildung. Die 4-(Trifluoromethoxy)phenylboronsäure **59h** mit einem Trifluoromethoxy-Substituenten in *para*-Position konnte das Produkt zu etwa 70 % bilden (siehe **Tabelle 10**, Eintrag 7). Dies könnte an der etwas abgeschwächten elektronenschiebenden Gruppe liegen.

Mit der heterozyklischen Boronsäure 4-Pyridinylboronsäure **59k** konnte ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt detektiert werden (siehe **Tabelle 10**, Eintrag 11).

Insgesamt konnte die Copolymer **P3**-vermittelte Suzuki-Miyaura-Reaktion unter Verwendung des DNA-Arylbromid-Konjugats **DNA-10a** mit vielen verschiedenen substituierten Arylboronsäuren ohne sichtbare Degradierung des DNA-Stranges erfolgreich durchgeführt werden. Es konnten vollständige Umsätze mit allen elektronenreichen Arylboronsäuren erhalten werden, sowie auch moderate bis gute Umsätze mit einigen elektronenarmen Arylboronsäuren.

Somit ist die Reaktion für eine DEL-Synthese geeignet, da sie ein breites Spektrum an Reaktanden abdeckt und mit hohen Ausbeuten und geringen Nebenprodukten abläuft.

## 4. Aufreinigung von DNA-Konjugaten

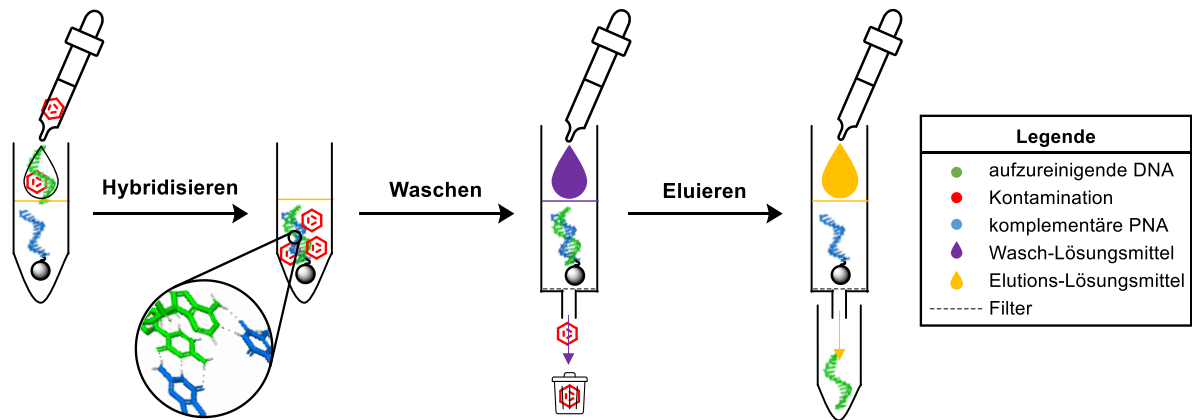
Um DNA-Konjugate in Lösung für die Reaktionsoptimierung oder eine DEL-Synthese aufzureinigen gibt es verschiedene Methoden, beruhend auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der DNA-Konjugate und der Kontaminationen. Weit verbreitete Methoden zur DNA-Aufreinigung sind die ethanolische Fällung, die Ionenpaar-, sowie die Ionenaustausch-Chromatographie.<sup>[100,101,105,183,184]</sup> Einige dieser Aufreinigungen wurden bereits in den vorherigen Kapiteln für die Etablierung von Copolymer-vermittelten Reaktionen angewendet (siehe **Kapitel 3**). Dabei konnte oft beobachtet werden, dass die verschiedenen Aufreinigungen nicht alle Kontaminationen entfernen konnten. Bei der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion konnten einige Aniline nicht durch die Extraktion mit EtOAc entfernt werden. Im Falle der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung wurden die Proben durch die durchgeführte ethanolische Fällung mit Salzen verunreinigt, welches anhand der MALDI-MS-Spektren beobachtet werden konnte. Des Weiteren waren die Proben der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion nach einer Extraktion mit EtOAc und ethanolischer Fällung noch zu verunreinigt, um diese mittels HPLC analysieren zu können. All diese Kontaminationen führen in einer DEL-Synthese zu sehr unreinen Proben, wodurch eventuell falsch-positive *Hits* erhalten werden. Die Aufreinigungsmethode ist somit ein zentrales Element für die Etablierung von neuen Reaktionen und für die Anwendung in DNA-kodierten Bibliotheken. Eine Aufreinigungsmethode für DNA-kodierte Substanzen sollte möglichst 1) unterschiedlich polare Reagenzien entfernen, 2) in einer hohen Wiedergewinnung resultieren, 3) keine Kontaminationen durch Salze oder Elutionsmittel verursachen, 4) auf viele DEL-Kodierstrategien anwendbar sein und 5) einfach und parallel zu handhaben sein. Für die Entwicklung einer neuen Aufreinigungsmethode für DNA-kodierte Substanzen sollten viele dieser genannten Eigenschaften zutreffen.

### 4.1 Design der Affinitäts-Aufreinigung von DNA-Konjugaten

Um eine neue Aufreinigungsmethode zu etablieren, wurde sich an der DNA-Chemie-Etablierung auf fester Phase (CPG) der *Arbeitsgruppe Brunschweiler*<sup>[95-99]</sup>, sowie an der Affinitäts-Aufreinigung von mRNA von *Gagnon et al.*<sup>[185-188]</sup> orientiert.

Der Vorteil der Chemie-Entwicklung auf einer festen Phase besteht durch das effiziente Auswaschen der meisten Kontaminationen über einen Filter. Das synthetisierte DNA-Produkt bleibt an der festen Phase gebunden auf dem Filter und überschüssige Reagenzien können entfernt werden. Dabei können verschiedene Lösungsmittel eingesetzt werden, um auch unterschiedlich polare und somit unterschiedlich lösliche Kontaminationen zu entfernen.<sup>[98,99]</sup>

Die bereits 1972 beschriebene Affinitäts-Aufreinigung beruht auf der Bindung von Poly-A-reicher mRNA an 18 aufeinanderfolgende Thymin-Basen, welche an eine feste Phase gebunden sind, über Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>[185–188]</sup> Das Waschen erfolgt mit wässrigen Puffer-Lösungen, in denen EDTA, Natriumphosphat und Natriumchlorid enthalten sind, und die Elution der aufgereinigten mRNA mit Hilfe eines Tris-Puffers mit niedriger Ionenstärke. Diese Form der Aufreinigung wurde nun wiederentdeckt für die Verwendung von mRNA in der Gentherapie, als auch für Impfstoffe.<sup>[185–188]</sup>



**Abbildung 30:** Design der Affinitäts-Aufreinigung.

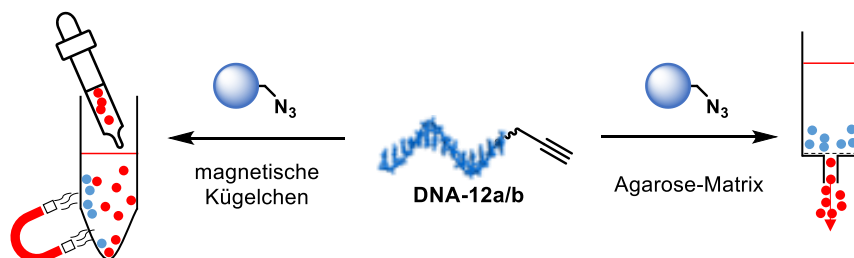
Die aufzureinigende DNA in einer Reaktionsmischung soll zu einer komplementären PNA, gebunden an einer festen Phase, hinzugegeben werden. Die beiden Einzelstränge sollen über die Watson-Crick-Basenpaarung aneinander gebunden werden. Die Kontaminationen sollen durch Waschschrte entfernt werden, wobei die feste Phase zurückgehalten wird (hier: durch einen Filter). Der aufgereinigte DNA-Einzelstrang soll durch ein Elutionsmittel von der festen Phase abgetrennt werden.

Angelehnt an diese beiden Aufreinigungsmethoden wurde eine neue Aufreinigung von DNA für die DEL-Synthese basierend auf den Prinzipien einer dispersen Festphasenextraktion (DSPE, *disperse solid phase extraction*) entwickelt (siehe **Abbildung 30**). Dies stellt eine spezielle Form der Festphasenextraktion dar, wobei die feste Phase nicht stationär fixiert, sondern in der Lösung dispergiert vorliegt. Dabei sollte ein PNA-Einzelstrang an eine feste Phase (Matrix) gebunden werden, um anschließend eine komplementäre DNA-Sequenz über die Watson-Crick-Basenpaarung zu binden. Da die PNA-DNA-Interaktion stärker ist, als eine DNA-DNA-Interaktion, sollte ein nachfolgendes Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln ermöglicht werden, um möglichst viele Kontaminationen mit unterschiedlichen Löslichkeiten zu entfernen.<sup>[189]</sup> Abschließend sollte die aufgereinigte DNA-Sequenz von der PNA gelöst werden und für die nächste Reaktion in einem DEL-Zyklus zur Verfügung stehen. Da eine PNA-Sequenz im Vergleich zu einer DNA-Sequenz teurer ist, wurde die Etablierung und Optimierung dieses Aufreinigungsprozesses zu Beginn mit einer 14mer-DNA-Sequenz auf der festen Phase durchgeführt. In den folgenden Abschnitten wird näher auf die einzelnen Aufreinigungsschritte, wie die Matrix-Auswahl und -Vorbereitung, das Hybridisieren der zwei DNA-Einzelstränge, das Waschen, sowie das Eluieren des aufgereinigten DNA-Einzelstranges, eingegangen.

Dazu wurden zu Beginn unterschiedliche Trägermaterialien getestet. Anschließend wurde die Stabilität der DNA-DNA-Bindung untersucht, um geeignete Lösungsmittel zum Auswaschen der Kontaminationen zu finden. Für die Elution wurden verschiedene Bedingungen und Elutionsmittel analysiert, um eine möglichst reine DNA und eine möglichst hohe Wiedergewinnung zu erhalten. Die optimierten Bedingungen der Aufreinigung wurden anschließend für verschieden lange DNA-Sequenzen, eine Amidsynthese und eine Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion angewendet.

## 4.2 Untersuchung verschiedener Trägermaterialien für die Affinitäts-Aufreinigung

In einer ersten Testreihe wurden zwei verschiedene Trägermaterialien zur Immobilisierung eines gelösten DNA-Stranges näher betrachtet. Hierfür wurden eine Agarose-Matrix und magnetische Kügelchen miteinander verglichen, die über unterschiedliche Trennmethoden, wie über einen Filter oder einen Magneten, die Separation der flüssigen Phase von der festen Phase ermöglichten (siehe **Abbildung 31**). Beide feste Phasen waren mit einer Azid-Gruppe auf der Oberfläche funktionalisiert, welches für die kovalente Bindung eines DNA-Einzelstranges genutzt werden kann. Hierfür wurde ein 14mer DNA-Einzelstrang **DNA-12a** (5'-GAA TTC GGC AAG AC-3') mit einer Alkin-Modifikation am 5'-Ende über eine Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC, *copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*) an die Matrix gebunden.

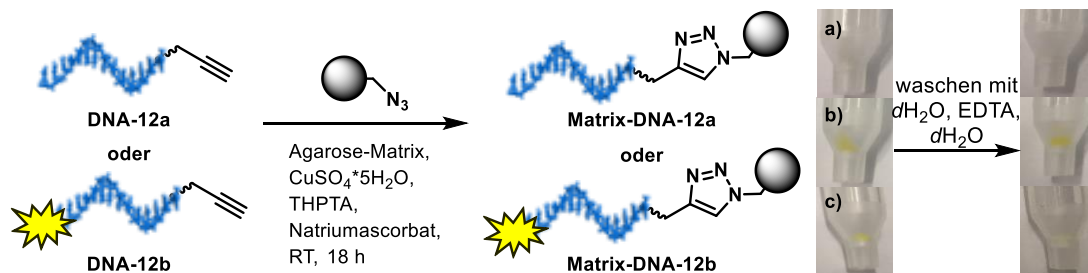


**Abbildung 31:** Vergleich der unterschiedlichen Trennmethoden der Trägermaterialien. Die magnetischen Kügelchen (links) können mit einem Magneten von der Lösung (rot) abgetrennt werden. Die Agarose-Matrix (rechts) kann durch eine Filtration von der Lösung (rot) abgetrennt werden.

In einem Reaktionsansatz wurde die Matrix als Feststoff vorgelegt, die **DNA-12a** zugegeben und die homogen gelösten Reagenzien,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , THPTA und Natriumascorbat, zu der **Matrix-DNA-12a**-Mischung hinzugefügt. Dabei wurde ein Verhältnis von **DNA-12a** zu der Azid-Funktionalität bei der Agarose-Matrix von 1:150 und bei den magnetischen Kügelchen von 1:100 gewählt. Im Anschluss wurden die magnetischen Kügelchen durch einen Magneten von der Lösung getrennt und die Lösung vorsichtig abpipettiert. Dabei konnte eine Übertragung der magnetischen Kügelchen in den Überstand beobachtet werden, weshalb nachfolgend nur noch die Agarose-Matrix verwendet wurde.



Die Agarose-Matrix wurde in einen Säulenfilter überführt und mit  $dH_2O$ , wässriger EDTA-Lösung (0,1 M) und  $dH_2O$  gewaschen (siehe **Abbildung 32a**). Es wurde EDTA-Lösung als Waschlösung verwendet, um Kupfer-Rückstände der CuAAC-Reaktion zu entfernen. Die zwei Aminogruppen, sowie die vier Carboxylgruppen des EDTAs dienen als Bindungsstellen für Metallionen und können somit stabile, wasserlösliche Chelate bilden, welche durch den nachfolgenden Waschschrift mit Wasser entfernt werden können.<sup>[190]</sup> Die Menge an **DNA-12a**, die nicht an die Matrix gebunden wurde und dementsprechend heruntergewaschen wurde, konnte mit Hilfe der UV-Vis-Absorption nicht bestimmt werden, da die Reagenzien der CuAAC-Reaktion die Messungen störte.

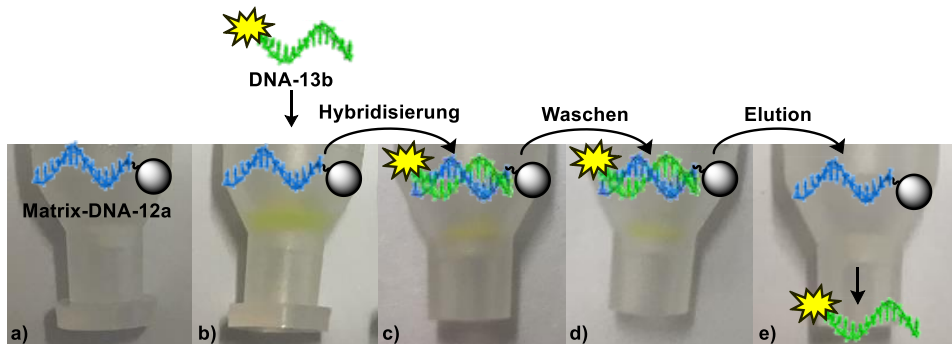


**Abbildung 32:** Herstellung der **Matrix-DNA-12a** und der **Kontroll-Matrix-DNA-12b** über die CuAAC-Reaktion. Bilder der **Matrix-DNA-12a** (a) und **12b** (b) in Filtersäulen nach der CuAAC-Reaktion (linkes Foto) und nach dem Waschen (rechtes Foto) mit Wasser und wässriger EDTA-Lösung (0,1 M) zur Entfernung von Rückständen aus der CuAAC-Reaktion. Die **DNA-12b** wurde mit einem Fluorophor als Prozess-Kontrolle markiert. Ein Kontrollexperiment (c) wurde ohne die Reagenzien  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ /THPTA/Natriumascorbat mit **DNA-12b** durchgeführt, um eine unselektive Bindung der DNA an die Matrix auszuschließen.

Als Prozesskontrolle wurde daher ein DNA-Einzelstrang mit einem Fluorophor am 3'-Ende der **DNA-12b** verwendet und mit Hilfe der CuAAC-Reaktion an die Matrix gebunden. Dabei war die Matrix vor und nach dem Waschen gelb verfärbt, was auf eine erfolgreiche CuAAC-Reaktion und somit eine erfolgreiche Bindung der **DNA-12b** an die Matrix schließen lässt (siehe **Abbildung 32b**). Als Kontrollexperiment wurde die CuAAC-Reaktion mit der Fluorophor-markierten **DNA-12b** ohne  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA und Natriumascorbat durchgeführt. Dabei konnte nach dem Waschen keine gelbe Verfärbung der Matrix beobachtet werden, wodurch eine nicht-spezifische Bindung der **DNA-12b** an die Matrix ausgeschlossen werden konnte (siehe **Abbildung 32c, Anhang Abbildung 82**). Die Affinitäts-Matrix war somit vorbereitet für den Aufreinigungsprozess.

### 4.3 Etablierung des Affinitäts-Aufreinigungs-Verfahrens

Nach der Funktionalisierung der Matrix mit einem DNA-Einzelstrang wurde anschließend die Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Einzelstrang **DNA-13a** (5'-GTC TTG CCG AAT TC-3') getestet. Dafür wurde die **Matrix-DNA-12a** (0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a**) mit einer Fluorophor-markierten **DNA-13b** (500 pmol) und einem Puffer (TRIS (10 mM), EDTA (1 mM), NaCl (50 mM)) zusammengegeben und auf 95 °C erhitzt, für 2 min. gehalten und anschließend langsam wieder abgekühlt (siehe **Abbildung 33b, c**). Die beiden Einzelstränge sollten über die Watson-Crick Basenpaarung einen Doppelstrang bilden und somit den komplementären DNA-Strang **DNA-13b** an die **Matrix-DNA-12a** binden.

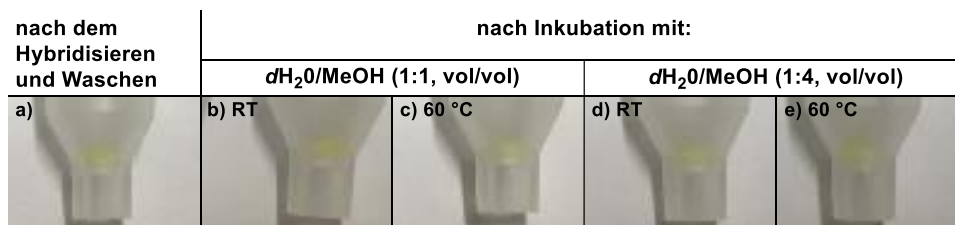


**Abbildung 33:** Bilder der **Matrix-DNA-12a** in Filtersäulen (a) nach dem Hybridisieren von **DNA-13b** (b, c), dem Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln (d) und der Elution von **DNA-13b** mit wässriger NaOH-Lösung (e). Die **DNA-13b** wurde mit einem Fluorophor als prozessbegleitende Kontrolle markiert.

Anschließend wurde das Gemisch auf einen Säulenfilter übertragen und mit verschiedenen Lösungsmitteln über einen Vakuumverteiler gewaschen, um Kontaminationen zu entfernen (siehe **Abbildung 33d**). Es wurde zuerst jeweils dreimal mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M) und erneut  $dH_2O$  gespült. Dabei konnte stets eine gelbe Färbung der Matrix von dem mit einem Fluorophor-markierten hybridisierten DNA-Strang **DNA-13b** beobachtet werden. Darauf folgend wurde mit organischen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polaritäten (DMF, MeOH, MeCN und  $CH_2Cl_2$ ) gewaschen, da dieser Aufreinigungsprozess für möglichst viele verschiedenen Reaktionen mit unterschiedlichen Reagenzien mit unterschiedlichen Lösungseigenschaften angewendet werden soll. Dabei wurde nach jedem Waschschrift das Eluat aufgefangen und das Lösungsmittel verdampft. Der Rückstand wurde wieder in Wasser gelöst und mit Hilfe der UV-Vis-Absorption analysiert. Dabei konnte die Menge an **DNA-13b** nach dem Waschen mit DMF und  $CH_2Cl_2$  nicht bestimmt werden, da Lösungsmittelreste aufgrund ihrer Eigenabsorption die Messungen störte.<sup>[191]</sup> Die Waschfraktionen von MeOH und MeCN enthielten keine detektierbare Menge an **DNA-13b**. Auch konnte stets eine gelbe Färbung der Matrix nach jedem Waschschrift beobachtet werden, was auf einen stabilen DNA-Doppelstrang hindeutet (siehe **Anhang Abbildung 85**).

Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen, die zeigen, dass ein DNA-Doppelstrang in wässrigen Mischungen mit polaren organischen Lösungsmitteln oder reinen organischen Lösungsmitteln, wie Formamid, Methanol, DMSO oder Pyridin, destabilisiert wird, sich entfaltet und es zu einer Strangtrennung kommt.<sup>[189,192]</sup> Ein Grund für die Stabilität des DNA-Doppelstranges könnte die kurze Inkubationszeit mit den organischen Lösungsmitteln sein. Der DNA-Doppelstrang, sowie auch die Agarose-Matrix könnte noch von einer Hydrathülle umgeben sein, welche die Abspaltung des DNA-Einzelstranges verhindert.<sup>[193,194]</sup> Nach dem Auswaschen der Kontaminationen sollten mit einem abschließenden Waschschrift mit  $dH_2O$  Lösungsmittelreste entfernt werden. Anschließend sollte der DNA-Einzelstrang **DNA-13b** wieder von der festen Phase und seinem komplementären Gegenstrang eluiert werden, um die vollständig aufgereinigte **DNA-13b** zu erhalten. Dafür wurde zunächst eine Hitzedenaturierung getestet.

Die Matrix wurde in Wasser suspendiert, auf 95 °C erhitzt und mit Hilfe eines Eisbades schnell abgekühlt. Der Überstand wurde direkt abpipettiert und mittels UV-Vis-Absorption und einer analytische HPLC vermessen. Die **DNA-13b** konnte in dem Überstand nicht wiedergefunden werden. Auch zeigte die Matrix noch eine gelbe Färbung. Im Anschluss wurden verschiedene wässrige Mischungen mit organischen Lösungsmitteln ( $dH_2O$ /EtOH,  $dH_2O$ /MeOH,  $dH_2O$ /MeCN, jeweils 1:1 und 1:4, vol/vol) in Kombination mit einer Hitzedenaturierung (60 °C) verwendet. Aber auch hier konnte keine **DNA-13b** in dem Überstand detektiert werden und die Matrix zeigte stets eine gelbe Färbung, wie am Beispiel mit MeOH als Elutionsmittel in **Abbildung 34** zu sehen ist.



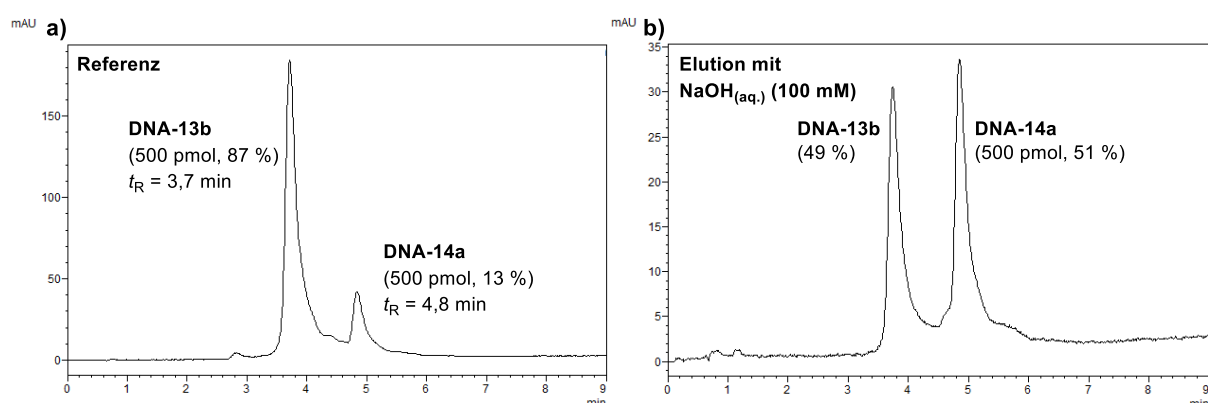
**Abbildung 34:** Prüfung verschiedener Elutionsbedingungen nach der Hybridisierung von **DNA-13b** an **Matrix-DNA-12a**.

Bilder der **Matrix-DNA-12a** a) nach dem Hybridisieren von **DNA-13b** und dreimaligem Waschen mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$ . Die Elution wurde mit  $dH_2O$ /MeOH (1:1, vol/vol) (b) bei Raumtemperatur und (c) 60 °C und  $dH_2O$ /MeOH (1:4, vol/vol) (d) bei Raumtemperatur und (e) 60 °C durchgeführt. Es konnte keine Farbveränderung beobachtet werden.

Da basische Bedingungen dafür bekannt sind, DNA-Doppelstränge zu denaturieren, wurden verschieden konzentrierte wässrige NaOH-Lösungen (1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M) verwendet.<sup>[195]</sup> Die Matrix wurde in deren Lösung, beginnend mit der geringsten Konzentration an wässriger NaOH-Lösung, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde der Überstand entfernt und mit  $dH_2O$  nachgespült. Die Probe wurde mit einer wässrigen HCl-Lösung neutralisiert.

Bei diesen Experimenten konnte eine Entfärbung der Matrix beobachtet werden (siehe **Abbildung 33e**, **Anhang Abbildung 86**). Das Eluat wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption (siehe **Anhang Tabelle 42**), der analytischen HPLC und der MALDI-MS analysiert.

Für die Elution mit 100 mM konnte über die UV-Vis-Absorption eine wiedergewonnene Menge von 46 % **DNA-13b** berechnet werden. Da Salzkontaminationen die Absorptionsmessungen beeinflussen können, wurde ebenfalls die analytische HPLC mit einem internen Standard (**DNA-14a**, 5' - Aldehyd - C6-Aminolinker - TTT TTT - 3'), welcher einen ausreichenden Retentionszeiten-Unterschied zu **DNA-13b** aufweist, als quantitative und qualitative Methode herangezogen.



**Abbildung 35:** Quantitative und qualitative Bestimmung der wiedergewonnenen Menge an **DNA-13b** mit Hilfe der analytischen HPLC und eines internen Standards (**DNA-14a**).

a) HPLC-Chromatogramm von jeweils 500 pmol **DNA-13b** und **DNA-14a** (int. Standard) und b) des Eluats mit  $\text{NaOH}_{(\text{aq.})}$  (100 mM) nach Zugabe von **DNA-14a** (int. Standard).

Für die quantitative Analyse wurde als erstes jeweils 500 pmol von **DNA-13b** und **DNA-14a** (int. Standard) zusammengegeben, mit Hilfe der analytischen HPLC gemessen und die Flächen bestimmt. Dabei konnte ein Verhältnis von 87 % **DNA-13b** zu 13 % **DNA-14a** erhalten werden. Für die Bestimmung der wiedergewonnenen Menge an **DNA-13b** in dem Eluat wurde der interne Standard **DNA-14a** (500 pmol) für die analytische HPLC-Messung hinzugegeben und es konnte ein Verhältnis von 49 % **DNA-13b** zu 51 % **DNA-14a** erhalten werden. Durch eine Normierung mit der Referenzprobe konnte hierdurch eine Wiedergewinnung an **DNA-13b** von 56 % erhalten werden.

$$\text{Wiedergewinnung DNA-13b [\%]} = \frac{\text{Fläche DNA-13b [\%]}}{\text{Fläche DNA-13b}_{\text{Ref.}} [\%]} \times 100$$

$$\text{Beispielrechnung: } \frac{49 \%}{87 \%} \times 100 = 56 \%$$

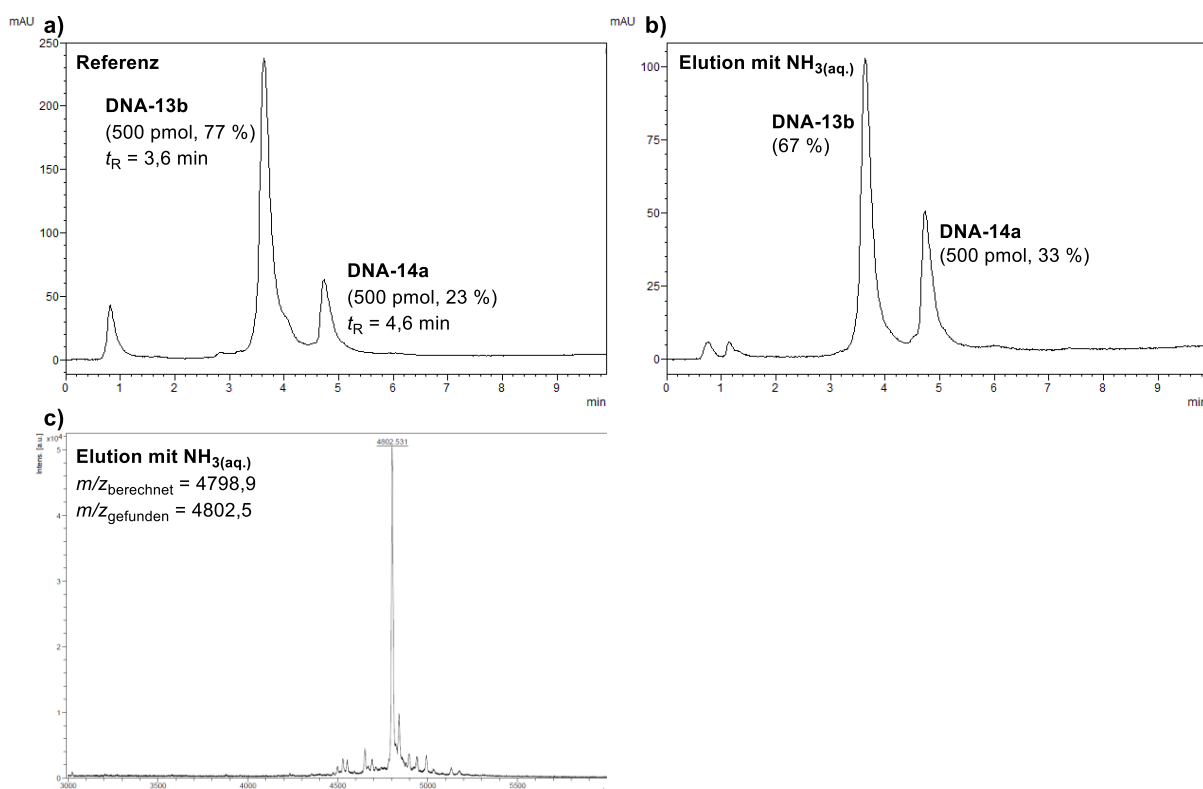
Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Wiedergewinnung von **DNA-13b** sind somit vergleichbar und es können beide Messmethoden für die Berechnung herangezogen werden. Auch konnte bei der HPLC-Messung eine hohe Reinheit des Eluates festgestellt werden (siehe **Abbildung 35**). Eine MALDI-MS-Analyse wurde nicht durchgeführt, da eine Kontamination mit NaCl-Salz durch die Elution herbeigeführt wurde.

## 4.4 Optimierung der einzelnen Aufreinigungsschritte

Da der Aufreinigungsprozess erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden die einzelnen Arbeitsschritte nun optimiert, um eine bessere Wiedergewinnung zu erzielen. Dabei wurde mit der Optimierung der Elution begonnen.

### 4.4.1. Optimierung des Elutionsmittels

In einem ersten Optimierungsschritt wurde die Elution variiert. Die bis dahin verwendete Elution mit wässriger NaOH-Lösung hatte den Nachteil, dass nach der Elution mit einer wässrigen HCl-Lösung neutralisiert werden musste und anschließend NaCl-Salze als Verunreinigung in der Probe vorhanden waren. Deshalb wurde das Elutionsmittel durch eine wässrige Ammoniak-Lösung ausgetauscht, da dieses ohne Rückstände verdampft und somit ein reines DNA-Pellet erhalten werden kann, welches wiederum in Wasser gelöst werden kann. Dafür wurde die Matrix mit einer 32%igen wässrigen Ammoniak-Lösung (2 x 50  $\mu$ L) für 2 min inkubiert und anschließend mit Wasser nachgespült (2 x 50  $\mu$ L). Die Überstände wurden verdampft, das Pellet in Wasser gelöst und mit Hilfe der analytischen HPLC, der UV-Vis-Absorption und der MALDI-MS analysiert.



**Abbildung 36:** Quantitative und qualitative Bestimmung der wiedergewonnenen Menge an **DNA-13b** mit Hilfe der analytischen HPLC und eines internen Standards (**DNA-14a**) und der MALDI-MS nach zweifacher Elution mit  $\text{NH}_3(\text{aq.})$ .

a) HPLC-Chromatogramm von jeweils 500 pmol **DNA-13b** und **DNA-14a** (int. Standard) und b) des Eluats mit  $\text{NH}_3(\text{aq.})$  nach Zugabe von **DNA-14a**; c) MALDI-MS-Spektrum des Eluats mit  $\text{NH}_3(\text{aq.})$ .

Die quantitative Analyse ergab eine Wiedergewinnung von **DNA-13b** von 82 % (UV-Vis-Absorption, siehe **Anhang Tabelle 43**) und 87 % (analytische HPLC, siehe **Abbildung 36a, b**). Von dieser Gesamtmenge an **DNA-13b** lösten sich bereits 80 % (340 pmol) durch das erste Inkubieren und Waschen mit der wässrigen Ammoniak-Lösung von dem immobilisierten, komplementären Strang an der Agarose-Matrix. Weitere 12 - 17 % (60 pmol - 85 pmol) an **DNA-13b** konnten durch den zweiten Waschschrift mit der wässrigen Ammoniak-Lösung eluiert werden. Daher war ein zweiter Elutionsschritt wichtig, um die Ausbeute der wiedergewonnenen **DNA-13b** zu erhöhen. Mit diesem Elutionsmittel konnte eine hohe Reinheit der **DNA-13b**, sichtbar in dem HPLC-Chromatogramm und in dem MALDI-MS-Spektrum (siehe **Abbildung 36b, c**), erhalten werden. Die einfache Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung ergab somit eine höhere Wiedergewinnung im Vergleich zu der einfachen Elution mit wässriger NaOH-Lösung (56 % mit NaOH und 68 % mit  $\text{NH}_{3(\text{aq.})}$ ), sowie eine höhere Reinheit, da keine Verunreinigungen durch Salze während der Elution eingetragen wurden.

### 4.4.2. Optimierung der Vorbereitung der Agarose-Matrix

Als nächstes wurden die Bedingungen für eine optimale Beladung der Agarose-Matrix mit dem DNA-Strang **DNA-12a** getestet. Dazu wurde die CuAAC-Reaktion mit unterschiedlichen Mengen der Matrix (0,5 - 1 mg) und somit gleichbedeutend auch mit unterschiedlichen Mengen an Azid-Funktionalität, als auch mit unterschiedlichen Mengen der **DNA-12a** (1 - 2 nmol) angesetzt (siehe **Tabelle 11**, Eintrag 1-3). Desweiteren wurde die Agarose-Matrix nach einer erfolgten CuAAC-Reaktion gewaschen und anschließend erneut angesetzt, um den Effekt der wiederholten CuAAC-Reaktion auf die Beladung und somit auf die Wiedergewinnung der **DNA-13b** zu beobachten (siehe **Tabelle 11**, Eintrag 4-6). Zudem wurde als Kontrolle eine Agarose-Matrix verwendet, an die keine **DNA-12a** gebunden wurde (**Tabelle 11**, Eintrag 7). Der Einfluss der Beladung der Agarose-Matrix wurde über die Menge der wiedergewonnenen **DNA-13b** validiert. Der Aufreinigungsprozess wurde mit **DNA-13b** (500 pmol) und Matrix (0,5 mg) durchgeführt und die Wiedergewinnung mit Hilfe der UV-Vis-Absorption nach der zweiten Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung berechnet (siehe **Tabelle 11**). Durch eine Verdoppelung der gebundenen **DNA-12a** konnte eine leichte Steigerung der Wiedergewinnung an **DNA-13b** von etwa 380 pmol auf 410 pmol erreicht werden. Allerdings bewirkte eine Verdoppelung der Menge an Matrix eine Senkung der wiedergewonnenen **DNA-13b** auf 350 pmol.

**Tabelle 11:** Variation der verwendeten Menge an Agarose-Matrix und **DNA-12a** für die CuAAC-Reaktion.

Eintrag	$m_{\text{Matrix}}$ [mg]	$n_{\text{Azid-Funktionalität}}$ [nmol]	$n_{\text{DNA-12a}}$ [nmol]	Wiedergewinnung von <b>DNA-13b</b> [pmol]
1	0,5	150	1	380
2	0,5	150	2	410
3	1,0	300	2	350
4 <sup>a</sup>	0,5	150	1	400
5 <sup>a</sup>	0,5	150	2	400
6 <sup>a</sup>	1,0	300	2	500
7	0,5	150	-	110

a) Wiederholung der CuAAC-Reaktion.

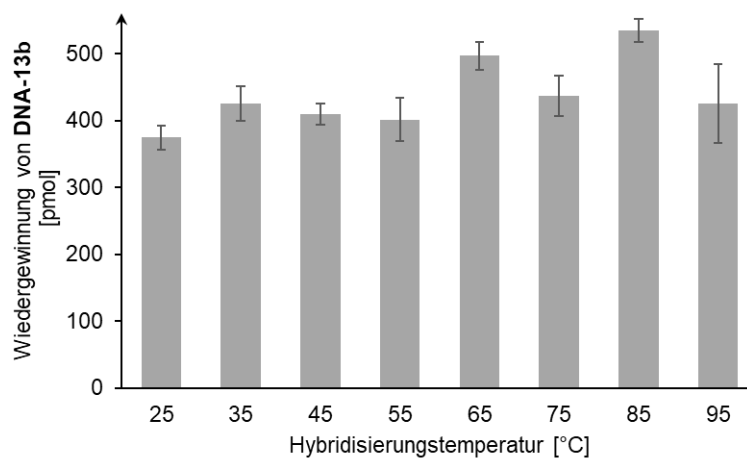
Durch eine Wiederholung der CuAAC-Reaktion konnte kein Unterschied mehr zwischen der einfachen und der doppelten Menge an **DNA-12a** beobachtet werden (siehe **Tabelle 11**, Eintrag 4, 5). Lediglich die Verwendung von mehr Matrix (1 mg) konnte eine Steigerung der wiedergewonnenen Menge an **DNA-13b** auf etwa 500 pmol bewirken (siehe **Tabelle 11**, Eintrag 6). Es konnte demnach kein signifikanter Unterschied der wiedergewonnenen Menge an **DNA-13b** zwischen den verschiedenen CuAAC-Reaktionsbedingungen beobachtet werden. Auch nach einer Wiederholung der CuAAC-Reaktion und anschließendem Aufreinigungsprozess konnte kein Trend für eine Erhöhung der Wiedergewinnung der **DNA-13b** bestimmt werden (siehe **Tabelle 11**, Eintrag 4 - 6). Nach dem Aufreinigungsprozess mit der Agarose-Matrix ohne gebundene **DNA-12a** konnten etwa 110 pmol an **DNA-13b** wiedergewonnen werden (siehe **Tabelle 11**, Eintrag 7). Daraus folgt, dass lediglich Spuren der **DNA-13b** an die freie Agarose-Matrix binden und die Waschschriffe überstehen. Die Wiedergewinnung an DNA beruht demnach größtenteils auf der Bindung zu dem komplementären DNA-Strang, welcher an die Matrix gebunden wurde. Aus diesen Experimenten folgt, dass die Menge an Matrix, sowie an **DNA-12a** keine signifikanten Auswirkungen auf die Wiedergewinnung der **DNA-13b** ausübt und somit ausreichend **DNA-12a** an die Matrix gebunden wurde, um mit der aufzureinigenden Probe zu hybridisieren.

### 4.4.3. Optimierung der Bedingungen der Hybridisierung

Darauffolgend wurde der Hybridisierungsprozess optimiert. Dabei wurde der Puffer, die Hybridisierungstemperatur und die Menge an **Matrix-DNA-12a** und der aufzureinigenden **DNA-13b** variiert.

Für die Analyse unterschiedlicher Puffer (Annealing-, T4-Ligase-, DNA-Duplex-Puffer) wurde der Aufreinigungsprozess mit **DNA-13b** (500 pmol) und Matrix (0,5 mg) bei einer Hybridisierungstemperatur von 95 °C durchgeführt. Dabei konnte mit allen Puffersystemen die Aufreinigung durchgeführt werden und eine vergleichbare Wiedergewinnung der **DNA-13b** von etwa 80 % gemessen werden (siehe **Anhang Abbildung 85**).

Auch wurde die Hybridisierungstemperatur von 25 - 95 °C variiert. Dabei wurde die Matrix mit der aufzureinigenden **DNA-13b** zusammengegeben und langsam auf die gewünschte Temperatur erhitzt, 10 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und wieder 10 min gehalten. Anschließend wurde die **DNA-13b** eluiert und mit Hilfe der UV-Vis-Absorption und der analytischen HPLC analysiert. Für diese Experimente wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Hierbei muss angemerkt werden, dass der Prozess des Aufheizens und Herunterkühlens bei einer Temperatur von 95 °C insgesamt länger gedauert hat, als bei einer Temperatur von 35 °C.



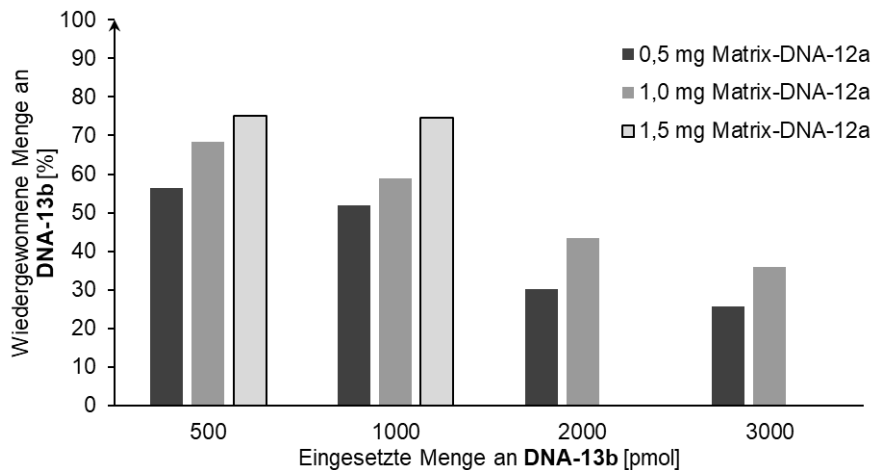
**Abbildung 37:** Wiedergewonnene Menge an **DNA-13b** nach der Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung nach einer Hybridisierung bei 25 – 95 °C bestimmt in Triplikaten mit Fehlerindikatoren.

Dabei konnte auch bei unterschiedlicher Hybridisierungs-Temperatur kein signifikanter Unterschied in der Menge der wiedergewonnenen **DNA-13b** bestimmt werden (siehe **Abbildung 37**). Die Werte liegen zwischen 370 pmol bei einer Hybridisierungstemperatur von 25 °C und 530 pmol bei 85 °C. Allerdings folgten die Werte keinem Trend.

Somit wurde für weitere Experimente eine optimierte Hybridisierungstemperatur von 35 °C gewählt, da mit etwa 430 pmol (85 %) eine hohe Wiedergewinnung an **DNA-13b** erzielt werden konnte und durch die geringere Temperatur eine mögliche thermische Degradation von DNA-Produkten verhindert werden sollte.



Des Weiteren kann die Menge der **Matrix-DNA-12a**, sowie die Menge an **DNA-13b** die Ausbeute der aufgereinigten **DNA-13b** beeinflussen. Beide Parameter wurden variiert, um die Wiedergewinnung an **DNA-13b** nach dem Hybridisieren, Waschen und der Elution zu analysieren. Es konnte deutlich beobachtet werden, dass mit steigender Menge an **Matrix-DNA-12a** auch die Wiedergewinnung an **DNA-13b** ansteigt, wohingegen eine Erhöhung der eingesetzten Menge an **DNA-13b** bei gleichbleibender Matrix-Menge zu einer Abnahme an aufgereinigter **DNA-13b** führte (siehe **Abbildung 38**).



**Abbildung 38:** Wiedergewonnene Menge an **DNA-13b** nach der Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung nach einer Hybridisierung bei 35 °C mit unterschiedlichen Mengen an **Matrix-DNA-12a** und eingesetzter **DNA-13b**.

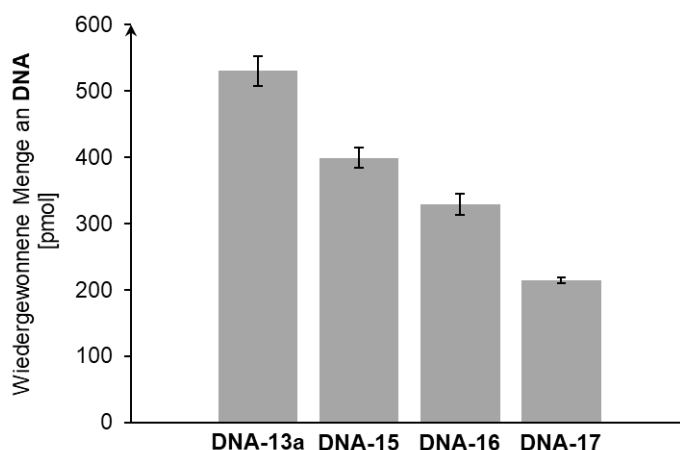
Die Optimierungsexperimente haben gezeigt, dass der Puffer und die Hybridisierungstemperatur entsprechend der zu reinigenden Probe gewählt werden können. Sollte sich die aufzureinigende Probe bereits in einem geeigneten Puffer befinden, z.B. nach einer Ligation in einem Ligase-Puffer, so könnte diese Probe direkt für die Affinitäts-Aufreinigung verwendet werden, ohne dass zuvor ein Austausch des Lösungsmittels durchgeführt werden muss. Zudem könnte bei der Verwendung von unterschiedlich langen DNA-Strängen die Hybridisierungstemperatur angepasst werden, um eine optimale Wiedergewinnung zu erhalten. Ein großer Einfluss auf die wiedergewonnene Menge der aufgereinigten Probe hatte die verwendete Menge an **Matrix-DNA-12a**. Als optimierte Bedingung wurde daher eine Hybridisierung mit 1,5 mg **Matrix-DNA-12a** und 500 pmol aufzureinigender **DNA-13b** in einem T4-Ligase-Puffer bei 35 °C gewählt. Mit diesen optimierten Bedingungen wurde das Anwendungsspektrum der Affinitäts-Aufreinigung untersucht.

## 4.5 Anwendung der Affinitäts-Aufreinigung

Da die Affinitäts-Aufreinigung für ein Modellsystem mit einem 14mer-DNA-Einzelstrang optimiert wurde, konnte anschließend die Anwendung der Aufreinigung für verschiedene DNA-Längen und verschiedene Reaktionen mit unterschiedlich polaren Reagenzien getestet werden. Dazu wurde die Amidsynthese und die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion verwendet.

### 4.5.1. Affinitäts-Aufreinigung von unterschiedlichen DNA-Längen

Um die Affinitäts-Aufreinigung auch für die DEL-Synthese anzuwenden, wurden verschiedene DNA-Längen getestet. Dafür wurde die Affinitäts-Matrix, wie in **Kapitel 4.4.2** beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurden drei längere DNA-Sequenzen (30mer (**DNA-15**), 60mer (**DNA-16**), 90mer (**DNA-17**)) verwendet, welche alle die komplementäre Sequenz zu **Matrix-DNA-12a** enthielten. Die Affinitäts-Aufreinigung wurde mit den optimierten Bedingungen (siehe **Kapitel 4.4.3**) durchgeführt und die wiedergewonnene Menge mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt. Für diese Experimente wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt (siehe **Abbildung 39**).



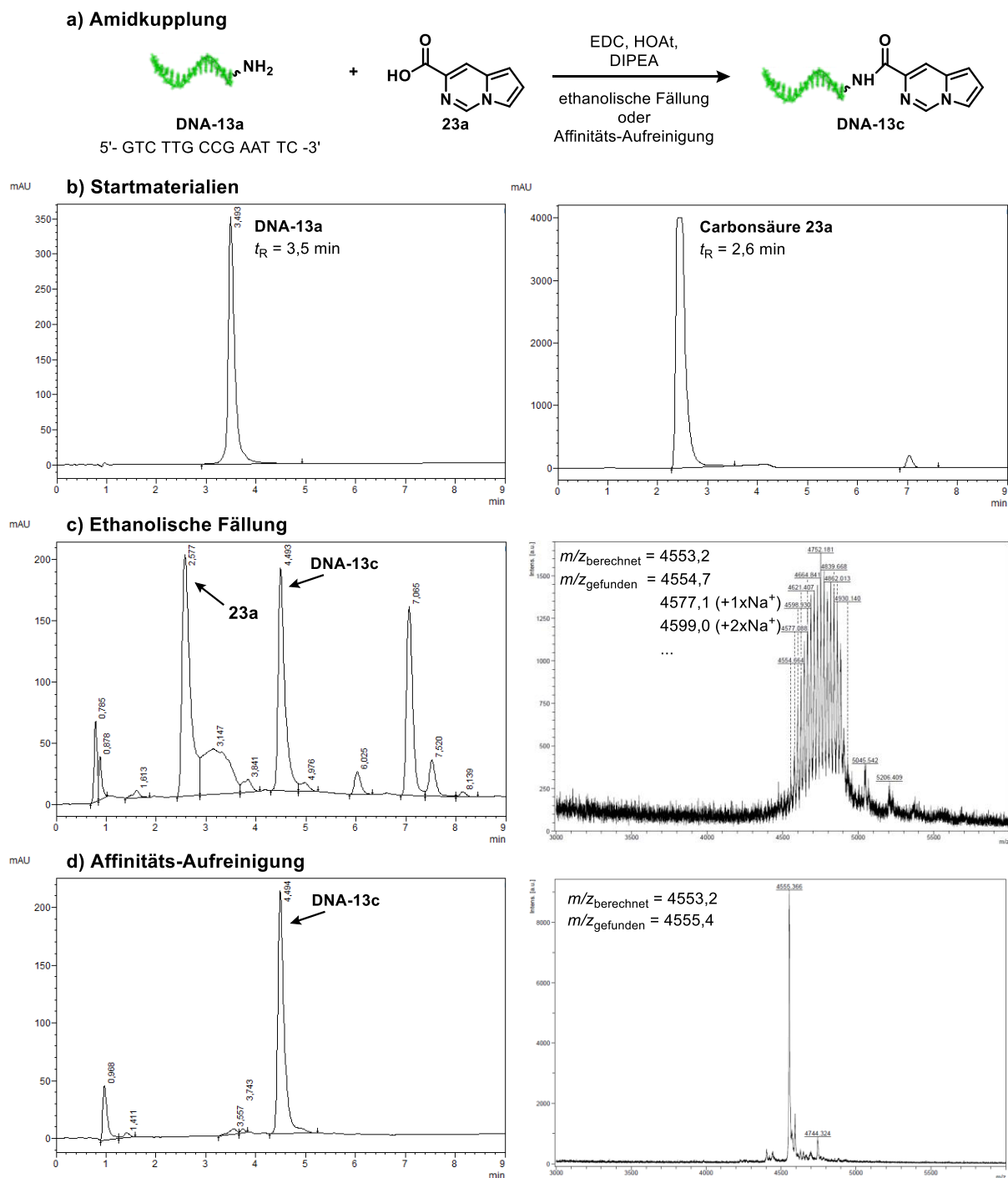
**Abbildung 39:** Wiedergewonnene Menge an DNA nach der Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung nach einer Hybridisierung bei 35 °C mit unterschiedlichen DNA-Längen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass mit zunehmender DNA-Länge die wiedergewonnene DNA-Menge abnimmt. So kann mit dem vollständig komplementären 14mer-DNA-Einzelstrang **DNA-13a** eine quantitative Wiedergewinnung erhalten werden, wohingegen mit dem 30mer-DNA-Einzelstrang **DNA-15** die Wiedergewinnung auf 78 % gesunken ist. Für den 60mer-DNA-Einzelstrang **DNA-16** konnte noch eine Wiedergewinnung von 64 % erhalten werden und für den 90mer-DNA-Einzelstrang **DNA-17** von 43 %.

Um die Wiedergewinnung für längere DNA-Stränge zu verbessern, könnte in weiteren Experimenten die Hybridisierungs-Temperatur und die -Zeit variiert werden. In diesem Experiment wurde für 10 min auf 35 °C hochgeheizt. Dabei könnte die Temperatur, sowie die Reaktionszeit zu gering gewesen sein. Zudem könnte der an die Agarose-Matrix gebundene DNA-Strang ebenfalls verlängert werden, um eine umfassendere Hybridisierung der komplementären DNA-Stränge zu ermöglichen.

#### 4.5.2. Affinitäts-Aufreinigung einer Amidsynthese

Schließlich wurde die Affinitäts-Aufreinigung mit den optimierten Bedingungen für eine Amidsynthese, einer weit verbreiteten Reaktion im DEL-Bereich, verwendet.<sup>[196]</sup> Dabei wurde ebenfalls die Affinitäts-Aufreinigung mit der ethanolischen Fällung verglichen. An einen C6-Aminolinker-modifizierten, 14-Nucleobasen-langen Einzelstrang **DNA-13a** wurde die Carbonsäure **23a** mit HOAt, EDC\*HCl und DIPEA gekoppelt (siehe **Abbildung 40a**).<sup>[196]</sup> Anschließend wurde das Produkt **DNA-13c** durch eine ethanolische Fällung oder durch die Affinitäts-Aufreinigung gereinigt. Die gereinigte **DNA-13c** wurde mittels MALDI-MS und analytischer HPLC analysiert. Die ethanolische Fällung ergab im HPLC-Chromatogramm den Produktpeak bei 4,5 min, aber auch zwei markante Peaks bei 2,5 min und 7,1 min, die auf niedermolekulare Verunreinigungen zurückzuführen sind, z. B. die aus der ethanolischen Lösung ebenfalls ausgefällt und bei 2,5 min eluierte Carbonsäure **23a**. Außerdem sind im MALDI-MS-Spektrum deutliche Salzaddukte zu beobachten (siehe **Abbildung 40b, c**). Für die ethanolische Fällung werden standardmäßig Salze, wie hier Natriumacetat, hinzugegeben, um die Menge an präzipitierter DNA zu erhöhen.<sup>[196]</sup> Im Vergleich dazu konnte in dem HPLC-Chromatogramm der Affinitäts-Aufreinigung ein einzelner Peak des Produktes **DNA-13c** erhalten werden. Auch das MALDI-MS-Spektrum liefert ein einzelnes Signal bei der gewünschten Masse. Es können keine Salzaddukte oder andere Verunreinigungen beobachtet werden (siehe **Abbildung 40d**). Die Affinitäts-Aufreinigung einer Amidsynthese konnte somit erfolgreich durchgeführt werden und lieferte ein reineres Produkt als durch die konventionell durchgeführte ethanolische Fällung.

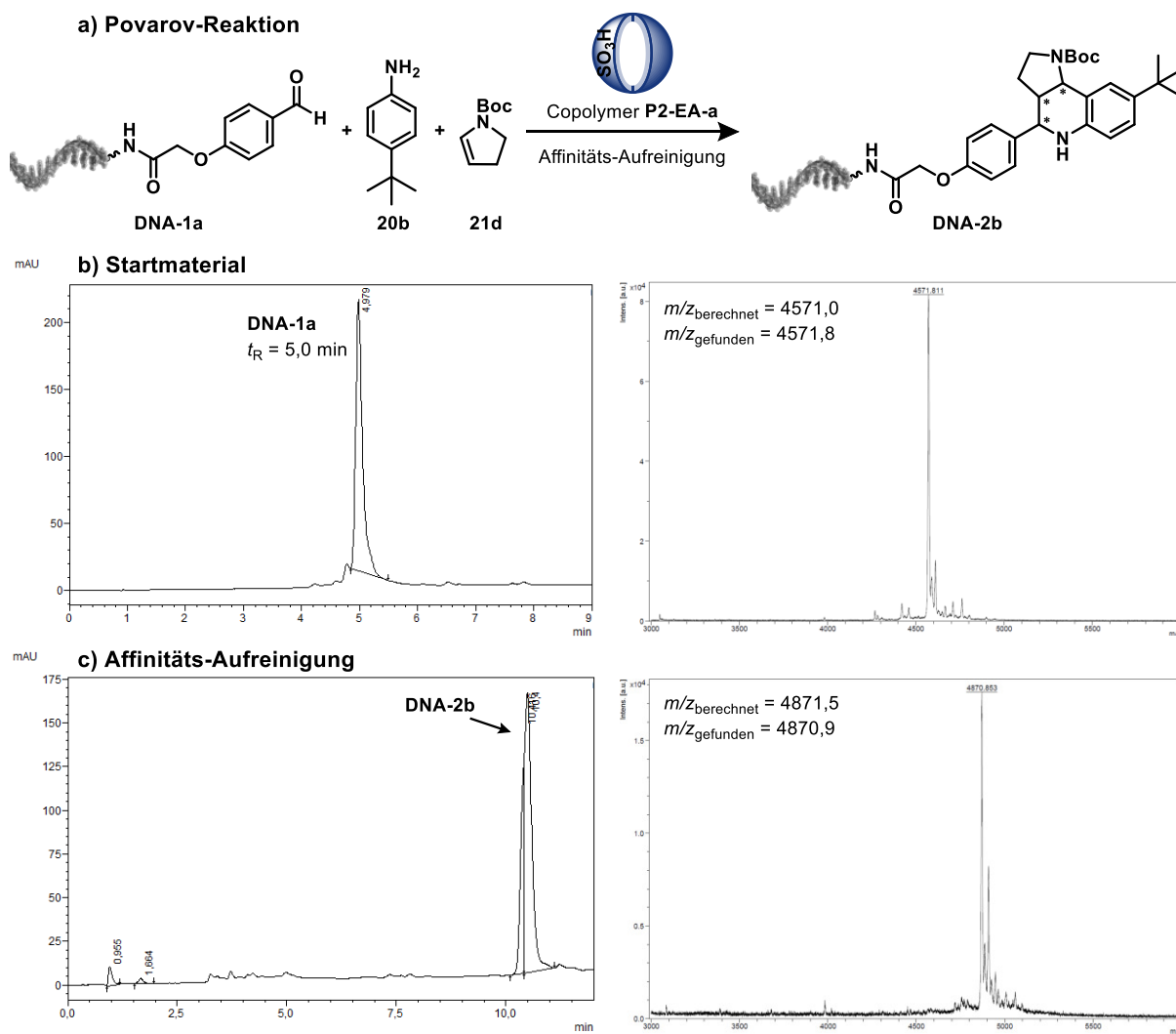


**Abbildung 40:** Vergleich der Aufreinigung einer Amidsynthese durch die ethanolische Fällung und die Affinitäts-Aufreinigung.

a) Reaktionsschema der Amidsynthese. Die Carbonsäure **23a** (5400 Äquiv.) wurde mit EDC<sup>+</sup>HCl (2400 Äquiv.), HOAt (480 Äquiv.) und DIPEA (2400 Äquiv.) in DMSO aktiviert und zu dem DNA-Konjugat **DNA-13a** (500 pmol) in MOPS-Puffer gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde erneut die Carbonsäure **23a** aktiviert, zu dem Reaktionsgemisch gegeben und erneut vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Probe wurde entweder über die ethanolische Fällung, oder über die Affinitäts-Aufreinigung gereinigt; b) HPLC-Chromatogramme der Startmaterialien **DNA-13a** (links) und der Carbonsäure **23a** (rechts); c) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) der Amidsynthese nach der ethanolischen Fällung; d) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) der Amidsynthese nach der Affinitäts-Aufreinigung.

### 4.5.3. Affinitäts-Aufreinigung der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

Bei der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion an DNA-Konjugaten in Lösung handelt es sich um eine Säure-katalysierte Multikomponenten-Reaktion, welche in **Kapitel 3.2** etabliert wurde. Dabei bilden ein Aldehyd, ein Anilin und ein Olefin ein Tetrahydrochinolin, eine *N*-heterozyklischen Verbindung. Bei der Reaktion befinden sich viele Reagenzien (Copolymer, Anilin, Olefin) unterschiedlichster Polaritäten und Äquivalenten in der Lösung, welche, nach erfolgter Reaktion, entfernt werden müssen. Die in **Kapitel 3.2** beschriebene Extraktion mit Ethylacetat als Aufreinigung konnte nicht alle Kontaminationen entfernen, welches vor allem bei der Verwendung verschiedener Aniline beobachtet werden konnte. Um diese Reaktion in einer DEL-Synthese durchführen zu können, wurde die Affinitäts-Aufreinigung getestet. Dabei wurde die Povarov-Reaktion, wie in **Kapitel 3.2** beschrieben, mit **DNA-1a**, 4-*tert*-Butylanilin **20b**, dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** und dem Copolymer **P2-EA-a** angesetzt und über Nacht bei 40 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel verdampft und die Affinitäts-Aufreinigung mit den optimierten Bedingungen aus **Kapitel 4.4.3** mit T4-Ligase-Puffer bei 35 °C und einer Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung durchgeführt. Das Eluat wurde mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS analysiert (siehe **Abbildung 41**). Dabei ist in dem HPLC-Chromatogramm lediglich der Produktpeak von **DNA-2b** bei einer Retentionszeit von 10,4 min zu sehen, was auf eine vollständige Entfernung der überschüssigen Reagenzien, wie das Anilin **20b** und Olefin **21d**, schließen lässt. Auch die MALDI-MS-Analyse zeigt nur das Signal des gewünschten Produktes **DNA-2b**. Somit konnte die Affinitäts-Aufreinigung ebenfalls erfolgreich auf ein komplexes Reaktionsgemisch, wie die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion, angewendet werden.



**Abbildung 41:** Affinitäts-Aufreinigung einer Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion.

a) Reaktionsschema der Povarov-Reaktion. Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** (8000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (8000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und 5 Vol-% EtOAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt; b) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) von **DNA-1a**; c) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) von **DNA-2b** nach der Affinitäts-Aufreinigung.

## 5. Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek

In den vorherigen Kapiteln konnten die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion, die Boc-Entschützung, sowie die Suzuki-Miyaura-Reaktion erfolgreich etabliert werden. Die Reaktionsbedingungen konnten optimiert werden und mit einem breiten Reaktandenspektrum erfolgreich umgesetzt werden. Die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion zu dem DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugat bietet in einer Molekülbibliothek die Möglichkeit, ein exponentielles Wachstum der Molekülanzahl über eine 3-Zyklen-basierte kombinatorische Chemie zu generieren. In einem ersten Zyklus können diverse Aldehyde verwendet werden. Diese können darauffolgend in einem zweiten Synthesesyklus über die Povarov-Reaktion mit verschiedenen Anilinen und einem Boc-geschützten Pyrrolin zum Grundgerüst der DNA-kodierten Molekülbibliothek reagieren. Nach einer anschließenden Boc-Entschützung können in einem dritten Zyklus diverse Carbonsäuren über das freie Amin gebunden werden.

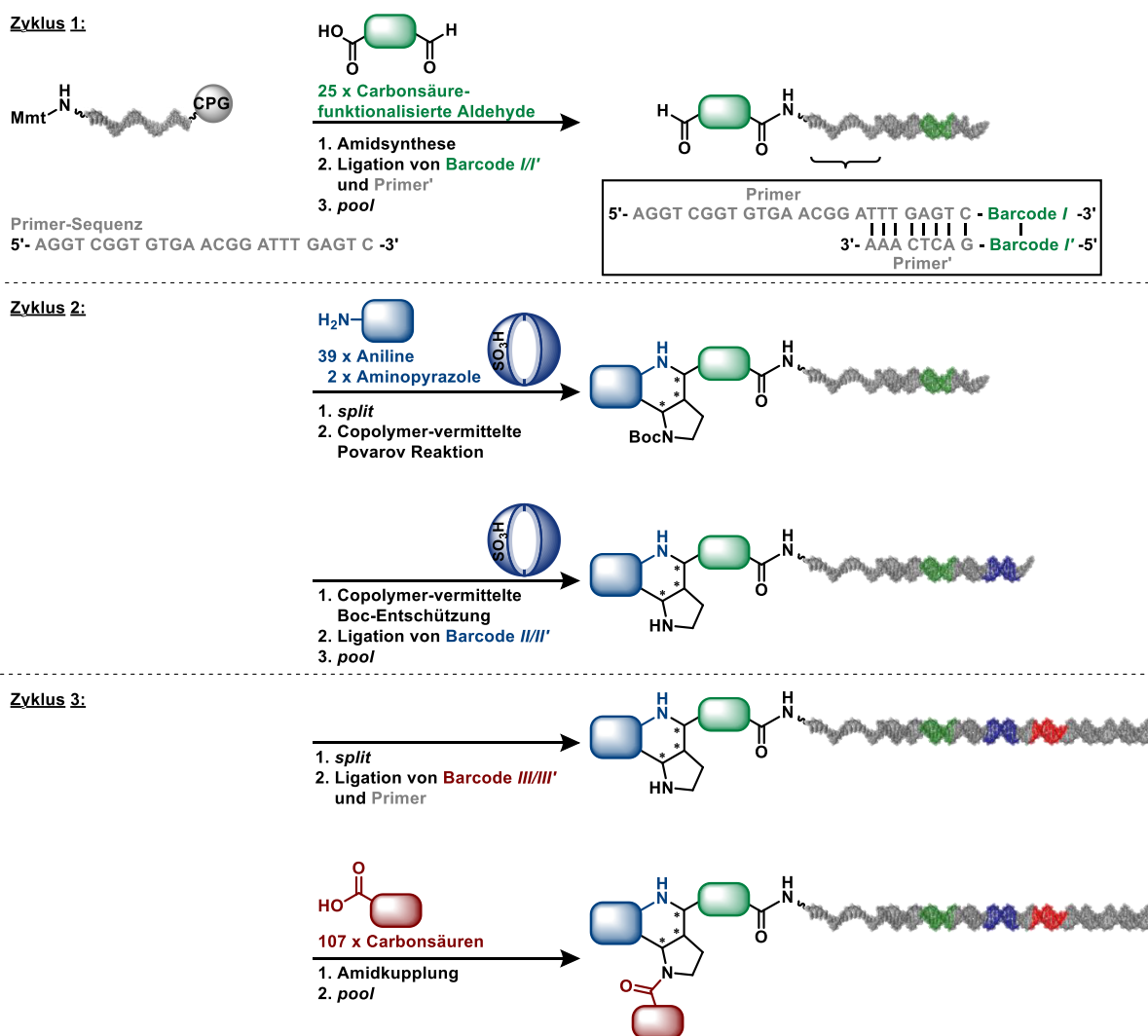
Das Tetrahydropyrrolochinolin ist ein wichtiges Grundgerüst in der Wirkstoffforschung und kann in vielen Naturstoffen und bioaktiven Molekülen wiedergefunden werden.<sup>[167,168]</sup> In der herzustellenden DNA-kodierten Molekülbibliothek kann dieses zentrale Strukturmotiv vorteilhaft für ein Bindungsassay mit verschiedenen Proteinen sein und die Chancen, bioaktive Moleküle zu erhalten, steigern.

Zudem sollte die zuvor beschriebene Affinitäts-Aufreinigung in dieser DNA-kodierten Molekülbibliothek angewendet werden. Dazu sollte das Kodierdesign der DEL für die neu entwickelte Aufreinigung angepasst werden. Durch die Verwendung dieser Aufreinigung könnte eine reinere Molekülbibliothek erhalten werden und somit falsch positive *Hits* reduziert werden.

In den folgenden Kapiteln wird auf das Design der DNA-kodierten Molekülbibliothek eingegangen, sowie auf die Auswahl und Kodierung der Molekülbausteine mit Hilfe von computergestützten Methoden. Zudem wird die chemische Synthese und die enzymatische Kodierung der DEL für jeden Bibliothekszyklus beschrieben. Anschließend sollte die synthetisierte DNA-kodierte Molekülbibliothek auf verschiedenen Proteinen in einem Bindungsassay getestet werden.

## 5.1 Design der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL)

Für die Synthese der DNA-kodierten Molekülbibliothek sollten zwei zentrale Strategien angewendet werden. Zum einen die in der *Arbeitsgruppe Brunschweiler* etablierte Festphasen-DNA-Chemie (*controlled pore glass*, CPG)<sup>[95–99]</sup>, sowie die in dieser Arbeit entwickelten Copolymer-vermittelten Reaktionen (siehe **Kapitel 3**). Die Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek (*micelle-mediated DNA-encoded library*, MiDEL) sollte mit vier Synthese- und drei Ligationszyklen aufgebaut werden. Um das Molekül aufzubauen, sollte eine Amidsynthese, eine Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion mit anschließender Copolymer-vermittelter Boc-Entschützung und eine zweite Amidsynthese verwendet werden. Als kodierende Molekülbausteine waren 25 Carbonsäure-funktionalisierte Aldehyde, 39 Aniline, zwei Aminopyrazole und 107 verschieden substituierte Carbonsäuren geplant. Daraus sollte eine DNA-kodierte Molekülbibliothek mit 109.675 Bibliotheksmitgliedern (25 x 41 x 107) entstehen. Der Syntheseweg ist in **Abbildung 42** dargestellt.



**Abbildung 42:** Design der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL) bestehend aus 3 Zyklen.



Als Ausgangspunkt sollte eine Primer-Sequenz, die eine C6-Aminolinker-Modifikation trägt, über eine Amidsynthese mit 25 Carbonsäure-funktionalisierten Aldehyden in einem ersten Syntheseschritt diversifiziert werden. Nach der Synthese sollten die DNA-Aldehyd-Konjugate von der festen Phase abgespalten werden und mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt und mittels MALDI-MS und analytischer HPLC analysiert werden. Wurden die DNA-Konjugate erfolgreich hergestellt, so sollte der entsprechende Barcode *II'* für den ersten Molekülbaustein über eine enzymatische Ligation angebunden werden. Dabei sollte der Barcode *I* einen spezifischen Überhang (*sticky ends*) zu der Primer-Sequenz enthalten. Der Gegenstrang der Primer-Sequenz (Primer') sollte allerdings nicht vollständig die Primer-Sequenz abdecken, damit die Möglichkeit geboten wird, die Affinitäts-Aufreinigung anzuwenden (siehe **Kapitel 4**). Dafür sollte als Affinitäts-Matrix der freibleibende Teil-Gegenstrang zu der Primer-Region verwendet werden (siehe **Abbildung 42**, Zyklus 1). Somit könnte in jedem Schritt der Bibliothekssynthese die Affinitäts-Aufreinigung verwendet werden. Die nun kodierten DNA-Aldehyd-Konjugate sollten über eine ethanolische Fällung aufgereinigt werden und vermischt werden (*pool*) (siehe **Abbildung 42**, Zyklus 1).

Für den nächsten Synthesesyklus sollten diese DNA-Aldehyd-Konjugate für die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion aufgeteilt werden (*split*). Im Anschluss an die Reaktion mit dem zweiten Molekülbaustein sollte die Affinitäts-Aufreinigung durchgeführt werden, um die Überschüsse der Reagenzien, vor allem der Aniline, zu entfernen. Daraufgehend sollte die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung mit ethanolischer Fällung durchgeführt werden. Die so hergestellten Moleküle sollten mit dem dazugehörigen Barcode *III'* über eine enzymatische Ligation versehen werden und vermischt werden (*pool*) (siehe **Abbildung 42**, Zyklus 2).

Der dritte und letzte Zyklus der Bibliothekssynthese sollte mit der Ligation des Barcode *IIII'* und der endständigen Primer-Sequenz begonnen werden. Der letzte Schritt sollte somit die Amidsynthese der Carbonsäuren an das freie Amin des DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin-Konjugates darstellen. Um möglichst viele Kontaminationen zu entfernen, sollte erste eine ethanolische Fällung und anschließend eine Aufreinigung mittels der Affinitäts-Matrix durchgeführt werden (siehe **Abbildung 42**, Zyklus 3).

Über diesen Syntheseweg sollte die Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek (MiDEL) mit hohen Ausbeuten und möglichst geringen Kontaminationen aufgebaut werden können.

## 5.2 Computer-gestützte Auswahl der Molekülbausteine und Generierung der Barcodes

Die Auswahl der Molekülbausteine, sowie die Generierung der Barcodes für die einzelnen Syntheseschritte einer DNA-kodierten Bibliothek ist von großer Bedeutung für die Wahrscheinlichkeit, bioaktive Moleküle zu finden. Für die Auswahl von bioaktiven Molekülen gibt es viele Richtlinien bezüglich der Eigenschaften dieser Moleküle. So sind beispielsweise die „*Rule of 5*“, vorgeschlagen von *Lipinski et al.*, wichtige Richtlinien für die Erfolgchancen von oral-verabreichten Arzneimitteln. Die Moleküle, die diesen Regeln folgen, enthalten weniger als 5 Wasserstoffbrücken-Donatoren und weniger als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren, ein Molekulargewicht von unter 500 g/mol, sowie einen logP unter 5.<sup>[197,198]</sup> Vergleichbar dazu sind die „*Rule of 2*“, vorgestellt von *Goldberg et al.*, welche Richtlinien für Molekülbausteine darstellen. Dabei sollte der Molekülbaustein dem finalen Molekül nicht mehr als 200 g/mol Molekulargewicht hinzufügen, sowie weniger als 2 Wasserstoffbrücken-Donatoren und weniger als 4 -Akzeptoren aufweisen. Durch diese Richtlinien soll die Qualität der entstehenden Moleküle verbessert werden, sowie der Zugang zu vielfältigen Molekülbausteinen ermöglicht werden.<sup>[199]</sup> Da eine manuelle Auswahl der Molekülbausteine, sowie die Generierung der Barcodes sehr zeitaufwändig und mühsam ist, wurden in dieser Arbeit verschiedene Computer-assistierte Methoden verwendet.

Für die Auswahl von Molekülbausteinen wurde zunächst eine Datenbank-Abfrage über käuflich erwerbliche Startmaterialien durchgeführt. Diese wurde in einem weiteren Schritt definierten Filtern zugeführt. Für den ersten Syntheseschritt wurde nach bifunktionellen Molekülen mit einer Aldehyd- und einer Carbonsäure-Funktionalität des Anbieters *Enamine* gesucht. Die erhaltene Liste enthielt knapp 3000 Einträge zu diesen bifunktionellen Molekülen. Diese Liste wurde anschließend mit der freien Software *KNIME*<sup>®</sup> zusammen mit *Dr. Silvia Chines* gefiltert. *KNIME*<sup>®</sup> (*Konstanz Information Miner*) ermöglicht es, Daten durch nacheinander geschaltete Befehle (*Nodes*) zu analysieren und anschließend die Ergebnisse zu visualisieren (siehe **Anhang Abbildung 92**).<sup>[200–202]</sup> Für die Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren wurde das Molekulargewicht zwischen 150 g/mol und 300 g/mol festgelegt, sowie ein Preis von maximal 350 € pro 250 mg. Aus der erhaltenden Liste wurden anschließend mit dem Befehl „*Diversity Picker*“ die vielfältigsten Moleküle ausgewählt. Dieser Befehl bestimmt für jedes eingegebene Molekül einen individuellen Code, den sogenannten „*fingerprint*“. Anschließend wird der Tanimoto-Abstand, die Ähnlichkeit zweier Moleküle, anhand der „*fingerprints*“ berechnet und basierend auf dem MaxMin-Algorithmus die verschiedensten Moleküle bestimmt.<sup>[203,204]</sup> Die Auswahl möglichst diverser Moleküle beruht auf der Annahme, dass strukturell diverse Moleküle ein unterschiedliches Aktivitätenprofil aufweisen und somit die Menge an Informationen über die Struktur-Aktivität-Wechselwirkung maximiert wird.<sup>[203]</sup>

Dieser Vorgang wurde für die Auswahl der Aniline und der Carbonsäuren wiederholt. Bei der Auswahl der Aniline wurde das Molekulargewicht auf maximal 200 g/mol beschränkt und bei den Carbonsäuren sollte eine Masse zwischen 100 g/mol und 200 g/mol vorliegen.

Um anschließend diese Moleküle einem individuellen Barcode zuzuordnen, mussten zu Beginn Barcodes aus den vier natürlichen Nucleobasen generiert werden. Dabei sollte ein Barcode aus 8 Nucleobasen bestehen. Daraus ergibt sich eine maximale Anzahl an Barcodes von 4.096 ( $8^{\text{Länge des Barcodes}}$   $4^{\text{Anzahl der natürlichen Nucleobasen}}$ ). Darunter befinden sich allerdings auch Barcodes, welche in einer DNA-kodierte Molekülbibliothek unerwünscht sind, wie z.B. Palindrome (5' - CGAA TTCG - 3') und Barcodes bestehend aus der gleichen Base (5' - GGGG GGGG - 3'). Um dies zu umgehen, wurde ein Programm (*SequenceGenerator*, *RStudio*) verwendet, welches von *Lukas Arendt* und *Ina Dormuth* (Prof. Dr. Jörg Rahnenführer und Prof. Dr. Roland Fried, Fakultät für Statistik, TU Dortmund) entwickelt wurde. Dabei konnte die Länge der Barcodes (hier: 8 Nucleobasen), die Anzahl der zu generierenden Barcodes, die Höchstmenge jeder Nucleobase in einem Barcode (hier: jeweils 4), sowie die maximale Länge eines Teils des Barcodes, der nur eine Nucleobase enthält (hier: jeweils 2), eingestellt werden (siehe **Anhang Abbildung 93**). Mit diesen Bedingungen wurden für die drei Molekülbausteine Barcodes generiert und den einzelnen Molekülbausteinen zugeordnet. Die verwendeten Molekülbausteine mit den zugeordneten Barcodes sind im Anhang in **Tabelle 45 - 47** zu finden.

### **5.3 Synthese der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek**

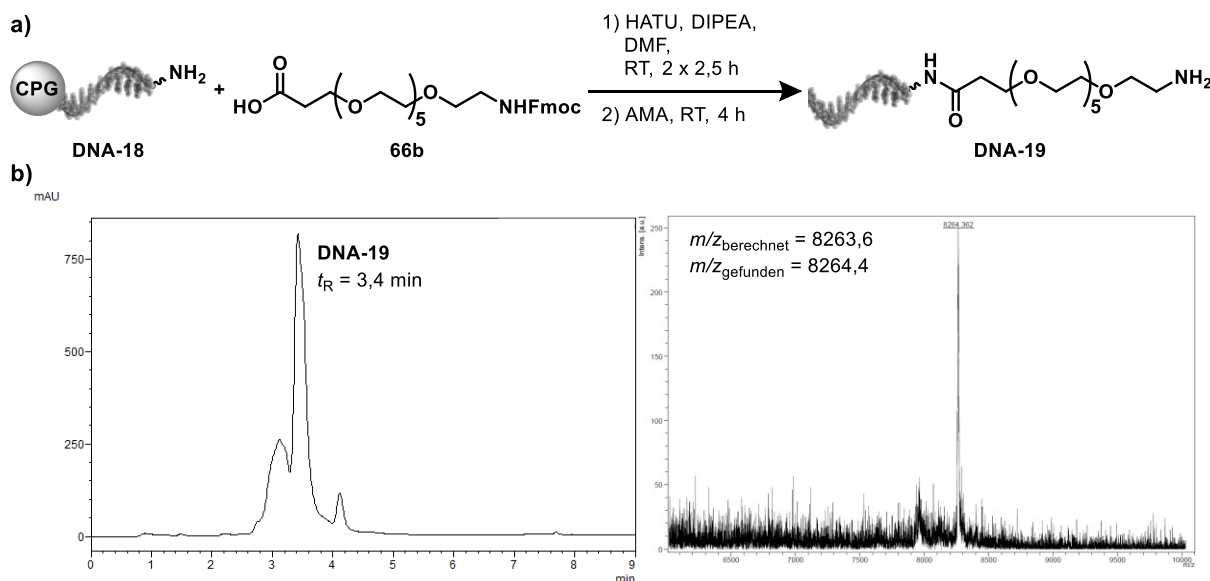
In diesem Kapitel wird im Detail die Synthese der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL) erläutert. Diese wurde basierend auf dem bereits vorgestellten Design und dem Syntheseweg durchgeführt. Die über Computer-gestützte Methoden ausgewählten und kodierten Molekülbausteine (siehe **Anhang Tabelle 45 - 47**) wurden hier in den drei chemischen Syntheseschritten umgesetzt. Dabei werden die chemischen Syntheseschritte und die enzymatischen Ligationsschritte getrennt beschrieben.

#### **5.3.1. Chemische Synthese der einzelnen Zyklen der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek**

In den folgenden Kapiteln wird die chemische Synthese der Molekülbibliothek, sowie die durchgeführten Aufreinigungen beschrieben. Die enzymatischen Ligationsschritte werden in **Kapitel 5.3.2** erläutert.

### 5.3.1.1. Zyklus 1 - Synthese von DNA-Aldehyd-Konjugaten

Begonnen wurde die Synthese der Molekülbibliothek mit einer Amidsynthese. Dazu wurde eine Primer-Sequenz **DNA-18** (5' - AGGT CGGT GTGA ACGG ATTT GAGT C - 3') gebunden an einer festen Phase (*controlled pore glass*, CPG) verwendet. An dieser Primer-Sequenz war ein C6-Amino-Linker mit einem geschützten primären Amin gebunden. Um den Abstand zwischen Molekül und DNA-Strang zu vergrößern, sollte als erstes ein Polyethylenglykol-Linker **66b** an die Primer-Sequenz **DNA-18** über eine Amidsynthese gebunden werden (siehe **Abbildung 43**).



**Abbildung 43:** Synthese des Primer-PEG(5)-Konjugats **DNA-19**.

a) Reaktionsschema der Amidsynthese. Das DNA-Konjugat **DNA-18** (4  $\mu\text{mol}$ ) wurde mit Fmoc-NH-(PEG)<sub>5</sub>-COOH **66b** (100 Äquiv.), HATU (100 Äquiv.) und DIPEA (250 Äquiv.) in DMF bei Raumtemperatur zweimal 2,5 h geschüttelt. Anschließend wurde das DNA-Konjugat **DNA-19** mit der AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h von dem CPG entfernt; b) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) des DNA-Konjugats **DNA-19**.

Dazu wurde zunächst die Mmt-Schutzgruppe der **DNA-18** mittels 3 %iger Trichloressigsäure in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  entfernt, bis keine gelbe Färbung mehr beobachtet werden konnte. Anschließend wurde der Fmoc-NH-(PEG)<sub>5</sub>-COOH-Linker **66b** mit [O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat] (HATU) und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF für 15 min aktiviert. Diese Lösung wurde zu der in DMF suspendierten **DNA-18** gegeben und für 2,5 Stunden geschüttelt. Die **DNA-19** wurde über einen Filter mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen, um den Überschuss an Reagenzien zu entfernen. Die Amidsynthese wurde einmal wiederholt. Um den Reaktionserfolg zu bestimmen, wurde ein kleiner Teil des CPGs (0,5 mg) des **DNA-19** entnommen. Das gebundene DNA-Konjugat **DNA-19** wurde mit einer Lösung aus Ammoniak und Methylamin (AMA) von der festen Phase abgespalten und mit Hilfe der MALDI-MS auf die Produktidentität und über die analytische HPLC auf die Reinheit untersucht.

Dabei konnte in dem HPLC-Chromatogramm ein Hauptpeak bei einer Retentionszeit von  $t_R = 3,4$  min beobachtet und in dem MALDI-MS-Spektrum die gewünschte Masse mit 8264,4 g/mol detektiert werden. Da die Amidsynthese des PEG(5)-Linkers an die Primer-Sequenz erfolgreich ablief, konnte anschließend der erste Molekülbaustein, die 25 verschiedenen Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren **64a** und **64d - aa** ebenfalls über eine Amidsynthese gekuppelt werden. Zuvor wurden alle nicht umgesetzten freien Amine acyliert und die Fmoc-Schutzgruppe des PEG(5)-Linkers mit 20 % Piperidin in DMF entfernt. Mit diesem Konjugat **DNA-19** wurde die Amidsynthese analog mit den 25 verschiedenen Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren durchgeführt (siehe **Tabelle 12**). Die erhaltenen DNA-Konjugate **DNA-20a - y** wurden von der festen Phase abgespalten und über die präparative HPLC aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen der einzelnen DNA-Konjugate wurden mit Hilfe der MALDI-MS-Analyse und der analytischen HPLC-Chromatographie analysiert (siehe **Anhang Abbildung 94**). Zudem wurde die Ausbeute der Produkt-Konjugate über die UV-Vis-Absorption bestimmt (siehe **Anhang Tabelle 45**). Unter diesen 25 Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren waren viele *N*-Heterozyklen, insbesondere viele Indole, sowie auch einige *O*-Heterozyklen zu finden, da diese in vielen Naturstoffen präsent sind und eine hohe Bioaktivität aufweisen.<sup>[205]</sup>

**Tabelle 12:** Amidsynthese der 25 Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren **64a** und **64d - aa** an die **DNA-19**.<sup>a</sup>

Eintrag	Aldehyd-funktionalisierte Carbonsäure	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> <sup>c</sup> / $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>	Ausbeute [nmol] <sup>d</sup>
1	<b>64h</b> 	<b>DNA-20a</b>	60	8434,8 8435,4	11,2
2	<b>64i</b> 	<b>DNA-20b</b>	55	8398,7 8400,9	9,9
3	<b>64j</b> 	<b>DNA-20c</b>	60	8435,8 8436,3	11,2
4	<b>64k</b> 	<b>DNA-20d</b>	60	8434,8 8436,8	11,1
5	<b>64l</b> 	<b>DNA-20e</b>	45	8464,8 8464,9	7,4

Fortsetzung Tabelle 12

6	64m		DNA-20f	55	8462,8 8462,9	9,4
7	64d		DNA-20g	n.d.	8448,8 n.d.	n.d.
8	64e		DNA-20h	60	8469,8 8470,0	9,5
9	64n		DNA-20i	50	8425,8 8425,9	10,0
10	64o		DNA-20j	45	8448,8 8448,7	7,4
11	64p		DNA-20k	40	8502,9 8502,5	7,6
12	64f		DNA-20l	60	8462,8 8462,5	10,2
13	64q		DNA-20m	55	8462,8 8462,0	8,2
14	64r		DNA-20n	40	8469,2 8469,0	6,5
15	64s		DNA-20o	40	8475,8 8474,3	6,5
16	64t		DNA-20p	40	8460,2 8462,2	6,4
17	64u		DNA-20q	40	8488,9 8489,9	8,0

Fortsetzung Tabelle 12

18	64v		DNA-20r	55	8434,8 8433,8	9,0
19	64w		DNA-20s	65	8455,8 8454,4	8,9
20	64x		DNA-20t	55	8469,8 8470,7	8,0
21	64y		DNA-20u	15	8455,8 8455,4	2,7
22	64z		DNA-20v	65	8437,8 8438,9	2,5
23	64aa		DNA-20w	50	8478,8 8478,7	8,0
24	64a		DNA-20x	50	8425,7 8425,8	9,2
25	64g		DNA-20y	30	8395,7 8400,9	9,4

<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-19** (100 nmol) wurde mit der Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäure (100 Äquiv.), HATU (100 Äquiv.) und DIPEA (250 Äquiv.) in DMF bei Raumtemperatur dreimal 2,5 h geschüttelt. Anschließend wurde das DNA-Konjugat **DNA-20** mit der AMA-Lösung bei Raumtemperatur für 4 h von dem CPG entfernt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (präparative HPLC) bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. <sup>d</sup> Die Ausbeute des gesammelten DNA-Produktes wurde über die UV-Vis-Absorption bestimmt. n.d. = nicht detektiert.

Insgesamt konnten von den 25 Molekülbausteinen **64a** und **64d - aa** 14 mit einem Umsatz von über 50 % erhalten werden. Darunter befanden sich einige Indol-Struktur motive (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 4, 6, 12, 13, 18, 23), sowie auch andere heterozyklische Strukturen, wie ein Indolizin **46h** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 1), ein Pyrrol **64i** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 2), ein Pyrazolo[1,5-a]pyridin **64j** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 3) und ein Dihydrobenzofuran **64z** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 22). Acht weitere Aldehyd-funktionalisierte Carbonsäuren konnten mit einem Umsatz von 30-50 % erhalten werden. Darunter waren unter anderem drei Indole **64l**, **64o**, **64r** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 5, 10, 14), zwei Pyrrole **64p**, **64u** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 11, 17) und ein Furan **64s** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 15).

Durch die Aufreinigung mit Hilfe der präparativen HPLC konnte auch bei den DNA-Konjugaten mit geringerem Umsatz das reine Produkt in einer ausreichenden Menge isoliert werden und für die weitere Synthese eingesetzt werden.

Lediglich für die Amidsynthese mit dem Indol-Derivat **64d** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 7) konnte das Produkt **DNA-20g** nicht erhalten werden und wurde demnach für die weitere Synthese der Molekülbibliothek nicht weiterverwendet.

Für die weitere Synthese sollte eine Menge von 1 nmol pro DNA-Aldehyd-Konjugat eingesetzt werden. Da die Ausbeuten, mit Ausnahme von Indol-Derivat **64d** (siehe **Tabelle 12**, Eintrag 7), im Bereich von 2,5 nmol bis 11,2 nmol lagen, konnte die Synthese mit 24 der 25 DNA-Aldehyd-Konjugaten **DNA-20** fortgesetzt werden (siehe **Tabelle 12**). Die Ligation des Barcodes *///* für jeden Molekülbaustein **64a** und **64d - aa** ist in **Kapitel 5.3.2** beschrieben.



### 5.3.1.2. Zyklus 2

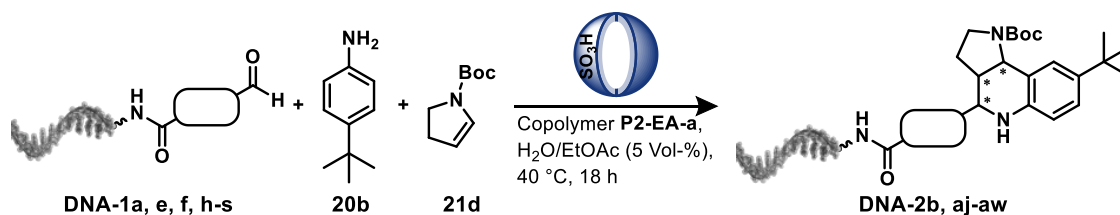
Der zweite Syntheseyklus der Molekülbibliothek umfasst die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion mit diversen Anilinen und Aminopyrazolen und die Boc-Entschützung. Die Etablierung beider Reaktionen sind in den **Kapiteln 3.2** und **3.3** beschrieben. Da mit Hilfe von Computer-unterstützten Methoden neue Molekülbausteine ausgewählt wurden (siehe **Kapitel 5.2, Anhang Tabelle 46**), wurden einige dieser Moleküle vor der eigentlichen Bibliothekssynthese auf ihre Reaktivität in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion untersucht.

#### 5.3.1.2.1. Validierung der ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate und Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion

Um die Reaktivität der Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion zu testen, wurden 15 der für die DEL ausgewählten 25 Moleküle **64a, 64e, 64f, 64h - s** an eine 14-Nucleobasen lange DNA über eine Amidsynthese gebunden. Die erhaltenen Produkte wurden mit der analytischen HPLC-Chromatographie und der MALDI-MS analysiert (siehe **Anhang Abbildung 96**). Diese DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-1a, e, f, h - s** wurden anschließend mit 4-*tert*-Butylanilin **20b**, *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** und Copolymer **P2-EA-a** bei 40 °C über Nacht geschüttelt (siehe **Tabelle 13**). Die erhaltenen Produkte wurden mit der analytischen HPLC-Chromatographie und der MALDI-MS analysiert (siehe **Anhang Abbildung 97**). Elf der 15 ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate konnten in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit einem vollständigen Umsatz zu dem gewünschten Produkt reagieren. Darunter befanden sich einige Indol-Struktur motive **DNA-1k, l, q, r** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 4, 5, 12, 13), sowie auch andere heterozyklische Strukturen, zwei Pyrrole **DNA-1i, p** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 2, 10), ein Pyrazolo[1,5-*a*]pyridin **DNA-1j** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 3) und ein Furan **DNA-1s** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 14). Zwei weitere Indole **DNA-1m, o** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 6, 9) und ein Indolizin **DNA-1h** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 1) konnten mit einem Umsatz von 60 % - 80 % zur Reaktion gebracht werden. Nur für das Indol **DNA-1f** (siehe **Tabelle 13**, Eintrag 11) konnte das Produkt nur zu 25 % beobachtet werden, wobei noch Startmaterial, sowie ein nicht-identifiziertes Nebenprodukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 4751,4 detektiert werden konnte.

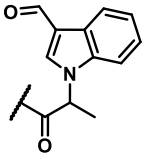
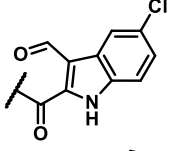
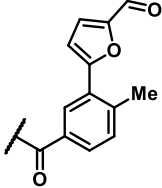
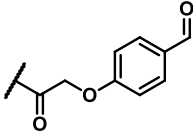
Validierung der ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate und Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion

**Tabelle 13:** Validierung einiger DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-1a, e, f, h - s** in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion.<sup>a</sup>



Eintrag	DNA-Aldehyd-Konjugat	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> <sup>c</sup> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	DNA-1h 	DNA-2al	70	4880,7 4881,3
2	DNA-1i 	DNA-2am	> 90	4844,6 4843,7
3	DNA-1j 	DNA-2an	> 90	4881,7 4881,4
4	DNA-1k 	DNA-2ao	> 90	4880,7 4880,9
5	DNA-1l 	DNA-2ap	> 90	4910,7 4910,1
6	DNA-1m 	DNA-2aq	80	4908,7 4908,8
7	DNA-1e 	DNA-2aj	> 90	4915,7 4915,0
8	DNA-1n 	DNA-2ar	> 90	4871,7 4872,0
9	DNA-1o 	DNA-2as	60	4894,7 4894,9
10	DNA-1p 	DNA-2at	> 90 <sup>d</sup>	4948,8 4949,1
11	DNA-1f 	DNA-2ak	25	4908,7 4908,9

Fortsetzung Tabelle 13

12	DNA-1q		DNA-2au	> 90	4908,7 4907,6
13	DNA-1r		DNA-2av	> 90	4915,1 4914,7
14	DNA-1s		DNA-2aw	> 90	4921,5 4920,8
15	DNA-1a		DNA-2b	> 90	4871,5 4870,9

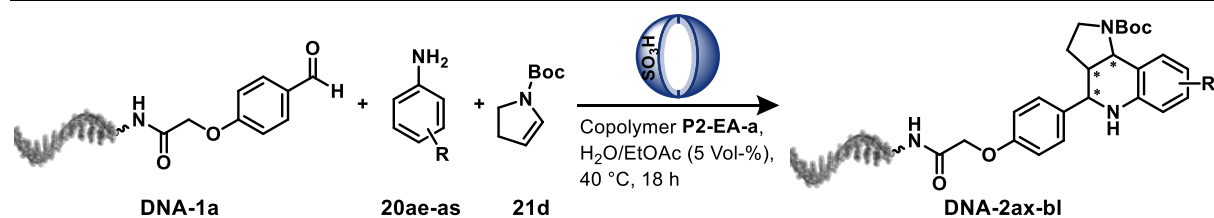
<sup>a</sup> Das DNA-Aldehyd-Konjugat (500 pmol) wurde mit 4-*tert*-Butylanilin **20b** (8000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (8000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und 5 Vol-% EtOAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. <sup>d</sup> Es konnte die Oxidation des DNA-Aldehydes zur Carbonsäure beobachtet werden. n.d. = nicht detektiert. Geschwungene Linie = Amidbindung zum C6-Aminolinker.

Die Auswahl der Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren schien für die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion geeignet zu sein, da sehr hohe Umsätze mit wenigen Nebenprodukten erhalten werden konnten.

Im Anschluss wurden 15 der für die DEL ausgewählten 39 Aniline auf die Reaktivität in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion getestet. Dazu wurde DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a** mit Anilin **20ae - as**, *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** und Copolymer **P2-EA-a** bei 40 °C über Nacht geschüttelt (siehe **Tabelle 14**). Die erhaltenen Produkte wurden mit der analytischen HPLC-Chromatographie und der MALDI-MS (siehe **Anhang Abbildung 98**) analysiert. Elf der 15 ausgewählten Aniline konnten in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit einem Umsatz von über 70 % zu dem gewünschten Produkt reagieren. Darunter befanden sich Aniline mit elektronenschiebenden, sowie elektronenziehenden Gruppen in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position und auch di-substituierte Aniline. Die Aniline **20af** und **20ag** (siehe **Tabelle 14**, Eintrag 2, 3) konnten nur mit einem Umsatz von 30 % und 35 % zu dem gewünschten Produkt reagieren. Beide Aniline verfügen jeweils über einen Substituenten in *ortho*- und *meta*-Position. Dabei ist der Substituent bei beiden Anilinen in *ortho*-Position sterisch anspruchsvoll, wodurch eventuell die Povarov-Reaktion gehindert werden könnte.

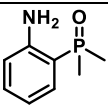
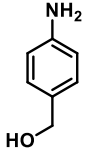

Validierung der ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate und Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion

**Tabelle 14:** Validierung einiger Aniline **20ae - as** in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion.<sup>a</sup>



Eintrag	Anilin	Produkt	Umsatz [%] <sup>b</sup>	$m/z$ <sub>berechnet</sub> $m/z$ <sub>gefunden</sub> <sup>c</sup>
1	<b>20ae</b> 	<b>DNA-2ax</b>	85	48471 4848,8
2	<b>20af</b> 	<b>DNA-2ay</b>	30	4907,2 4907,6
3	<b>20ag</b> 	<b>DNA-2az</b>	35	4911,2 4910,9
4	<b>20ah</b> 	<b>DNA-2ba</b>	> 90	4903,2 4903,1
5	<b>20ai</b> 	<b>DNA-2bb</b>	> 90	4847,1 4846,9
6	<b>20aj</b> 	<b>DNA-2bc</b>	> 90	4829,2 4830,4
7	<b>20ak</b> 	<b>DNA-2bd</b>	> 90	4879,6 4890,5
8	<b>20al</b> 	<b>DNA-2be</b>	> 90	4849,1 4849,8
9	<b>20am</b> 	<b>DNA-2bf</b>	n.d.	4849,1 n.d.
10	<b>20an</b> 	<b>DNA-2bg</b>	> 90	4829,2 4830,5
11	<b>20ao</b> 	<b>DNA-2bh</b>	> 90	4899,1 4899,3
12	<b>20ap</b> 	<b>DNA-2bi</b>	< 10	4906,1 4909,5

Fortsetzung Tabelle 14

13	20aq		DNA-2bj	75	4891,2 4891,5
14	20ar		DNA-2bk	> 90	4845,2 4845,1
15	20as		DNA-2bl	85	4833,1 4832,7

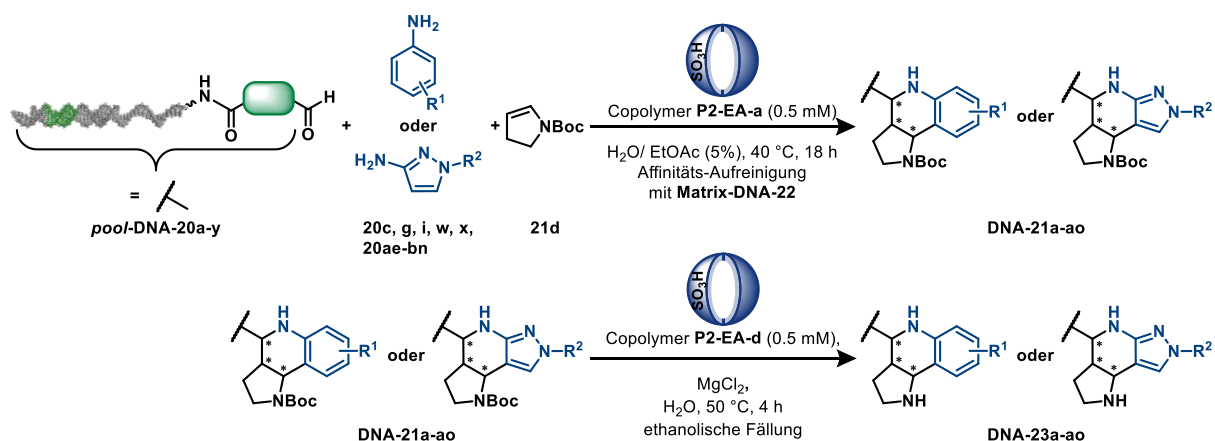
<sup>a</sup> Das DNA-Konjugat **DNA-1a** (500 pmol) wurde mit Anilin (8000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (8000 Äquiv.) und Copolymer **P2-EA-a** (50 Äquiv., 0,5 mM) in Wasser und 5 Vol-% EtOAc bei 40 °C über Nacht geschüttelt. <sup>b</sup> Der Umsatz wurde mit Hilfe der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt. <sup>c</sup> Das Masse-zu-Ladungsverhältnis wurde mit der MALDI-MS-Analyse gemessen. n.d. = nicht detektiert.

Lediglich die Aniline **20am** und **20ap** (siehe **Tabelle 14**, Eintrag 9, 12) konnten nur in Spuren, oder gar nicht das gewünschte Produkt bilden. Beide Aniline haben auch hier jeweils einen Substituenten in *ortho*- und *meta*-Position und könnten über eine sterische Abstoßung in der Reaktion gehindert worden sein. Dieses Argument wurde durch das Ergebnis der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit Anilin **20al** (siehe **Tabelle 14**, Eintrag 8) unterstützt. Bei diesem Anilin **20al** befindet sich die Hydroxy-Gruppe in *para*-Position statt in *meta*-Position (siehe **Tabelle 14**, Eintrag 9) und es konnte ein vollständiger Umsatz zu dem gewünschten Produkt **DNA-2be** beobachtet werden.

Insgesamt konnten 11 der 15 getesteten Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion das gewünschte Produkt mit sehr guten Umsätzen bilden. Somit waren die ausgewählten Aniline gut für die Synthese der Molekülbibliothek geeignet.

### 5.3.1.2.2. Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung

Die durch Computer-assistierte Methoden ausgewählten und kodierten Molekülbausteine **20ae - as** konnten erfolgreich in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion validiert werden und können somit für die Synthese der Molekülbibliothek eingesetzt werden. Dazu wurden die in **Kapitel 5.3.2** erfolgreich synthetisierten und kodierten DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-20a - y** anschließend vermischt, um das erste Gemisch der Molekülbibliothek **pool-DNA-20a - y** zu erhalten. Mit diesen Produkten aus dem ersten Syntheseyklus wurde nun die Copolymer-vermittelte Povarov Reaktion und Boc-Entschützung durchgeführt (siehe **Schema 19**). Die Etablierung dieser Reaktionen erfolgte in **Kapitel 3.2** und **3.3**. Als Molekülbaustein wurden die in **Kapitel 5.2** ausgewählten Amine **20c, g, i, w, x, ae - bn** (insgesamt 41 Moleküle) verwendet (siehe **Anhang Tabelle 46**).



**Schema 19:** Reaktionsschema der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung für den zweiten Synthesesyklus der Molekülbibliothek mit dem DNA-Aldehyd-*pool* **DNA-20a-y** und den Aminen **20c, g, i, w, x, ae - bn** als Molekülbausteine.

Die Amine **20c, g, i, w, x, ae - bn** wurden in Reaktionsgefäßen vorgelegt und in Ethylacetat gelöst. Anschließend wurde das *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** hinzugegeben, sowie die vermischten DNA-Aldehyd-Konjugate **pool-DNA-20a - y** (500 pmol). Das Copolymer **P2-EA-a** wurde zugefügt und bei 40 °C über Nacht geschüttelt. Nach der Reaktion wurde zuerst mit Ethylacetat extrahiert, um Überschüsse des Copolymers, sowie des Amins und Olefins zu entfernen. Anschließend wurde die Affinitäts-Aufreinigung durchgeführt. Dazu wurde eine **Matrix-DNA-22**, wie in **Kapitel 8.10.1** beschrieben, mit dem komplementären DNA-Oligonucleotid **DNA-22** (5'-TCCG TTCA CACC GACC T-3') zu der Primer-Region hergestellt. Diese wurde nun zu jeder Povarov-Reaktion hinzugegeben und der Aufreinigungsprozess wurde, wie in **Kapitel 8.10.6** beschrieben, durchgeführt. Die aufgereinigten Povarov-Produkte **DNA-21a - ao** wurden direkt für die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung eingesetzt. Dazu wurde das Copolymer **P2-EA-d** in Wasser mit Magnesiumchlorid gemischt, zu jedem Povarov-Produkt hinzugegeben und für 4 h bei 50 °C geschüttelt. Im Anschluss an die Reaktion wurden die Produkte **DNA-23a - ao** zweifach mittels der ethanolischen Fällung aufgereinigt. Nach dem Vermischen der DNA-Aldehyd-Konjugate **pool-DNA-20a - y** konnte die Produktbildung nicht mehr beobachtet werden, da nun ein komplexes Reaktionsgemisch vorliegt. Es konnte somit keine analytische HPLC-Chromatographie und auch keine MALDI-MS Analyse durchgeführt werden. Es konnte ausschließlich die Menge der erhaltenen Produkte mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt werden (siehe **Anhang Tabelle 46**).

Für den letzten Synthesesyklus der Molekülbibliothek sollten etwa 100 pmol pro DNA-Konjugat **DNA-23a - ao** verwendet werden, um eine Derivatisierung dieser DNA-Konjugate mit 107 verschiedenen Carbonsäuren in einem 30 pmol-Maßstab zu ermöglichen.

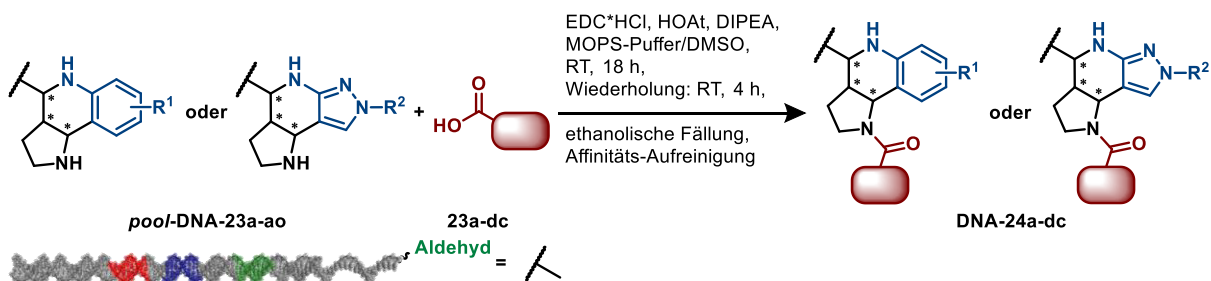
$$n_{\text{total Zyklus 3}} = 30 \text{ pmol} * 107 = 3.210 \text{ pmol}$$

$$n_{\text{DNA-23a - ao}} = \frac{3.210 \text{ pmol}}{41} = 78,3 \text{ pmol}$$

Da die Ausbeuten der DNA-Konjugate **DNA-23a - ao** im Bereich von 240 pmol bis 450 pmol lagen, konnte die Synthese der Molekülbibliothek mit allen DNA-Konjugaten **DNA-23a - ao** fortgesetzt werden. Die verwendeten Amine **20c, g, i, w, x, ae - bn** wurden in einem Ligationsschritt mit Barcode *IIII'* kodiert (siehe **Kapitel 5.3.2**) und zu **pool-DNA-23a - ao** vereinigt.

### 5.3.1.3. Zyklus 3 - Derivatisierung der DNA-Konjugate über eine Amidsynthese

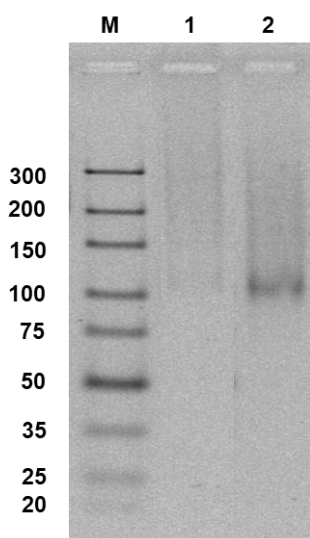
Im Anschluss an den zweiten Syntheseyklus sollte eine Amidsynthese mit 107 ausgewählten Carbonsäuren (siehe **Anhang Tabelle 47**) durchgeführt werden. Dazu wurde zuerst der Barcode *IIII'* mit dem enthaltenen endständigen Primer angefügt, indem der **pool-DNA-23a - ao** auf 107 Reaktionsgefäße aufgeteilt und über eine enzymatische Ligation ligiert wurde (siehe **Kapitel 5.3.2**). Im Anschluss wurden die Carbonsäuren **23a - dc** mit HOAt, EDC<sup>+</sup>HCl und DIPEA aktiviert und zu den aufgereinigten Ligationsprodukten hinzugegeben. Diese Amidsynthese wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit frisch aktivierter Carbonsäure für weitere vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (siehe **Schema 20**).<sup>[196]</sup>



**Schema 20:** Reaktionsschema der Amidsynthese für den dritten Syntheseyklus der Molekülbibliothek mit dem **pool-DNA-23a - ao** und den Carbonsäuren **23a - dc** als Molekülbausteine.

Nach der Reaktion wurden die Produkte zunächst dreifach mittels einer ethanolischen Fällung gereinigt, um Überschüsse der Reagenzien und Carbonsäuren zu entfernen. Da die DNA-Konjugate bereits kodiert wurden, konnten die aufgereinigten Proben anschließend vereinigt werden und lieferten den finalen **pool-DNA-24a - dc** (MiDEL). Die Molekülbibliothek wurde in einem letzten Schritt zusätzlich zu der ethanolischen Fällung über die Affinitäts-Aufreinigung gereinigt. Dieser Schritt war nötig, da selbst nach der ethanolischen Fällung noch sichtbare Verunreinigungen in dem Rückstand zu beobachten waren (siehe **Anhang Abbildung 101**). Diese Verunreinigungen könnten sowohl von den Reagenzien, als auch von den Carbonsäuren der Amidsynthese verursacht worden sein.

Die verwendeten Carbonsäuren wiesen unterschiedliche Löslichkeiten, z.B. in Ethanol, auf, weshalb nicht alle über eine ethanolische Fällung entfernt werden konnten. Um diese Verunreinigungen zu entfernen und somit die Qualität der Molekülbibliothek zu verbessern, wurde die in **Kapitel 4** etablierte Affinitäts-Aufreinigung angewendet. Dazu wurde die gleiche **Matrix-DNA-22** verwendet, die auch schon für die Aufreinigung der Produkte der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion eingesetzt wurde (siehe **Kapitel 5.3.1.2.2**). Dies ist möglich, da der DNA-Einzelstrang **DNA-22**, welcher an die Matrix gebunden wurde, komplementär zu der beginnenden Primer-Sequenz ist. Diese Primer-Sequenz wurde als Startmaterial für die Synthese der Molekülbibliothek verwendet. Für die Affinitäts-Aufreinigung wurde die **Matrix-DNA-22** zu der Molekülbibliothek hinzugegeben und, wie in **Kapitel 8.10.6** beschrieben, verwendet. Vor und nach dieser Aufreinigung wurde mittels der UV-Vis-Absorption die erhaltene DNA-Menge analysiert. Dabei konnte deutlich eine Abnahme der Menge an **MiDEL** von 6,5 nmol vor der Aufreinigung zu etwa 500 pmol nach der Affinitäts-Aufreinigung beobachtet werden. Durch eine Analyse mit Hilfe der Gel-Elektrophorese konnte allerdings beobachtet werden, dass die gleiche eingesetzte Menge (je 25 pmol nach UV-Vis-Absorptionsmessung) für die Gel-Elektrophorese bei der Probe vor der Aufreinigung zu keiner Bande führte, wohingegen die Probe nach der Aufreinigung eine Bande bei der gewünschten Länge an Basen zeigte (siehe **Abbildung 44**).



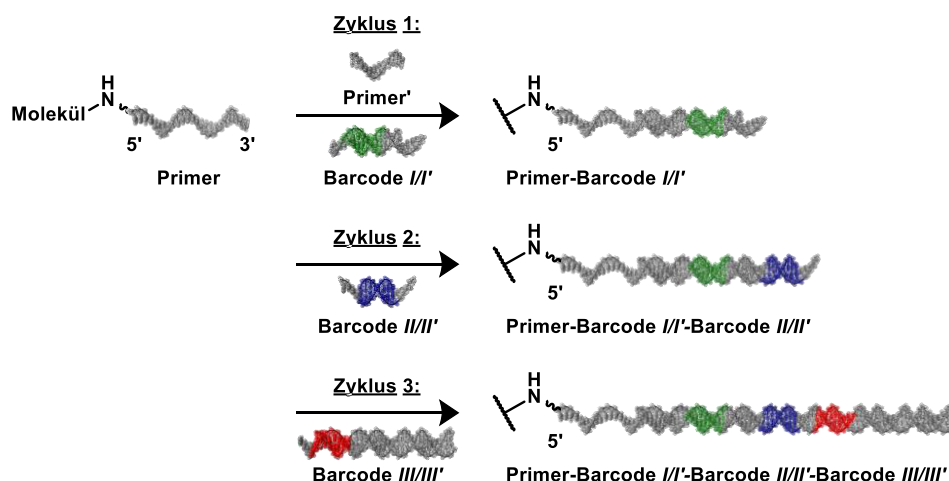
**Abbildung 44:** Visualisierung der **MiDEL** vor und nach der Affinitäts-Aufreinigung mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*); 1 = 25 pmol der **MiDEL** vor der Affinitäts-Aufreinigung; 2 = 25 pmol der **MiDEL** nach der Affinitäts-Aufreinigung.

Dadurch wurde deutlich, dass nach der ethanolischen Fällung noch sehr viele Kontaminationen in der Probe enthalten waren, wodurch die Messung der UV-Vis-Absorption gestört wurde. Im Anschluss an die Affinitäts-Aufreinigung konnte die gewünschte Bande beobachtet werden, wodurch die finale Molekülbibliothek weniger Kontaminationen enthielt und somit der Wert der UV-Vis-Absorption nicht verfälscht wurde.



### 5.3.2. Kodierung der Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek

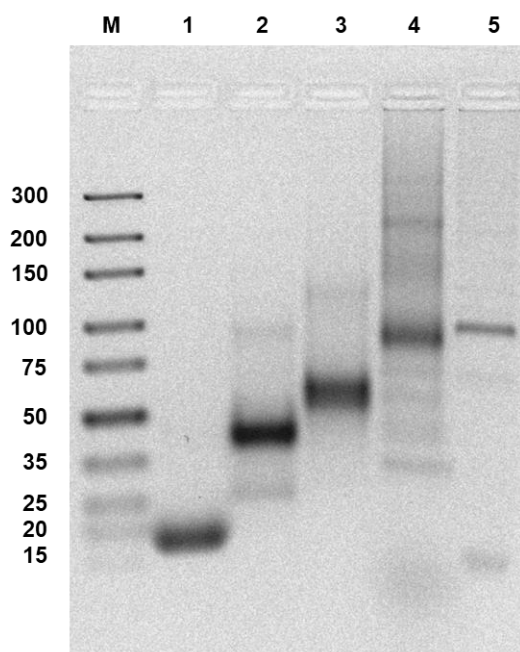
In diesem Kapitel wird nun die Kodierung der einzelnen Molekülbausteine beschrieben. Die verwendeten Barcodes, sowie die Zuordnung zu den Molekülbausteinen sind im Anhang aufgelistet (siehe **Anhang Tabelle 45 - 47**). Die Kodierung erfolgte in drei Einzelschritten über eine enzymatische Ligation (siehe **Abbildung 45**). Dabei wurden komplementäre DNA-Stränge als Überhänge (*sticky ends*) und die T4 DNA-Ligase verwendet.<sup>[206]</sup>



**Abbildung 45:** Kodierschema der enzymatischen Ligationen der Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek.

Der erste Zyklus wurde mit der Phosphorylierung der 5'-Enden der DNA Barcodes *I* und *I'*, sowie einer verkürzten Primer'-Sequenz begonnen. Die Barcodes *III'* sollten dabei die verschiedenen Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren **64a** und **64d - aa** kodieren. Die verkürzte Primer'-Sequenz enthielt eine komplementäre Region zu dem Primer und zu Barcode *I*, wodurch eine Verknüpfung dieser beiden Stränge ermöglicht werden sollte. Zudem wurde ein verkürzter Primer' verwendet, um eine freie Region für die Affinitäts-Aufreinigung zu erhalten. Nach erfolgter Phosphorylierung wurden die DNA-Stränge hybridisiert, über Nacht ligiert und anschließend wurde die T4 DNA-Ligase inaktiviert. Diese erste Ligation wurde mit 1 nmol der jeweiligen DNA-Stränge und der DNA-Aldehyde-Konjugate **DNA-20a - y** durchgeführt, um den nachfolgenden Syntheseschritt der Molekülbibliothek mit 41 Molekülbausteinen in einem Maßstab von 500 pmol durchführen zu können. Die Produkte wurden zweifach durch eine ethanolische Fällung aufgereinigt und mittels einer Gel-Elektrophorese analysiert (siehe **Abbildung 46**, Linie 2, **Anhang Abbildung 95**). Dabei konnte eine Verschiebung zu einer höheren Anzahl an Basenpaaren im Vergleich zu der Primer-Sequenz (siehe **Abbildung 46**, Linie 1) beobachtet werden. Die entstandene Sequenz sollte eine Länge von 41 Basenpaaren aufweisen und konnte in dem Agarose-Gel anhand des Markers zwischen 35 und 50 Basenpaaren detektiert werden.

Der Primer-DNA-Strang lief deutlich unter den enthaltenen 25 Basen, da es sich hierbei um einen Einzelstrang handelt und der Marker für die Gel-Elektrophorese für Basenpaare ausgelegt ist. Nach einer erfolgreichen ersten Ligation konnte mit der chemischen Synthese der Molekülbibliothek fortgesetzt werden. Im Anschluss an die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung fand die zweite Ligation statt. Dieser zweite Ligationsschritt wurde mit 500 pmol der Produkt-Konjugate **DNA-23a - ao** und der dazugehörigen DNA-Sequenzen durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Barcodes *III'*, welche die Povarov-Reaktion kodierten, phosphoryliert. Anschließend wurden die Produkte der Molekülbibliothek mit den Barcodes *III'* zusammengegeben, hybridisiert und über Nacht ligiert. Nach erfolgter Inaktivierung der T4 DNA-Ligase wurden die Produkte zweifach über eine ethanolische Fällung aufgereinigt und mittels der Gel-Elektrophorese analysiert. Dabei konnte ein deutlicher Anstieg der Anzahl der Banden auf 50-75 Basenpaare beobachtet werden (siehe **Abbildung 46**, Linie 3, **Anhang Abbildung 99**). Dieser Bereich entspricht der gewünschten Anzahl an Basen mit 53 Basenpaaren. Dabei konnten 20,5 nmol des **pool-DNA-23a - ao** hergestellt werden.



**Abbildung 46:** Visualisierung der Kodierung der einzelnen Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*); 1 = 200 pmol des Primers; 2 = Ligation der DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-20a - y** mit Barcode *I'*; 3 = Ligation der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit Barcode *III'*; 4 = Ligation der Derivatisierung der Carbonsäuren **23a - dc** mit Barcode *III/III'*; 5 = **MIDEL** nach erfolgter Affinitäts-Aufreinigung.

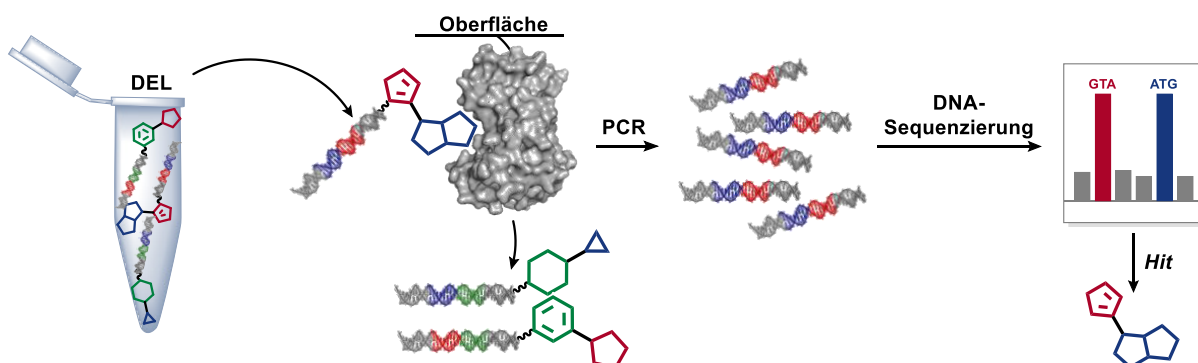
Direkt im Anschluss an die erfolgreiche zweite Ligation wurde der dritte Barcode *III/III'* mit der endständigen Primer-Sequenz angefügt. Dazu wurde erneut das 5'-Ende des Barcodes *III* phosphoryliert. Im Anschluss wurde das Produkt der zweiten Ligation mit dem phosphorylierten Barcode *III*, sowie mit Barcode *III'* hybridisiert, ligiert und inaktiviert. Dabei wurde die Ligation mit 30 pmol des **pool-DNA-23a - ao** und der zu ligierenden DNA-Sequenzen angesetzt. Nach der erfolgten dritten Ligation wurde ebenfalls zweifach eine ethanolische Fällung durchgeführt und der Erfolg der Ligation mit Hilfe der Gel-Elektrophorese untersucht.

Dabei konnte eine deutliche Verschiebung der Anzahl der Banden auf 75-100 Basenpaare beobachtet werden (siehe **Anhang Abbildung 100**). Dies entspricht der gewünschten Anzahl an Basenpaaren von 88. Im Anschluss an den letzten Syntheseschritt konnte nun die finale DNA-kodierte Molekülbibliothek vereinigt werden und über eine anschließende Affinitäts-Aufreinigung gereinigt werden (siehe **Abbildung 46**, Linie 5). Die Analyse der **MiDEL** vor und nach der Affinitäts-Aufreinigung mit der Gel-Elektrophorese zeigten erneut, dass eine zusätzliche Aufreinigung deutlich zu der Qualität der Molekülbibliothek beiträgt. So kann bei der zusätzlich aufgereinigten Molekülbibliothek nur eine definierte Bande bei der gewünschten Anzahl an Basenpaaren (88 Basenpaare, siehe **Abbildung 46**, Linie 5) beobachtet werden, wohingegen die Molekülbibliothek nach der ethanolischen Fällung zu vielfachen Banden führt (siehe **Abbildung 46**, Linie 4).

Dieser Unterschied zeigt deutlich, dass die bisher verfügbaren Aufreinigungsmethoden zu sehr verunreinigten Molekülbibliotheken führen. Die in **Kapitel 4** etablierte Affinitäts-Aufreinigung konnte sowohl für die Entwicklung neuer Chemien an DNA-Konjugaten eingesetzt, sowie auch erfolgreich für die Aufreinigung einer Molekülbibliothek angewendet werden.

## 5.4 Selektionsexperimente der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek mit diversen Proteinen

Durch eine Amidsynthese, eine Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion, eine Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung, sowie eine weitere Amidsynthese konnte eine Molekülbibliothek **MiDEL** mit 105.288 Mitgliedern erfolgreich hergestellt werden. Dabei konnte die Qualität der Molekülbibliothek durch die in **Kapitel 4** etablierte Affinitäts-Aufreinigung verbessert werden. Diese aufgereinigte Molekülbibliothek sollte nun in Selektionsexperimenten (Selektionsassays) mit verschiedenen Proteinen getestet werden, um mögliche bioaktive Moleküle zu identifizieren (siehe **Abbildung 47**).



**Abbildung 47:** Selektionsexperiment einer DNA-kodierten Molekülbibliothek mit einem immobilisierten Protein (*protein of interest*, POI, hier: PDB-Code: 6QFL) mit anschließender PCR (*polymerase chain reaction*) und DNA-Sequenzierung zur Identifizierung möglicher bioaktiver Moleküle (*Hits*).

Eine viel verwendete Strategie, um die DEL in einem Selektionsassay zu testen, ist die Immobilisierung der Zielstruktur an magnetischen Kügelchen. Dafür wurde das gewünschte Protein mit Histidinen markiert, was eine Koordinierung an den magnetischen Kügelchen immobilisierten Nickel-Ionen ermöglicht.<sup>[207,208]</sup> Um eine unspezifische Adsorption des Proteins an die magnetischen Kügelchen zu reduzieren und zusätzlich freie Histidin-Bindestellen zu blockieren, wurden die magnetischen Kügelchen nach der Immobilisierung des Proteins mit einer Waschlösung mit enthaltenem Bovinem Serumalbumin behandelt. Anschließend wurde die aufgereinigte **MiDEL** (250 fmol) mit dem immobilisierten Protein (5 µg) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nicht-bindende Moleküle wurden durch acht Waschschrte entfernt. Die gebundenen Moleküle wurden durch eine Hitzedenaturierung des Proteins bei 80 °C für 5 min eluiert. Mit diesem Eluat wurde das Selektionsexperiment mit einem frisch immobilisierten Protein wiederholt. Im Anschluss an den zweiten Selektionszyklus wurden die DNA-Sequenzen der gebundenen Moleküle mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Zudem wurde die Molekül-Sequenz durch eine zweite PCR mit Adapter-Sequenzen verlängert und in einem dritten PCR-Experiment Selektionsexperiment-spezifische DNA-Barcodes angefügt. Dadurch sollte ein Auslesen der DNA-Sequenzen nach dem Prinzip der Illumina-Sequenzierung (*next generation sequencing*) ermöglicht werden. Die Adapter-Sequenzen, sowie die Selektionsexperiment-spezifischen DNA-Barcodes sind im Anhang aufgelistet (siehe **Anhang Tabelle 40, 48**).

Es wurden während der Selektionsexperimente verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurde die Molekülbibliothek mit magnetischen Kügelchen inkubiert, welche nicht mit einem Protein versehen waren (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 9). Dadurch sollten Moleküle gefunden werden, die nicht spezifisch an das Protein gebunden haben, sondern an die magnetischen Kügelchen. Zudem sollte eine Validierung des Prozesses des Selektionsexperiments, bestehend aus dem Inkubieren der Molekülbibliothek, dem Herauswaschen von nicht-bindenden Molekülen, sowie dem Eluieren der bindenden Moleküle, ermöglicht werden. Dafür wurde in dem letzten Syntheseschritt der Molekülbibliothek  $\alpha$ -Desthiobiotin **23dc** als Carbonsäure-Baustein verwendet. Die mit diesem Baustein diversifizierten Moleküle sollten in einem Selektionsexperiment an magnetische Kügelchen binden, welche mit dem Protein Streptavidin modifiziert waren (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 10). Dieses Protein ist in der Lage, Biotin mit einer hohen Affinität zu binden und wird somit häufig für viele Markierungs- und Selektionsexperimente eingesetzt.<sup>[209–212]</sup> Zudem wurde die Molekülbibliothek direkt mit Hilfe der drei PCRs amplifiziert und verlängert, ohne dass ein Selektionsexperiment durchgeführt wurde. Das Ergebnis sollte als Ausgangswert dienen, um die Verteilung der einzelnen Moleküle, bzw. der DNA-Stränge, in der Molekülbibliothek zu bestimmen (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 17).

Es wurden verschiedene Proteine in den Selektionsexperimenten mit den oben beschriebenen Bedingungen verwendet (siehe **Tabelle 15**).

**Tabelle 15:** Eingesetzten Proteine und verwendete Bedingungen für die Selektionsexperimente zur Identifizierung von *Hit*-Strukturen der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek, sowie die berechneten Stoffmengen der aufgereinigten PCR-3-Produkte.

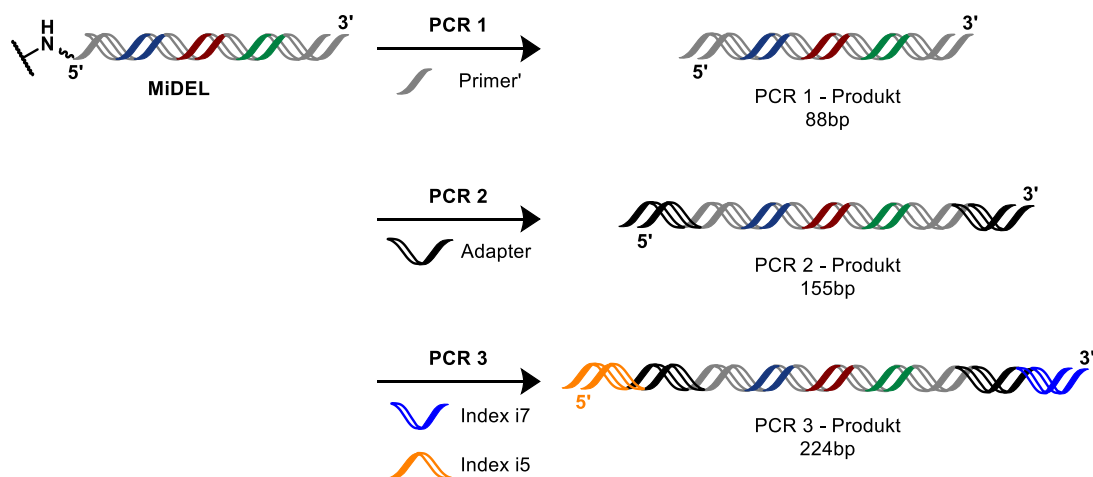
Eintrag	Protein	magnetische Kügelchen	Abweichungen von den Standard-Bedingungen <sup>a</sup>	Eluat [pmol] <sup>b</sup>
1	MKK-7	Ni-NTA		9,9
2	hTEAD4	Ni-NTA		11,6
3	MDM2	Ni-NTA		8,4
4	Bcl-xL	Ni-NTA		15,8
5	XIAP	Ni-NTA		13,9
6	NKD2	Ni-NTA		14,7
7	CXCL4	Ni-NTA		12,9
8	BAG3	Ni-NTA		14,6
9	-	Ni-NTA	kein immobilisiertes Zielprotein	16,8
10	-	Streptavidin	Streptavidin-Kügelchen	14,5
11	hTEAD4palm.	Ni-NTA	palmityliertes hTEAD4	13,3
12	hTEAD4	Ni-NTA	10 µg Protein	20,5
13	hTEAD4	Ni-NTA	500 fmol <b>MIDEL</b>	20,0
14	hTEAD4	Ni-NTA	Wiederholung Eintrag Nr. 2	22,0
15	hTEAD4	Ni-NTA	Denaturierung des Proteins bei 80 °C für 5 min.	20,0
16	hTEAD4	Ni-NTA	3 aufeinanderfolgende Selektionsrunden	17,2
17	-	-	amplifizierte <b>MIDEL</b>	17,2

<sup>a</sup> Das Protein (5 µg) wurde an den magnetischen Kügelchen immobilisiert und anschließend mit der **MIDEL** (250 fmol) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die nicht-bindenden Moleküle durch Waschschriffe entfernt und die gebundenen Moleküle durch eine Hitzedenaturierung bei 80 °C für 5 min eluiert. Die DNA-Sequenzen der gebundenen Moleküle wurden amplifiziert und aufgereinigt. <sup>b</sup> Die Menge der aufgereinigten PCR-3-Produkte wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

Für das Protein hTEAD wurden zusätzlich noch verschiedene Bedingungen im Selektionsexperiment getestet. Zum einen wurde die Menge an immobilisiertem Protein auf 10 µg und zum anderen die Menge an inkubierter Molekülbibliothek auf 500 fmol verdoppelt (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 12, 13). Zudem wurde das Protein hTEAD durch eine posttranslationale Palmitoylierung an der hydrophoben Bindetasche im Zentrum der YAP-bindenden Domäne verändert und ebenfalls in einem Selektionsexperiment getestet (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 11). Sollte eine Bindung von Molekülen aus der Molekülbibliothek detektiert werden, so könnte dies entweder auf eine erhöhte Bindungsaffinität hinweisen, oder aber auf einen anderen Bindungsmodus.<sup>[213–215]</sup>

Ein zusätzliches Kontrollexperiment mit dem Protein hTEAD sollte eine unspezifische Bindung an das denaturierte Protein ausschließen (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 15). Dazu wurde das Protein zuerst an die magnetischen Kügelchen über eine Histidin-Markierung gebunden. Anschließend wurde das Protein bei 80 °C für 5 min denaturiert. Mit diesem immobilisierten und denaturierten Protein wurde nun die Molekülbibliothek inkubiert und auf bindende Moleküle hin untersucht. Dieses Kontrollexperiment wurde durchgeführt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass während des Selektionsexperiments auch denaturiertes Protein vorlag und Moleküle an dieses gebunden haben. Daher sollten durch das Kontrollexperiment jene Moleküle herausgefunden werden, die an das denaturierte Protein gebunden haben. Des Weiteren wurden in einem hTEAD-Selektionsexperiment drei Selektionszyklen anstelle von zwei Zyklen nacheinander durchgeführt (siehe **Tabelle 15**, Eintrag 16). Dabei sollten nur starke Binder den dritten Selektionszyklus überstehen und in dem Eluat wiedergefunden werden.

Nach den erfolgten Selektionsexperimenten sollten die DNA-Sequenzen der bindenden Moleküle vervielfältigt und verlängert werden (siehe **Abbildung 48**). Diese PCR-Experimente wurden zuvor mit der **MiDEL** optimiert.

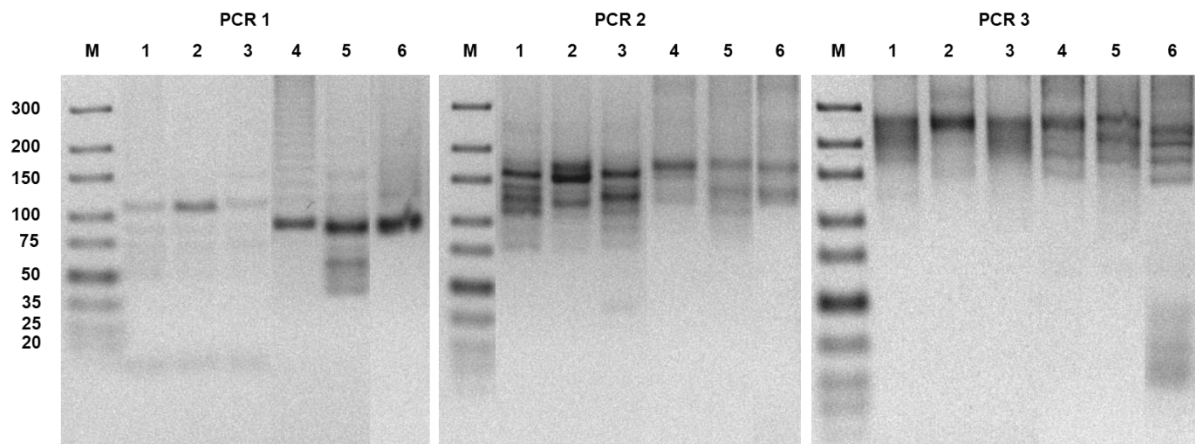


**Abbildung 48:** Schema der Polymerase-Kettenreaktionen PCR 1 - 3 für die Vervielfältigung und Verlängerung der DNA-Sequenzen der bindenden Moleküle aus dem Selektionsexperiment für das *next generation sequencing*.

Bei dem ersten PCR-Experiment sollten die DNA-Sequenzen der bindenden Moleküle nur vervielfältigt und nicht verlängert werden. Dazu wurden genau die komplementären Primer-Sequenzen (*forward/ reverse primer*) verwendet. Als optimierte Bedingungen konnte eine Annealing-Temperatur von 64 °C und eine Zyklenzahl von 25 bestimmt werden. In dem zweiten PCR-Experiment sollten die DNA-Stränge um eine Adapter-Sequenz (*forward/ reverse adapter*) für das *next generation sequencing* (Illumina) verlängert werden. Dabei konnte mit einer Zyklenzahl von 8 die Produktbande beobachtet werden und nur geringe Nebenprodukte erhalten werden.

In dem dritten PCR-Experiment sollte für jedes Selektionsexperiment eine spezifische Kombination des Index i5 und i7 an den verlängerten DNA-Strang angefügt werden, um die einzelnen Selektionsexperimente nach dem dritten PCR-Experiment vermischen zu können. Dafür wurde die Annealing-Temperatur auf 55 °C reduziert und eine Zyklenzahl von 15 verwendet. Mit diesen Bedingungen konnte die gewünschte Bande mit Hilfe der Gel-Elektrophorese bestimmt werden.

Somit konnten nun die PCR-Experimente für die Eluate der Selektionsexperimente durchgeführt und über die Gel-Elektrophorese analysiert werden (siehe **Abbildung 49** und **Anhang Abbildung 102 - 104**). Die Ergebnisse der Amplifikationen der Selektionsexperimente mit den Proteinen MKK-7, hTEAD und MDM2 (**Tabelle 15**, Eintrag 1 - 3), sowie der Kontrollexperimente (**Tabelle 15**, Eintrag 9, 10, 17) sind in **Abbildung 49** dargestellt. Dabei konnte für die Vervielfältigung der DNA-Sequenzen jeweils eine Bande bei den gewünschten 88 Basenpaaren beobachtet werden. Die Banden der Selektionsexperimente mit den Proteinen MKK-7, hTEAD und MDM2 wiesen eine geringere Konzentration auf als die Kontrollexperimente, wodurch die Bande in dem Gel vermutlich ein anderes Laufverhalten aufwies und somit eine Bande bei etwas über 100 Basenpaaren zeigte (siehe **Abbildung 49**, PCR 1, Spuren 1-3).



**Abbildung 49:** Visualisierung der drei PCR-Vervielfältigungen der Selektionsexperimente (siehe **Tabelle 15**) mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel).

M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*); 1 - 3 = Selektionsexperimente mit verschiedenen Proteinen (**Tabelle 15**, Eintrag 1 - 3); 4 = Selektionsexperiment mit magnetischen Kügelchen ohne immobilisiertes Protein (**Tabelle 15**, Eintrag 9); 5 = Selektionsexperiment mit Streptavidin-immobilisierten magnetischen Kügelchen (**Tabelle 15**, Eintrag 10); 6 = PCR-Vervielfältigung der **MIDEL** ohne Selektionsexperiment (**Tabelle 15**, Eintrag 17).

Nach dem zweiten PCR-Experiment, der Verlängerung mit den Adapter-Sequenzen für die Sequenzierung, konnte für alle Experimente ein Anstieg der Banden auf etwa 150 Basenpaare beobachtet werden (siehe **Abbildung 49**, PCR 2, Spuren 1-6). Es konnte noch eine weitere prominente Bande bei etwa 125 Basenpaaren detektiert werden. Dies könnte auf eine unvollständige PCR hindeuten. Im Anschluss wurde die dritte PCR durchgeführt. Dabei wurden die Selektionsexperiment-spezifischen DNA-Barcodes angefügt und die DNA-Stränge dabei auf etwa 224 Basenpaare verlängert.

Dies konnte mit Hilfe der Gel-Elektrophorese bestätigt werden (siehe **Abbildung 49**, PCR 3, Spur 1-6). Die finalen PCR-3-Produkte wurden nachfolgend mit einem Aufreinigungs-Kit gereinigt, um verbliebene Polymerase und Nebenprodukte der PCR zu entfernen. Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt. Dabei lagen die Werte zwischen 8,4 pmol und 22 pmol (siehe **Tabelle 15**). Anschließend wurden diese Proben äquimolar vereinigt und durch die Firma *CeGaT* über das *next generation sequencing* analysiert. Zu Beginn wurde die Qualität der gepoolten Bibliothek mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Quantifizierungsmethode und einer Fragmentlängenanalyse untersucht. Für die Probe konnte ein Q30-Wert von 88,08 % erhalten werden. Daraus folgt, dass etwa 90 % der sequenzierten Basen einen Phred-Score  $\geq 30$  haben. Dies ist ein Maß für die Qualität der DNA-Sequenzierung. Ein Phred-Score von 30 für eine Base bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für ein falsches Auslesen dieser Base bei 1 zu 1000 liegt. Da für etwa 90 % der sequenzierten Basen ein Phred-Score von  $\geq 30$  bestimmt werden konnte, wurde die Qualitätskontrolle bestanden und die Probe konnte anschließend sequenziert werden. Dabei konnten für die einzelnen Selektionsassays zwischen 500.000 und 900.000 Datenpunkte (*Reads*) erhalten werden. Diese Menge an Daten wird nun mit einem Algorithmus ausgewertet. Der Algorithmus wurde von *Lukas Arendt*, *Ina Dormuth* und *Nils Jannik Schüßler* (Prof. Dr. Jörg Rahnenführer und Prof. Dr. Roland Fried, Fakultät für Statistik, TU Dortmund) entwickelt und optimiert. Dadurch können die jeweiligen Anreicherungsfaktoren von bestimmten Molekülen in den einzelnen Selektionsexperimenten bestimmt werden und anschließend potenziell bioaktive Moleküle extrahiert und validiert werden.



## 6. Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln

Im Laufe dieser Arbeit wurden chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten in Lösung mit Hilfe von amphiphilen Copolymeren, die eine katalytisch-aktive Einheit immobilisiert hatten, etabliert und für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek angewendet (siehe **Kapitel 3** und **5**). Das genutzte Lösungsmittel war, aufgrund der Löslichkeit des vielfach negativ geladenen DNA-Startmaterials, Wasser. Dazu konnten Co-Lösungsmittel gegeben werden, um die organischen Reagenzien zu lösen. Die starke Hydrophilie des DNA-Stranges birgt Einschränkungen in der Wahl der durchzuführenden chemischen Reaktion, da viele Reaktionen nur unter Ausschluss von Wasser erfolgreich ablaufen. Die schwach (Brønsted) saure und basische Aktivität, sowie die Nucleophilie des Sauerstoffatoms eines Wassermoleküls können einen negativen Einfluss auf den Reaktionsverlauf haben, was zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann. Für die Etablierung von chemischen Reaktionen an DNA-Konjugaten wurden daher verschiedene Strategien entwickelt, um Wasser als Lösungsmittel zu vermeiden.<sup>[26,216]</sup> Dabei wurde die DNA entweder kovalent oder reversibel an einer festen Phase immobilisiert, oder soweit chemisch modifiziert, dass eine Löslichkeit der DNA in organischen Lösungsmitteln ermöglicht werden konnte. Die *Arbeitsgruppe Brunschweiler* nutzte an poröse Glaskügelchen (*controlled pore glass*, CPG) kovalent gebundene DNA-Startmaterialien für die Etablierung neuer chemischer Reaktionen. Dieser Ansatz ermöglichte die Reduzierung von Wasser durch eine Trocknung der Glaskügelchen und die Verwendung von organischen Lösungsmitteln. Mit dieser Methode konnte beispielsweise die Castagnoli-Cushman-Reaktion, eine (1,3)-Cycloaddition und eine *aza*-Diels-Alder Reaktion erfolgreich durchgeführt werden.<sup>[95,96]</sup> Um organische Lösungsmittel für chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten zu verwenden, wurde neben der kovalenten Bindung auch eine reversible Bindung der DNA an eine feste Phase beschrieben. In 2004 verwendeten *Harbury et al.* Diethylaminoethanol (DEAE) gebunden an Sepharose als feste Phase, um DNA-Stränge über ionische Wechselwirkungen reversibel zu binden. Anschließend konnte die DNA, gebunden an die feste Phase, in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, wie MeOH, DMSO, DMF, EtOAc oder CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, suspendiert werden. Nach der erfolgten Reaktion konnte die DNA mit einer wässrigen Pufferlösung wieder von der festen Phase entfernt werden. Durch diese Methode konnten verschiedene Amidsynthesen, sowie auch die Click-Reaktion, erfolgreich in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.<sup>[80,104]</sup> Inspiriert von diesem Prinzip verwendeten *Dawson et al.* eine inerte, nicht quellende feste Phase basierend auf Polystyrol mit immobilisierten quaternären Ammonium-Gruppen, um das DNA-Startmaterial reversibel an diese feste Phase zu binden. Dabei konnten verschiedenste organische Lösungsmittel, wie CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, DMF, 1,4-Dioxan, DMSO, MeCN und DMA, für die Entwicklung von chemischen Reaktionen verwendet werden.

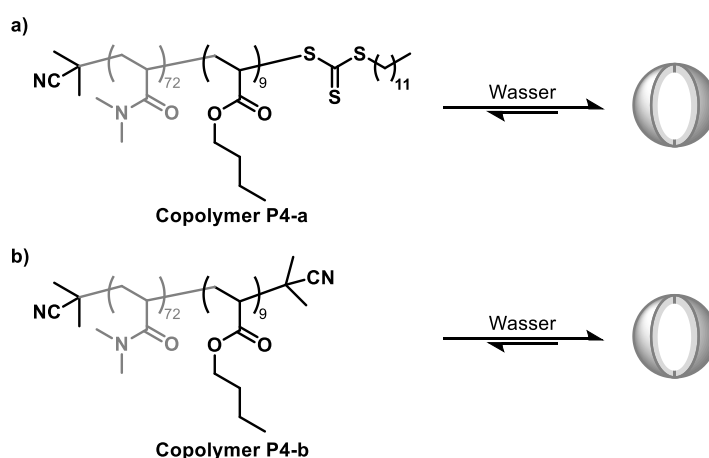
Mit dieser Methode konnte eine  $C(sp^2)$ - $C(sp^3)$ -Kreuzkupplung, eine elektrochemische Aminierung, eine reduktive Aminierung, sowie eine kontrollierte ortsspezifische Biokonjugation durchgeführt werden.<sup>[100,217]</sup> Zur selben Zeit entwickelten *Berst et al.* ebenfalls eine alternative feste Phase für die Löslichkeit von DNA in organischen Lösungsmitteln. Sie verwendeten ein kationisches, amphiphiles Polymer auf Polyethylenglykol (PEG)-Basis, welches ebenfalls eine reversible Bindung und Elution von DNA-Startmaterialien und eine chemische Reaktion unter wasserfreien Bedingungen ermöglichte. Dabei konnte eine Umpolungsreaktion, eine Heterozyklen-Reaktion basierend auf dem Zinn (Sn)-Amin-Protokolls (SnAP) und eine Photoredox-Decarboxylierungs-Kreuzkupplung erfolgreich durchgeführt werden.<sup>[101]</sup> Neben den Immobilisierungs-Methoden wurden auch Strategien vorgestellt, bei denen keine feste Phase für die Lösung von DNA-Molekülen in organischen Lösungsmitteln benötigt wird. *Ito et al.* modifizierten dafür einen DNA-Strang mit einer Polyethylenglykol-Einheit (PEG) und konnten so die modifizierte DNA in 1,4-Dioxan, 1,2-Dichlorethan, Acetonitril und Methanol lösen.<sup>[218]</sup> Um eine Modifikation der DNA zu umgehen, verwendeten *Herrmann et al.* ein kationisches Tensid (Didodecyldimethylammoniumbromid, DDAB), um die DNA zu komplexieren und in organischen Lösungsmitteln, wie DMF, DMSO, THF und  $CHCl_3$  zu lösen.<sup>[219]</sup> Inspiriert von der von *Herrmann et al.* beschriebenen Methode sollten in dieser Arbeit amphiphile Copolymere verwendet werden, um DNA für die chemische Synthese in diversen organischen Lösungsmitteln zu lösen.

### **6.1 Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln**

Um DNA-Startmaterialien in organischen Lösungsmitteln lösen zu können, sollten amphiphile Copolymere verwendet werden. Diese sollten eine ähnliche Struktur aufweisen, wie die Copolymere, die in den **Kapiteln 3** und **5** eingesetzt wurden, da bereits bekannt war, dass diese Copolymere eine starke Interaktion mit der DNA gelöst in Wasser eingehen.<sup>[161]</sup> Allerdings sollte keine katalytisch aktive Einheit in diesen Copolymeren immobilisiert sein. Nach der Auswahl der Copolymere sollten erste Löslichkeitsexperimente in verschiedenen organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Zudem sollte die Interaktion der Copolymere mit der DNA in organischen Lösungsmitteln mit Hilfe der UV-Vis-Absorption und der dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht werden. Anschließend sollten Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden. Dabei sollte die Stabilität zwischen der DNA in Wasser und der DNA in organischen Lösungsmitteln nach Zugabe von diversen Metallkatalysatoren und Organokatalysatoren unter Verwendung der Copolymere verglichen werden.

## 6.2 Verwendete Copolymere P4

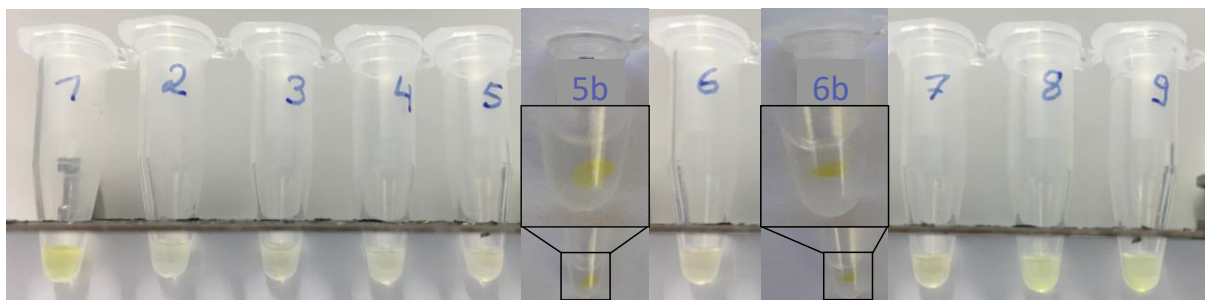
In dieser Arbeit wurden amphiphile Block-Copolymere verwendet, die über eine RAFT-Polymerisation nach *Laschewsky et al.* von *Dr. Christian Gramse* und *Marvin Dieter* aus der *Arbeitsgruppe Weberskirch* hergestellt wurden.<sup>[165]</sup> Dabei wurde als erstes der hydrophile Polymerblock, bestehend aus dem Monomer *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA), und anschließend der hydrophobe Polymerblock, bestehend aus dem Monomer *n*-Butylacrylat (BA), aufgebaut (**P4-a**). Dabei wurde in einem Copolymer (**P4-b**) die Trithiocarbonat-Gruppe entfernt, um den Einfluss dieser Gruppe auf die Löslichkeit der DNA in organischen Lösungsmitteln zu bewerten. Die in diesem Abschnitt verwendeten Copolymere sind in **Abbildung 50** dargestellt.



**Abbildung 50:** Copolymerstruktur und schematische Darstellung der nicht-funktionalisierten Copolymere. a) Allgemeine Struktur des Copolymers **P4-a** mit Trithiocarbonat-Endgruppe; b) Allgemeine Struktur des Copolymers **P4-b** nach Abspaltung der Trithiocarbonat-Endgruppe.

## 6.3 Etablierung der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln

Für die ersten Versuche wurde eine 14-Nucleobasen lange einzelsträngige DNA mit gebundenem Fluorophor (6-FAM) **DNA-13b** verwendet. Diese wurde mit dem **Copolymer P4-a** in Wasser gelöst und vermischt. Das Lösungsmittel des Copolymer-DNA-Gemisches wurde entfernt und der Rückstand wurde über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Im Anschluss wurde versucht, den Rückstand in verschiedenen trockenen Lösungsmitteln zu lösen. Es wurde Acetonitril, 1,2-Dichlorethan, Dichlormethan und Toluol als Lösungsmittel verwendet. Als Kontrolle wurde ein Copolymer-DNA-Rückstand in Wasser und in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril (1:1) gelöst. Zudem wurde versucht, die **DNA-13b** in Dichlormethan und in Toluol zu lösen, ohne dass das Copolymer **P4-a** hinzugegeben wurde. Anhand der Markierung der **DNA-13b** mit einem Fluorophor kann eine gelbe Färbung beobachtet und fotografisch festgehalten werden (siehe **Abbildung 51**).



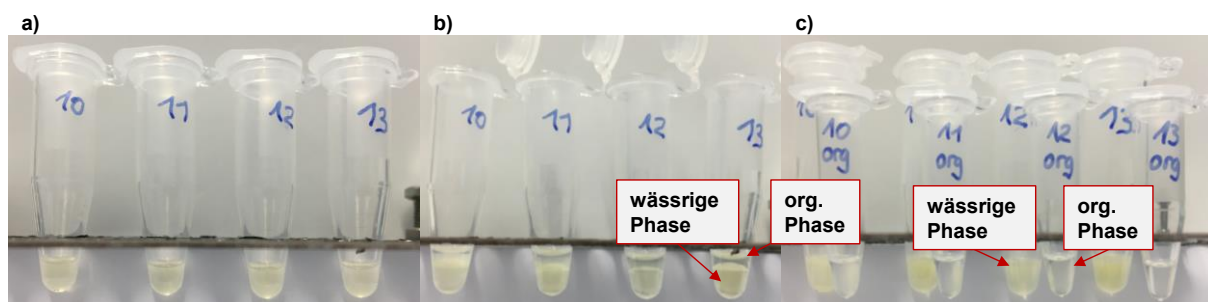
**Abbildung 51:** Bilder der Copolymer-DNA-Mischungen in verschiedenen Lösungsmitteln. 1 = Copolymer-DNA in Wasser; 2 = Copolymer-DNA in Wasser/Acetonitril (1:1); 3 = Copolymer-DNA in Acetonitril; 4 = Copolymer-DNA in 1,2-Dichlorethan; 5 = Copolymer-DNA in Dichlormethan; 5b = **DNA-13b** in Dichlormethan (aufgenommen von Dr. Mateja Klika Škopić); 6 = Copolymer-DNA in Toluol; 6b = **DNA-13b** in Toluol (aufgenommen von Dr. Mateja Klika Škopić); 7 = Copolymer-**P4-b**-DNA in Toluol; 8 = Copolymer-**DNA-25** in Toluol; 9 = Copolymer-**DNA-26** in Toluol.

Das Copolymer-DNA-Gemisch gelöst in Wasser zeigte eine intensive homogen verteilte gelbe Färbung der Lösung (siehe **Abbildung 51**, Eintrag 1). Durch Hinzugabe der organischen Lösungsmittel (MeCN, 1,2-DCE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Toluol) zu dem Copolymer-**P4-a**-**DNA-13b**-Rückstand konnte ebenfalls eine leichte Gelbfärbung beobachtet werden (siehe **Abbildung 51**, Eintrag 2 - 6). Allerdings war diese Färbung nicht so intensiv, wie bei der in Wasser gelösten Probe. Zudem konnte eine Trübung der Lösung beobachtet werden. Die gelbe Färbung der **DNA-13b** war allerdings homogen verteilt und setzte sich mit der Zeit nicht ab, weshalb auf eine Emulsion geschlossen werden kann. Die Proben ohne zugegebenes Copolymer **P4-a** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Toluol zeigten ein deutlich abgetrenntes gelbes Pellet, welches sich auch durch 30-minütiges Mischen und nach Verwendung eines Ultraschallbades nicht löste (siehe **Abbildung 51**, Eintrag 5b und 6b). Daher kann ein positiver Effekt auf die Durchmischung der **DNA-13b** in verschiedenen organischen Lösungsmitteln durch die Zugabe des Copolymers **P4-a** beobachtet werden.

Eine ähnliche Färbung zu Eintrag 6 konnte ebenfalls nach Verwendung des Copolymers **P4-b** ohne die Trithiocarbonat-Gruppe detektiert werden (siehe **Abbildung 51**, Eintrag 7). Daher schien die Trithiocarbonat-Gruppe keinen Effekt auf die Löslichkeit der **DNA-13b** in organischen Lösungsmitteln zu haben. Anschließend wurden längere DNA-Einzelstränge (28 Nucleobasen **DNA-25**, 42 Nucleobasen **DNA-26**) mit einem gebundenen Fluorophor (Alexa-430) verwendet und ebenfalls mit dem Copolymer **P4-a** vermischt, getrocknet und versucht in Toluol zu lösen. Dabei konnte ebenfalls eine trübe gelbe Färbung der Lösung beobachtet werden (siehe **Abbildung 51**, Eintrag 8 und 9). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass auch längere DNA-Einzelstränge mit dem Copolymer **P4-a** interagieren und sich in organischen Lösungsmitteln emulgieren lassen.

Im Anschluss sollte die **DNA-13b** wieder aus dem organischen Lösungsmittel entfernt werden. Dazu wurde eine Extraktion mit Wasser und unterschiedlich konzentrierten NaCl-Lösungen versucht, da bekannt war, dass die Copolymer-DNA-Interaktion durch Zugabe von NaCl-Salz gelöst werden kann und dadurch die DNA in die wässrige Phase überführt werden sollte.<sup>[161]</sup>

Dazu wurden verschieden konzentrierte NaCl-Lösungen hergestellt ( $dH_2O$  (Eintrag 10), 0,5 M (Eintrag 11), 2,5 M (Eintrag 12), 5 M (Eintrag 13)) und zu der in Toluol emulgierten Probe (siehe **Abbildung 52a**) hinzugegeben. Diese Mischung wurde für 10 sec. vermischt (siehe **Abbildung 52b**) und die organische Phase anschließend von der wässrigen Phase getrennt (siehe **Abbildung 52c**). Die Extraktion wurde wiederholt und die erhaltene wässrige Phase wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption analysiert. Durch die Markierung der **DNA-13b** mit einem Fluorophor konnte mit allen Extraktionsmitteln der Übergang der **DNA-13b** von der organischen Phase in die wässrige Phase beobachtet werden.



**Abbildung 52:** Bilder der ersten Extraktion von Copolymer-DNA-Mischungen in Toluol mit  $dH_2O$  und wässrigen NaCl-Lösungen.

a) Copolymer-DNA-Gemisch in Toluol; b) Zugabe der Extraktionsmittel: 10 =  $dH_2O$ ; 11 = NaCl-Lösung (0,5 M); 12 = NaCl-Lösung (2,5 M); 13 = NaCl-Lösung (5 M); c) Trennung der organischen (rechts) von der wässrigen (links) Phase.

Durch die Markierung der **DNA-13b** mit einem Fluorophor konnte mit allen Extraktionsmitteln der Übergang der **DNA-13b** von der organischen Phase in die wässrige Phase beobachtet werden. Bei der Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel (siehe **Abbildung 52**, Eintrag 10) konnte ebenfalls eine gelbe Färbung der wässrigen Phase beobachtet werden, obwohl davon ausgegangen wurde, dass eine erhöhte Salz-Konzentration für die Trennung der Copolymer-DNA-Interaktion benötigt wird. Allerdings konnte hier eine Trübung beider Phasen beobachtet werden. Diese Trübung nahm mit Zunahme der Salz-Konzentration von 0,5 M auf bis zu 5 M ab (siehe **Abbildung 52**, Eintrag 11 - 13).

Aus diesen Experimenten folgt, dass eine Überführung der DNA aus der organischen Phase in die wässrige Phase möglich ist. Nach der zweiten Extraktion und Trennung der Phasen konnte die wiedergewonnene Menge an **DNA-13b** über die UV-Vis-Absorption bestimmt werden. Dabei konnte für alle Extraktionsmittel 1,3 nmol - 1,5 nmol an **DNA-13b** (eingesetzt: 2 nmol) berechnet werden. Dies entspricht 65 % - 75 % der eingesetzten Menge an **DNA-13b**. Diese Menge an wiedergewonnener **DNA-13b** könnte eventuell durch erneute Wiederholungen der Extraktion gesteigert werden.

## 6.4 Charakterisierung der Copolymer-DNA-Interaktion in organischen Lösungsmitteln

Da das Copolymer **P4-a** in der Lage war, die **DNA-13b** in organischen Lösungsmitteln zu emulgieren, sollte die Interaktion dieser beiden Moleküle analysiert werden. Es sollte der hydrodynamische Durchmesser ( $d_h$ ) mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht werden. Dadurch sollte die Bildung von Aggregaten und die Größe dieser Aggregate in Abhängigkeit von der Anwesenheit von DNA in verschiedenen Lösungsmitteln beobachtet werden können. Dazu wurde eine zehn Nucleobasen-lange einzelsträngige **DNA-27** mit dem Copolymer **P4-a** in Wasser gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Dieser wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln (Wasser, Acetonitril, 1,2-Dichlorethan, Dichlormethan, Toluol) gelöst und in Dreifachbestimmungen von *Marvin Dieter* aus der *Arbeitsgruppe Weberskirch* vermessen. Dazu wurde das jeweilige Lösungsmittel als Nullpunkt (*Blank*) verwendet. Als Kontrolle zu den Copolymer-DNA-Mischungen wurden ebenfalls Proben angefertigt, die nur das Copolymer **P4-a** in den verschiedenen Lösungsmitteln enthielten. Zudem wurde der hydrodynamische Durchmesser für die in Wasser gelöste **DNA-27** bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 16** aufgeführt.

**Tabelle 16:** DLS-Messungen des Copolymers **P4-a** und der Copolymer-DNA-Mischungen in verschiedenen Lösungsmitteln.

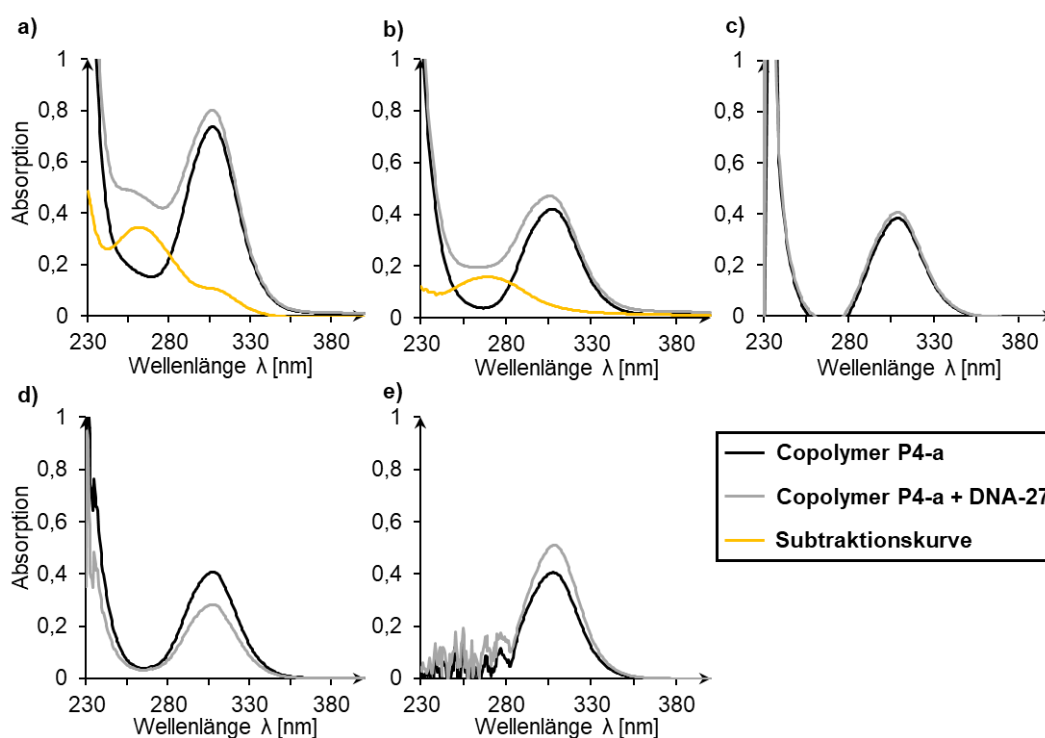
Eintrag	DNA-27	Lösungsmittel	$d_h$ [nm] <sup>a</sup>
1	-	Wasser	19,07 ± 3,22
2	x	Wasser	18,45 ± 2,96
3 <sup>b</sup>	x	Wasser	(3839,12 ± 460,60)
4	-	Acetonitril	0,14 ± 0,06
5	x	Acetonitril	(400,39 ± 44,94)
6	-	1,2-Dichlorethan	2,15 ± 2,68
7	x	1,2-Dichlorethan	(523,36 ± 511,77)
8	-	Dichlormethan	0,22 ± 0,01
9	x	Dichlormethan	(1008,89 ± 58,05)
10	-	Toluol	0,21 ± 0,01
11	x	Toluol	60,59 ± 23,74

<sup>a</sup> Der hydrodynamische Durchmesser wurde über die dynamische Lichtstreuung (DLS) von Copolymer **P4-a** (1 mM) und Copolymer-DNA-Mischungen (1 mM Copolymer **P4-a**; 0,04 mM **DNA-27**) bestimmt. <sup>b</sup> Es wurde kein Copolymer **P4-a** hinzugegeben.

Das Copolymer **P4-a** wies in Wasser einen hydrodynamischen Durchmesser von 19 nm auf (siehe **Tabelle 16**, Eintrag 1). Durch Zugabe der **DNA-27** veränderte sich der hydrodynamische Durchmesser in Wasser nicht signifikant (siehe **Tabelle 16**, Eintrag 2). Wurde allerdings der hydrodynamische Durchmesser von **DNA-27** in Wasser ohne das Copolymer **P4-a** gemessen, so konnte ein Wert von etwa  $3840 \pm 460$  nm bestimmt werden (siehe **Tabelle 16**, Eintrag 3). Da besonders einzelsträngige DNA sehr flexibel ist und sich die Struktur schnell verändern kann, kann durch die dynamische Lichtstreuung kein definierter Wert erhalten werden.<sup>[220,221]</sup> Es wird allerdings deutlich, dass durch Zugabe des Copolymers **P4-a** eine Stabilisierung der DNA-Einzelstränge hervorgerufen wurde, da bei dieser Messung ein expliziter hydrodynamischer Durchmesser erhalten werden konnte. Dieses Phänomen wurde auch schon in der Literatur beschrieben. Erst durch die Interaktion von DNA-Strängen mit Additiven, wie z.B. Chitosan oder Gold-Nanopartikeln, konnte die DNA über die DLS-Messung nachgewiesen werden.<sup>[222,223]</sup> Bei den DLS-Messungen des Copolymers **P4-a** in allen organischen Lösungsmitteln (MeCN, 1,2-DCE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Toluol) konnte keine Bildung von Aggregaten beobachtet werden (siehe **Tabelle 16**, Eintrag 4, 6, 8, 10). Für die DLS-Messungen der Copolymer-DNA-Mischungen in den organischen Lösungsmitteln konnten allerdings große Aggregate gemessen werden (siehe **Tabelle 16**, Eintrag 5, 7, 9, 11). Dabei nahm der hydrodynamische Durchmesser von 400 nm in Acetonitril bis zu 1000 nm in Dichlormethan zu. Bei der Probe in Toluol konnte ein hydrodynamischer Durchmesser von 60 nm bestimmt werden. Daraus folgt, dass sich durch die Zugabe der **DNA-27** zu dem Copolymer **P4-a** Aggregate bilden, welche sich abhängig vom Lösungsmittel unterscheiden. Die Aggregatgröße kann einen Rückschluss auf die Copolymer-DNA-Interaktion zulassen. Möglicherweise ist die Copolymer-DNA-Interaktion abgeschwächt, je unpolarer das Lösungsmittel ist (mit Ausnahme von Toluol). Dies ginge mit einer stärkeren Fluktuation der Strukturen einher, welche in einem höheren hydrodynamischen Durchmesser resultieren. Zusätzlich zu den DLS-Messungen sollte die Copolymer-DNA-Interaktion mit Hilfe der UV-Vis-Absorption analysiert werden. Dabei sollte sowohl die Absorption der Trithiocarbonat-Gruppe des Copolymer **P4-a** bei einer Wellenlänge von 270 - 360 nm, sowie auch die Absorption der **DNA-27** bei einer Wellenlänge von 240 - 280 nm betrachtet werden. Die Proben wurden analog zu den DLS-Messungen vorbereitet und in Dreifachbestimmungen von *Marvin Dieter* aus der *Arbeitsgruppe Weberskirch* vermessen. Dazu wurde das jeweilige Lösungsmittel als Nullpunkt (*Blank*) verwendet. Als Kontrolle zu den Copolymer-DNA-Mischungen wurden ebenfalls Proben angefertigt, die nur das Copolymer **P4-a** in den verschiedenen Lösungsmitteln enthielten. Darüber sollte eine Veränderung der Absorption der Trithiocarbonat-Gruppe des Copolymers **P4-a** mit und ohne Zugabe der **DNA-27** detektiert werden (siehe **Abbildung 53**).

In Wasser kann eine Absorption des Copolymers **P4-a** bei einer Wellenlänge von 280 - 330 nm für die Trithiocarbonat-Gruppe erhalten werden (siehe **Abbildung 53a**, schwarz).

Diese Absorption kann neben einer Absorption der **DNA-27** bei 260 nm auch in dem Spektrum der Copolymer-DNA-Mischung beobachtet werden (siehe **Abbildung 53a**, grau). Wurde die Absorption der Copolymer **P4-a**-Probe von der Copolymer-DNA-Mischung abgezogen, so konnte die Absorption der **DNA-27** sichtbar gemacht werden (siehe **Abbildung 53a**, gelb). Ähnliche Absorptionen konnten auch bei den Proben in Acetonitril beobachtet werden (siehe **Abbildung 53b**). Dort konnte eine Absorption der Trithiocarbonat-Gruppe des Copolymers **P4-a** bei 280 - 330 nm (schwarz), sowie eine Absorption der **DNA-27** bei 260 nm (grau und gelb) bestimmt werden. Daraus folgt, dass die **DNA-27** der Copolymer-DNA-Probe in Acetonitril gemischt vorlag, da ansonsten keine Absorption der **DNA-27** gemessen werden könnte.



**Abbildung 53:** UV-Vis-Spektren des Copolymers **P4-a** (schwarz), der Copolymer-DNA-Mischungen (grau) und der Subtraktionskurve (gelb) in verschiedenen Lösungsmitteln. Die UV-Vis-Spektren wurden in den Lösungsmitteln a) Wasser; b) Acetonitril; c) 1,2-Dichlorethan; d) Dichlormethan; e) Toluol aufgenommen.

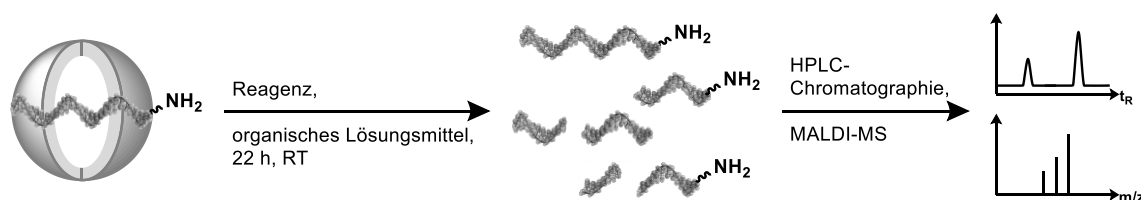
Diese Beobachtung konnte bei den Lösungsmitteln 1,2-Dichlorethan, Dichlormethan und Toluol nicht gemacht werden (siehe **Abbildung 53c - e**). Dort konnte lediglich eine Absorption der Trithiocarbonat-Gruppe des Copolymers **P4-a** bei einer Wellenlänge von 280 - 330 nm gemessen werden. Es konnte keine Veränderung der Proben mit und ohne Zugabe von **DNA-27** beobachtet werden.



Um die Interaktion zwischen der DNA und dem Copolymer in organischen Lösungsmitteln weiter zu charakterisieren, könnten analoge Messungen angelehnt an die Charakterisierung der DNA-Copolymer-Interaktion in Wasser durchgeführt werden.<sup>[161]</sup> Dabei könnte durch Kleinwinkel-Röntgenstreuung-Messungen (*small-angle X-ray scattering*, SAXS), analog zu den DLS-Messungen, die Größe und Form der Aggregate bestimmt werden. Zudem könnte die Aufnahme von Circular dichroismus-Spektren (*circular dichroism*, CD) Aufklärung zu der vorliegenden DNA-Struktur geben. Des Weiteren könnten Fluoreszenz-Löschungs-Experimente durchgeführt werden, um die Position der DNA an dem Copolymer zu bestimmen.

## 6.5 Stabilitätsuntersuchungen der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln

Die **DNA-13b** konnte mit dem Copolymer **P4-a** in organischen Lösungsmitteln emulgiert werden. Zudem konnten Indizien für eine Copolymer-DNA-Interaktion in organischen Lösungsmitteln mit Hilfe von DLS- und UV-Vis-Absorptions-Messungen gefunden werden. Nun sollte das Ausmaß der DNA-Stabilität nach einer Inkubation mit diversen Metallsalzen und organischen Reagenzien betrachtet werden (siehe **Abbildung 54**). Ferner sollte der Einfluss des Copolymers **P4-a** auf die DNA-Stabilität bestimmt werden. Dies ist nötig, um mittels des Copolymers **P4-a** in organischen Lösungsmitteln gemischte DNA-Startmaterialien für die Entwicklung einer neuen Chemie zu verwenden.



**Abbildung 54:** Schema der Stabilitätsuntersuchungen der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln gegenüber diversen Reagenzien.

Für diese Experimente wurden zwei zehn Nucleobasen lange einzelsträngige DNA-Startmaterialien mit einer unterschiedlichen Nucleobasen-Zusammensetzung verwendet. **DNA-27** war aus allen vier Nucleobasen zusammengesetzt, wohingegen der **DNA-28** die instabilere Nucleobase Guanin fehlte. Diese DNA-Stränge wurden jeweils mit dem **Copolymer P4-a** in Wasser gelöst. Das Lösungsmittel wurde verdampft und der Rückstand getrocknet. Anschließend wurde das Metallsalz oder das organische Reagenz gelöst in dem gewünschten Lösungsmittel zu dem Copolymer-DNA-Rückstand hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Gemisch aufgereinigt und der Grad der DNA-Degradierung mit Hilfe der analytischen HPLC-Chromatographie und die Identität der Fragmente oder depurinierten DNA anhand der MALDI-MS bestimmt.

Diese Ergebnisse wurden von *Anna Schöne* im Rahmen einer Bachelorarbeit in der *Arbeitsgruppe Brunschweiler* erarbeitet.<sup>[224]</sup> Die Testungen der Metallsalze wurde mit Experimenten ohne Zugabe des Copolymers in wässrigen Lösungsmittelgemischen verglichen.<sup>[225]</sup> Die Ergebnisse der Testung von diversen organischen Reagenzien in reinen organischen Lösungsmitteln wurde mit Versuchen mit an eine feste Phase gebundene DNA (on-CPG) verglichen.<sup>[95]</sup>

### **6.5.1. Inkubation von Metallsalzen mit DNA-Konjugaten in wässrigen Lösungsmittelgemischen und reinen organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers P4-a<sup>[224]</sup>**

Ein wichtiges Werkzeug, um chemische Transformationen durchzuführen, ist die Verwendung von Metallsalzen, welche eine Reaktion katalysieren können oder als Hilfsstoff fungieren können. In diesem Abschnitt wurden diverse Metallsalze in einem Gemisch aus Wasser und organischem Lösungsmittel oder in reinem organischen Lösungsmittel mit den beiden DNA-Strängen **DNA-27** und **DNA-28** inkubiert. Dabei sollte die Stabilität der beiden DNA-Stränge verglichen werden, sowie die Anwesenheit von Wasser auf die Stabilität der DNA-Stränge untersucht werden. Die Auswahl der Metallsalze orientierte sich an der *Bachelorarbeit* von *Elena* aus der *Arbeitsgruppe Brunschweiler*.<sup>[225]</sup> Die Ergebnisse, sowie die Vergleichswerte aus der *Bachelorarbeit*, sind in **Tabelle 17** aufgeführt. Bei der Testung von vielen Metallsalzen konnte nur eine geringe DNA-Degradierung von unter 20 % beobachtet werden. Dabei konnte kein Unterschied bestimmt werden zwischen den verwendeten DNA-Strängen, der Anwesenheit von Wasser und auch der Anwesenheit des Copolymers **P4-a**. Darunter fielen die Metallsalze  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_3$ ,  $\text{La}(\text{Oi-Pr})_3$ ,  $\text{Ni}(\text{acac})_2$  und  $\text{ZnCl}_2$ , sowie der Grubbs I-Katalysator und das  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ . Im Unterschied dazu zeigte das zweite Ru-Metallsalz ( $[\text{Ru}(\text{Mebally})_2\text{COD}]$ ), sowie das zweite Pd-Metallsalz ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) jeweils eine DNA-Degradierung von über 60 %. Hierbei konnten nur noch sehr geringe Mengen der DNA-Startmaterialien und sehr viele Degradierungs-Produkte detektiert werden. Dies war sowohl bei der **DNA-28** als auch bei der etwas stabileren **DNA-27** der Fall. Zudem hatte auch der Wasseranteil keinen Einfluss auf die DNA-Degradierung. Bei diesen beiden Metallsalzen könnte der Ligand Einfluss auf die DNA-Schädigung haben.

Für die Lewis-Säuren BiBr<sub>3</sub> und SbCl<sub>3</sub> konnten sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Dabei konnte bei einem Wasseranteil von 50 % eine fast vollständige DNA-Degradierung bei beiden DNA-Strängen beobachtet werden, wohingegen die Inkubation der Metallsalze in reinem organischem Lösungsmittel zu keiner DNA-Schädigung führte. Diese Ergebnisse können damit erklärt werden, dass die beiden Metallsalze in Kontakt mit Wasser zu BiOBr/SbOCl und HBr/HCl reagieren und demnach jeweils eine starke Säure in der Lösung vorliegt, die die DNA-Stränge schädigen kann. Diese Reaktion läuft in reinem organischem Lösungsmittel nicht ab, wodurch keine Schädigung der DNA beobachtet werden konnte. Das Cerammoniumnitrat ([Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>](NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) lieferte nach einer Inkubation mit der **DNA-27** eine Degradierung von unter 20 %. Dies konnte sowohl für das wässrige Lösungsmittelgemisch als auch für das reine organische Lösungsmittel beobachtet werden.

**Tabelle 17:** DNA-Stabilität von **DNA-27** und **DNA-28** nach Inkubation von diversen Metallsalzen in wässrigen Lösungsmittelgemischen und organischen Lösungsmitteln mit und ohne Copolymer **P4-a**.<sup>a[224]</sup>

Metallsalz	Lösungsmittel	mit Copolymer P4-a				ohne Copolymer P4-a <sup>[225]</sup>			
		DNA-27		DNA-28		DNA-27	DNA-28		
		Anteil Wasser [%]		Anteil Wasser [%]		Anteil Wasser [%]	Anteil Wasser [%]		
		50	0	50	0	50	50		
BiBr <sub>3</sub>	MeCN	b		b					
[Ce(NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ](NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	MeOH								
Grubbs I	MeCN								
InCl <sub>3</sub>	MeCN								
La(Oi-Pr) <sub>3</sub>	THF								
Ni(acac) <sub>2</sub>	MeCN								
Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub> <sup>c</sup>	MeOH								
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> <sup>c</sup>	MeOH								
[Rh(COD)Cl] <sub>2</sub> <sup>c</sup>	MeOH								
[Ru(Me-ally) <sub>2</sub> COD] <sup>c</sup>	MeCN								
SbCl <sub>3</sub>	MeCN	b		b					
Sc(OTf) <sub>3</sub>	MeCN								
Ti(Oi-Pr) <sub>4</sub> <sup>c</sup>	MeOH								
ZnCl <sub>2</sub>	MeCN								
DNA-Degradierung <sup>c</sup>		≤ 20 %		21 - 40 %		41 - 60 %		≥ 61 %	

<sup>a</sup> Die DNA (2 nmol) wurde mit Metallsalz (200 Äquiv.) und Copolymer **P4-a** (1 mM) in wässrigen Lösungsmittelgemischen oder organischen Lösungsmitteln bei RT über Nacht geschüttelt. Die DNA-Degradierung wurde mit Hilfe der Fläche des Startmaterial-Signals gegenüber den Degradierungs-Signalen im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt. <sup>b</sup> Es bildete sich nach Zugabe zum Copolymer-DNA-Gemisch ein weißer Niederschlag. <sup>c</sup> Es wurde eine Suspension zu dem Copolymer-DNA-Gemisch gegeben.

Wurde allerdings die **DNA-28** mit dem Cer-Komplex inkubiert, konnte in dem wässrigen Lösungsmittelgemisch eine DNA-Degradierung von etwa 50 % beobachtet werden. Diese Degradierung konnte durch die Verwendung des reinen organischen Lösungsmittels auf unter 20 % reduziert werden.

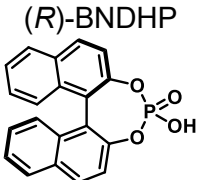
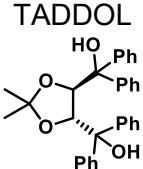
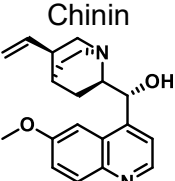

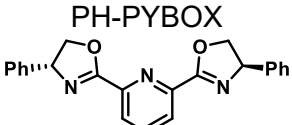
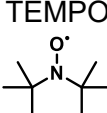
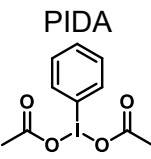
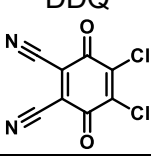
Im Vergleich zu den Ergebnissen im wässrigen Lösungsmittelgemisch ohne die Verwendung des Copolymers wurde eine höhere DNA-Degradierung für die Metallsalze BiBr<sub>3</sub>, SbCl<sub>3</sub> und [Ru(Me-ally)<sub>2</sub>COD] erhalten. Im Falle der Metallsalze BiBr<sub>3</sub> und SbCl<sub>3</sub> konnte die DNA-Stabilität allerdings durch die Entfernung des Wassers deutlich gesteigert werden. Dies konnte mit dem Metallsalz [Ru(Me-ally)<sub>2</sub>COD] nicht erreicht werden. Eine Hypothese für die höhere DNA-Schädigung mit dem Copolymer könnte sein, dass sich das Metallsalz in der Umgebung des Copolymers besser löst und somit ein engerer Kontakt zu der DNA besteht.

Allerdings zeigten die Ergebnisse der drei Metallsalze BiBr<sub>3</sub>, SbCl<sub>3</sub> und [Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>](NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> deutlich, dass eine Entfernung des Wassers für die DNA-Stabilität von Vorteil ist. Dies ist allerdings nur durch die Verwendung des Copolymer-DNA-Gemisches möglich.

### **6.5.2. Inkubation von organischen Reagenzien mit DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers P4-a<sup>[224]</sup>**

Neben Metallsalzen sind auch organische Reagenzien von großer Bedeutung für die Etablierung von chemischen Reaktionen. Daher wurden acht diverse Reagenzien mit zwei DNA-Strängen **DNA-27** und **DNA-28** (ATC- und ATCG-DNA) über Nacht bei Raumtemperatur in organischen Lösungsmitteln inkubiert. Dazu wurden die DNA-Stränge zuerst mit dem Copolymer **P4-a** vermischt und getrocknet, um das Copolymer-DNA-Gemisch anschließend in den organischen Lösungsmitteln zu emulgieren. Dabei wurden einerseits polare organische Lösungsmittel und auch 1,2-Dichlorethan als unpolares organisches Lösungsmittel verwendet. Die Auswahl der organischen Reagenzien erfolgte auf Basis der bereits durchgeführten Testung dieser Reagenzien, bei der die DNA an eine feste Phase (CPG) gebunden war.<sup>[95]</sup> Dabei sollte die Stabilität der beiden DNA-Stränge, sowie auch die beiden Strategien (Festphase, Lösung) miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 18** dargestellt. Dabei kann beobachtet werden, dass die meisten der organischen Reagenzien ((*R*)-BNDHP, TADDOL, Chinin, L-Prolin, PH-PYBOX, TEMPO) beide DNA-Stränge nur zu unter 20 % schädigen. Bei der Verwendung des (*R*)-BNDHP's konnte bei beiden DNA-Strängen auf der Festphase eine leichte Degradierung von 21 - 40 % beobachtet werden. Diese konnte durch die Verwendung des Copolymer-DNA-Gemisches auf unter 20 % reduziert werden. Das Oxidationsmittel PIDA führte bei beiden DNA-Strängen auf der Festphase zu einer Degradierung von 41 - 60 %.

**Tabelle 18:** DNA-Stabilität von **DNA-27** und **DNA-28** nach Inkubation von diversen organischen Reagenzien in organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers **P4-a** oder der festen Phase (CPG).<sup>a[224]</sup>

organisches Reagenz	LM	mit Copolymer P4-a in LM (Lösung)		ohne Copolymer P4-a (Festphase) <sup>[95]</sup>		mit Copolymer P4-a in 1,2-DCE		
		DNA-27	DNA-28	DNA-27	DNA-28	DNA-27	DNA-28	
	MeOH	Green	Green	Light Green	Light Green	Green	Green	
	MeOH	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
	MeOH	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
	MeCN	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
	MeCN	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
	MeCN	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
	MeCN	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	
	EtOH	Red	Yellow	Light Green	Light Green	Green	Light Green	
DNA-Degradierung <sup>c</sup>		≤ 20 %		21 - 40 %		41 - 60 %		≥ 61 %

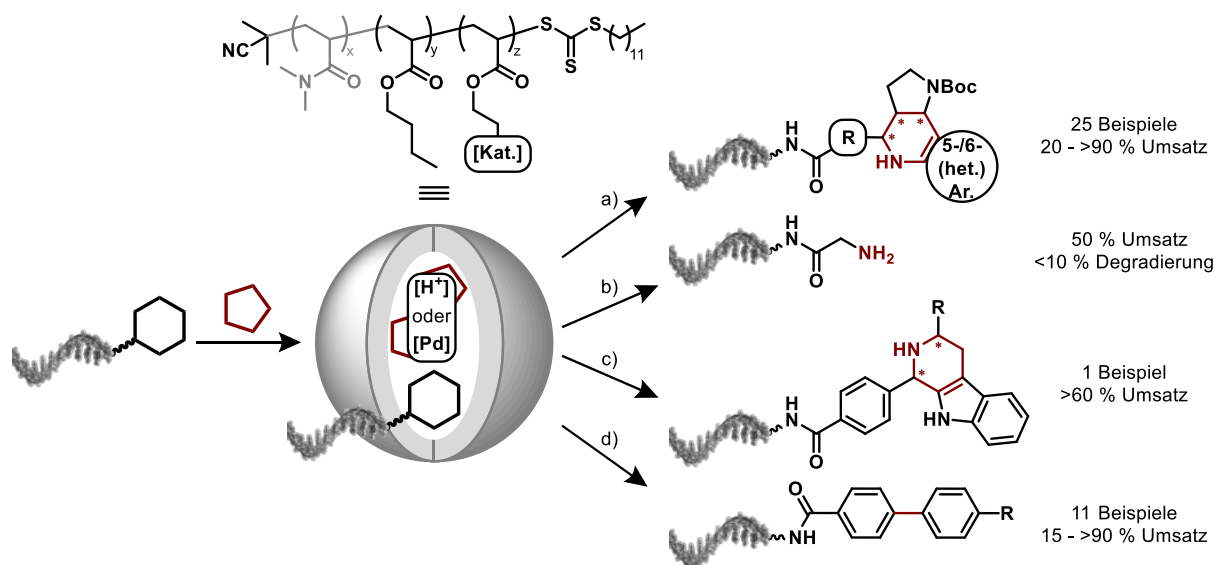
<sup>a</sup> Die DNA (2 nmol) wurde mit dem Reagenz (200 Äquiv.) und Copolymer **P4-b** (1 mM) in organischen Lösungsmitteln (LM) bei RT über Nacht geschüttelt. Die DNA-Degradierung wurde mit Hilfe der Fläche des Startmaterial-Signals gegenüber den Degradierungs-Signalen im HPLC-Chromatogramm (analytische HPLC) und MALDI-MS bestimmt.

Dies konnte bei dem ATC-DNA-Strang **DNA-27** unter Verwendung des Copolymers **P4-a** reduziert werden. Auch das Oxidationsmittel DDQ führte bei beiden DNA-Strängen auf der Festphase zu einer DNA-Degradierung von 21 - 40 %.

Diese Schädigung wurde durch die Verwendung des Copolymers **P4-a** erhöht. Allerdings konnte durch die Änderung des Lösungsmittels zu dem unpolaren 1,2-Dichloroethan eine Verringerung der DNA-Schädigung erreicht werden und sogar eine Verbesserung in Bezug auf die ATC-DNA **DNA-27** im Vergleich zu der Festphase. Somit konnte durch die Reduzierung des Wassers ein positiver Effekt auf die DNA-Stabilität bestimmt werden, was nur möglich war, durch die Verwendung der amphiphilen Block-Copolymere. Somit könnten mit dieser Copolymer-DNA-Interaktion chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln realisiert werden, um so den chemischen Raum zu erweitern und strukturreiche DNA-kodierte Substanzbibliotheken herzustellen.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Durch eine Kombination von molekularbiologischen Methoden, wie die genetische Kodierung, Selektion, DNA-Amplifikation und DNA-Sequenzierung, mit der kombinatorischen organischen Synthese konnten große Sammlungen an Molekülen, sogenannte DNA-kodierte Bibliotheken, hergestellt und für die Identifikation von bioaktiven Molekülen genutzt werden. Ziel dieser Arbeit war es, amphiphile Block-Copolymere für die Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek zu verwenden, sowie eine neue Aufreinigungs-Methode zu etablieren und anzuwenden und dadurch einige Herausforderungen, wie die notwendige Kompatibilität der verwendeten organischen Reaktionen mit dem DNA-Barcode und die erforderliche Reinheit einer Molekülbibliothek, zu reduzieren. Um den chemischen Raum zu erweitern, sollten amphiphile Block-Copolymere verwendet werden, die ab einer kritischen Mizellbildungskonzentration nanometergroße in hydrophil- und hydrophob-abgetrennte Reaktionsräume bilden, wodurch der polare DNA-Barcode von dem reaktiven hydrophoben Reaktionsmedium getrennt vorliegen sollte. Dafür wurde in **Kapitel 3**, basierend auf einer vorausgegangenen Masterarbeit, die Etablierung von Copolymer-vermittelten Reaktionen an DNA-Konjugaten fortgesetzt (siehe **Abbildung 55**). Die Block-Copolymere wurden von *Dr. Christian Gramse* aus der *Arbeitsgruppe Weberskirch* hergestellt und enthielten einen hydrophilen Polymerblock aus *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA)-Monomeren und einem hydrophoben Polymerblock aus verschiedenen langen Alkylacrylat-Monomeren, sowie einer katalytisch aktiven Einheit, wie einer Sulfonsäure oder einem Palladium-Komplex.



**Abbildung 55:** Etablierung der Copolymer-vermittelten a) Povarov-Reaktion; b) Boc-Entschützung; c) Pictet-Spengler-Reaktion und d) Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung an DNA-Konjugaten.

Die katalytisch aktive Einheit konnte dabei sowohl in den hydrophoben Block als auch in den hydrophilen Polymerblock eingebaut werden. Zudem konnte durch die Wahl des hydrophoben Monomers die Polarität des Mizellenkerns variiert werden.

Die Sulfonsäure-immobilisierten Copolymere wurden anschließend für die Etablierung der Povarov-Reaktion, einer Boc-Entschützung, sowie der Pictet-Spengler-Reaktion eingesetzt. Die Copolymer **P1-BA-b**-vermittelte Povarov-Reaktion konnte in einer vorausgegangenen Masterarbeit mit einem DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a**, verschiedenen Anilinen **20** und dem 3,4-Dihydro-2*H*-pyran **21c** erfolgreich etabliert werden. In dieser Arbeit wurde darauffolgend das Reaktandenspektrum untersucht, um die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek zu verwenden. Dafür wurde zunächst das Olefin **21c** durch das *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** ausgetauscht, um nach einer anschließenden Boc-Entschützung eine freie Aminogruppe zu bilden, welche als Ausgangsvektor für einen nächsten Syntheseschritt dient. Bei der Untersuchung der Produktbildung nach unterschiedlichen Zeitpunkten konnte festgestellt werden, dass mit dem Olefin **21d** bereits nach einer Stunde das gewünschte Produkt **DNA-2b** zu 90 % gebildet wurde, wohingegen die Produktbildung mit dem Olefin **21c** erst bei 10 % lag. Eine Erhöhung der Temperatur auf 40 °C erzielte ebenfalls eine vollständige Produktbildung. Daher wurde für die Erweiterung des Reaktandenspektrums eine Reaktionstemperatur von 40 °C gewählt. Als erste Komponente wurden weitere Olefine mit einer enthaltenen Boc-Schutzgruppe **21e** und **21f** in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion eingesetzt. Dabei konnte das gewünschte Produkt nicht oder nur mit geringem Umsatz erhalten werden. Daher wurde im weiteren Verlauf nur das Olefin **21d** verwendet. Darauffolgend wurde die zweite Komponente, das Amin, in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion variiert. Dabei wurden elf verschieden substituierte Aniline **20b - l**, sechs Aminopyridine **20m - 20o**, **20q - 20s**, ein Aminopyrimidin **20p**, ein Aminoquinolin **20t**, sowie neun Aminopyrazole **20u - 20ad** eingesetzt. Alle Aniline konnten mit einem vollständigen Umsatz und keinem Nebenprodukt in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion umgesetzt werden. Dahingegen konnte mit den meisten heteroaromatischen Aminen das gewünschte Produkt nicht detektiert werden. Nur die Aminopyrazole **20v - x** und **20aa** konnten das gewünschte Produkt mit einem vollständigen Umsatz bilden und konnten für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek in Betracht gezogen werden. Zuletzt wurde die dritte Komponente, der an die DNA gebundene Aldehyd, verändert. Dazu wurden fünf Carbonsäure-funktionalisierte Aldehyde **64b - f** über eine Amidsynthese an die DNA gebunden und in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem Anilin **20b** und Olefin **21d** umgesetzt. Dabei konnten sowohl die DNA-Aldehyd-Konjugate mit einem Indol-, als auch mit einem Pyrrol-Strukturmotiv erfolgreich umgesetzt werden. Somit konnte die Amin- und die Aldehyd-Komponente erfolgreich mit dem Olefin **21d** in der Copolymer-vermittelten Reaktion variiert werden und war daher geeignet für die Synthese einer DNA-kodierten Substanzbibliothek.

Um im Anschluss an die Povarov-Reaktion einen weiteren Syntheseyklus anschließen zu können, musste die Boc-Entschützung etabliert und optimiert werden.



Die Etablierung erfolgte mit einem Boc-geschützten Glycin-DNA-Konjugat **DNA-4**. Dieses DNA-Konjugat wurde mit dem Sulfonsäure-immobilisierten Copolymer **P1-BA-b** für vier Stunden bei Raumtemperatur in Wasser geschüttelt. Dabei konnte das freie Amin **DNA-5** zu etwa 20 % und eine starke Depurinierung der DNA zu etwa 45 % beobachtet werden. Da trotz der Verwendung des Copolymers **P1-BA-b** eine Zerstörung der DNA festgestellt werden konnte, wurde die Zugabe verschiedener Additive, wie  $MgCl_2$  oder 4-*tert*-Butylanilin **20b** getestet, um die Depurinierung zu reduzieren. Dabei konnte mit 1000 Äquivalenten an  $MgCl_2$  die Depurinierung auf unter 10 % gesenkt werden bei einer Produktbildung von etwa 30 %. Um die Produktbildung weiter zu erhöhen, wurden verschiedene Copolymer-Strukturen verwendet. Zum einen wurde die Position der immobilisierten Sulfonsäure untersucht, indem die Sulfonsäure entweder im hydrophilen, oder im hydrophoben Polymerblock immobilisiert wurde. Zum anderen wurde die Alkylkette des hydrophoben Acrylat-Monomers, sowie die Anzahl der eingebauten Monomere, auch Polymerisationsgrad genannt, variiert, um die Polaritäten des hydrophoben und hydrophilen Polymerblocks zu verändern. Aus diesen Untersuchungen zur Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung konnte beobachtet werden, dass die Positionierung der Sulfonsäure keinen großen Einfluss auf die durchgeführte Reaktion ausübte, wohingegen die Wahl des hydrophoben Monomers eine große Auswirkung auf die Produktbildung hatte. Mit einer kürzeren Alkylkette und somit einem hydrophileren Mizellenkern konnte eine erhöhte Produktbildung beobachtet werden. Auch der Polymerisationsgrad zeigte einen Effekt auf die Produktbildung in der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung. So konnte mit zunehmender Menge des hydrophoben Monomers eine Steigerung der Produktbildung beobachtet werden. Durch die Variation der Copolymer-Struktur konnte die Produktbildung auf 50 % gesteigert werden mit einer Depurinierung von unter 10 %. Somit war die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek geeignet.

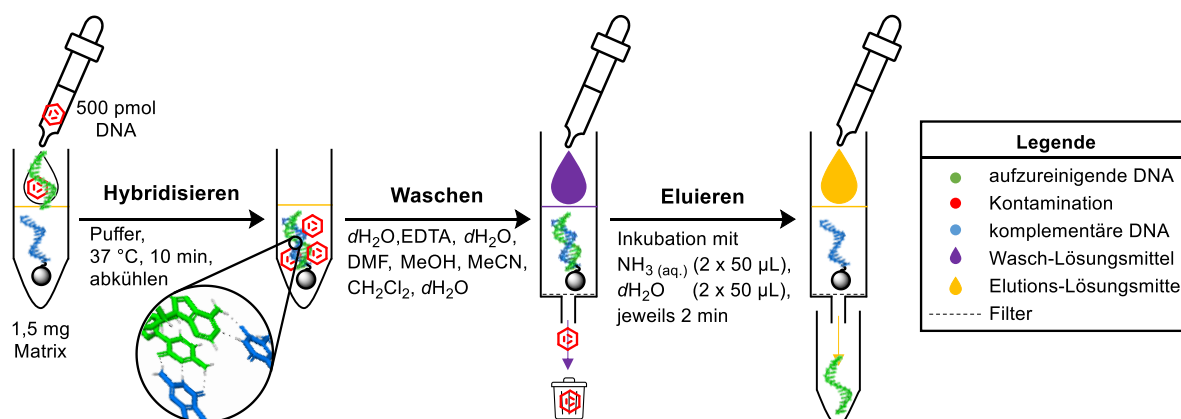
Anschließend sollte die Pictet-Spengler-Reaktion als eine weitere Säure-katalysierte Reaktion mit Hilfe der Copolymere auf DNA-Konjugaten etabliert werden. Dabei konnte das gewünschte  $\beta$ -Carbolin-Konjugat **DNA-6b** nur mit dem DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1g** und mit dem Amin **42c** erfolgreich durchgeführt werden. Durch die Variation der Reaktionsbedingungen, wie die Konzentration des Copolymers und des Amins, das Co-Lösungsmittel oder die Copolymer-Struktur, konnte das gewünschte  $\beta$ -Carbolin-Konjugat **DNA-6b** mit über 60 % gebildet werden. Allerdings konnte anschließend das Reaktandenspektrum nicht erweitert werden. Es wurden verschieden substituierte Tryptamine und Phenylethylamine getestet, als auch ein weiteres DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-1a**. Zudem wurde die Reaktion mit einem Tryptamin-DNA-Konjugat **DNA-8a** und verschiedenen Aldehyden **6d - h** durchgeführt. Allerdings konnte auch hier keine Produktbildung beobachtet werden, wodurch diese Reaktion nicht für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek in Betracht gezogen wurde.

Um die Copolymere nicht nur für Säure-katalysierte Reaktionen einzusetzen, wurde ein Copolymer mit einem immobilisierten Palladium-Komplex hergestellt. Dieses Copolymer **P3** sollte für die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung an DNA-Konjugaten eingesetzt werden. Dazu wurde ein Arylbromid über eine Amidsynthese an ein DNA-Oligonukleotid **DNA-10a** gebunden und mit der Trifluoromethylboronsäure **59b**, einer Base (KF, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) und dem Copolymer **P3** bei 50 °C über Nacht geschüttelt. Dabei konnte mit einer Copolymer-Konzentration von 0,25 mM und der Base Kaliumcarbonat als beste Bedingung das Produkt **DNA-11a** zu 50 % gebildet werden, ohne eine Degradierung der DNA zu beobachten. Mit diesen Reaktionsbedingungen wurde die Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Reaktion mit 13 verschiedenen Boronsäuren **59a - m** durchgeführt. Dabei konnte für alle elektronenreiche Arylboronsäuren **59e, f, m** ein vollständiger Umsatz und mit einigen elektronenarmen Arylboronsäuren **59b, h, a, k** moderate bis gute Umsätze erhalten werden. Da die Reaktion mit hohen Umsätzen, wenigen Nebenprodukten und ohne eine Zerstörung der DNA ablief, war diese Reaktion für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek geeignet.

Somit konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass es möglich war, sowohl Säure-katalysierte Reaktionen, als auch eine Palladium-katalysierte Reaktion mit Hilfe von amphiphilen Block-Copolymeren mit nur geringen Zerstörungen der DNA-Sequenzen und einem breiten Reaktandenspektrum erfolgreich durchzuführen und daher für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek eingesetzt werden können.

Eine weitere Herausforderung neben der Erweiterung des chemischen Raumes ist die erforderliche Qualität, wie die Reinheit, einer DNA-kodierten Molekülbibliothek für die Identifikation von bioaktiven Molekülen. Daher wurde in **Kapitel 4** eine neue Aufreinigungsmethode auf Basis einer dispersen Festphasenextraktion etabliert (siehe **Abbildung 56**). Dafür wurde ein DNA-Einzelstrang **DNA-12a** über eine Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition an eine feste Agarose-Matrix gebunden. Anschließend konnte ein aufzureinigender DNA-Einzelstrang **DNA-13b**, welcher vollständig komplementär zu der an der Matrix gebundenen DNA ist, über Watson-Crick-Wechselwirkungen an die feste Phase immobilisiert werden. Dies geschah durch Inkubation der **Matrix-DNA-12a** mit der aufzureinigenden **DNA-13b** in einem Puffer bei erhöhter Temperatur. Der Erfolg der Hybridisierung konnte über eine Markierung der aufzureinigenden **DNA-13b** mit einem Fluorophor beobachtet werden. Anschließend konnte die gebundene **DNA-13b** mit diversen wässrigen und organischen Lösungsmitteln, wie dH<sub>2</sub>O, EDTA, DMF, MeOH, MeCN und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, gewaschen werden, ohne sich von dem komplementären Strang **DNA-12a** und der Matrix zu lösen. Durch die Verwendung verschieden polarer Lösungsmittel ist es möglich, viele unterschiedlich polare Kontaminationen zu entfernen. Der aufgereinigte DNA-Strang **DNA-13b** konnte anschließend durch die Verwendung von wässriger Ammoniak-Lösung von dem komplementären DNA-Strang und der festen Phase abgelöst werden.

Das Ammoniak konnte rückstandsfrei entfernt werden, wodurch die aufgereinigte **DNA-13b** ohne eine Kontamination durch das Elutionsmittel erhalten werden konnte.

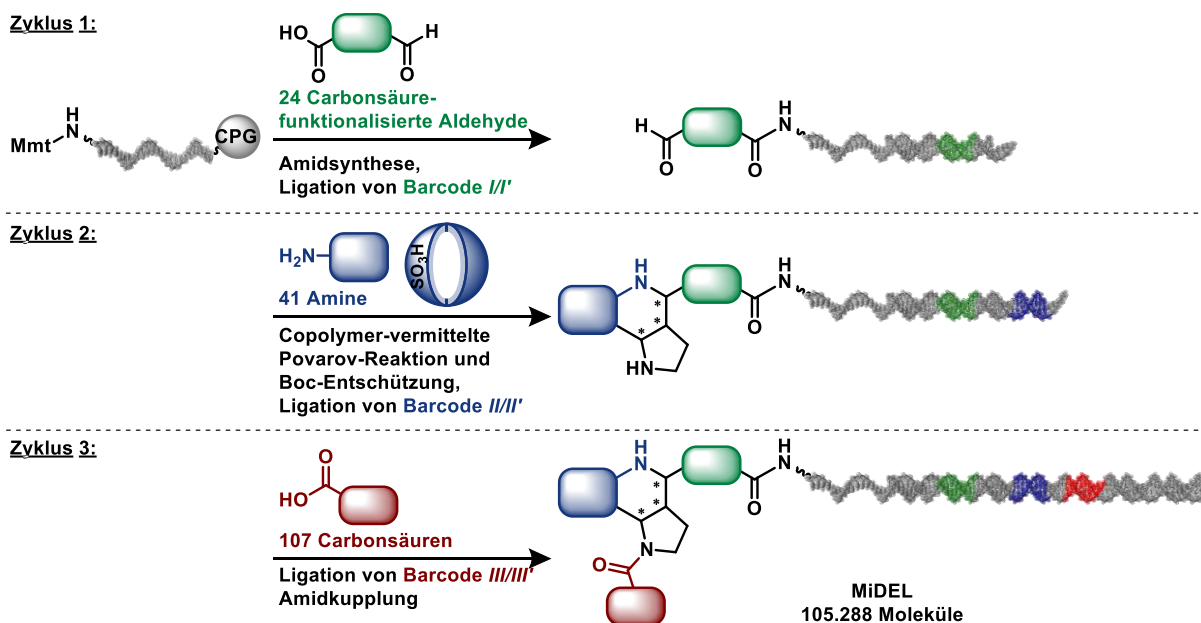


**Abbildung 56:** Affinitäts-Aufreinigung für den DEL-Syntheseprozess mit den optimierten Bedingungen.

Die etablierte Aufreinigung wurde anschließend mit unterschiedlich langen aufzureinigenden DNA-Einzelsträngen durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender DNA-Länge die DNA-Wiedergewinnung abnimmt. Diese könnte durch die Optimierung der Bedingungen der Hybridisierung oder durch die Verwendung längerer an die Matrix gebundener DNA-Einzelstränge gesteigert werden. Darauffolgend konnte die Affinitäts-Aufreinigung erfolgreich für eine Amidsynthese, sowie eine Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion eingesetzt werden, wobei eine deutliche Steigerung der Reinheit der DNA-Konjugate im Vergleich zu herkömmlichen Aufreinigungs-Methoden, wie der ethanolischen Fällung, beobachtet werden konnte. Somit war es in dieser Arbeit gelungen, eine neue Aufreinigungsmethode für DNA-Konjugate zu etablieren. Es ist möglich, unterschiedlich polare Reagenzien zu entfernen, eine hohe Wiedergewinnung der aufgereinigten Probe zu erhalten, sowie keine Kontaminationen durch die Elution einzutragen. Zudem könnte diese Aufreinigung auf alle DEL-Designs angewendet werden, die einzelsträngige oder partiell-einzelsträngige DNA verwenden. Auch eine Automatisierung dieser Affinitäts-Aufreinigung konnte durch die Zusammenarbeit mit *Robin Dinter und Leon Justen* aus der *Arbeitsgruppe Kockmann* (TU Dortmund, Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen) ermöglicht werden.<sup>[226]</sup>

Mit den Copolymer-vermittelten Reaktionen und der geeigneten Aufreinigungsmethode in der Hand wurde in **Kapitel 5** die Synthese einer 105.288-Mitglieder großen DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL) beschrieben (siehe **Abbildung 57**). Dabei wurden vier Synthese- und drei Ligationsschritte durchgeführt. Die Auswahl der Molekülbausteine und der DNA-Barcodes wurde mit Computer-gestützten Methoden durchgeführt. Der Aufbau des Moleküls wurde mit einer Festphasen-Amidsynthese von 25 diversen Carbonsäure-funktionalisierten Aldehyden **64a** und **64d - aa** an eine Primer-Sequenz **DNA-19** über einen Polyethylenglykol-Linker **66b** begonnen.

Davon konnten 24 Carbonsäure-funktionalisierte Aldehyde **64a** und **64e - aa** erfolgreich an die **DNA-19** gebunden und mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt werden. Im Anschluss erfolgte die enzymatische Ligation mit DNA-Barcode I und damit die Kodierung der 24 DNA-Aldehyd-Konjugate. Diese kodierten DNA-Konjugate **DNA-20a - y** konnten gemischt werden (**pool-DNA-20a - y**) und für die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion mit dem *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d**, und 41 diversen Aminen **20c, g, i, w, x, ae - bn** aufgeteilt und in der Povarov-Reaktion umgesetzt werden. Diese Produktgemische wurden mit Hilfe der Affinitäts-Aufreinigung gereinigt. In einem nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe unter Verwendung des Copolymers **P2-EA-d** entfernt. Das eingefügte Amin wurde über eine enzymatische Ligation mit DNA-Barcode II kodiert und gemischt (**pool-DNA-23a - ao**). Im Anschluss wurde der letzte DNA-Barcode III für 107 verschiedene Carbonsäuren **23a - dc**, welche über eine Amidsynthese an das freie Amin gebunden wurden, ligiert. Die finalen DNA-Konjugate (**MiDEL**) wurden gemischt und erneut mit Hilfe der Affinitäts-Aufreinigung gereinigt.



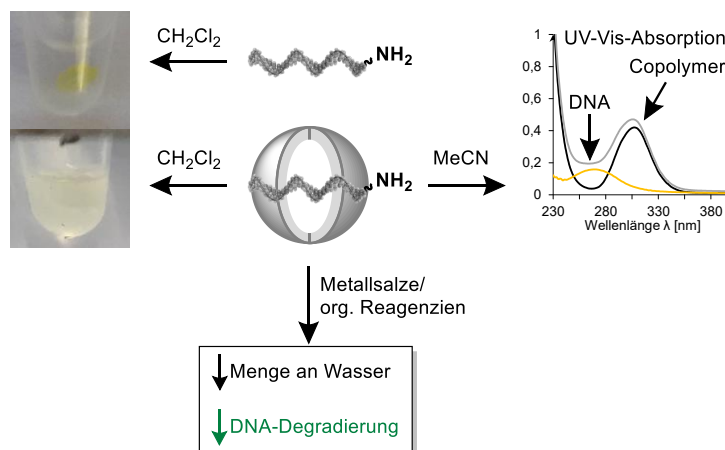
**Abbildung 57:** Synthese der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL).

Durch eine Analyse der nicht-aufgereinigten und aufgereinigten MiDEL mittels der Gel-Elektrophorese konnte eine deutliche Verbesserung der Konzentrationsbestimmung mittels UV-Vis-Absorption durch eine abgenommene Menge an Kontaminationen erzielt werden. Diese aufgereinigte Molekülbibliothek wurde anschließend in Selektionsassays gegen verschiedene Proteine mit verschiedenen Bedingungen getestet. Sollten Moleküle aus der DEL während dieser Selektionsexperimente angereichert worden sein, so müssen diese *Hit*-Strukturen anschließend validiert werden.

Aufgrund der starken Hydrophilie des DNA-Stranges muss Wasser als (Co-) Lösungsmittel für die Etablierung von chemischen Reaktionen an DNA-Konjugaten, sowie die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek verwendet werden.

Dies birgt allerdings Einschränkungen in der Wahl der chemischen Reaktion. Um Wasser als Lösungsmittel bei der Durchführung von chemischen Reaktionen an DNA-Konjugaten zu vermeiden, sollten ebenfalls amphiphile Block-Copolymere verwendet werden. Diese sollten mit der DNA interagieren und durch diesen Copolymer-DNA-Komplex ein Mischen mit organischen Lösungsmitteln ermöglichen (siehe **Abbildung 58**).

Die Block-Copolymere wurden von *Dr. Christian Gramse* und *Marvin Dieter* aus der *Arbeitsgruppe Weberskirch* hergestellt und enthielten einen hydrophilen Polymerblock aus *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA)-Monomeren und einem hydrophoben Polymerblock aus *n*-Butylacrylat (BA)-Monomeren. Dabei wurde keine katalytisch aktive Einheit eingebaut. Das Copolymer **P4-a** wurde mit einem Fluorophor-markierten DNA-Einzelstrang **DNA-13b** in Wasser vermischt, getrocknet und anschließend mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (MeCN, 1,2-DCE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Toluol) versucht zu lösen. Dabei konnte bei allen Lösungsmitteln eine homogen verteilte gelbe Färbung beobachtet werden, welche sich mit der Zeit nicht absetzte. Im Vergleich dazu zeigte eine DNA-Probe ohne die Verwendung des Copolymers ein deutlich abgetrenntes gelbes Pellet. Somit konnte ein positiver Effekt auf die Durchmischung der **DNA-13b** in verschiedenen organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers **P4-a** beobachtet werden. Durch Zugabe von Wasser oder NaCl-Lösungen konnte eine deutliche Phasentrennung und eine Anreicherung der **DNA-13b** in der wässrigen Phase beobachtet werden, wodurch ein Überführen der **DNA-13b** wieder in die wässrige Phase ermöglicht werden konnte.



**Abbildung 58:** Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Oligonukleotiden in organischen Lösungsmitteln. Löslichkeitsversuche, Analyse der Copolymer-DNA-Interaktion und Untersuchung der DNA-Degradierung gegenüber diversen Metallsalzen und organischen Reagenzien.

Die Copolymer-DNA-Interaktion wurde mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und der UV-Vis-Absorption analysiert. Bei den DLS-Messungen konnte für das Copolymer keine Bildung von Aggregaten in den organischen Lösungsmitteln festgestellt werden. Die Copolymer-DNA-Komplexe lieferten allerdings sehr große und stark fluktuierende Aggregate. Die Aggregatgröße schien dabei von der Polarität des Lösungsmittels beeinflusst zu werden.

Je unpolarer das Lösungsmittel war, desto größer war der hydrodynamische Durchmesser, welches eventuell auf eine stärkere Fluktuation und somit auf eine Abschwächung der Copolymer-DNA-Interaktion hindeutet. Über UV-Vis-Messungen konnte mittels der Absorption der Trithiocarbonat-Gruppe des Copolymers **P4-a**, sowie der Absorption der **DNA-27** gemessen werden, ob die einzelnen Komponenten detektierbar waren. Lediglich in Wasser und Acetonitril konnten beide Absorptionen beobachtet werden. Daraus folgt, dass die **DNA-27** durch den Copolymer-DNA-Komplex in Acetonitril gemischt vorlag, da ansonsten keine Absorption der **DNA-27** beobachtet werden könnte. Des Weiteren wurde die Stabilität von DNA-Einzelsträngen gegenüber verschiedenen Metallsalzen und organische Reagenzien in organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers **P4-a** untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich eine Reduzierung des Wassers positiv auf die Stabilität der DNA-Einzelstränge auswirkt, was nur durch die Verwendung der amphiphilen Copolymere möglich ist. Diese Copolymer-DNA-Interaktion kann es demnach möglich machen, chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln durchzuführen und somit den chemischen Raum zu erweitern und strukturreiche DNA-kodierte Substanzbibliotheken herzustellen.

Im Zuge dieser Arbeit konnte der chemische Raum von DNA-kodierten Substanzbibliotheken erfolgreich durch die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren durch die Etablierung von zwei Säure-vermittelten Reaktionen, sowie einer Palladium-vermittelten Reaktion an DNA-Konjugaten, erweitert werden und für die Synthese einer 105.288-Mitglieder großen DNA-kodierten Molekülbibliothek eingesetzt werden. Zudem konnte eine neue Aufreinigungsmethode entwickelt und während der Synthese der Molekülbibliothek verwendet werden. Dadurch konnten sowohl einzelne DNA-Konjugate als auch komplexe Molekülbibliotheks-Gemische aufgereinigt werden. Des Weiteren wurden amphiphile Block-Copolymere ohne eine immobilisierte katalytische Einheit dazu verwendet, DNA-Konjugate in organischen Lösungsmitteln zu mischen. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, chemische Reaktionen an DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln, durchzuführen und somit den chemischen Raum von DNA-kodierten Molekülbibliotheken zu erweitern ohne die Herstellung von Reaktions-spezifischen Copolymeren.

## 8. Experimenteller Teil

### 8.1 Hilfssoftware

Die in dieser Arbeit dargestellten chemischen Strukturen wurden mit dem Programm *ChemDraw® Professional 21.0.0* der Fa. *PerkinElmer Informatics* erstellt. Abbildungen und deren Bearbeitung erfolgte mit der Software *Microsoft Paint 3D* und *PowerPoint*. Die Literatur wurde mit dem Programm *Mendeley 1.17.13* verwaltet.

### 8.2 Chemikalien und Lösungen

#### Chemikalien und Lösungsmittel

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Chemikalien der Firmen *abcr*, *Acros Organics*, *Aldrich Market Select*, *AlfaAesar*, *Biozym*, *Carbolution Chemicals*, *Carl Roth*, *Fisher Scientific*, *Fluka*, *Fluorochem*, *Honeywell*, *Ilumina*, *Merck*, *New England Biolabs*, *Nippon Genetics Europe GmbH*, *Sigma Aldrich*, *TCI*, *Thermo Scientific*, *TCI Chemicals* und *VWR* verwendet. Die Chemikalien und trockenen Lösungsmittel (MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1,2-DCE, DMF, MeOH, THF, Toluol) wurden wie vom Hersteller erhältlich verwendet. Das verwendete Wasser wurde durch das Reinstwasser-System *MicroPure* der Firma *TKA* destilliert.

Die 5'-Aminolinker-modifizierte DNA, gebunden an *controlled pore glass* (CPG, 1000 Å), wurden von den Firmen *IBA* und *EllaBiotech* hergestellt. DNA in Lösung wurde von der Firma *Integrated DNA Technologies* genutzt.

#### Angesetzte Lösungen

AMA: wässrige Ammoniak-Lösung (30 %)/ Methylamin (40 %), 1:1, vol/vol.

Capping-Lösung: 1:1 Mischung von THF/Methylimidazol, 9:1, vol/vol, und THF/Pyridin/Essigsäureanhydrid, 8:1:1, vol/vol.

MALDI-Matrix 1: 2,5:1 Mischung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (90 mg/mL) in MeOH und Ammoniumcitrat tribasisch (113 mg/mL) in dH<sub>2</sub>O.

MALDI-Matrix 2: Gesättigte Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure in einer 1:1 Mischung von 0,1 % TFA in dH<sub>2</sub>O und Ammoniumcitrat (10 mg/mL) in MeCN.

#### Verwendete Puffer

Annealing-Puffer: TRIS (10 mM), EDTA (1 mM), NaCl (50 mM).

T4 Ligase-Puffer (*New England Biolabs*): TRIS (50 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), ATP (1 mM), DTT (10 mM), pH 7,5.

Nukleasefreier Duplexpuffer (*IDT*): HEPES (30 mM), pH 7,5, Kaliumacetat (100 mM).

## 8.3 Allgemeine chemische Arbeitstechniken und Geräte

### Waagen

Zum Abwiegen aller Chemikalien wurden die Waagen CP225D der Firma *Sartorius* und Kern 770 der Firma *Kern & Sohn GmbH* verwendet.

### Verteilen von Lösungen/ Reaktionsmischungen

Für das Verteilen von Lösungen und Reaktionsgemischen wurden Pipetten für unterschiedliche Volumina (0,1 - 2,5  $\mu\text{L}$ , 0,5 - 10  $\mu\text{L}$ , 2 - 20  $\mu\text{L}$ , 20 - 200  $\mu\text{L}$ , 100 - 1000  $\mu\text{L}$ ) der Firma *Eppendorf* verwendet.

### pH-Meter

Zur Einstellung des pH-Wertes von Puffern und anderen Lösungen wurde das pH-Meter FiveEasy™ FE20 mit der Elektrode LE409 der Firma *Mettler Toledo* verwendet.

### Lösen/Vermischen

Für ein kurzzeitiges Vermischen von Lösungen und angesetzten Reaktionen wurde der Reagenzglasschüttler REAX top der Firma *Heidolph* verwendet. Sollten sich Feststoffe nicht lösen lassen, wurde das Ultraschallbad mit Heizfunktion SONOREX Super RK 255 H der Firma *Bandelin* verwendet. Zum Vermischen von Proben über einen längeren Zeitraum und bei verschiedenen Temperaturen wurden die Thermoschüttler TS-100 der Firma *Lab4you*, Thermoshaker der Firma *Thermo Scientific*, Mixing Block MB-102 der Firma *Bioer* und der Heiz-Thermomixer der Firma *HTC DiTabis* mit verschiedenen Aufsätzen für unterschiedliche Gefäßgrößen (0,6 mL, 1,6 mL) verwendet.

### Vakuumverteiler

Für die Aufreinigung von CPG-gebundenen und Matrix-gebundene DNA-Proben wurden diese in Filtersäulen der Firma *HTI Bio-X* überführt und mit Hilfe eines Vac-Man-Vakuumverteilers der Firma *Promega* und der Firma *Sigma Aldrich* und einer Vakuumpumpe der Firma *Ilmvac* gereinigt.

### Vakuumzentrifugen

Zum Einengen und Trocknen von DNA-Proben wurden die Vakuumzentrifugen Concentrator 5301 der Firma *Eppendorf*, RVC 2-18CDplus der Firma *Christ* und miVac Duo Concentrator der Firma *GeneVac* bei 40 - 45 °C verwendet.



### **Zentrifugen**

Für das Zentrifugieren von einzelnen kleinen Gefäßen wurde die Zentrifuge 5415R der Firma *Eppendorf* bei 4 °C und 11.000 rpm verwendet. Zum Zentrifugieren von Mikrotiterplatten wurde die Heraeus Megafuge 8R der Firma *Thermo Scientific* bei 4 °C und 4.400 rpm verwendet.

### **Analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (analytische RP-HPLC)**

Die in dieser Arbeit hergestellten DNA-Konjugate und die Reaktionsgemische wurden mit Hilfe der analytischen HPLC der Fa. *Shimadzu Prominence* analysiert. Dabei wurde eine C<sub>18</sub>-Säule (*Phenomenex*, Gemini; 5 µm, C18, 110 Å, 50 x 4,6 mm) mit einer Vorsäule (*Phenomenex*, Security Guard™) verwendet. Die Methode bestand aus einem Gradienten aus wässrigem Triethylammoniumacetat-Puffer (10 mM, pH = 8) und Methanol bei einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurde mit 10 % MeOH gestartet und auf 80 % innerhalb von 9 min erhöht. Anschließend wurde auf 100 % MeOH innerhalb einer halben Minute geändert und für 3 min gehalten. Anschließend wurde innerhalb einer Minute auf einen Gehalt von 10 % MeOH umgestellt und für 4,5 min gehalten. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme wurden mit dem Programm *LabSolutions* (Version 5.54 SP5) analysiert.

### **Präparative Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (präparative RP-HPLC)**

Die in dieser Arbeit hergestellten DNA-Konjugate wurden mit Hilfe der präparativen HPLC der Fa. *Shimadzu Prominence* aufgereinigt. Dabei wurde eine C<sub>18</sub>-Säule (*Phenomenex*, Gemini; 5 µm, C18, 110 Å) mit einer Vorsäule (*Phenomenex*, Gemini, SemiPrep Cartridges, C18, 10 x 10 mm) verwendet. Die Methode bestand aus einem Gradienten aus wässrigem Triethylammoniumacetat-Puffer (100 mM, pH = 8) und Methanol bei einer Flussrate von 5 ml/min. Es wurde mit 20 % MeOH gestartet und auf 70 % innerhalb von 13 min erhöht. Anschließend wurde auf 100 % MeOH innerhalb einer Minute geändert und für 3 min gehalten. Anschließend wurde innerhalb einer Minute auf einen Gehalt von 20 % MeOH umgestellt und für 4 min gehalten. Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme wurden mit dem Programm *Labsolution* (Version 5.54 SP5) analysiert.

### **Matrix-assistierte Laser-Desorption/-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF)**

Die DNA-Konjugate, sowie Reaktionsgemische und –Produkte wurden mit Hilfe des MALDI-TOF/TOF Systems der Firma *Bruker Daltonics* des Max-Planck-Instituts analysiert. Für kurze DNA-Oligonukleotide (< 4000 g/mol) wurde die MALDI-Matrix 1 verwendet. Für längere DNA-Oligonukleotide (> 4000 g/mol) wurde die MALDI-Matrix 2 eingesetzt. Von dieser Matrix wurde 1 µL auf einen Probenträger aufgetragen, mit 1 µL der Probe vermischt und getrocknet.

### **Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

Für die Analyse der Mizell-/Partikelgröße wurden DLS-Messungen mit dem Gerät NanoBrook ZetaPals Zeta der Firma *Brookhaven Instruments* mit einem He-Ne-Laser ( $\lambda = 633$  nm) der Arbeitsgruppe von Prof. Weberskirch durchgeführt. Die Copolymere wurden mit einer Konzentration von 1 mM in dem jeweiligen Lösungsmittel bei 25 °C vermessen. Es wurden 3-fach Messungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BIC Particle Solutions der Firma *Brookhaven Instruments*.

### **Spektralphotometer**

Die Oligonukleotid-Konzentration wurde durch die UV-Vis-Absorption ( $\lambda = 260$  nm) mit einem Spektralphotometer NanoDrop 2000 der Firma *Thermo Fisher Scientific* bestimmt. Dazu wurde zunächst mit Wasser (1 µL) der Blindwert bestimmt und anschließend die Probe (1 µL) vermessen. Es wurde für jede Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die Berechnung der DNA-Konzentration aus der gemessenen Absorption wurde das *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*-Tool verwendet.

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

Für die Messung der UV-Vis-Absorption der Copolymer-DNA-Interaktion wurde das Doppelstrahl-Spektralphotometer UV6300-PC der Firma *VWR* verwendet.

## **8.4 Allgemeine biologische Arbeitstechniken, Materialien und Geräte**

### **Ethanolische Fällung von DNA-Oligonukleotiden**

Zu dem aufzureinigenden DNA-Oligonukleotid (40 µL) wurde wässrige NaOAc-Lösung (4 µL, 3 M, pH = 4,75) und Ethanol (176 µL, 100 %ig) gegeben und bei -80 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4 °C, 11.000 rpm, 50 min) und der Überstand wurde abgenommen. Das DNA-Pellet wurde bei 37 °C für 10 min getrocknet. Anschließend wurde erneut Ethanol (220 µL, 100 %ig) hinzugegeben und die Probe für mindestens eine Stunde bei -80 °C inkubiert, darauffolgend zentrifugiert und getrocknet. Die DNA-Probe wurde in *dH<sub>2</sub>O* oder IDTE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH = 8,0, *IDT*) aufgenommen.

### **Phosphorylierung**

Für die Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Oligonukleotiden (280 pmol, 100 mM) wurde eine T4 Polynukleotidkinase (1 µL, *Thermo Fisher Scientific*), PNK-Puffer A (2 µL, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin, pH = 7,6 bei 25 °C, *Thermo Fisher Scientific*) und ATP (2 µL, 10 mM, *Thermo Fisher Scientific*) verwendet und auf 20 µL mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Kinase für 10 min bei 75 °C inaktiviert. Die Probe wurde langsam auf 4 °C heruntergekühlt. Dies geschah in einem Thermocycler Biometra TOne (*analytic jena*).

### **Ligation**

Für die enzymatische Ligation wurden die komplementären DNA-Oligonukleotide (40 pmol) mit einem T4 DNA-Ligasepuffer (2 µL, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH = 7,5 bei 25 °C, *New England Biolabs*) versetzt und auf ein Volumen von 20 µL mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Diese Reaktionsmischung wurde auf 85 °C erhitzt, für 10 min bei der Temperatur gehalten und anschließend in 5 °C-Schritten je 2 min auf 4 °C heruntergekühlt. Anschließend wurde eine T4 DNA-Ligase (1 µL, T4 DNA Ligase, *New England Biolabs*) hinzugegeben und für 16 h bei 25 °C inkubiert. Die Ligase wurde durch Erhitzen auf 75 °C für 15 min inaktiviert. Die Probe wurde auf 4 °C heruntergekühlt und gelagert. Dies geschah in einem Thermocycler Biometra TOne (*analytic jena*)

Die Kodierungen der MiDEL (Phosphorylierung und enzymatische Ligation) erfolgten in Mikrotiterplatten STERILIN mit 96 Kavitäten (*Kisker Biotech*) mit selbstklebenden Verschlussfolien *Optical Clear Adhesive Seal Sheets* (*Thermo Scientific*).

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von DNA-Oligonukleotiden wurde eine *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity* DNA Polymerase (0,5 µL, 2.000 U/mL, *New England Biolabs*), 5 x *Phusion HF* Puffer (8 µL, *New England Biolabs*), MgCl<sub>2</sub> (2,4 µL, 50 mM, *New England Biolabs*), dNTP-Mix (1 µL, 100 mM, *Biozym*) mit den Primern und den DNA-Oligonukleotiden vermischt und mit einem Temperaturprogramm in einem Thermocycler Biometra TOne (*analytic jena*) inkubiert. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *QIAquick*<sup>®</sup> *PCR Purification Kits* (*Qiagen*) aufgereinigt. Für die Einführung der Selektionsexperiment-spezifischen DNA-Barcodes wurden in nacheinander folgenden PCR-Experimenten DNA-Adapter (100 µM, *IDT*) und anschließend Primer aus dem *Nextera*<sup>®</sup> *XT Index Kit* (*Illumina*) verwendet.

### **Gel-Elektrophorese**

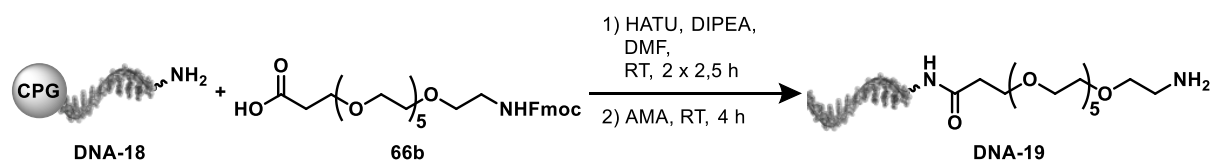
Für die Auftrennung von unterschiedliche langen DNA-Oligonukleotiden für die Analyse von enzymatischen Ligationen und Vervielfältigung mittels PCR wurde die Gel-Elektrophorese verwendet. Dazu wurde ein 4 oder 5,5 % Agarose-Gel (4 g oder 5,5 g, LE Agarose, *Biozym*) in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (100 mL, 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH = 8) durch Erhitzen in der Mikrowelle und gießen in eine Gelkammer (*Febikon Labortechnik GmbH*) hergestellt. Nach Aushärten des Agarose-Gels wurden die DNA-Proben und der DNA-Marker *GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*), gefärbt mit *Midori Green Direct* (*Nippon Genetics Europe GmbH*), in die Gelkammern geladen. Die Auftrennung erfolgte 10 min bei 100 V und anschließend 40 min bei 150 V durch das Netzgerät *PowerPac Universal* (*Bio-Rad*). Das Gel wurde anschließend über das Dokumentationssystem *FastGene FAS-Digi Pro* (*Nippon Genetics*) visualisiert.

### **Selektionsassay**

Für das Selektionsassay wurden *HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads* (12,5 mg/mL in 20 % Ethanol, *Thermo Scientific*), sowie *Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads* (10 mg/mL in Wasser mit 0,05 % NaN<sub>3</sub>, *Thermo Scientific*) vermischt und 4 µL pro Experiment in ein Reaktionsgefäß (1,6 mL) überführt. Die Kügelchen wurden mit PBS-Puffer (4 x 100 µL) mit anschließendem Abnehmen des Überstands mit Hilfe einer magnetischen Reaktionsgefäßhalterung *magnetic separation rack* (*New England Biolabs*) gewaschen. Anschließend wurden die Kügelchen mit einem Protein-spezifischen Immobilisierungs-Puffer (2 x 100 µL) gewaschen. Das Protein (10 µL) wurde hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C auf einem Plattformschüttler *Unimax 1010* (*Heidolph Instruments*) mit den Kügelchen inkubiert. Darauf folgend wurden die Protein-beschichteten Kügelchen mit dem Immobilisierungs-Puffer (2 x 100 µL), einem *Bead Blocking* Puffer (100 µL, Immobilisierungspuffer mit Rinderserumalbumin (BSA, 0,1 mg/mL, *Fisher Scientific*) und *herring sperm* DNA (0,2 mg/mL, *Invitrogen*) und wieder dem Immobilisierungs-Puffer (2 x 100 µL) mit Hilfe der magnetischen Reaktionsgefäßhalterung gewaschen. Anschließend wurde die DEL (1 µL, 250 fmol) mit dem Immobilisierungs-Puffer (49 µL) zu den Protein-beschichteten Kügelchen gegeben und für 45 min bei Raumtemperatur auf dem einem Plattformschüttler inkubiert. Die magnetischen Kügelchen wurden mit einem Wasch-Puffer (8 x 100 µL, Immobilisierungs-Puffer mit BSA (0,1 mg/mL)) gewaschen. Die gebundenen Moleküle der DEL wurden durch zweifache Inkubation von dH<sub>2</sub>O (20 µL) mit den magnetischen Kügelchen bei 80 °C für 5 min eluiert. Im Anschluss wurde der Selektionsassay wiederholt, indem 20 µL des Eluats anstelle der DEL zu einem frisch immobilisierten Protein gegeben wurde. Bei einigen Experimenten wurde Tween-20 (0,01 %, *Fisher Scientific*) in den PBS- und Immobilisierungs-Puffer gegeben.

## 8.5 Amidsynthese von DNA-Konjugaten

### Synthese von DNA-PEG-Linker Konjugaten



**Schema 21:** Reaktionsschema der Amidsynthese eines Polyethylenglykol-Linkers an eine DNA-Sequenz.

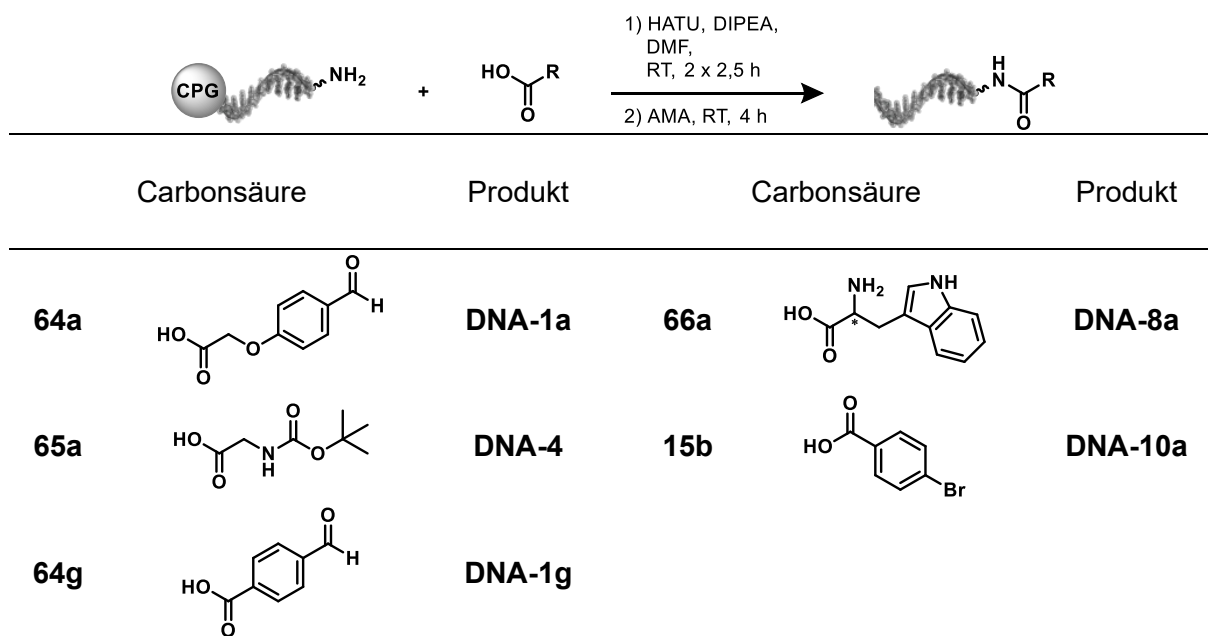
**Schritt 1:** Für die Amidsynthese wurde ein DNA-Einzelstrang (1  $\mu\text{mol}$ ) mit einem C6-Amino-Linker am 5'-Ende modifiziert, welcher über eine MMT- oder DMt-Schutzgruppe geschützt war, gebunden an *controlled pore glass* (CPG, 1000 Å), verwendet. Die MMT- oder DMt-Schutzgruppe wurde durch Zugabe von 3 %iger Trichloressigsäure in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 200  $\mu\text{L}$ ) für je 1 min entfernt. Die vollständige Entschützung konnte über den Farbwechsel der Lösung von gelb über orange zu farblos beobachtet werden. Anschließend wurde die DNA über eine Filtersäule mit 1 % TEA in MeCN neutralisiert und mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen.

**Schritt 2:** Die DNA (4 x 250 nmol), der Fmoc-NH-PEG(X)-COOH-linker (100  $\mu\text{mol}$ , 100 Äquiv.) und HATU (38 mg, 100  $\mu\text{mol}$ , 100 Äquiv.) wurden 15 min unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde jedes Reagenz in trockenem DMF (je 300  $\mu\text{L}$ ) gelöst und die DNA suspendiert. Zur Aktivierung der Carbonsäure wurde HATU und DIPEA (42,5  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{mol}$ , 250 Äquiv.) zugegeben und für 15 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde diese Lösung auf die DNA verteilt und 2,5 h bei RT geschüttelt (1.000 U/min). Nach der Amidsynthese wurde das DNA-Konjugat auf der Festphase über eine Filtersäule mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Die Aktivierung der Carbonsäure, die Amidsynthese und das anschließende Waschen wurde einmal wiederholt. Nicht umgesetzte Amine wurden mit der Capping-Lösung (3 x 200  $\mu\text{L}$  je 30 sek.) behandelt, zwischendurch mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

**Schritt 3:** Sollte eine weitere Amidsynthese durchgeführt werden, wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch Schütteln mit einer 20 %igen Lösung von Piperidin in trockenem DMF (800  $\mu\text{L}$ ) innerhalb von 10 min bei RT entfernt. Anschließend wurde das DNA-Konjugat über eine Filtersäule mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

## Synthese von DNA-Konjugaten

Tabelle 19: Synthese verschiedener DNA-Startmaterialien über die Amidsynthese auf fester Phase (CPG).



**Schritt 1:** Für die Amidsynthese wurde ein DNA-Einzelstrang (1  $\mu\text{mol}$ ) mit einem C6-Amino-Linker am 5'-Ende modifiziert, welcher über eine MMT- oder DMt-Schutzgruppe geschützt war, gebunden an *controlled pore glass* (CPG, 1000 Å), verwendet. Die MMT- oder DMt-Schutzgruppe wurde durch Zugabe von 3 %iger Trichloressigsäure in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 200  $\mu\text{L}$ ) für je 1 min entfernt. Die vollständige Entschützung konnte über den Farbwechsel der Lösung von gelb über orange zu farblos beobachtet werden. Anschließend wurde die DNA über eine Filtersäule mit 1 % TEA in MeCN neutralisiert und mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen.

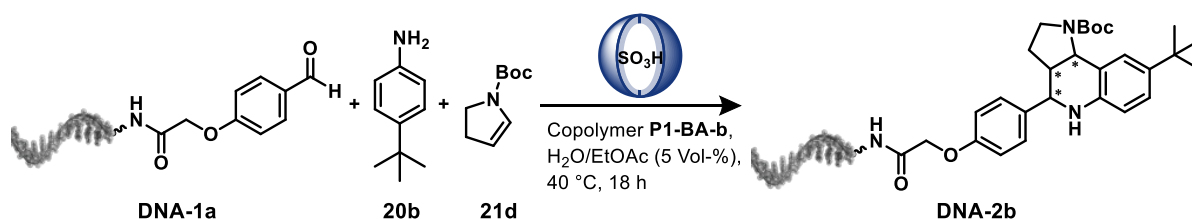
**Schritt 2:** Die DNA (4 x 250 nmol), die Carbonsäure (100  $\mu\text{mol}$ , 100 Äquiv.) und HATU (38 mg, 100  $\mu\text{mol}$ , 100 Äquiv.) wurden 15 min unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde jedes Reagenz in trockenem DMF (je 300  $\mu\text{L}$ ) gelöst oder suspendiert. Zur Aktivierung der Carbonsäure wurde HATU und DIPEA (42,5  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{mol}$ , 250 Äquiv.) zugegeben und für 15 min bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde diese Lösung auf die DNA verteilt und 2,5 h bei RT geschüttelt (1.000 U/min). Nach der Amidsynthese wurde das DNA-Konjugat auf der Festphase über eine Filtersäule mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Die Aktivierung der Carbonsäure, die Amidsynthese und das anschließende Waschen wurde einmal wiederholt. Nicht umgesetzte Amine wurden mit der Capping-Lösung (3 x 200  $\mu\text{L}$  je 30 sek.) behandelt, zwischendurch mit DMF, MeOH, MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 3 x 200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

**Schritt 3:** Das DNA-Konjugat wurde durch Schütteln mit der AMA-Lösung (500  $\mu\text{L}$ ) über 4 h bei RT von dem CPG getrennt und entschützt. Nach dieser Reaktion wurde der Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und der Feststoff mit  $d\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (200  $\mu\text{L}$ , 1:1) gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt und ein 1 M Tris-Puffer (20  $\mu\text{L}$ ) wurde hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde in der Vakuumzentrifuge verdampft und das entstandene Pellet in  $d\text{H}_2\text{O}$  (100  $\mu\text{L}$ ) gelöst.

**Schritt 4:** Das Produkt wurde über eine präparative RP-HPLC gereinigt. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden gesammelt und das Lösungsmittel wurde in der Vakuumzentrifuge entfernt. Das entstandene Pellet wurde in  $d\text{H}_2\text{O}$  (200  $\mu\text{L}$ ) gelöst und mit Hilfe der MALDI-MS analysiert. Anschließend wurde EtOH (800  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und das DNA-Konjugat über Nacht bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  ausgefällt. Das Gemisch wurde zentrifugiert (50 min, 11000 rpm,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ), der Überstand abdekantiert und das Pellet bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet. Zu dem Pellet wurde erneut EtOH (800  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und mindestens 1 h bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  ausgefällt. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (50 min, 11000 rpm,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ), der Überstand abdekantiert und das Pellet bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet.

**Schritt 5:** Der weiße Rückstand wurde in  $d\text{H}_2\text{O}$  (200  $\mu\text{L}$ ) gelöst und die Konzentration der DNA-Probe wurde mit Hilfe des Spektralphotometers und die Reinheit mit Hilfe der analytischen HPLC bestimmt.

## 8.6 Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion



Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-1a** (500 pmol, 1 Äquiv.) in destilliertem Wasser wurde 4-*tert*-Butylanilin **20b** (0,159  $\mu\text{L}$ , 1 nmol, 2000 Äquiv.) und *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (0,173  $\mu\text{L}$ , 1 nmol, 2000 Äquiv.) zugegeben. Für das Copolymer **P2-EA-a** wurde eine Stammlösung (für fünf Reaktionen à 50 Äquiv.: 1,125 mg, 125 nmol, 250 Äquiv.) in destilliertem Wasser (80  $\mu\text{L}$ , 16  $\mu\text{L}$  pro Reaktion) hergestellt und zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Um eine Konzentration an Copolymer **P2-EA-a** von 0,5 mM zu erhalten, wurde mit destilliertem Wasser und EtOAc (5  $\mu\text{L}$ ) auf 50  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und die Reaktionsmischung bei 40 °C für 18 h geschüttelt. Die Reaktionsmischungen wurden mit EtOAc (6 x 200  $\mu\text{L}$ ) extrahiert, die wässrige Phase in einer Vakuumzentrifuge verdampft und der Rückstand in destilliertem Wasser (40  $\mu\text{L}$ ) gelöst. Mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS-Analyse wurde die Probe auf Produktbildung und Produktidentität untersucht.

### 8.6.1. Variation der Reaktionsbedingungen

#### Kinetik der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

Die Reaktionen wurden nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.6** bei 25 °C, 40 °C, 50 °C und 60 °C mit unterschiedlichen Reaktionszeiten durchgeführt (siehe **Tabelle 20**).

**Tabelle 20:** Variation der Reaktionszeit und Temperatur für die Synthese des DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin Konjugats **DNA-2b**.

Eintrag	$T$ [°C]	$t$ [h]	Eintrag	$T$ [°C]	$t$ [h]
1	25	0,5	10	50	1
2	25	1	11	50	2
3	25	2	12	50	4
4	25	4	13	60	0,5
5	40	0,5	14	60	1
6	40	1	15	60	2
7	40	2			
8	40	4			
9	50	0,5			



## 8.6.2. Reaktandenspektrum der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

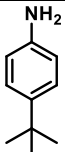


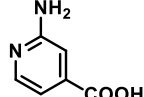
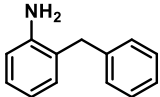
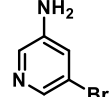
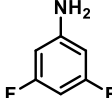
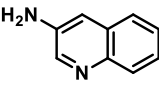
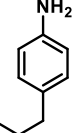

### Variation des Olefins

Die Reaktion wurde mit *tert*-Butylvinylcarbammat **21e** oder *N*-Boc-Allylamin **21f** anstelle des *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.6** durchgeführt.

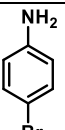
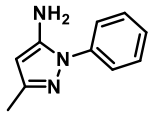
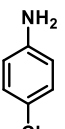
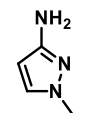
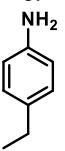
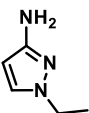
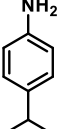
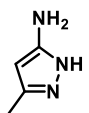
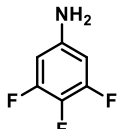
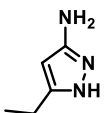

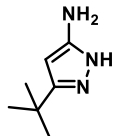

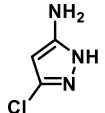

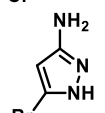

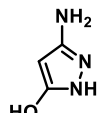

### Variation des Amins

Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-1a** (500 pmol) in destilliertem Wasser wurde ein Anilin (**Tabelle 21**; 4  $\mu\text{mol}$ , 8000 Äquiv.), gelöst in 2,5  $\mu\text{L}$  EtOAc (von einer Stammlösung mit 40  $\mu\text{mol}$  Anilin gelöst in 25  $\mu\text{L}$  EtOAc), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (0,69  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{mol}$ , 8000 Äquiv.) und das Copolymer **P2-EA-a** (25 nmol, 50 Äquiv.), gelöst in destilliertem Wasser (16  $\mu\text{L}$  von einer Stammlösung mit 1,25  $\mu\text{mol}$  Copolymer **P2-EA-a** gelöst in 800  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser), zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 50  $\mu\text{L}$  aufgefüllt, um eine Endkonzentration des Polymers von 0,5 mM zu erhalten und anschließend bei 40 °C für 18 h geschüttelt. Im Anschluss wurde mit EtOAc (6 x 200  $\mu\text{L}$ ) extrahiert, die wässrige Phase in einer Vakuumzentrifuge verdampft, der Rückstand mit destilliertem Wasser (40  $\mu\text{L}$ ) gelöst und mit Hilfe der analytischen HPLC mit einem Gradienten von TEAA-Puffer (10 mM, pH = 8) und Methanol (10 % - 60 % Methanol) über 9 min. analysiert. Außerdem wurde von der Reaktionsmischung eine MALDI-MS-Analyse durchgeführt.

**Tabelle 21:** Verwendete Amine für die Etablierung der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese von Tetrahydrochinolin-Konjugaten.

Eintrag	Anilin	Produkt	Eintrag	Anilin	Produkt
1	<b>20b</b> 	<b>DNA-2b</b>	16	<b>20q</b> 	<b>DNA-2s</b>
2	<b>20c</b> 	<b>DNA-2e</b>	17	<b>20r</b> 	<b>DNA-2t</b>
3	<b>20d</b> 	<b>DNA-2f</b>	18	<b>20s</b> 	<b>DNA-2u</b>
4	<b>20e</b> 	<b>DNA-2g</b>	19	<b>20t</b> 	<b>DNA-2v</b>
5	<b>20f</b> 	<b>DNA-2h</b>	20	<b>20u</b> 	<b>DNA-2w</b>

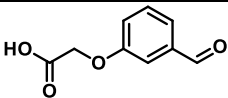
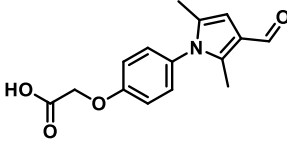
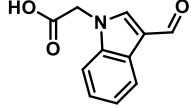
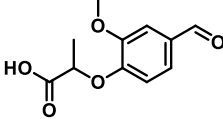
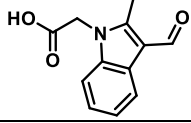
Fortsetzung Tabelle 21

6	20g		DNA-2i	21	20v		DNA-2x
7	20h		DNA-2j	22	20w		DNA-2y
8	20i		DNA-2k	23	20x		DNA-2z
9	20j		DNA-2l	24	20y		DNA-2aa
10	20k		DNA-2m	25	20z		DNA-2ab
11	20l		DNA-2n	26	20aa		DNA-2ac
12	20m		DNA-2o	27	20ab		DNA-2ad
13	20n		DNA-2p	28	20ac		DNA-2ae
14	20o		DNA-2q	29	20ad		DNA-2af
15	20p		DNA-2r				

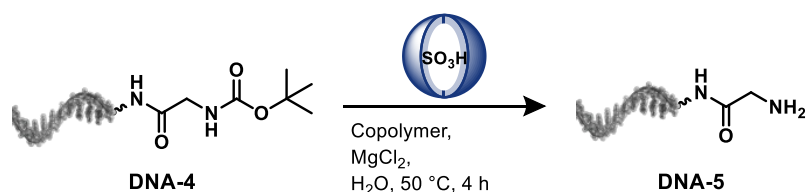
**Variation des DNA-Aldehyd-Konjugates**

Die Reaktion wurde mit verschiedenen DNA-Aldehyd-Konjugaten **DNA-1b - f** nach **Kapitel 8.6** durchgeführt.

**Tabelle 22:** Verwendete DNA-Aldehyd-Konjugate für die Etablierung der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion.

Eintrag	DNA-Aldehyd-Konjugat	Produkt
1	<b>DNA-1b</b> 	<b>DNA-2ag</b>
2	<b>DNA-1c</b> 	<b>DNA-2ah</b>
3	<b>DNA-1d</b> 	<b>DNA-2ai</b>
4	<b>DNA-1e</b> 	<b>DNA-2aj</b>
5	<b>DNA-1f</b> 	<b>DNA-2ak</b>

## 8.7 Copolymer-vermittelte Abspaltung der Boc-Schutzgruppe



Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-4** (500 pmol, 1 Äquiv.) und  $\text{MgCl}_2$  (1.000 Äquiv.) in destilliertem Wasser wurde das Copolymer **P2-EA-d** aus einer Stammlösung (für fünf Reaktionen à 25 Äquiv.: 0,58 mg, 62,5 nmol, 125 Äquiv.) in destilliertem Wasser (80  $\mu\text{L}$ , 16  $\mu\text{L}$  pro Reaktion) hergestellt und zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Um eine Konzentration an Copolymer **P2-EA-d** von 0,5 mM zu erhalten, wurde mit destilliertem Wasser auf 12,5  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und die Reaktionsmischung bei 50  $^\circ\text{C}$  für 4 h geschüttelt. Mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS-Analyse wurde die Probe auf Produktbildung und Produktidentität untersucht.

### Variation des Additivs

Die Reaktionen wurden nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.7** mit Zugabe unterschiedlicher Additive durchgeführt. Dafür wurde eine Stammlösung für  $\text{MgCl}_2$  (4,76 mg, 5.000 nmol, 10.000 Äquiv.) und 4-*tert*-Butylanilin **20b** (1,49 mg, 10.000 nmol, 20.000 Äquiv.) hergestellt und entsprechend verdünnt.

**Tabelle 23:** Variation der Additive und der Copolymer **P1-BA-b**-Konzentration auf die Boc-Entschützung des DNA-Konjugats **DNA-4**.

Eintrag	Copolymer [Äquiv.]	Additiv	Additiv [Äquiv.]
1	25	-	-
2	25	4- <i>tert</i> -Butylanilin <b>20b</b>	25
3	25	$\text{MgCl}_2$	1000
4	50	-	-
5	50	4- <i>tert</i> -Butylanilin <b>20b</b>	50
6	50	$\text{MgCl}_2$	1000

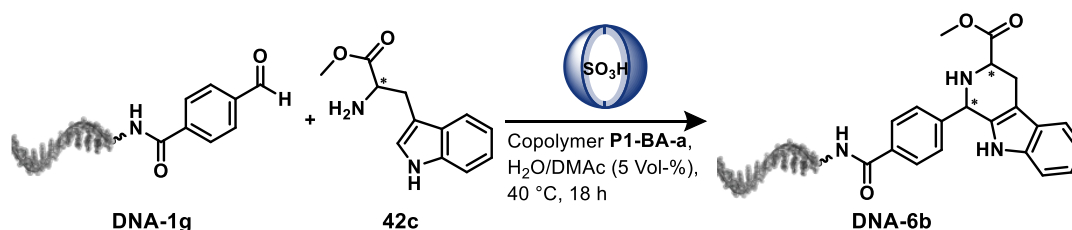
**Variation der Copolymer-Struktur**

Die Reaktionen wurden nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.7** mit Zugabe unterschiedlicher Copolymere und unterschiedlicher Äquivalenten durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Stammlösung (Beispiel: für fünf Reaktionen à 50 Äquiv.: 0,58 mg, 125 nmol, 250 Äquiv.) in destilliertem Wasser (80 µL, 16 µL pro Reaktion) hergestellt und zu der Reaktionsmischung hinzugegeben.

**Tabelle 24:** Untersuchung des Einflusses der Copolymer-Struktur auf die Produktbildung und Depurinierung der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung der **DNA-4**.

Eintrag	Copolymer	Copolymer [Äquiv.]	Eintrag	Copolymer	Copolymer [Äquiv.]
<b>1</b>	<b>P1-BA-a</b>	25	<b>9</b>	<b>P2-EA-c</b>	25
<b>2</b>		50	<b>10</b>		50
<b>3</b>	<b>P1-BA-b</b>	25	<b>11</b>	<b>P2-EA-d</b>	25
<b>4</b>		50	<b>12</b>		50
<b>5</b>	<b>P2-EA-a</b>	25	<b>13</b>	<b>P2-BA</b>	25
<b>6</b>		50	<b>14</b>		50
<b>7</b>	<b>P2-EA-b</b>	25			
<b>8</b>		50			

## 8.8 Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion



Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-1g** (500 pmol, 1 Äquiv.) in destilliertem Wasser wurde Tryptophanmethylester **42c** (1,02 mg, 4 nmol, 8000 Äquiv.) und Copolymer **P1-BA-a** zugegeben. Für das Copolymer **P1-BA-a** wurde eine Stammlösung (für fünf Reaktionen à 50 Äquiv.: 0,65 mg, 62,5 nmol, 250 Äquiv.) in destilliertem Wasser (80 µL, 16 µL pro Reaktion) hergestellt und zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Um eine Konzentration an Copolymer **P1-BA-a** von 0,5 mM zu erhalten, wurde mit destilliertem Wasser und DMAc (5 µL) auf 50 µL aufgefüllt und die Reaktionsmischung bei 40 °C für 18 h geschüttelt. Die Reaktionsmischungen wurden mit EtOAc (6 x 200 µL) extrahiert, die wässrige Phase in einer Vakuumzentrifuge verdampft und der Rückstand zweifach mit Ethanol (20 µL) ausgefällt. Dabei wurde die Probe jeweils bei -80 °C über Nacht gelagert, anschließend zentrifugiert (11.000 rpm, 4 °C, 50 min) und getrocknet (37 °C, 10 min). Das Produkt wurde in destilliertem Wasser (40 µL) gelöst und mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS-Analyse auf Produktbildung und Produktidentität untersucht.

### 8.8.1. Variation der Reaktionsbedingungen

#### Variation der Copolymer-Struktur, der Copolymer-Äquivalenten und der Reaktionstemperatur

Die Reaktionen wurden nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.8** mit Tryptamin **42b** und mit Zugabe unterschiedlicher Copolymere und unterschiedlicher Äquivalenten durchgeführt. Zudem wurde die Reaktionstemperatur variiert. Dazu wurde jeweils eine Stammlösung (Beispiel: für fünf Reaktionen à 50 Äquiv.: 0,65 mg, 62,5 nmol, 250 Äquiv.) in destilliertem Wasser (31,25 µL, 6,25 µL pro Reaktion) hergestellt und zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Für Tryptamin **42b** wurde ebenfalls eine Stammlösung angefertigt (für fünf Reaktionen à 8000 Äquiv.: 3,20 mg, 40.000 Äquiv.) und zur Reaktion hinzugegeben. Um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten, wurde mit unterschiedlichen Mengen an destilliertem Wasser verdünnt.

**Tabelle 25:** Effekt der Copolymer-Struktur, der Copolymer-Äquivalenten und der Reaktionstemperatur auf die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion von **DNA-1g** und Tryptamin **42b**.

Eintrag	Copolymer	$c_{\text{Copolymer}}$ [mM]	$c_{\text{Amin}}$ [mM]	$T$ [°C]	Eintrag	Copolymer	$c_{\text{Copolymer}}$ [mM]	$c_{\text{Amin}}$ [mM]	$T$ [°C]
1	<b>P1-BA-a</b>	0,5	160	25	5	<b>P2-BA</b>	0,5	160	25
2		0,5	160	40	6		0,5	160	40
3		1,0	320	25	7		1,0	320	25
4		1,0	320	40	8		1,0	320	40

### Variation des Co-Lösungsmittels

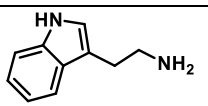
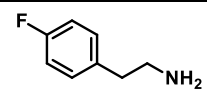
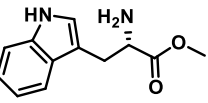
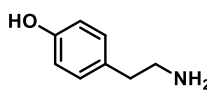
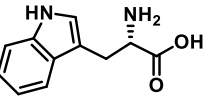
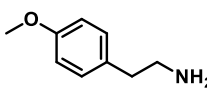
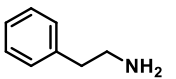
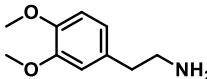
Die Reaktionen wurden nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.8** mit **DNA-1g**, Tryptophanmethylester **42c** und Copolymer **P1-BA-a** unter Verwendung verschiedener Co-Lösungsmittel (5 Vol%, EtOAc, DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH, THF, MeCN, 1,2-DCE, 1,4-Dioxan, DMSO, HFIP, DMAc) durchgeführt.

## 8.8.2. Reaktandenspektrum der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion

### Variation des Amins

Die Reaktion wurde mit verschiedenen Aminen nach **Kapitel 8.8** durchgeführt.

**Tabelle 26:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P1-BA-a**-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an **DNA-1g** durch Einsatz verschiedener Amine **42b - d** und **40a - e**.<sup>a</sup>

Eintrag	Amin	Produkt	Eintrag	Amin	Produkt
1	<b>42b</b> 	<b>DNA-6a</b>	5	<b>40b</b> 	<b>DNA-7b</b>
2	<b>42c</b> 	<b>DNA-6b</b>	6	<b>40c</b> 	<b>DNA-7c</b>
3	<b>42d</b> 	<b>DNA-6c</b>	7	<b>40d</b> 	<b>DNA-7d</b>
4	<b>40a</b> 	<b>DNA-7a</b>	8	<b>40e</b> 	<b>DNA-7e</b>


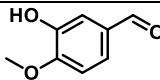

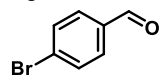
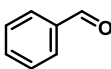
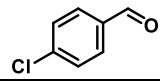
### Variation des DNA-Aldehyd-Konjugats

Die Reaktion wurde mit **DNA-1a** nach **Kapitel 8.8** durchgeführt.

**Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion mit einem DNA-Tryptophan-Konjugat DNA-8a und verschiedenen Aldehyden 6a, 6d - h**

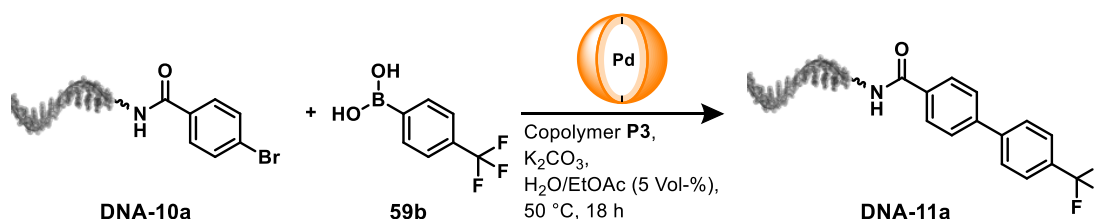
Die Reaktion wurde mit **DNA-8a** nach **Kapitel 8.8** durchgeführt. Es wurden verschiedene Aldehyde **6a, 6d - h** verwendet.

**Tabelle 27:** Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer **P1-BA-a**-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an **DNA-8a** durch Einsatz verschiedener Aldehyde **6a, 6d - h**.<sup>a</sup>

Eintrag	Aldehyd	Produkt	Eintrag	Aldehyd	Produkt
1	<b>6d</b> 	<b>DNA-9a</b>	4	<b>6f</b> 	<b>DNA-9d</b>
2	<b>6e</b> 	<b>DNA-9b</b>	5	<b>6g</b> 	<b>DNA-9e</b>
3	<b>6a</b> 	<b>DNA-9c</b>	6	<b>6h</b> 	<b>DNA-9f</b>



## 8.9 Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung



Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-10a** (1000 pmol, 1 Äquiv.) in destilliertem Wasser wurde 4-(Trifluoromethyl)phenylboronsäure **59b** (8000 nmol, 8000 Äquiv.), gelöst in EtOAc (5  $\mu\text{L}$ ), und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (250 nmol, 250 Äquiv.), gelöst in 2,5  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser, und Copolymer **P3** (50 nmol, 50 Äquiv.) zugegeben. Für das Copolymer **P3** wurde eine Stammlösung (für fünf Reaktionen à 50 Äquiv.: 0,65 mg, 62,5 nmol, 250 Äquiv.) in destilliertem Wasser (40  $\mu\text{L}$ , 8  $\mu\text{L}$  pro Reaktion) hergestellt und zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Um eine Konzentration an Copolymer **P3** von 0,25 mM zu erhalten, wurde mit destilliertem Wasser und EtOAc (2,5  $\mu\text{L}$ ) auf 50  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und die Reaktionsmischung bei 50  $^\circ\text{C}$  für 18 h geschüttelt. Die wässrige Phase wurde in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Anschließend wurde eine Aufreinigung mit 1,3,5-Triazin-2,4,6-trithiol Trinatriumsalz-Lösung (TMT-Lösung) durchgeführt. Dafür wurde der Rückstand mit destilliertem Wasser (45  $\mu\text{L}$ ) aufgenommen und TMT (5  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei 25  $^\circ\text{C}$  geschüttelt, anschließend zentrifugiert (11.000 rpm, 4  $^\circ\text{C}$ , 50 min). Der Überstand wurde abdekantiert und ausgefällt. Dazu wurde Natriumacetat-Lösung (1  $\mu\text{L}$ , 5 M, pH 4,75) und Ethanol (200  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und über Nacht bei -80  $^\circ\text{C}$  gelagert. Anschließend wurde die Reaktion zentrifugiert (11.000 rpm, 4  $^\circ\text{C}$ , 50 min) und erneut für eine Stunde bei -80  $^\circ\text{C}$  mit EtOH (200  $\mu\text{L}$ ) ausgefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in destilliertem Wasser (40  $\mu\text{L}$ ) gelöst und mit Hilfe der analytischen HPLC und der MALDI-MS-Analyse auf Produktbildung und Produktidentität untersucht.

### 8.9.1. Variation der Reaktionsbedingungen

#### Optimierung der Äquivalente und Konzentrationen von Copolymer P3

Die nachfolgenden Reaktionen wurden, wie in der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.9** beschrieben, mit Variation der Äquivalente und der Konzentration des Copolymers **P3** (siehe **Tabelle 28**) durchgeführt.

**Tabelle 28:** Optimierung der Äquivalente und Konzentration des Copolymer **P3** und Variation der Base für die Suzuki-Miyaura-Reaktion des **DNA-10a**-Konjugats.

Eintrag	Copolymer [Äquiv.]	$c_{\text{Copolymer}}$ [mM]	Base	Boronsäure	Eintrag	Copolymer [Äquiv.]	$c_{\text{Copolymer}}$ [mM]	Base	Boronsäure
<b>1</b>	100	0,5	KF	-CF <sub>3</sub>	<b>7</b>	25	0,125	KF	-CF <sub>3</sub>
<b>2</b>	100	0,5	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	<b>8</b>	25	0,125	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>
<b>3</b>	100	0,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	<b>9</b>	25	0,125	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>
<b>4</b>	50	0,25	KF	-CF <sub>3</sub>	<b>10</b>	-	-	KF	-CF <sub>3</sub>
<b>5</b>	50	0,25	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	<b>11</b>	50	0,25	KF	-H
<b>6</b>	50	0,25	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	<b>12</b>	50	0,25	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-H
					<b>13</b>	50	0,25	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-H

## 8.9.2. Reaktandenspektrum der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung

### Reaktion mit verschiedenen Boronsäuren 59a - m

Die nachfolgenden Reaktionen wurden, wie in der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.9** beschrieben, mit Variation der Boronsäure **59a - m** (siehe **Tabelle 29**) durchgeführt.

**Tabelle 29:** Verwendete Boronsäuren **59a - m** für die Etablierung der Copolymer **P3**-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion zur Synthese von DNA-Biphenyl-Konjugaten.

Eintrag	Boronsäure	Produkt	Eintrag	Boronsäure	Produkt
1	<b>59c</b> 	<b>DNA-11b</b>	8	<b>59i</b> 	<b>DNA-11h</b>
2	<b>59b</b> 	<b>DNA-11a</b>	9	<b>59j</b> 	<b>DNA-11i</b>
3	<b>59d</b> 	<b>DNA-11c</b>	10	<b>59a</b> 	<b>DNA-11j</b>
4	<b>59e</b> 	<b>DNA-11d</b>	11	<b>59k</b> 	<b>DNA-11k</b>
5	<b>59f</b> 	<b>DNA-11e</b>	12	<b>59l</b> 	<b>DNA-11l</b>
6	<b>59g</b> 	<b>DNA-11f</b>	13	<b>59m</b> 	<b>DNA-11m</b>
7	<b>59h</b> 	<b>DNA-11g</b>			

## 8.10 Affinitäts-Aufreinigung

Für die Affinitäts-Aufreinigung wurden die Agarose-Matrix und die magnetischen Kügelchen TurboBeads™-Azid von der Firma *Sigma Aldrich* verwendet. Die Agarose-Matrix wurde in Mobicol "Classic" der Firma *Mo Bi Tec GmbH* mit einer Filterporengröße von 35 µm oder in Filtersäulen X-Col der Firma *HTI Automation* mit einer Filterporengröße von 7 - 12 µm gewaschen. Die magnetischen Kügelchen wurden mit Hilfe einer magnetischen Reaktionsgefäßhalterung *magnetic separation rack* (*New England Biolabs*) von der Lösung getrennt. Die 5'-Aminolinker-modifizierte **DNA-13a**, **DNA-13c** und **DNA-14a**, gebunden an eine feste Phase (CPG, 1000 Å), wurden von der Firma *Ella Biotech GmbH* bezogen. Die restlichen DNA-Sequenzen wurden von der Firma *IDT* hergestellt. Die DNA-Sequenzen **DNA-12b** und **DNA-13b** trugen das 6-Carboxyfluorescein (6-FAM). Die Sequenzen sind in **Tabelle 30** dargestellt. Die verwendeten Puffer mit ihrer Zusammensetzung sind in **Tabelle 31** aufgelistet.

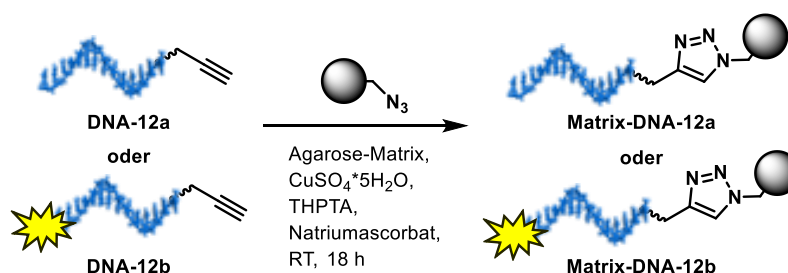
**Tabelle 30:** Die verwendeten DNA-Sequenzen für die Affinitäts-Aufreinigung.

DNA	Sequenz (5' - 3')
<b>DNA-12a</b>	/5Hexynyl/iSp9/GAA TTC GGC AAG AC/3
<b>DNA-12b</b>	/5Hexynyl/iSp9/GAA TTC GGC AAG AC/36-FAM/
<b>DNA-13a</b>	C6-Aminolinker-GTC TTG CCG AAT TC
<b>DNA-13b</b>	GTC TTG CCG AAT TC/36-FAM/
<b>DNA-13c</b>	Carbonsäure <b>23a</b> -GTC TTG CCG AAT TC
<b>DNA-14a</b>	Aldehyd <b>64a</b> -C6-Aminolinker-TTT TTT
<b>DNA-15</b>	GTCTTGCCGAATTCAGTCGTCCTAACGCTA
<b>DNA-16</b>	GTCTTGCCGAATTCAGTCGTCCTAACGCTACTCTCTTAACT- ACCTGTATGTTCCAACCC
<b>DNA-17</b>	GTCTTGCCGAATTCAGTCGTCCTAACGCTACTCTCTTAACTACCT- GTATGTTCCAACCCCTAGATCCAGATGACCTCAACTACATGGTCT

**Tabelle 31:** Die verwendeten Puffer für die Affinitäts-Aufreinigung mit ihren Zusammensetzungen.

Puffer	Hersteller	Zusammensetzung
Hybridisierungs-Puffer	eigen	TRIS (10 mM), EDTA (1 mM), NaCl (50 mM)
T4 Ligase-Puffer	<i>New England Biolabs</i>	TRIS (50 mM), MgCl <sub>2</sub> (10 mM), ATP (1 mM), DTT (10 mM), pH 7,5
Nukleasefreier Duplexpuffer	<i>IDT</i>	HEPES (30 mM), pH 7,5, Kaliumacetat (100 mM)

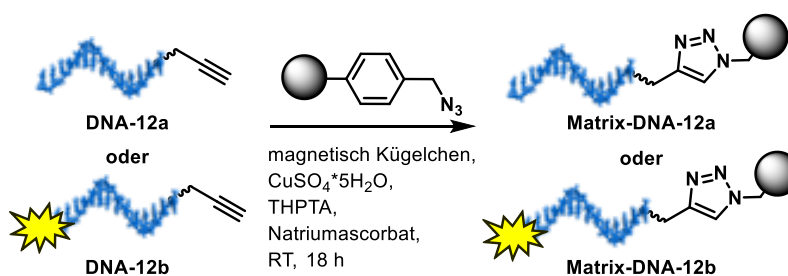
### 8.10.1. CuAAC-Reaktion der DNA-12a/b an die Agarose-Matrix



**Schema 22:** CuAAC-Reaktion der **DNA-12a** (oben) und **DNA-12b** (unten) an die Agarose-Matrix.

Die Agarose-Matrix wurde geschüttelt und in ein Reaktionsgefäß (1,6 mL) überführt (100 µL, Beladung der Agarose-Matrix mit  $N_3 = 15 \mu\text{mol/mL}$ , 1,5 µmol, 1 Äquiv., 5 mg). Die Agarose-Matrix wurde mit  $dH_2O$  (650 µL) gewaschen und zentrifugiert (11.000 rpm, 1 min). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurde  $dH_2O$  (90 µL), **DNA-12a/DNA-12b** (10 nmol, 0,07 Äquiv.) und eine Mischung aus  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,75 µmol, 0,5 Äquiv.), THPTA (3,75 µmol, 5 Äquiv.) und Natriumascorbat (15 µmol, 10 Äquiv.) zu der Agarose-Matrix gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (1.000 U/min). Nach der Reaktion wurde das Gemisch mit der Agarose-Matrix in einen Säulenfilter überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$  (je 3\*200 µL) gewaschen.

### 8.10.2. CuAAC-Reaktion der DNA-12a/ b an magnetische Kügelchen



**Schema 23:** CuAAC-Reaktion der **DNA-12a** (oben) und **DNA-12b** (unten) an magnetische Kügelchen.

Zu den magnetischen Kügelchen (10 mg, Beladung der magnetischen Kügelchen mit  $N_3 = 0,1 \text{ mmol/g}$ , 1,0 µmol, 1 Äquiv.) wurde  $dH_2O$  (90 µL), **DNA-12a/DNA-12b** (10 nmol, 0,07 äquiv.) und eine Mischung aus  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,75 µmol, 0,5 äquiv.), THPTA (3,75 µmol, 5 äquiv.) und Natriumascorbat (15 µmol, 10 äquiv.) gegeben und im Ultraschallbad bis zu einer kompletten schwarzen Färbung vermischt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt (1.000 U/min). Nach der Reaktion wurde das Gemisch in die magnetische Reaktionsgefäßhalterung gegeben und die Lösung vorsichtig abpipettiert. Die magnetischen Kügelchen wurden mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$  (je 3\*200 µL) gewaschen.

### 8.10.3. Optimierter Prozess der Affinitäts-Aufreinigung

Die **Matrix-DNA-12a** (30  $\mu\text{L}$ , 1,5 mg, 3 nmol **DNA-12a**) wurde mit der aufzureinigenden DNA (500 pmol), T4-Ligase Puffer (10-fach, 6  $\mu\text{L}$ ) und  $d\text{H}_2\text{O}$  (auf 60  $\mu\text{L}$  aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 35 °C aufgeheizt, für 10 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a** wurde in einen Säulenfilter überführt und mit  $d\text{H}_2\text{O}$ , EDTA (0,1 M),  $d\text{H}_2\text{O}$ , DMF, MeOH, MeCN,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und  $d\text{H}_2\text{O}$  (je 3\*200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Zu der **Matrix-DNA-12a** in einem Säulenfilter wurde eine wässrige Ammoniak-Lösung (32 %, 50  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und für 2 min inkubiert. Die Probe wurde zentrifugiert (11.000 rpm, 1 min.) und das Eluat wurde aufgefangen und gesammelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt und anschließend wurde die **Matrix-DNA-12a** mit  $d\text{H}_2\text{O}$  (2\*50  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Die Eluate wurden vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge bei 45 °C eingengt und getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in  $d\text{H}_2\text{O}$  (40  $\mu\text{L}$ ) gelöst. Die wiedergewonnene Menge und die Reinheit der DNA wurden mit Hilfe der UV-Vis-Absorption und der analytischen HPLC bestimmt. Für die Bestimmung der Wiedergewinnung an DNA mittels der analytischen HPLC wurde als interner Standard die **DNA-14a** (500 pmol) zu der aufgereinigten Probe gegeben.

### 8.10.4. Etablierung der Affinitäts-Aufreinigung

#### Prüfung einer selektiven und unselektiven Bindung der DNA-12b an die Agarose-Matrix mit und ohne Cu/Ligand/Na-Ascorbat-Gemisch

Die **Matrix-DNA-12b** (**113**) wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12b** hergestellt. Bei der Probe **114** wurden die CuAAC-Reagenzien  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , THPTA, Natriumascorbat nicht verwendet. Die Matrix wurde in eine Filtersäule (Mobicol) überführt und mit  $d\text{H}_2\text{O}$ , EDTA (0,1 M) und  $d\text{H}_2\text{O}$  (je 3\*200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Die Matrix **113** war durch das an **DNA-12b** gebundene Fluorophor gefärbt, was auf eine erfolgreiche CuAAC-Reaktion hinwies. Die Matrix **114** wurde nach dem Waschen nicht von der **DNA-12b** gefärbt, sodass keine unselektive Bindung an die Matrix erfolgte.

#### Prüfung verschiedener Waschbedingungen nach der CuAAC-Reaktion von Matrix-DNA-12b

Die **Matrix-DNA-12b** (**112** und **113**) wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12b** hergestellt. Die Matrix wurde in eine Filtersäule (Mobicol) überführt und mit  $d\text{H}_2\text{O}$ , EDTA (0,1 M),  $d\text{H}_2\text{O}$ , DMF, MeOH, MeCN,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und  $d\text{H}_2\text{O}$  (je 3\*200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Die Matrix **112** und **113** waren noch durch das an **DNA-12b** gebundene Fluorophor gefärbt.

**Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs DNA-13a und DNA-13b an der Matrix-DNA-12a**

Die **Matrix-DNA-12a** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12a** hergestellt. Die **Matrix-DNA-12a** (10 µL, 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a**) wurde mit der aufzureinigenden DNA (500 pmol, **DNA-13b (109)**, **DNA-13a (110)**), T4-Ligase Puffer (10-fach, 2 µL) und *d*H<sub>2</sub>O (auf 20 µL aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 95 °C aufgeheizt, für 3 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit *d*H<sub>2</sub>O, EDTA (0,1 M), *d*H<sub>2</sub>O, DMF, MeOH, MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und *d*H<sub>2</sub>O (je 3\*200 µL) gewaschen. Die Matrix **109** war noch durch das an **DNA-13b** gebundene Fluorophor gefärbt.

**Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs DNA-13b and die Matrix-DNA-12a in verschiedenen Puffern**

Die **Matrix-DNA-12a** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12a** hergestellt. Bei der Probe **111** wurden die CuAAC-Reagenzien CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, THPTA, Natriumascorbat nicht verwendet. Die **Matrix-DNA-12a** (10 µL, 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a**) wurde mit der aufzureinigenden **DNA-13b** (500 pmol) und entweder mit T4-Ligase Puffer (10-fach, 2 µL, **110**), Hybridisierungs-Puffer (1-fach: **108**, **111**; 10-fach: **109**) oder Nukleasefreier Duplexpuffer (1-fach) und *d*H<sub>2</sub>O (auf 20 µL aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 95 °C aufgeheizt, für 3 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit *d*H<sub>2</sub>O, EDTA (0,1 M), *d*H<sub>2</sub>O, DMF, MeOH, MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und *d*H<sub>2</sub>O (je 3\*200 µL) gewaschen. Die **Matrix-DNA-12a** der Proben **108-110** waren noch durch das an **DNA-13b** gebundene Fluorophor gefärbt. Die **Matrix-DNA-12a** der Probe **111** zeigte keine gelbe Färbung, weshalb keine unselektive Bindung der **DNA-13b** an der unbeladenen Agarose-Matrix stattfand.

**Prüfung verschiedener Elutionsbedingungen nach der Hybridisierung von DNA-13b an Matrix-DNA-12a**

Die **Matrix-DNA-12a** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12a** hergestellt. Die **Matrix-DNA-12a** (10 µL, 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a**) wurde mit der aufzureinigenden **DNA-13b** (500 pmol) und entweder mit T4-Ligase Puffer (10-fach, 2 µL, **110**) oder mit Hybridisierungs-Puffer (10-fach: **109**) und *d*H<sub>2</sub>O (auf 20 µL aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 95 °C aufgeheizt, für 3 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt.

Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$  (je  $3 \cdot 200 \mu L$ ) gewaschen. Es wurde versucht, **DNA-13b** mit verschiedenen wässrigen Lösungsmittelgemischen ( $dH_2O$  : MeCN/MeOH/EtOH) in verschiedenen Verhältnissen (50 % oder 80 % des organischen Lösungsmittels) und bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 60 °C) zu eluieren. Dazu wurde das wässrige Lösungsmittelgemisch (50  $\mu L$ ) auf die Matrix gegeben, 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C) und mit  $dH_2O$  (50  $\mu L$ ) gewaschen. Es konnte keine Elution von **DNA-13b** beobachtet werden. Zur Elution der **DNA-13b** wurden anschließend verschiedene wässrige NaOH-Lösungen (0,1 mM, 1 mM, 10 mM) verwendet. Dazu wurde die NaOH-Lösung (50  $\mu L$ ) auf die Matrix gegeben, für 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C) und wiederholt. Danach wurde die Matrix mit  $dH_2O$  (2 x 50  $\mu L$ ) gewaschen und das Eluat mit wässriger HCl-Lösung neutralisiert.

### 8.10.5. Optimierung der Affinitäts-Aufreinigung

#### CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b

Die **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit verschiedenen Mengen an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** hergestellt. Bei der Probe **121** wurden die CuAAC-Reagenzien  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA, Natriumascorbat nicht verwendet. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M) und  $dH_2O$  (je  $3 \cdot 200 \mu L$ ) gewaschen.

**Tabelle 32:** CuAAC-Reaktionsbedingungen mit Variation der Menge an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b**.

Eintrag	115	117	119	116	118	120	121
Menge Agarose-Matrix [mg]	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5
verwendete DNA	<b>DNA-12a</b>	<b>DNA-12a</b>	<b>DNA-12a</b>	<b>DNA-12b</b>	<b>DNA-12b</b>	<b>DNA-12b</b>	<b>DNA-12b</b>
Menge DNA [nmol]	1	2	2	1	2	2	1

#### Prüfung verschieden konzentrierter wässriger NaOH-Lösungen für die Elution von **DNA-13b**

Die **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit verschiedenen Mengen an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** hergestellt (siehe **Tabelle 32**). Bei der Probe **121** wurden die CuAAC-Reagenzien  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , THPTA, Natriumascorbat nicht verwendet. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M) und  $dH_2O$  (je  $3 \cdot 200 \mu L$ ) gewaschen.



Die **Matrix-DNA-12a/-12b** (10 µL, 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a/-12b**) wurde mit der aufzureinigenden **DNA-13b** (500 pmol), T4-Ligase Puffer (10-fach, 2 µL) und *d*H<sub>2</sub>O (auf 20 µL aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 95 °C aufgeheizt, für 3 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Das Mobicol von Probe 120 war während des Heizens undicht. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit *d*H<sub>2</sub>O, EDTA (0,1 M), *d*H<sub>2</sub>O, DMF, MeOH, MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und *d*H<sub>2</sub>O (je 3\*200 µL) gewaschen. Zur Elution der **DNA-13b** wurden anschließend verschiedene wässrige NaOH-Lösungen (1 mM, 5 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M) verwendet. Dazu wurde die NaOH-Lösung (50 µL) auf die Matrix gegeben, für 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C) und wiederholt. Danach wurde die Matrix mit *d*H<sub>2</sub>O (2 x 50 µL) gewaschen und das Eluat mit wässriger HCl-Lösung neutralisiert. Die wiedergewonnene Menge **DNA-13b** wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

#### **Prüfung einer wässrigen Ammoniak-Lösung für die Elution von DNA-13b**

Die **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit verschiedenen Mengen an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** hergestellt (siehe **Tabelle 32**). Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit *d*H<sub>2</sub>O, EDTA (0,1 M) und *d*H<sub>2</sub>O (je 3\*200 µL) gewaschen. Die **Matrix-DNA-12a/-12b** (10 µL, 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a/-12b**) wurde mit der aufzureinigenden **DNA-13b** (500 pmol), T4-Ligase Puffer (10-fach, 2 µL) und *d*H<sub>2</sub>O (auf 20 µL aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 95 °C aufgeheizt, für 3 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter (Mobicol) überführt und mit *d*H<sub>2</sub>O, EDTA (0,1 M), *d*H<sub>2</sub>O, DMF, MeOH, MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und *d*H<sub>2</sub>O (je 3\*200 µL) gewaschen. Zur Elution der **DNA-13b** wurde anschließend eine wässrige Ammoniak-Lösungen (32 %, 50 µL) auf die Matrix gegeben, für 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C) und wiederholt. Danach wurde die Matrix mit *d*H<sub>2</sub>O (2 x 50 µL) gewaschen und das Lösungsmittel der kombinierten Eluate wurde bei 45 °C verdampft. Die wiedergewonnene Menge **DNA-13b** wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

#### **CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b und einmalige Wiederholung der CuAAC-Reaktion**

Die **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit verschiedenen Mengen an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** hergestellt. Bei der Probe **128** wurden die CuAAC-Reagenzien CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, THPTA, Natriumascorbat nicht verwendet.

Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M) und  $dH_2O$  (je 3\*200  $\mu L$ ) gewaschen. Die CuAAC-Reaktion wurde einmal wiederholt und erneut gewaschen.

**Tabelle 33:** CuAAC-Reaktionsbedingungen mit Variation der Menge an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** und Wiederholung der CuAAC-Reaktion.

Eintrag	122	124	126	123	125	127	128
Menge Agarose-Matrix [mg]	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5
verwendete DNA	<b>DNA-12a</b>	<b>DNA-12a</b>	<b>DNA-12a</b>	<b>DNA-12b</b>	<b>DNA-12b</b>	<b>DNA-12b</b>	<b>DNA-12b</b>
Menge DNA [nmol]	1	2	2	1	2	2	1

Die **Matrix-DNA-12a/-12b** (10  $\mu L$ , 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a/-12b**) wurde mit der aufzureinigenden **DNA-13b** (500 pmol), T4-Ligase Puffer (10-fach, 2  $\mu L$ ) und  $dH_2O$  (auf 20  $\mu L$  aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 95 °C aufgeheizt, für 3 min bei dieser Temperatur gehalten und anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$  (je 3\*200  $\mu L$ ) gewaschen. Zur Elution der **DNA-13b** wurde anschließend eine wässrige Ammoniak-Lösungen (32 %, 50  $\mu L$ ) auf die Matrix gegeben, für 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C) und wiederholt. Danach wurde die Matrix mit  $dH_2O$  (2 x 50  $\mu L$ ) gewaschen und das Lösungsmittel der kombinierten Eluate wurde bei 45 °C verdampft. Die wiedergewonnene Menge **DNA-13b** wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

### Variation der Hybridisierungstemperatur

Die **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12a/-12b** hergestellt. Die **Matrix-DNA-12a/-12b** (10  $\mu L$ , 0,5 mg, 1 nmol **DNA-12a/-12b**) wurde mit der aufzureinigenden **DNA-13b** (500 pmol), T4-Ligase Puffer (10-fach, 2  $\mu L$ ) und  $dH_2O$  (auf 20  $\mu L$  aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf verschiedene Temperaturen (25 °C - 95 °C) aufgeheizt, für 10 min bei dieser Temperatur gehalten, anschließend langsam auf 25 °C abgekühlt und wieder für 10 min gehalten. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter überführt und mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$  (je 3\*200  $\mu L$ ) gewaschen. Zur Elution der **DNA-13b** wurde anschließend eine wässrige Ammoniak-Lösungen (32 %, 50  $\mu L$ ) auf die Matrix gegeben, für 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4 °C) und wiederholt. Danach wurde die Matrix mit  $dH_2O$  (2 x 50  $\mu L$ ) gewaschen und das Lösungsmittel der kombinierten Eluate wurde bei 45 °C verdampft. Die wiedergewonnene Menge **DNA-13b** wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

### Variation der Menge an Matrix-DNA-12a/-12b und DNA-13b

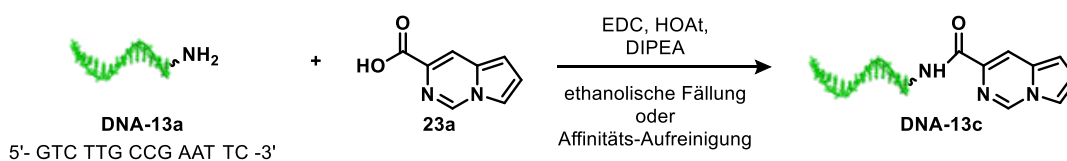
Die **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12a/-12b** hergestellt. Verschiedene Mengen an **Matrix-DNA-12a/-12b** (10  $\mu\text{L}$  - 30  $\mu\text{L}$ , 0,5 mg - 1,5 mg, 1 nmol - 3 nmol **DNA-12a/-12b**) wurde mit verschiedenen Mengen an aufzureinigender **DNA-13b** (500 pmol - 3.000 pmol), T4-Ligase Puffer (10-fach, 2  $\mu\text{L}$  - 6  $\mu\text{L}$ ) und  $d\text{H}_2\text{O}$  (auf 20  $\mu\text{L}$  - 60  $\mu\text{L}$  aufgefüllt) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 35  $^\circ\text{C}$  aufgeheizt, für 10 min bei dieser Temperatur gehalten, anschließend langsam auf 25  $^\circ\text{C}$  abgekühlt und wieder für 10 min gehalten. Das Gemisch mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** wurde in einen Säulenfilter überführt und mit  $d\text{H}_2\text{O}$ , EDTA (0,1 M),  $d\text{H}_2\text{O}$ , DMF, MeOH, MeCN,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und  $d\text{H}_2\text{O}$  (je 3\*200  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Zur Elution der **DNA-13b** wurde anschließend eine wässrige Ammoniak-Lösungen (32 %, 50  $\mu\text{L}$ ) auf die Matrix gegeben, für 2 min inkubiert und das Eluat abzentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, 4  $^\circ\text{C}$ ) und wiederholt. Danach wurde die Matrix mit  $d\text{H}_2\text{O}$  (2 x 50  $\mu\text{L}$ ) gewaschen und das Lösungsmittel der kombinierten Eluate wurde bei 45  $^\circ\text{C}$  verdampft. Die wiedergewonnene Menge **DNA-13b** wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

### 8.10.6. Anwendung der Affinitäts-Aufreinigung

#### Affinitäts-Aufreinigung von unterschiedlichen DNA-Längen

Die **Matrix-DNA-12a** wurde nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.1 mit **DNA-12a** hergestellt. Die Affinitäts-Aufreinigung wurde anschließend nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.3 mit den DNA-Sequenzen **DNA-13a**, **DNA-15**, **DNA-16** und **DNA-17** durchgeführt.

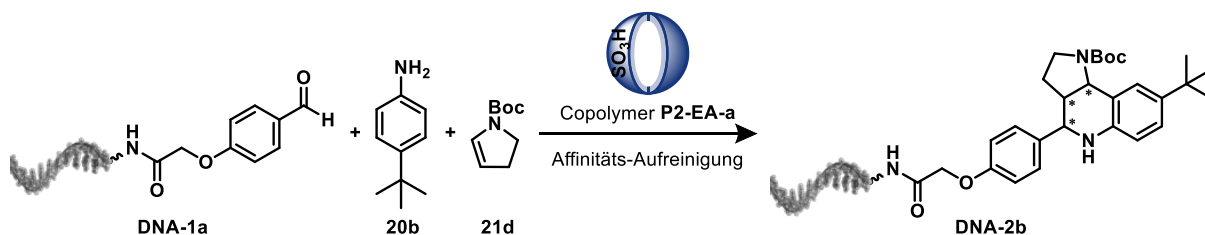
#### Amidsynthese der Carbonsäure 23a an DNA-13a und Reinigung durch eine ethanolische Fällung oder die Affinitäts-Aufreinigung



Zu einer Lösung von **DNA-13a** (500 pmol), gelöst in MOPS-Puffer (71,3  $\mu\text{L}$ , 50 mM, pH = 8, 0,5 M NaCl), wurde eine Mischung aus Carbonsäure **23a** (2,7  $\mu\text{mol}$ , 5400 Äquiv.), gelöst in 14,3  $\mu\text{L}$  DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 25  $\mu\text{mol}$ , gelöst in 132,7  $\mu\text{L}$  DMSO), EDC x HCl (1,2  $\mu\text{mol}$ , 2400 Äquiv.), gelöst in 14,3  $\mu\text{L}$  DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 10,5  $\mu\text{mol}$ , gelöst in 125,4  $\mu\text{L}$  DMSO), HOAt (240 nmol, 480 Äquiv.), gelöst in 14,3  $\mu\text{L}$  DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 8,4  $\mu\text{mol}$ , gelöst in 500  $\mu\text{L}$  DMSO), und DIPEA (1,2  $\mu\text{mol}$ , 2400 Äquiv.), gelöst in 14,3  $\mu\text{L}$  DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 10,5  $\mu\text{mol}$ , gelöst in 125,4  $\mu\text{L}$  DMSO), zuvor 15 min lang bei Raumtemperatur aktiviert.

Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde ein zweites Aliquot der frisch aktivierten Carbonsäure **23a** zu der Reaktionsmischung gegeben und weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Amidkupplungsprodukt **DNA-13c** wurde durch ethanolische Fällung (siehe Kapitel **8.4**) oder Affinitäts-Aufreinigung isoliert. Für die Affinitäts-Aufreinigung wurde die Probe in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C eingengt. Anschließend wurde die Synthesevorschrift in Kapitel **8.10.3** verwendet.

### Affinitäts-Aufreinigung der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion



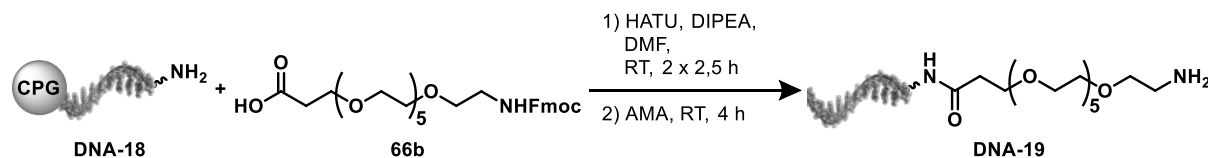
Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-1a** (500 pmol) in destilliertem Wasser wurde das 4-*tert*-Butylanilin **20b** (0,64  $\mu$ L, 4  $\mu$ mol, 8000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (0,69  $\mu$ L, 4  $\mu$ mol, 8000 Äquiv.) in 2,5  $\mu$ L EtOAc und das Copolymer **P2-EA-a** (25 nmol, 50 Äquiv.), gelöst in destilliertem Wasser (16  $\mu$ L von einer Stammlösung mit 125 nmol Copolymer **P2-EA-a** gelöst in 80  $\mu$ L destilliertem Wasser), zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 50  $\mu$ L aufgefüllt, um eine Endkonzentration des Copolymers von 0,5 mM zu erhalten und anschließend bei 40 °C für 18 h geschüttelt. Im Anschluss wurde mit EtOAc (2 x 400  $\mu$ L) extrahiert und der Rückstand in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C verdampft. Anschließend wurde für die Affinitäts-Aufreinigung die Synthesevorschrift in Kapitel **8.10.3** verwendet.

## 8.11 Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek

Die 5'-Aminolinker-modifizierte Primer-Sequenz **DNA-18**, gebunden an eine feste Phase (CPG, 1000 Å), wurde von der Firma *Ella Biotech GmbH* bezogen. Die DNA-Barcodes, die Primer'-Sequenz, sowie die Adapter-Sequenzen wurden von der Firma *IDT* verwendet.

### 8.11.1. Zyklus 1 - Synthese und Kodierung

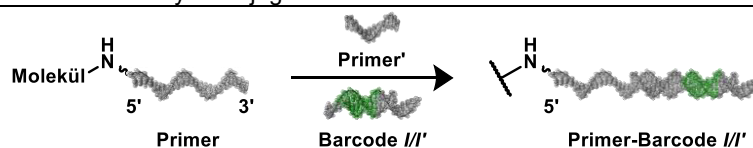
Die 5'-Aminolinker-modifizierte Primer-Sequenz **DNA-18** (4 µmol, 1 Äquiv.), gebunden an eine feste Phase (CPG, 1000 Å), wurde über eine Amidsynthese nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.5** mit einem Polyethylenglykol-Linker **66b** (Fmoc-NH-(PEG)<sub>5</sub>-COOH, 400 µmol, 100 Äquiv.) modifiziert (siehe **Schema 24**). Nach der Amidsynthese wurde ein kleiner Teil des Produktes (0,5 mg) entnommen und von der festen Phase mit AMA-Lösung (150 µL) für 4 h bei Raumtemperatur abgespalten. Das Reaktionsgemisch wurde anhand der analytischen HPLC und MALDI-MS-Analyse auf die Produktbildung untersucht.



**Schema 24:** Reaktionsschema der Amidsynthese des DNA-PEG(5)-Konjugats **DNA-19**.

Im Anschluss wurde die **DNA-19**, gebunden an eine feste Phase, auf 25 Reaktionsgefäße (1,6 mL) aufgeteilt (je 100 nmol, 1 Äquiv.) und über eine Amidsynthese nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.5** mit den Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren **64a** und **64d - aa** aus **Tabelle 45** (10 µmol, 100 Äquiv.) modifiziert. Die Amidsynthese wurde insgesamt dreimal nacheinander durchgeführt. Im Anschluss wurden die DNA-Aldehyd-Konjugate von dem CPG unter Verwendung der AMA-Lösung abgespalten und über die präparative HPLC aufgereinigt. Anhand der Fläche des Produkt-Signals gegenüber dem Edukt-Signal der HPLC-Chromatogramme wurde der Umsatz der Amidsynthese bestimmt. Die Produkt-Fractionen wurden anhand der MALDI-MS-Analyse bestimmt, vereinigt und über die ethanolische Fällung gereinigt. Die aufgereinigten Proben wurden erneut über die MALDI-MS-Analyse auf die Produktidentität und über die analytische HPLC auf die Reinheit überprüft. Anschließend wurde anhand der UV-Vis-Absorption die Konzentration der einzelnen DNA-Aldehyd-Konjugate bestimmt.

Die hergestellten DNA-Aldehyd-Konjugate wurden mit den dazugehörigen DNA-Barcodes enzymatisch ligiert (siehe **Tabelle 34**).

**Tabelle 34:** Reaktionsschema und verwendete DNA-Sequenzen der enzymatischen Ligation des Primers' und der DNA-Barcodes //I' an die DNA-Aldehyd-Konjugate.


DNA	Sequenz (5' - 3')
<b>Primer</b>	AGGT CGGT GTGA ACGG ATTT GAGT C
<b>Primer'</b>	AGAG GACT CAAA
<b>Barcode /</b>	CTCT XXXX XXXX ACCT
<b>Barcode I'</b>	ATAC AGGT XXXX XXXX

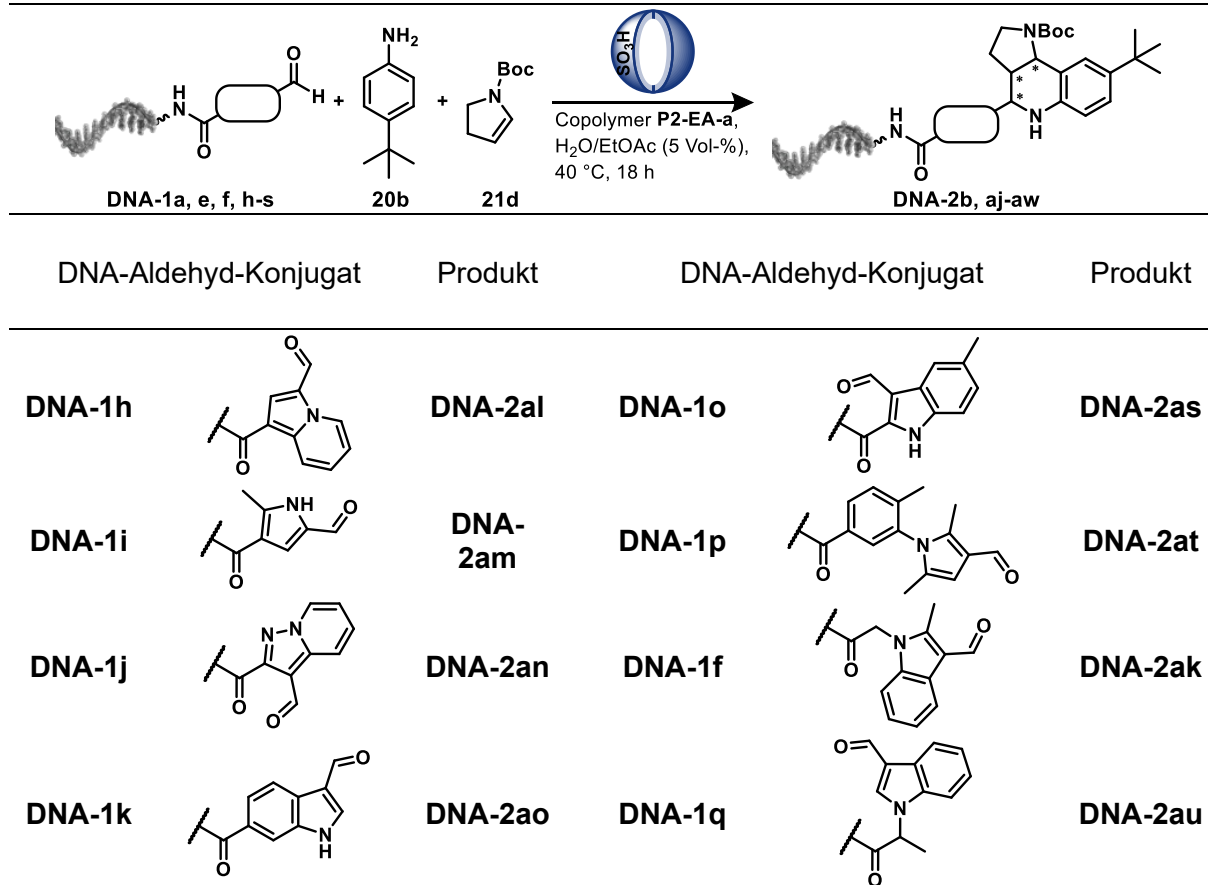
Dazu wurden die 5'-Enden des Primers' (28 x 1 nmol), der DNA-Barcodes / (je 1 nmol), sowie der Gegenstränge DNA-Barcode I' (je 1 nmol) nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** im 1 nmol-Maßstab phosphoryliert. Im Anschluss wurde die enzymatische Ligation nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** im 1 nmol-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde das DNA-Aldehyd-Konjugat **DNA-10a - y** (je 1 nmol) mit dem phosphorylierten Primer' und den entsprechenden phosphorylierten DNA-Barcodes / und I' vermischt. Zunächst wurde dieses Gemisch mit dem T4 Ligase-Puffer hybridisiert und anschließend durch Zugabe der T4 DNA-Ligase über Nacht bei 25 °C ligiert. Nach der Inaktivierung wurde ein Aliquot (1 µL) aus jeder enzymatischen Ligation für die Analyse mit Hilfe der Gel-Elektrophorese nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** entnommen. Die Proben wurden über eine ethanolische Fällung nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** aufgereinigt. Die kodierten DNA-Aldehyd-Konjugate wurden in  $d\text{H}_2\text{O}$  (40 µL) gelöst und vereinigt. Die verwendeten Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren **64a** und **64d - aa** und der dazugehörige DNA-Barcode / sind in **Tabelle 45** dargestellt.

## 8.11.2. Zyklus 2 - Validierung der ausgewählten DNA-Aldehyd-Konjugate und Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion

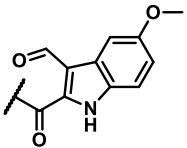
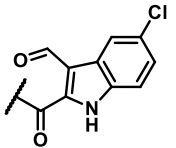
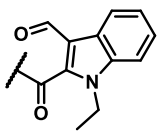
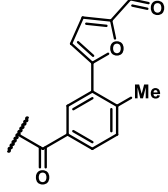
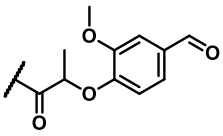
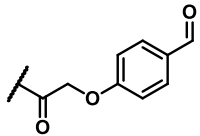
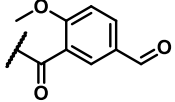
### Testung verschiedener DNA-Aldehyd-Konjugate

Die 14-Nucleobasen lange **DNA-13a** (je 100 nmol, 1 Äquiv.), gebunden an eine feste Phase, wurde über eine Amidsynthese nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.5** mit den Aldehydfunktionalisierten Carbonsäuren aus **Tabelle 35** (10 µmol, 100 Äquiv.) modifiziert. Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-1a, e, f, h - s** (500 pmol) in destilliertem Wasser wurde das 4-*tert*-Butylanilin **20b** (0,64 µL, 4 µmol, 8000 Äquiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (0,69 µL, 4 µmol, 8000 Äquiv.) in 2,5 µL EtOAc und das Copolymer **P2-EA-a** (25 nmol, 50 Äquiv.), gelöst in destilliertem Wasser (16 µL von einer Stammlösung mit 1,25 µmol Copolymer **P2-EA-a** gelöst in 800 µL destilliertem Wasser), zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 50 µL aufgefüllt, um eine Endkonzentration des Copolymers von 0,5 mM zu erhalten und anschließend bei 40 °C für 18 h geschüttelt. Im Anschluss wurde mit EtOAc (2 x 400 µL) extrahiert und der Rückstand in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C verdampft. Anschließend wurde für die Affinitäts-Aufreinigung die Synthesevorschrift in Kapitel **8.10.3** verwendet.

**Tabelle 35:** DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-1a, e, f, h - s** für die Validierung in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion.



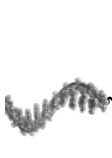
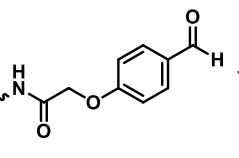
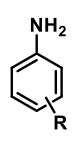
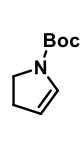


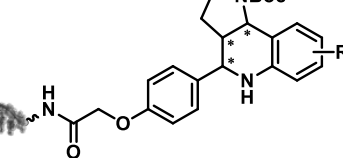
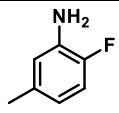
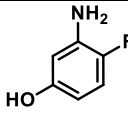
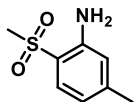
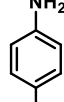
Fortsetzung Tabelle 35

DNA-1l		DNA-2ap	DNA-1r		DNA-2av
DNA-1m		DNA-2aq	DNA-1s		DNA-2aw
DNA-1e		DNA-2aj	DNA-1a		DNA-2b
DNA-1n		DNA-2ar			

Testung verschiedener Aniline

Zu einer Lösung des DNA-Konjugats **DNA-1a** (500 pmol) in destilliertem Wasser wurden verschiedene Aniline **20ae - as** (siehe **Tabelle 36**, 4  $\mu\text{mol}$ , 8000  $\text{\AA}$ quiv.), *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (0,69  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{mol}$ , 8000  $\text{\AA}$ quiv.) in 2,5  $\mu\text{L}$  EtOAc und das Copolymer **P2-EA-a** (25 nmol, 50  $\text{\AA}$ quiv.), gelöst in destilliertem Wasser (16  $\mu\text{L}$  von einer Stammlösung mit 1,25  $\mu\text{mol}$  Copolymer **P2-EA-a** gelöst in 800  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser), zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 50  $\mu\text{L}$  aufgefüllt, um eine Endkonzentration des Copolymers von 0,5 mM zu erhalten und anschließend bei 40 °C für 18 h geschüttelt. Im Anschluss wurde mit EtOAc (2 x 400  $\mu\text{L}$ ) extrahiert und der Rückstand in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C verdampft. Anschließend wurde für die Affinitäts-Aufreinigung die Synthesevorschrift in Kapitel **8.10.3** verwendet.

**Tabelle 36:** Aniline **20ae - as** für die Validierung in der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion.

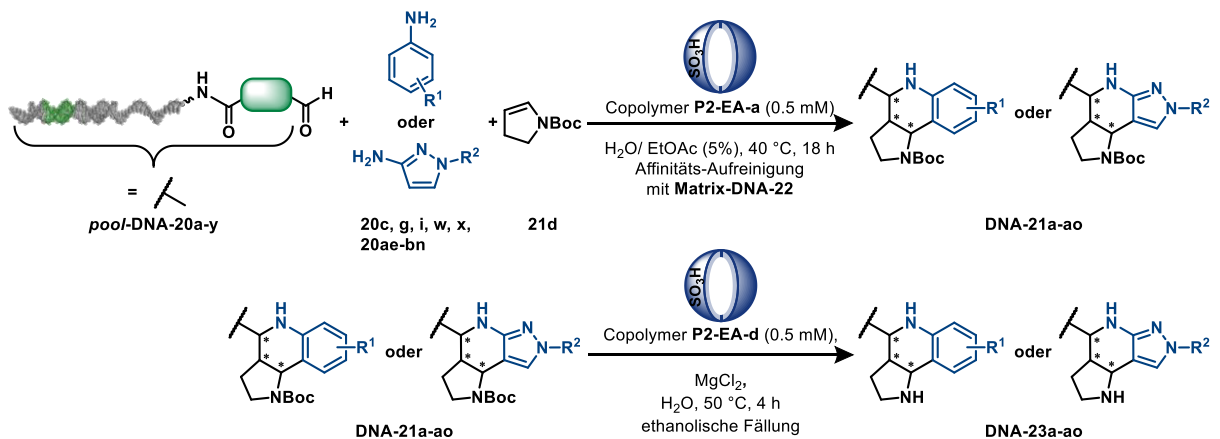
		+		+				
	DNA-1a		20ae-as		21d			DNA-2ax-bl
	Anilin		Produkt		Anilin		Produkt	
<b>20ae</b>			<b>DNA-2ax</b>		<b>20am</b>			<b>DNA-2bf</b>
<b>20af</b>			<b>DNA-2ay</b>		<b>20an</b>			<b>DNA-2bg</b>



Fortsetzung Tabelle 36

20a g		DNA-2az	20ao		DNA-2bh
20a h		DNA-2ba	20ap		DNA-2bi
20ai		DNA-2bb	20aq		DNA-2bj
20aj		DNA-2bc	20ar		DNA-2bk
20ak		DNA-2bd	20as		DNA-2bl
20al		DNA-2be			


### 8.11.3. Zyklus 2 - Synthese und Kodierung



Die in **Kapitel 8.11.1** synthetisierten und kodierten DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-20a - y** wurden äquimolar (1 nmol je DNA-Aldehyd-Konjugat) vereinigt und für 10 min vermischt, um den **pool-DNA-20a - y** zu erhalten. Mit diesem *Pool* wurde nun die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion durchgeführt. Die Amine **20c, g, i, w, x, ae - bn** (4  $\mu\text{mol}$ , 8000 Äquiv.) wurden in Reaktionsgefäße (0,6 mL) vorgelegt und in EtOAc (2,5  $\mu\text{L}$ ) gelöst. Anschließend wurde das *N*-Boc-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol **21d** (0,69  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{mol}$ , 8000 Äquiv.) hinzugegeben. Die vermischten DNA-Aldehyd-Konjugate wurden auf die 41 Reaktionsgefäße (je 500 pmol) verteilt und mit *d*H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 34  $\mu\text{L}$  aufgefüllt.

Anschließend wurde das Copolymer **P2-EA-a** (25 nmol, 50 Äquiv.), gelöst in destilliertem Wasser (16 µL von einer Stammlösung mit 1,5 µmol Copolymer **P2-EA-a** gelöst in 960 µL destilliertem Wasser), zugegeben und für 18 h bei 40 °C geschüttelt (1.000 U/min). Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (2 x 400 µL) extrahiert und der Rückstand in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C verdampft. Anschließend wurde für die Affinitäts-Aufreinigung die Synthesevorschrift in **Kapitel 8.10.3** verwendet. Dazu wurde eine **Matrix-DNA-22** nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.10.1** mit der komplementären Sequenz (5'-TCCG TTCA CACC GACC T-3') zu der Primer-Region hergestellt. Nach dem Verdampfen des Elutionsmittels wurde die Boc-Entschützung angeschlossen. Dafür wurde das Copolymer **P2-EA-d** (12,5 nmol, 25 Äquiv.), gelöst in destilliertem Wasser (5 µL von einer Stammlösung mit 385 nmol Copolymer **P2-EA-d** gelöst in 308 µL destilliertem Wasser) mit MgCl<sub>2</sub> (500 nmol, 1.000 Äquiv.) und dH<sub>2</sub>O (5 µL) vermischt und auf die 41 Reaktionsgefäße der Povarov-Reaktion verteilt (je 12,5 µL). Die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 4 h geschüttelt. Die Proben wurden anschließend mittels einer ethanolischen Fällung nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde in dH<sub>2</sub>O (40 µL) gelöst und die Ausbeute wurde anhand der UV-Vis-Absorption berechnet. Die hergestellten DNA-Povarov-Produkte wurden mit den dazugehörigen DNA-Barcodes enzymatisch ligiert (siehe **Tabelle 37**).

**Tabelle 37:** Reaktionsschema und verwendete DNA-Sequenzen der enzymatischen Ligation der DNA-Barcodes //II' an die DNA-Povarov-Produkte.

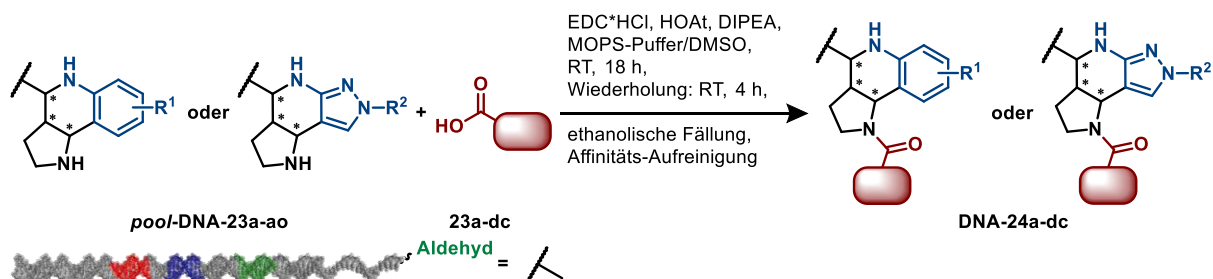


DNA	Sequenz (5' - 3')
<b>Barcode //</b>	GTAT XXXX XXXX
<b>Barcode //'</b>	TAGG XXXX XXXX

Dazu wurden die 5'-Enden der DNA-Produkte **DNA-23a - ao** (je 140 pmol), der DNA-Barcodes **//** (je 280 pmol), sowie der Gegenstränge DNA-Barcode **//'** (je 280 pmol) nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** phosphoryliert. Im Anschluss wurde die enzymatische Ligation nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** im 100 pmol-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde das phosphorylierte DNA-Produkt **DNA-23a - ao** mit den entsprechenden phosphorylierten DNA-Barcodes **//** und **//'** vermischt. Zunächst wurde dieses Gemisch mit dem T4 Ligase-Puffer hybridisiert und anschließend durch Zugabe der T4 DNA-Ligase über Nacht bei 25 °C ligiert. Nach der Inaktivierung wurde ein Aliquot (1 µL) aus jeder enzymatischen Ligation für die Analyse mit Hilfe der Gel-Elektrophorese nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** entnommen. Die Proben wurden über eine ethanolische Fällung nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** aufgereinigt.

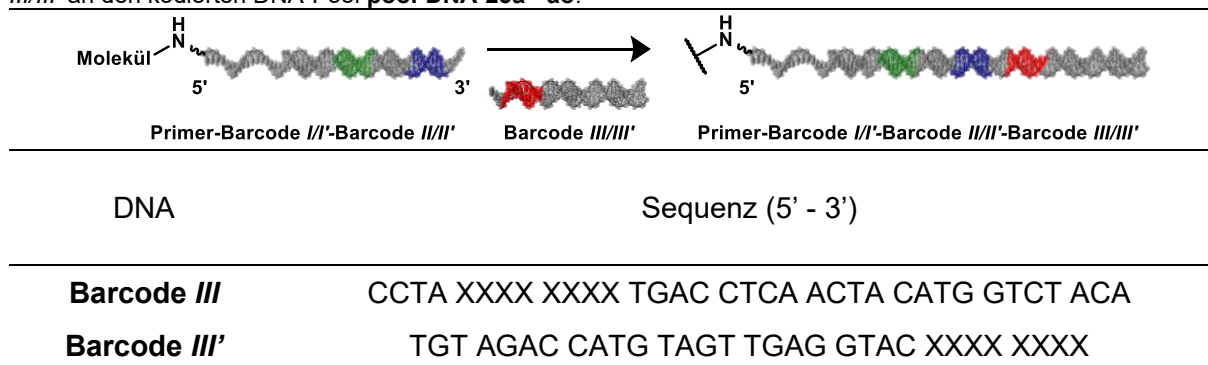
Die kodierten DNA-Aldehyd-Konjugate wurden in  $dH_2O$  (20  $\mu L$ ) gelöst, vereinigt und für 10 min vermischt. Die verwendeten Amine **20c, g, i, w, x, ae - bn**, die dazugehörigen DNA-Barcodes // und die Ausbeuten nach der Boc-Entschützung sind in **Tabelle 46** dargestellt.

### 8.11.4. Zyklus 3 - Synthese und Kodierung



Die kodierten und vermischten DNA-Povarov-Produkte wurden über eine enzymatische Ligation mit dem DNA-Barcode III/III' versehen (siehe **Tabelle 38**).

**Tabelle 38:** Reaktionsschema und verwendete DNA-Sequenzen der enzymatischen Ligation der DNA-Barcodes III/III' an den kodierten DNA-Pool **pool-DNA-23a - ao**.



Dazu wurden die 5'-Enden des DNA-Pools **pool-DNA-23a - ao** (12 x 280 pmol) und der DNA-Barcodes III (je 280 pmol) nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** phosphoryliert. Im Anschluss wurde die enzymatische Ligation nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** im 30 pmol-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde der phosphorylierte DNA-Pool **pool-DNA-23a - ao** auf 107 Reaktionsgefäße (je 6,54  $\mu L$ , 30 pmol) verteilt und mit dem entsprechenden phosphorylierten DNA-Barcode III und DNA-Barcode III' vermischt. Zunächst wurde dieses Gemisch mit dem T4 Ligase-Puffer hybridisiert und anschließend durch Zugabe der T4 DNA-Ligase über Nacht bei 25 °C ligiert. Nach der Inaktivierung wurde ein Aliquot (1  $\mu L$ ) aus jeder enzymatischen Ligation für die Analyse mit Hilfe der Gel-Elektrophorese nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** entnommen. Die Proben wurden über eine ethanolische Fällung nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** aufgereinigt. Anschließend wurden die 107 diversen Carbonsäuren **23a - dc** über eine Amidsynthese gebunden.

Zu dem DNA-Pellet (30 pmol) wurde MOPS-Puffer (10  $\mu L$ , 50 mM, pH = 8, 0,5 M NaCl) gegeben. Eine Mischung aus einer Carbonsäure **23a - dc** (162 nmol, 5400 Äquiv.), gelöst in

2 µL DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 8,1 µmol, gelöst in 100 µL DMSO), EDC x HCl (72 nmol, 2400 Äquiv.), gelöst in 2 µL DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 41,86 µmol, gelöst in 500 µL DMSO), HOAt (14,4 nmol, 480 Äquiv.), gelöst in 2 µL DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 8,4 µmol, gelöst in 500 µL DMSO), und DIPEA (72 nmol, 2400 Äquiv.), gelöst in 2 µL DMSO (entnommen aus einer Stammlösung: 41,86 µmol, gelöst in 500 µL DMSO), wurde 15 min bei Raumtemperatur aktiviert. Die aktivierte Carbonsäure wurde zu der DNA gegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde ein zweites Aliquot der frisch aktivierten Carbonsäure zu der Reaktionsmischung gegeben und weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Amidkupplungsprodukt **DNA-24a - dc** wurde durch eine dreifache ethanolische Fällung (siehe Kapitel 8.4) aufgereinigt und vereinigt. Anschließend wurde die Affinitäts-Aufreinigung des DNA-Pools (500 pmol) nach der Synthesevorschrift in Kapitel 8.10.3 durchgeführt. Die Konzentration des aufgereinigten finalen MiDEL-Pools wurde anhand der UV-Vis-Absorption bestimmt und anschließend mit IDTE-Lösung verdünnt (250 nM) und aliquotiert.

Die verwendeten Carbonsäuren **23a - dc** und die dazugehörigen DNA-Barcodes *III* sind in **Tabelle 47** dargestellt.

### 8.11.5. Selektionsassay

Die Selektionsassays wurden nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4** mit der finalen aufgereinigten **MiDEL** (1 µL, 250 fmol) durchgeführt. Die verwendeten Proteine mit den Protein-spezifischen Puffern sind in **Tabelle 39** dargestellt.

**Tabelle 39:** In den Selektionsassays eingesetzten Proteine, die verwendeten Puffer und ihre Zusammensetzungen.

Protein	Protein-Konzentration [mg/mL]	Puffer-Zusammensetzung
MKK-7	10,40	25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH = 7,4, 0,01 % Tween-20
hTEAD4	9,50	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 7,4
hTEAD4 palm.	12,50	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 7,4
MDM2	1,88	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH = 8, 5 % Glycerol, 0,01 % Tween-20
Bcl-xL	0,80	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH = 7,5, 5 % Glycerol, 0,01 % Tween-20
XIAP	1,03	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH = 7,5, 5 % Glycerol, 0,01 % Tween-20
NKD2	2,15	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH = 7,5, 0,01 % Tween-20
CXCL4	0,95	25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH = 7,5, 0,01 % Tween-20
BAG3	0,50	20 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, pH = 8,0, 10 % Glycerol, 0,01 % Tween-20

Als Kontrollexperiment wurde ein Selektionsassay ohne die Verwendung eines Proteins durchgeführt. Zudem wurden in einem Selektionsassay Streptavidin-gebundene magentische Kügelchen (*Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads*) anstelle der Nickel-Ionen-gebundenen magentischen Kügelchen (*HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads*) eingesetzt. Für diese beiden Experimente wurde der PBS-Puffer mit 0,01 % Tween-20 eingesetzt. Anschließend wurden die Bedingungen für das Selektionsassay mit dem Protein hTEAD variiert. Es wurde zum Einen die Proteinmenge von 5 µg auf 10 µg erhöht. Zum anderen wurde die Menge der zugegebenen **MiDEL** von 250 fmol auf 500 fmol verdoppelt. Auch wurde ein Selektionsassay mit drei aufeinanderfolgenden Selektionsrunden durchgeführt. Dabei wurde für die zweite und dritte Runde jeweils 20 µL des Eluats verwendet. In einem Experiment wurde zudem das immobilisierte Protein denaturiert. Dafür wurden die magnetischen Kügelchen mit dem immobilisierten Protein mit dH<sub>2</sub>O (20 µL) für 5 min bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde der Überstand entfernt, mit dem Immobilisierungs-Puffer (2 x 100 µL) mit Hilfe der magnetischen Reaktionsgefäßhalterung gewaschen und die DEL (1 µL, 250 fmol) wurde mit dem Immobilisierungs-Puffer (49 µL) zu dem denaturierten Protein gegeben. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4**. Nach der ersten Selektionsrunde wurde eine weitere Selektionsrunde angeschlossen mit der erneuten Denaturierung des Proteins.

Die Eluate der Selektionsexperimente wurden anschließend in drei aufeinanderfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) verlängert und mit Experiment-spezifischen DNA-Barcodes versehen für das nachfolgende *next generation sequencing*. Dabei wurden die PCR-Experimente nach der Synthesevorschrift in **Kapitel 8.4**. durchgeführt und mit Hilfe der Gel-Elektrophorese analysiert. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide für die PCR-Experimente sind in **Tabelle 40** gezeigt.

**Tabelle 40:** Für die Polymerase-Kettenreaktion verwendete DNA-Oligonukleotide zur Kodierung der Selektionsexperimente.

DNA	Sequenz (5' - 3')
<i>forward primer</i> (PCR 1)	AGGT CGGT GTGA ACGG ATTT G
<i>reverse primer</i> (PCR 1)	ACTG GAGT TGAT GTAC CAGA TGT
<i>forward adapter</i> (PCR 2)	TCGT CGGC AGCG TCAG ATGT GTAT AAGA GACA GAGG TCGG TGTG AACG GATT TG
<i>reverse adapter</i> (PCR 2)	ACTG GAGT TGAT GTAC CAGA TGTG ACAG AGAA TATG TGTA GAGG CTCG GGTG CTCT G
Index i7	CAAG CAGA AGAC GGCA TACG AGAT XXXX XXXX GTCT CGTG GGCT CGG
Index i5	AATG ATAC GGCG ACCA CCGA GATC TACA CXXX XXXX XTCG TCGG CAGC GTC

Es wurde das Eluat (10  $\mu$ L) der einzelnen Experimente entnommen und jeweils mit der *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity* DNA Polymerase (0,5  $\mu$ L, 2.000 U/mL), 5 x *Phusion* HF Puffer (8  $\mu$ L),  $MgCl_2$  (2,4  $\mu$ L einer 50 mM Lösung), dem dNTP-Mix (1  $\mu$ L einer 100 mM Lösung) und mit den Primern (PCR 1, 1  $\mu$ L einer 40  $\mu$ M Lösung) vermischt und mit *dH*<sub>2</sub>O auf 40  $\mu$ L aufgefüllt. Anschließend wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

T [°C]	t [s]	Reaktionsschritt	
95	30	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	} 25 x wiederholen
64	30	Hybridisierung	
72	30	Elongation	
72	300	abschließende Elongation	
4	$\infty$	Lagerung	

Das PCR-1-Produkt (10  $\mu$ L) wurde jeweils mit der *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity* DNA Polymerase (0,5  $\mu$ L, 2.000 U/mL), 5 x *Phusion* HF Puffer (8  $\mu$ L),  $MgCl_2$  (2,4  $\mu$ L einer 50 mM Lösung), dem dNTP-Mix (1  $\mu$ L einer 100 mM Lösung) und mit den Primern (PCR 2, 1  $\mu$ L einer 20  $\mu$ M Lösung) vermischt und mit *dH*<sub>2</sub>O auf 40  $\mu$ L aufgefüllt. Anschließend wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

T [°C]	t [s]	Reaktionsschritt	
95	30	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	} 8 x wiederholen
64	30	Hybridisierung	
72	30	Elongation	
72	300	abschließende Elongation	
4	$\infty$	Lagerung	

Das PCR-2-Produkt (10  $\mu$ L) wurde jeweils mit der *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity* DNA Polymerase (0,5  $\mu$ L, 2.000 U/mL), 5 x *Phusion* HF Puffer (8  $\mu$ L),  $MgCl_2$  (2,4  $\mu$ L einer 50 mM Lösung), dem dNTP-Mix (1  $\mu$ L einer 100 mM Lösung) und mit den vorher vermischten Primer-Paaren Index i5 und i7 (PCR 3, 10  $\mu$ L) vermischt und mit *dH*<sub>2</sub>O auf 40  $\mu$ L aufgefüllt. Anschließend wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

$T$ [°C]	$t$ [s]	Reaktionsschritt	
95	180	Initiale Denaturierung	
95	30	Denaturierung	} 15 x wiederholen
55	30	Hybridisierung	
72	30	Elongation	
72	300	abschließende Elongation	
4	$\infty$	Lagerung	

Die PCR-3-Produkte wurden mit Hilfe des *QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen)* aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der einzelnen Experimente anhand der UV-Vis-Absorption bestimmt und äquimolar vereinigt und auf eine Konzentration von 10 nM mit Tris-Puffer (10 mM) verdünnt. Das Auslesen der DNA-Oligonukleotide erfolgte über die Firma *CeGat* mittels des *next generation sequencing*.

## 8.12 Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln

Die **DNA-13b**, **DNA-27** und **DNA-28** wurden von der Firma *IDT* verwendet. Die DNA-Sequenz **DNA-13b** trug das 6-Carboxyfluorescein (6-FAM). Die DNA-Sequenzen **DNA-25** und **DNA-26** wurden von der Firma *IBA Lifesciences* hergestellt und trugen die Modifikation ALEXA430. Die Sequenzen sind in **Tabelle 41** dargestellt.

**Tabelle 41:** Die verwendeten DNA-Sequenzen für die Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln.

DNA	Sequenz (5' - 3')
<b>DNA-13b</b>	GTC TTG CCG AAT TC/36-FAM/
<b>DNA-25</b>	(ALEXA430) GAC GGT GAC CAA TGG AAT TCG GCA AGA C
<b>DNA-26</b>	(ALEXA430) TCA GAT GGA CAG CAG ACG GTG ACC AAT GGA ATT CGG CAA GAC
<b>DNA-27</b>	GTC ATG ATC T
<b>DNA-28</b>	TTA CTA CCT A

### 8.12.1. Etablierung der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln

Die **DNA-13b** (2 nmol, 0,04 mM, 1 Äquiv.) wurde mit dem Copolymer **P4-a** (50 nmol, 1 mM, 25 Äquiv.) in  $dH_2O$  (5  $\mu$ L) vermischt und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Wahl (50  $\mu$ L,  $dH_2O$ , MeCN, 1,2-DCE,  $CH_2Cl_2$  oder Toluol) zugegeben und für 30 min gemischt. Dieses Reaktionsgemisch wurde fotografisch aufgenommen.

Zur Kontrolle wurde die **DNA-13b** (2 nmol, 0,04 mM, 1 Äquiv.) in  $dH_2O$  (5  $\mu$ L) gelöst und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Wahl (50  $\mu$ L,  $CH_2Cl_2$  oder Toluol) zugegeben und für 30 min gemischt. Anschließend wurde ebenfalls das Ultraschallbad für 10 min verwendet. Dieses Reaktionsgemisch wurde fotografisch aufgenommen.

Das Copolymer-DNA-Gemisch wurde anschließend mit unterschiedlichen wässrigen Lösungen (50  $\mu$ L,  $dH_2O$ , 10 Vol% NaCl-Lösung (5 M), 50 Vol% NaCl-Lösung (5 M) oder 100 Vol% NaCl-Lösung (5 M)) versetzt, gemischt und fotografisch aufgenommen. Die organische Phase wurde abpipettiert und in einem weiteren Reaktionsgefäß gelagert. Anschließend wurde die Extraktion der organischen Phase wiederholt.

### 8.12.2. Charakterisierung der Copolymer-DNA-Interaktion in organischen Lösungsmitteln

#### Dynamische Lichtstreuung

Die **DNA-27** (20 nmol, 0,04 mM, 1 Äquiv.) wurde mit dem Copolymer **P4-a** (500 nmol, 1 mM, 25 Äquiv.) in  $dH_2O$  (50  $\mu$ L) vermischt und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Wahl (500  $\mu$ L,  $dH_2O$ , MeCN, 1,2-DCE,  $CH_2Cl_2$  oder Toluol) zugegeben und für 30 min gemischt.

Zur Kontrolle wurde das Copolymer **P4-a** (500 nmol, 1 mM, 25 Äquiv.) in  $dH_2O$  (5  $\mu$ L) gelöst und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Wahl (500  $\mu$ L,  $dH_2O$ , MeCN, 1,2-DCE,  $CH_2Cl_2$  oder Toluol) zugegeben und für 30 min gemischt.

Der hydrodynamische Durchmesser wurde mit Hilfe der DLS-Messungen bestimmt. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

#### UV-Vis-Absorption

Die **DNA-27** (4 nmol, 0,04 mM, 1 Äquiv.) wurde mit dem Copolymer **P4-a** (100 nmol, 1 mM, 25 Äquiv.) in  $dH_2O$  (100  $\mu$ L) vermischt und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Wahl (1 mL,  $dH_2O$ , MeCN, 1,2-DCE,  $CH_2Cl_2$  oder Toluol) zugegeben und für 30 min gemischt.



Zur Kontrolle wurde das Copolymer **P4-a** (100 nmol, 1 mM, 25 Äquiv.) in *d*H<sub>2</sub>O (100 µL) gelöst und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Wahl (1 mL, *d*H<sub>2</sub>O, MeCN, 1,2-DCE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder Toluol) zugegeben und für 30 min gemischt.

Die UV-Vis-Absorption wurde in Dreifachmessungen bestimmt.

## 9. Verzeichnisse

### 9.1 Literaturverzeichnis

- [1] Lebenserwartung in Deutschland nach Geschlecht bis 2021, Statistisches Bundesamt (Destatis), **2022**. In <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/185394/umfrage/entwicklung-der-lebenserwartung-nach-geschlecht/>.
- [2] Verteilung der häufigsten Todesursachen in Deutschland 2020, Statistisches Bundesamt (Destatis), **2022**. In <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/240/umfrage/verteilung-der-sterbefaelle-nach-todesursachen/>.
- [3] A. Brunschweiler, J. Hall, *ChemMedChem* **2012**, 7, 194 - 203.
- [4] A. L. Hopkins, C. R. Groom, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 727 - 730.
- [5] C. H. Arrowsmith, J. E. Audia, C. Austin, J. Baell, J. Bennett, J. Blagg, C. Bountra, P. E. Brennan, P. J. Brown, M. E. Bunnage, C. Buser-Doepner, R. M. Campbell, A. J. Carter, P. Cohen, R. A. Copeland, B. Cravatt, J. L. Dahlin, D. Dhanak, A. M. Edwards, M. Frederiksen, S. V. Frye, N. Gray, C. E. Grimshaw, D. Hepworth, T. Howe, K. V. M. Huber, J. Jin, S. Knapp, J. D. Kotz, R. G. Kruger, D. Lowe, M. M. Mader, B. Marsden, A. Mueller-Fahrnow, S. Müller, R. C. O. J. P. Overington, D. R. Owen, S. H. Rosenberg, B. Roth, R. Ross, M. Schapira, S. L. Schreiber, B. Shoichet, M. Sundström, G. Superti-Furga, J. Taunton, L. Toledo-Sherman, C. Walpole, M. A. Walters, T. M. Willson, P. Workman, R. N. Young, W. J. Zuercher, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 536 - 541.
- [6] R. M. Garbaccio, E. R. Parmee, *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23, 10 - 17.
- [7] M. Ellermann, A. Eheim, F. Rahm, J. Viklund, J. Guenther, M. Andersson, U. Ericsson, R. Forsblom, T. Ginman, J. Lindstro, C. Silvander, L. Treaugues, A. Giese, S. Bunse, R. Neuhaus, rg Weiske, M. Quanz, A. Glasauer, K. Nowak-Reppel, B. Bader, H. Irlbacher, H. Meyer, N. Queisser, M. Bauser, A. Haegebarth, M. Gorjaaz, *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12, 1986 - 1992.
- [8] A. L. Satz, A. Brunschweiler, M. E. Flanagan, A. Gloger, N. J. V. Hansen, L. Kuai, V. B. K. Kunig, X. Lu, D. Madsen, L. A. Marcaurelle, C. Mulrooney, G. O'Donovan, S. Sakata, J. Scheuermann, *Nat. Rev. Methods Primers* **2022**, 2, DOI 10.1038/s43586-021-00084-5.
- [9] S. Milhas, B. Raux, S. Betzi, C. Derviaux, P. Roche, A. Restouin, M. J. Basse, E. Rebuffet, A. Lugari, M. Badol, R. Kashyap, J. C. Lissitzky, C. Eydoux, V. Hamon, M. E. Gourdel, S. Combes, P. Zimmermann, M. Aurrand-Lions, T. Roux, C. Rogers, S. Müller, S. Knapp, E. Trinquet, Y. Collette, J. C. Guillemot, X. Morelli, *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 2140 - 2148.
- [10] R. Macarron, *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 277 - 279.
- [11] R. Macarron, M. N. Banks, D. Bojanic, D. J. Burns, D. A. Cirovic, T. Garyantes, D. V. S. Green, R. P. Hertzberg, W. P. Janzen, J. W. Paslay, U. Schopfer, G. S. Sittampalam, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, 10, 188 - 195.
- [12] L. M. Mayr, D. Bojanic, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, 9, 580 - 588.
- [13] B. K. Shoichet, P. W. Walters, H. Jiang, J. Bajorath, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 4033 - 4034.
- [14] J. B. Baell, G. A. Holloway, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2719 - 2740.
- [15] S. J. Chakravorty, J. Chan, M. N. Greenwood, I. Popa-Burke, K. S. Remlinger, S. D.

- Pickett, D. V. S. Green, M. C. Fillmore, T. W. Dean, J. I. Luengo, R. Macarrón, *SLAS Discov.* **2018**, *23*, 532 - 545.
- [16] B. K. Shoichet, *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 607 - 615.
- [17] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315 - 1317.
- [18] S. F. Parmley, G. P. Smith, *Gene* **1988**, *73*, 305 - 318.
- [19] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391 - 410.
- [20] G. P. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14428 - 14437.
- [21] S. Mimmi, D. Maisano, I. Quinto, E. Iaccino, *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 87 - 91.
- [22] A. Rami, M. Behdani, N. Yardehnavi, M. Habibi-Anbouhi, F. Kazemi-Lomedasht, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 599 - 602.
- [23] L. Ledsgaard, M. Kilstrup, A. Karatt-Vellatt, J. McCafferty, A. H. Laustsen, *Toxins* **2018**, *10*, 236 - 250.
- [24] K. B. Mullis, F. A. Faloona, *Methods Enzymol.* **1987**, *155*, 335 - 350.
- [25] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1992**, *89*, 5381 - 5383.
- [26] D. T. Flood, C. Kingston, J. C. Vantourout, P. E. Dawson, P. S. Baran, *Isr. J. Chem.* **2020**, *60*, 263 - 280.
- [27] R. A. Goodnow, C. E. Dumelin, A. D. Keefe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 131 - 147.
- [28] V. Kunig, M. Potowski, A. Gohla, A. Brunschweiler, *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 691 - 710.
- [29] K. Götte, S. Chines, A. Brunschweiler, *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151889 - 1518996.
- [30] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9812 - 9813.
- [31] M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1993**, *90*, 10700 - 10704.
- [32] Y. Kinoshita, K. Nishigaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1995**, *34*, 201 - 202.
- [33] S. Melkko, J. Scheuermann, C. E. Dumelin, D. Neri, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 568 - 574.
- [34] M. A. Clark, R. A. Acharya, C. C. Arico-Muendel, S. L. Belyanskaya, D. R. Benjamin, N. R. Carlson, P. A. Centrella, C. H. Chiu, S. P. Creaser, J. W. Cuzzo, C. P. Davie, Y. Ding, G. J. Franklin, K. D. Franzen, M. L. Gefter, S. P. Hale, N. J. V. Hansen, D. I. Israel, J. Jiang, M. J. Kavarana, M. S. Kelley, C. S. Kollmann, F. Li, K. Lind, S. Mataruse, P. F. Medeiros, J. A. Messer, P. Myers, H. O'Keefe, M. C. Oliff, C. E. Rise, A. L. Satz, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, L. Tang, K. Van Vloten, R. W. Wagner, G. Yao, B. Zhao, B. A. Morgan, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 647 - 654.
- [35] L. Mannocci, Y. Zhang, J. Scheuermann, M. Leimbacher, G. De Bellis, E. Rizzi, C. Dumelin, S. Melkko, D. Neri, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, *105*, 17670 - 17675.
- [36] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601 - 1605.
- [37] P. Blakskjaer, T. Heitner, N. Jakob, V. Hansen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 62 - 71.
- [38] D. L. Usanov, A. I. Chan, J. P. Maianti, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 704 - 714.
- [39] F. V. Reddavid, W. Lin, S. Lehnert, Y. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7924 - 7928.
- [40] R. K. O'Reilly, A. J. Turberfield, T. R. Wilks, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2496 - 2509.
- [41] M. H. Hansen, P. Blakskjaer, L. K. Petersen, T. H. Hansen, J. W. Højfeldt, K. V. Gothelf,

- N. J. Vest Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1322 - 1327.
- [42] A. B. MacConnell, P. J. McEnaney, V. J. Cavett, B. M. Paegel, *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 518 - 534.
- [43] N. G. Paciaroni, J. M. Ndungu, T. Kodadek, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 4656 - 4659.
- [44] A. L. Satz, L. Kuai, X. Peng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *39*, 127851 - 127856.
- [45] J. Scheuermann, D. Neri, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 99 - 103.
- [46] D. R. Halpin, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 1015 - 1021.
- [47] D. R. Halpin, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 1022 - 1030.
- [48] D. Neri, R. A. Lerner, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 479 - 502.
- [49] G. Zhao, Y. Huang, Y. Zhou, Y. Li, X. Li, *Expert Opin. Drug Discov.* **2019**, *14*, 735 - 753.
- [50] M. Wichert, N. Krall, W. Decurtins, R. M. Franzini, F. Pretto, P. Schneider, D. Neri, J. Scheuermann, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 241 - 249.
- [51] R. M. Franzini, C. Randolph, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6629 - 6644.
- [52] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 4848 - 4870.
- [53] C. T. Calderone, J. W. Puckett, Z. J. Gartner, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4104 - 4108.
- [54] L. Mannocci, M. Leimbacher, M. Wichert, J. Rg Scheuermann, D. Neri, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12747 - 12753.
- [55] D. A. Erlanson, S. W. Fesik, R. E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 605 - 619.
- [56] F. V. Reddavid, M. Cui, W. Lin, N. Fu, S. Heiden, H. Andrade, M. Thompson, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 3753 - 3756.
- [57] B. Shi, Y. Zhou, Y. Huang, J. Zhang, X. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 361 - 369.
- [58] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Nature* **1990**, *348*, 552 - 554.
- [59] W. Decurtins, M. Wichert, R. M. Franzini, F. Buller, M. A. Stravs, Y. Zhang, D. Neri, J. Scheuermann, *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 764 - 780.
- [60] A. I. Chan, L. M. McGregor, D. R. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *26*, 55 - 61.
- [61] L. M. McGregor, D. J. Gorin, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15522 - 15524.
- [62] B. Shi, Y. Deng, P. Zhao, X. Li, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2293 - 2301.
- [63] P. Zhao, Z. Chen, Y. Li, D. Sun, Y. Gao, Y. Huang, X. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10056 - 10059.
- [64] L. K. Petersen, P. Blakskjær, A. Chaikuad, A. B. Christensen, J. Dietvorst, J. Holmkvist, S. Knapp, M. Kořínek, L. K. Larsen, A. E. Pedersen, S. Röhm, F. A. Sløk, N. J. V. Hansen, *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1332 - 1339.
- [65] Y. Huang, L. Meng, Q. Nie, Y. Zhou, L. Chen, S. Yang, Y. Man Eva Fung, X. Li, C. Huang, Y. Cao, Y. Li, X. Li, *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 77 - 88.
- [66] L. M. McGregor, T. Jain, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3264 - 3270.
- [67] A. I. Chan, L. M. McGregor, T. Jain, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10192 - 10195.
- [68] B. Cai, D. Kim, S. Akhand, Y. Sun, R. J. Cassell, A. Alpsyoy, E. C. Dykhuizen, R. M. Van Rijn, M. K. Wendt, C. J. Krusemark, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17057 - 17061.

- [69] L. K. Petersen, A. B. Christensen, J. Andersen, C. G. Folkesson, O. Kristensen, C. Andersen, A. Alzu, F. A. Sløk, P. Blakskjaer, D. Madsen, C. Azevedo, I. Micco, N. J. V Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 2751 - 2756.
- [70] S. Ahn, A. W. Kahsai, B. Pani, Q.-T. Wang, S. Zhao, A. L. Wall, R. T. Strachan, D. P. Staus, L. M. Wingler, L. D. Sun, J. Sinnaeve, M. Choi, T. Cho, T. T. Xu, G. M. Hansen, M. B. Burnett, J. E. Lamerdin, D. L. Bassoni, B. J. Gavino, G. Husemoen, E. K. Olsen, T. Franch, S. Costanzi, X. Chen, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2017**, *114*, 1708 - 1713.
- [71] H. Richter, A. L. Satz, M. Bedoucha, B. Buettelmann, A. C. Petersen, A. Harmeier, R. Hermosilla, R. Hochstrasser, D. Burger, B. Gsell, R. Gasser, S. Huber, M. N. Hug, B. Kocer, B. Kuhn, M. Ritter, M. G. Rudolph, F. Weibel, J. Molina-David, J.-J. Kim, J. V. Santos, M. Stihle, G. J. Georges, R. D. Bonfil, R. Fridman, S. Uhles, S. Moll, C. Faul, A. Fornoni, M. Prunotto, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 37 - 49.
- [72] A. Litovchick, X. Tian, M. I. Monteiro, K. M. Kennedy, M. A. Guié, P. Centrella, Y. Zhang, M. A. Clark, A. D. Keefe, *Molecules* **2019**, *24*, 2026 - 2040.
- [73] L. H. Yuen, S. Dana, Y. Liu, S. I. Bloom, A. G. Thorsell, D. Neri, A. J. Donato, D. Kireev, H. Schüler, R. M. Franzini, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5169 - 5181.
- [74] S. L. Belyanskaya, Y. Ding, J. F. Callahan, A. L. Lazaar, D. I. Israel, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 837 - 842.
- [75] P. A. Harris, B. W. King, D. Bandyopadhyay, S. B. Berger, N. Campobasso, C. A. Capriotti, J. A. Cox, L. Dare, X. Dong, J. N. Finger, L. C. Grady, S. J. Hoffman, J. U. Jeong, J. Kang, V. Kasparcova, A. S. Lakdawala, R. Lehr, D. E. McNulty, R. Nagilla, M. T. Ouellette, C. S. Pao, A. R. Rendina, M. C. Schaeffer, J. D. Summerfield, B. A. Swift, R. D. Totoritis, P. Ward, A. Zhang, D. Zhang, R. W. Marquis, J. Bertin, P. J. Gough, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2163 - 2178.
- [76] J. W. Cuozzo, M. A. Clark, A. D. Keefe, A. Kohlmann, M. Mulvihill, H. Ni, L. M. Renzetti, D. I. Resnicow, F. Ruebsam, E. A. Sigel, H. A. Thomson, C. Wang, Z. Xie, Y. Zhang, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 7840 - 7856.
- [77] S. J. Wrenn, R. M. Weisinger, D. R. Halpin, P. B. Harbury, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13137 - 13143.
- [78] M. Leimbacher, Y. Zhang, L. Mannocci, M. Stravs, T. Geppert, J. Scheuermann, G. Schneider, D. Neri, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7729 - 7737.
- [79] A. M. Estévez, F. Gruber, A. L. Satz, R. E. Martin, H. P. Wessel, *Tetrahedron-Asymmetr.* **2017**, *28*, 837 - 842.
- [80] M. Klika Škopić, O. Bugain, K. Jung, S. Onstein, S. Brandherm, T. Kalliokoski, A. Brunschweiger, *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1957 - 1965.
- [81] H. Deng, J. Zhou, F. S. Sundersingh, J. Summerfield, D. Somers, J. A. Messer, A. L. Satz, N. Ancellin, C. C. Arico-Muendel, K. L. Bedard, A. Beljean, S. L. Belyanskaya, R. Bingham, S. E. Smith, E. Boursier, P. Carter, P. A. Centrella, M. A. Clark, C. Chung, C. P. Davie, J. L. Delorey, Y. Ding, G. Joseph Franklin, L. C. Grady, K. Herry, C. Hobbs, C. S. Kollmann, B. A. Morgan, L. J. Kaushansky, Q. Zhou, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 919 - 924.
- [82] A. L. Satz, J. Cai, Y. Chen, R. Goodnow, F. Gruber, A. Kowalczyk, A. Petersen, G. Naderi-Oboodi, L. Orzechowski, Q. Strebel, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1623 - 1632.
- [83] Y. Ding, J. Chai, P. A. Centrella, C. Gondo, J. L. DeLorey, M. A. Clark, *ACS Comb. Sci.* **2018**, *20*, 251 - 255.
- [84] F. Buller, L. Mannocci, Y. Zhang, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5926 - 5931.

- [85] L. Fan, C. P. Davie, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 843 - 847.
- [86] X. Lu, L. Fan, C. B. Phelps, C. P. Davie, C. P. Donahue, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1625 - 1629.
- [87] Y. Terui, T. Yoshida, A. Sakamoto, D. Saito, T. Oshima, M. Kawazoe, S. Yokoyama, K. Igarashi, K. Kashiwagi, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *99*, 147 - 153.
- [88] K. S. Gates, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747 - 1760.
- [89] C. Tamm, M. E. Hodes, E. Chargaff, *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 49 - 63.
- [90] S. Greer, S. Zamenhof, *J. Mol. Biol.* **1962**, *4*, 123 - 141.
- [91] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709 - 715.
- [92] M. Klika Škopić, H. Salamon, O. Bugain, K. Jung, A. Gohla, L. J. Doetsch, D. Dos Santos, A. Bhat, B. Wagner, A. Brunschweiler, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3356 - 3361.
- [93] M. Klika Škopić, S. Willems, B. Wagner, J. Schieven, N. Krause, A. Brunschweiler, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8648 - 8654.
- [94] V. B. K. Kunig, M. Potowski, M. Akbarzadeh, M. Klika Škopić, D. dos Santos Smith, L. Arendt, I. Dormuth, H. Adihou, B. Andlovic, H. Karatas, S. Shaabani, T. Zarganes-Tzitzikas, C. G. Neochoritis, R. Zhang, M. Groves, S. M. Guéret, C. Ottmann, J. Rahnenführer, R. Fried, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 20338 - 20342.
- [95] M. Potowski, F. Losch, E. Wünnemann, J. K. Dahmen, S. Chines, A. Brunschweiler, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10481 - 10492.
- [96] M. Potowski, V. B. K. Kunig, F. Losch, A. Brunschweiler, *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10*, 1082 - 1093.
- [97] V. B. K. Kunig, C. Ehrhart, A. Dömling, A. Brunschweiler, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7238 - 7243.
- [98] M. Potowski, V. B. K. Kunig, L. Eberlein, A. Vakalopoulos, S. M. Kast, A. Brunschweiler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 19744 - 19749.
- [99] M. Potowski, V. B. K. Kunig, L. Eberlein, M. Klika Škopić, A. Vakalopoulos, S. M. Kast, A. Brunschweiler, *Front. Chem.* **2022**, *10*, DOI 10.3389/fchem.2022.894563.
- [100] D. T. Flood, S. Asai, X. Zhang, J. Wang, L. Yoon, Z. C. Adams, B. C. Dillingham, B. B. Sanchez, J. C. Vantourout, M. E. Flanagan, D. W. Piotrowski, P. Richardson, S. A. Green, R. A. Shenvi, J. S. Chen, P. S. Baran, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9998 - 10006.
- [101] Y. Ruff, R. Martinez, X. Pellé, P. Nimsgern, P. Fille, M. Ratnikov, F. Berst, *ACS Comb. Sci.* **2020**, *22*, 120 - 128.
- [102] R. Fregel, A. González, V. M. Cabrera, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1350 - 1352.
- [103] Y. Li, S. Chen, N. Liu, L. Ma, T. Wang, R. N. Veedu, T. Li, F. Zhang, H. Zhou, X. Cheng, X. Jing, *Biotechniques* **2020**, *68*, 191 - 199.
- [104] D. R. Halpin, J. A. Lee, S. J. Wrenn, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 1031 - 1038.
- [105] R. Rama-Garda, J. Amigo, J. Priego, M. Molina-Martin, L. Cano, E. Domínguez, M. I. Loza, A. Rivera-Sagredo, J. de Blas, *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *40*, DOI 10.1016/j.bmc.2021.116178.
- [106] A. Behr, *Angewandte Homogene Katalyse*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [107] A. Behr, D. W. Agar, J. Jörissen, A. J. Vorholt, *Einführung in die Technische Chemie*, Springer Spektrum, Berlin, **2016**.
- [108] M.-C. Jones, J.-C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, *48*, 101 - 111.

- [109] T. Dwars, E. Paetzold, G. Oehme, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7174 - 7199.
- [110] G. La Sorella, G. Strukul, A. Scarso, *Green Chem.* **2015**, *17*, 644 - 683.
- [111] A. Kumar, M. K. Gupta, M. Kumar, D. Saxena, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 1673 - 1678.
- [112] P. P. Ghosh, P. Mukherjee, A. R. Das, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 8220 - 8226.
- [113] B. H. Lipshutz, S. Ghoraib, *Aldrichim. Acta* **2012**, *45*, 1 - 83.
- [114] P. Klumphu, B. H. Lipshutz, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 888 - 900.
- [115] Y. Hu, M. J. Wong, B. H. Lipshutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, DOI 10.1002/ANIE.202209784.
- [116] A. Lu, P. Cotanda, J. P. Patterson, D. A. Longbottom, R. K. O'Reilly, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9699 - 9701.
- [117] H. Petersen, M. Ballmann, N. Krause, R. Weberskirch, *ChemCatChem* **2022**, *14*, DOI 10.1002/cctc.202200727.
- [118] J. Dinges, C. Lamberth, *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [119] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [120] a) M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chemie* **1996**, *108*, 2192 - 2219. b) M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056 - 2083.
- [121] P. Slobbe, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1189 - 1218.
- [122] A. Dömling, W. Wang, K. Wang, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3083 - 3135.
- [123] A. Ilyin, V. Kysil, M. Krasavin, I. Kurashvili, A. V Ivachtchenko, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9544 - 9547.
- [124] L. El Kaim, M. Gizolme, L. Grimaud, J. Oble, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4019 - 4021.
- [125] A. Dömling, I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168 - 3210.
- [126] V. Sridharan, C. Avendaño, J. C. Menéndez, *Synthesis* **2008**, *7*, 1039 - 1044.
- [127] V. Sridharan, J. Carlos Menéndez, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3805 - 3849.
- [128] V. Sridharan, P. A. Suryavanshi, J. C. Menéndez, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7157 - 7259.
- [129] V. A. Glushkov, A. G. Tolstikov, *Russ. Chem. Rev.* **2008**, *77*, 137 - 159.
- [130] V. V Kouznetsov, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2721 - 2750.
- [131] P. Niño, M. Caba, N. Aguilar, E. Terricabras, F. Albericio, J.-C. Fernández, *Indian J. Chem.* **2016**, *55*, 1384 - 1399.
- [132] H. Ishitani, S. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7357 - 7360.
- [133] T. Akiyama, H. Morita, K. Fuchibe, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13070 - 13071.
- [134] G. Dagousset, J. Zhu, G. Masson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14804 - 14813.
- [135] S. Llona-Minguez, A. Throup, E. Steiner, M. Lightowler, S. Van Der Haegen, E. Homan, L. Eriksson, P. Stenmark, A. Jenmalm-Jensen, T. Helleday, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7758 - 7764.
- [136] W. Dong, Y. Yuan, B. Hu, X. Gao, H. Gao, X. Xie, Z. Zhang, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 80 - 83.
- [137] W.-G. Kim, J.-P. Kim, C.-J. Kim, K.-H. Lee, I.-D. Yoo, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 20 - 25.
- [138] W.-G. Kim, J.-P. Kim, I.-D. Yoo, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 26 - 30.
- [139] R. B. McCall, K. J. Lookingland, P. J. Bédard, R. M. Huff, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**,

314, 1248 - 1256.

- [140] M. L. A. Ferrari, P. M. Z. Coelho, C. M. F. Antunes, C. A. P. Tavares, & A. S. da Cunha, *Bull World Health Organ.* **2003**; *81*, 190 - 196.
- [141] R. Gosmini, V. Loc Nguyen, J. Toum, C. Simon, J.-M. G. Brusq, G. Krysa, O. Mirguet, A. M. Riou-Eymard, E. V Boursier, L. Trottet, P. Bamborough, H. Clark, C. Chung, L. Cutler, E. H. Demont, R. Kaur, A. J. Lewis, M. B. Schilling, P. E. Soden, S. Taylor, A. L. Walker, M. D. Walker, R. K. Prinjha, E. Nicodeme, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8111 - 8131.
- [142] J. D. Scott, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669 - 1730.
- [143] Faheem, B. Karan Kumar, K. Venkata Gowri Chandra Sekhar, S. Chander, S. Kunjiappan, S. Murugesan, *RSC Adv.* **2021**, *11*, 12254 - 12287.
- [144] F. Carbone, A. Djamshidian, K. Seppi, W. Poewe, *CSN Drugs* **2019**, *33*, 905 - 918.
- [145] C. W. Wright, D. Allen, Y. Cai, J. D. Phillipson, I. M. Said, G. C. Kirby, D. C. Warhurst, *Phytother. Res.* **1992**, *6*, 121 - 124.
- [146] E. D. Cox, J. M. Cook, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1797 - 1842.
- [147] A. H. Jackson, P. Smith, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2227 - 2239.
- [148] K. M. Czerwinski, L. Deng, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4721 - 4724.
- [149] M. S. Taylor, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10558 - 10559.
- [150] A. Pictet, T. Spengler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 2030 - 2036.
- [151] J. Stöckigt, A. P. Antonchick, F. Wu, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8538 - 8564.
- [152] J. Magano, J. R. Dunetz, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2177 - 2250.
- [153] C. C. C. Johansson Seechurn, M. O. Kitching, T. J. Colacot, V. Snieckus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5062 - 5085.
- [154] P. Devendar, R.-Y. Qu, W.-M. Kang, B. He, G.-F. Yang, *Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 8914 - 8934.
- [155] M. C. D'Alterio, È. Casals-Cruañas, N. V. Tzouras, G. Talarico, S. P. Nolan, A. Poater, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 13481 - 13493.
- [156] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866 - 867.
- [157] D. Blakemore, P. M. Doyle, Y. M. Fobian, *Synthetic Methods in Drug Discovery: Volume 1*, Royal Society of Chemistry, **2016**.
- [158] K. Menzel, F. Machrouhi, M. Bodenstein, A. Alorati, C. Cowden, A. W. Gibson, B. Bishop, N. Ikemoto, T. D. Nelson, M. H. Kress, D. E. Frantz, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 519 - 524.
- [159] M. Klika Škopić, K. Götte, C. Gramse, M. Dieter, S. Pospich, S. Raunser, R. Weberskirch, A. Brunschweiler, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 10546 - 10555.
- [160] J. Bobers, M. Klika Škopić, R. Dinter, P. Sakthithasan, L. Neukirch, C. Gramse, R. Weberskirch, A. Brunschweiler, N. Kockmann, *ACS Comb. Sci.* **2020**, *22*, 101 - 108.
- [161] M. Klika Škopić, C. Gramse, R. Oliva, S. Pospich, L. Neukirch, M. Manisegaran, S. Raunser, R. Winter, R. Weberskirch, A. Brunschweiler, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 10048 - 10057.
- [162] J. H. Hunter, L. Prendergast, L. F. Valente, A. Madin, G. Pairaudeau, M. J. Waring, *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 149 - 155.
- [163] J. H. Hunter, M. Potowski, H. A. Stanway-Gordon, A. Madin, G. Pairaudeau, A. Brunschweiler, M. J. Waring, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 17930 - 17935.



- [164] K. Götte, *Entwicklung von Synthesemethoden für DNS-kodierte Bibliotheken unter Verwendung der Mizellaren Katalyse*, Masterarbeit (TU Dortmund), **2018**.
- [165] C. Herfurth, P. Malo de Molina, C. Wieland, S. Rogers, M. Gradzielski, A. Laschewsky, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1606 - 1617.
- [166] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie: Ein Lehrbuch Für Chemiker, Physiker, Materialwissenschaftler Und Verfahrenstechniker*, Springer Spektrum, Berlin, **2014**.
- [167] K. M. Witherup, R. W. Ransom, A. C. Graham, A. M. Bernard, M. J. Salvatore, W. C. Lumma, P. S. Anderson, S. M. Pitzenberger, S. L. Varga, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6682 - 6685.
- [168] B. Maji, S. A. Gangopadhyay, M. Lee, M. Shi, P. Wu, R. Heler, B. Mok, D. Lim, S. U. Siriwardena, B. Paul, V. Dančík, A. Vetere, M. F. Mesleh, L. A. Marraffini, D. R. Liu, P. A. Clemons, B. K. Wagner, A. Choudhary, *Cell* **2019**, *177*, 1067 - 1079.e19.
- [169] L. R. Domingo, M. J. Aurell, J. A. Sáez, S. M. Mekelleche, *RCS Adv.* **2014**, *4*, 25268 - 25278.
- [170] B. C. Lemos, E. V. Filho, R. G. Fiorot, F. Medici, S. J. Greco, M. Benaglia, *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202101171.
- [171] O. Ghashghaei, C. Masdeu, C. Alonso, F. Palacios, R. Lavilla, *Drug Discov. Today Technol.* **2018**, *29*, 71 - 79.
- [172] G. L. Eichhorn, Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7323 - 7328.
- [173] A. D. MacKerell, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 646 - 650.
- [174] A. E. Every, I. M. Russu, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7689 - 7695.
- [175] S. Kotha, K. Lahiri, D. Kashinath, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633 - 9695.
- [176] J. Y. Li, H. Huang, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 3841 - 3846.
- [177] Y. Ding, M. A. Clark, *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 1 - 4.
- [178] H. Xu, F. Ma, N. Wang, W. Hou, H. Xiong, F. Lu, J. Li, S. Wang, P. Ma, G. Yang, R. A. Lerner, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1901551.
- [179] V. K. Siripuram, Y. K. Sunkari, T.-L. Nguyen, M. Flajolet, *Front. Chem.* **2022**, *10*, DOI 10.3389/fchem.2022.894603.
- [180] M. S. Wong, X. L. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4087 - 4089.
- [181] H. G. Kuivila, J. F. Reuwer, J. A. Mangravite, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2666 - 2670.
- [182] T. E. Barder, S. D. Walker, J. R. Martinelli, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4685 - 4696.
- [183] F. Buller, L. Mannocci, J. Scheuermann, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1571 - 1580.
- [184] R. M. Franzini, T. Ekblad, N. Zhong, M. Wichert, W. Decurtins, A. Nauer, M. Zimmermann, F. Samain, J. Scheuermann, P. J. Brown, J. Hall, S. Gräslund, H. Schüler, D. Neri, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 3927 - 3931.
- [185] M. Korenč, N. Mencin, J. Puc, J. Skok, K. Š. Nemeč, A. M. Celjar, P. Gagnon, A. Štrancar, R. Sekirnik, *Cell Gene Ther. Insights* **2021**, *7*, 1207 - 1216.
- [186] P. Gagnon, B. Goričar, Š. Peršič, U. Černigoj, A. Štrancar, *Cell Gene Ther. Insights* **2020**, *6*, 1035 - 1046.
- [187] P. Gagnon, Š. Peršič, B. Goričar, U. Černigoj, A. Štrancar, *Bioprocess Int.* **2020**, *18*, 36 - 45.

- [188] P. Gagnon, *Purification of Nucleic Acids - A Handbook for Purification of DNA Plasmids and MRNA for Gene Therapy and Vaccines*, BIA Separations, **2020**.
- [189] A. Sen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3367 - 3374.
- [190] K. Zhang, Z. Dai, W. Zhang, Q. Gao, Y. Dai, F. Xia, X. Zhang, *Coordin. Chem. Rev.* **2021**, *434*, DOI 10.1016/J.CCR.2021.213809.
- [191] G. Shinde, R. K. Godage, R. S. Jadhav, B. Manoj, B. Aniket, *Research J. Science and Tech.* **2020**, *12*, 47 - 51.
- [192] G. Bonner, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 339 - 344.
- [193] A. Arcella, G. Portella, R. Collepardo-Guevara, D. Chakraborty, D. J. Wales, M. Orozco, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 8540 - 8548.
- [194] T. C. J. Gribnau, C. A. G. Van Eekelen, C. Stumm, G. I. Tesser, *J. Chromatogr.* **1977**, *132*, 519 - 524.
- [195] X. Wang, H. J. Lim, A. Son, *Environ. Health Toxicol.* **2014**, *29*, DOI 10.5620/eht.2014.29.e2014007.
- [196] Y. Li, E. Gabriele, F. Samain, N. Favalli, F. Sladojevich, J. Scheuermann, D. Neri, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 438 - 443.
- [197] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3 - 26.
- [198] C. A. Lipinski, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235 - 249.
- [199] F. W. Goldberg, J. G. Kettle, T. Kogej, M. W. D. Perry, N. P. Tomkinson, *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 11 - 17.
- [200] M. R. Berthold, N. Cebron, F. Dill, T. R. Gabriel, T. Meini, P. Ohl, K. Thiel, B. Wiswedel, *ACM SIGKDD Explorations Newsletter* **2009**, *11*, 26 - 31.
- [201] J. Hemmerich, J. Gurinova, D. Digles, *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27*, 6444 - 6457.
- [202] S. Beisen, T. Meini, B. Wiswedel, L. F. de Figueiredo, M. Berthold, C. Steinbeck, *BMC Bioinformatics* **2013**, *14*, DOI 10.1186/1471-2105-14-257
- [203] M. Ashton, J. Barnard, F. Casset, M. Charlton, G. Downs, D. Gorse, J. Holliday, R. Lahana, P. Willett, *Quant. Struct.-Act. Relat.* **2002**, *21*, 598 - 604.
- [204] D. Bajusz, A. Rácz, K. Héberger, *J. Cheminform.* **2015**, *7*, DOI 10.1186/s13321-015-0069-3.
- [205] R. B. Van Order, H. G. Lindwall, *Chem. Rev.* **1942**, *30*, 69 - 96.
- [206] V. Sgaramella, J. H. van de Sande, H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1970**, *67*, 1468 - 1475.
- [207] J. A. Bornhorst, J. J. Falke, *Methods Enzymol.* **2000**, *326*, 245 - 254.
- [208] S. V. Wegner, F. C. Schenk, J. S Patz, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3156 - 3162.
- [209] S. Voss, A. Skerra, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 975 - 982.
- [210] I. P. Korndörfer, A. Skerra, *Protein Science* **2002**, *11*, 883 - 893.
- [211] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 625 - 636.
- [212] T. G. Schmidt, A. Skerra, *Nat Protoc.* **2007**, *2*, 1528 - 1535.
- [213] F. Gibault, M. Sturbaut, F. Bailly, P. Melnyk, P. Cotellet, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5057 - 5072.
- [214] C. L. Noland, S. Gierke, P. D. Schnier, J. Murray, W. N. Sandoval, M. Sagolla, A. Dey, R. N. Hannoush, W. J. Fairbrother, C. N. Cunningham, *Structure* **2016**, *24*, 179 - 186.

- [215] P. Chan, X. Han, B. Zheng, M. DeRan, J. Yu, G. K. Jarugumilli, H. Deng, D. Pan, X. Luo, X. Wu, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 282 - 289.
- [216] M. Cortes-Clerget, J. Yu, J. R. A. Kincaid, P. Walde, F. Gallou, B. H. Lipshutz, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 4237 - 4266.
- [217] D. T. Flood, K. W. Knouse, J. C. Vantourout, S. Kitamura, B. B. Sanchez, E. J. Sturgell, J. S. Chen, D. W. Wolan, P. S. Baran, P. E. Dawson, *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1789 - 1799.
- [218] H. Abe, N. Abe, A. Shibata, K. Ito, Y. Tanaka, M. Ito, H. Saneyoshi, S. Shuto, Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6475 - 6479.
- [219] K. Liu, L. Zheng, Q. Liu, J. Willem De Vries, J. Y. Gerasimov, A. Herrmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14255 - 14262.
- [220] A. Bosco, J. Camunas-Soler, F. Ritort, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 2064 - 2074.
- [221] S. Kumar, G. Mishra, *Soft Matter* **2011**, *7*, 4595 - 4605.
- [222] X.-M. Miao, C. Xiong, W.-W. Wang, L.-S. Ling, X.-T. Shuai, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11230 - 11236.
- [223] G. Yang, Y. Wang, *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1837*, 161 - 176.
- [224] A. Schöne, Untersuchungen zur chemischen Stabilität von mittels Copolymeren in organischen Lösungsmitteln solubilisierter DNA, Bachelorarbeit (TU Dortmund), **2021**.
- [225] E. Wünnemann, Screening von Metallkatalysatoren auf DNA Kompatibilität, Bachelorarbeit (TU Dortmund), **2019**.
- [226] K. Götte, R. Dinter, L. Justen, N. Kockmann, A. Brunschweiger, *ACS Omega* **2022**, *7*, 28369 - 28377.

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

1,2-DCE	1,2-Dichlorethan
AMA	wässrige Ammoniak-Lösung (30 %)/ Methylamin (40 %), 1:1, vol/vol.
Äquiv.	Äquivalente
BA	n-Butylacrylat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BTE	binder trap enrichment
c	Konzentration
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (engl. <i>critical micelle concentration</i> )
CPG	<i>controlled pore glass</i>
CuAAC	Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (engl. <i>copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i> )
DELs	DNA-kodierte Bibliotheken (engl. <i>DNA-encoded libraries</i> )
$d_h$	hydrodynamischer Durchmesser
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i> )
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacrylamid
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMt	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
$dp$	Polymerisationsgrad
DPAL	DNA-programmierte Affinitätsmarkierung (engl. <i>DNA-programmed affinity labeling</i> )
$\bar{E}_{260\text{ nm}}$	Mittelwert der UV-Vis-Absorption bei 260nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	Enantiomerenüberschuss
et al.	und weitere (lat. <i>et alii</i> )
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FG	Funktionelle Gruppe
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl

---

<i>h</i>	Stunden
Hal	Halogenid
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HFIP	Hexafluorisopropanol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl. <i>high throughput screening</i> )
IDPCR	Interaktions-abhängigen Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>interaction dependent polymerase chain reaction</i> )
LA	Lewis-Säure (engl. <i>lewis acid</i> )
MALDI-MS	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung-Massenspektrometrie (engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometry</i> )
MCR	Multikomponentenreaktion (engl. <i>multi component reaction</i> )
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MiDEL	Mizellen-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek
min	Minuten
MMt	Monomethoxytrityl
MOM	Methoxymethyl-Schutzgruppe
n.d.	nicht detektiert
NGS	<i>next generation sequencing</i>
PBS	<i>protein buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Poly(ethylenglykol)
PG	Schutzgruppe (engl. <i>protecting group</i> )
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PNK	Polynukleotidkinase
POI	<i>protein of interest</i>
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung (engl. <i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i> )
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
rpm	<i>rounds per min</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SPA-K	3-Sulfopropylacrylat Kaliumsalz (engl. <i>3-Sulfopropy acrylate potassium salt</i> )
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Temperatur

TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe
THQ	Tetrahydrochinolin (engl. <i>Tetrahydroquinoline</i> )
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/mL	<i>units per millilitre</i>
v/v	Volumenverhältnis

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Screening-Plattformen für die Identifizierung von bioaktiven Molekülen: a) Hochdurchsatz-Screening; b) Phagen-Display.....	2
Abbildung 2:	Darstellung eines a) DNA-kodierten Moleküls und b) zwei Zyklen der Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek nach dem <i>Split-and-Pool</i> -Ansatz mit alternierenden enzymatischen Ligations- und chemischen Syntheseschritten. ....	4
Abbildung 3:	Schematische Darstellung verschiedener Synthesen einer DNA-kodierten Molekülbibliothek. ....	5
Abbildung 4:	Schematische Darstellung verschiedener Selektions-Verfahren zur Identifizierung von <i>Hit</i> -Strukturen einer DNA-kodierten Molekülbibliothek gegen ein Protein (hier: PDB-Code: 6QFL). ....	9
Abbildung 5:	Beispiele für <i>Hit</i> -Strukturen identifiziert aus Selektionsexperimenten von DNA-kodierten Substanzbibliotheken. ....	10
Abbildung 6:	Darstellung häufig verwendeter chemischer Reaktionen zum Aufbau von DNA-kodierten Substanzbibliotheken (Hal = Halogenid). ....	12
Abbildung 7:	Ausgewählte DNA-Degradierungen verursacht durch verschiedene Reaktionsbedingungen. ....	13
Abbildung 8:	Auswahl verschiedener chemischer Reaktionen an DNA-Konjugaten gebunden an eine feste Phase (CPG) unter Verwendung verschiedener DNA-Sequenzen. ....	15
Abbildung 9:	Ausgewählte chemische Reaktionen auf DNA-Konjugaten mit einer Immobilisierung der DNA auf Anionenaustauschharzen. ....	16
Abbildung 10:	Verhalten von amphiphilen Molekülen in Wasser in Abhängigkeit von der Konzentration.....	19
Abbildung 11:	Strukturen der nicht-ionischen Tenside der 1. bis 3. Generation entwickelt von <i>Lipshutz et al.</i> <sup>[113]</sup> .....	21
Abbildung 12:	Amphiphiles Block-Copolymer mit immobilisiertem L-Prolin entwickelt von <i>O'Reilly et al.</i> <sup>[116]</sup> .....	22
Abbildung 13:	Auswahl von Säure-labilen Schutzgruppen für verschiedene funktionelle Gruppen.....	25
Abbildung 14:	Beispiele für bioaktive Tetrahydrochinolin-Derivate.....	30
Abbildung 15:	Säure-katalysierte Pictet-Spengler-Reaktion zur Bildung von a) Tetrahydroisochinolin 41 und b) Tetrahydro- $\beta$ -carbolin 43, sowie c) bioaktive Moleküle mit diesen Strukturmotiven. ....	31
Abbildung 16:	Darstellung häufig verwendeter Palladium-katalysierter Kreuzkupplungs-Reaktionen. ....	33

Abbildung 17: Darstellung des katalytischen Zyklus der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit den drei Schritten: oxidative Addition; Transmetallierung; reduktive Eliminierung. ....	34
Abbildung 18: Säure- und Palladium-vermittelte Reaktionen an DNA-Konjugaten durch die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren. ....	37
Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Affinitäts-Aufreinigung von DNA-Einzelsträngen. ....	39
Abbildung 20: Design für die Synthese einer DNA-kodierten Molekülbibliothek unter Verwendung der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung. ....	40
Abbildung 21: Schematische Darstellung für die Verwendung von amphiphilen Block-Copolymeren für DNA-Konjugate in organischen Lösungsmitteln. ....	40
Abbildung 22: Schematische Darstellung einer Copolymer-vermittelten Reaktion an DNA-Konjugaten. ....	41
Abbildung 23: Copolymerstrukturen und schematische Darstellung der Sulfonsäure-immobilisierten Copolymere. ....	43
Abbildung 24: Copolymerstruktur und schematische Darstellung des Palladium-immobilisierten Copolymers P3. ....	44
Abbildung 25: Synthese des DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrano[3,2- <i>c</i> ]chinolin-Konjugats DNA-2a. ....	46
Abbildung 26: Synthese des DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin Konjugats DNA-2b. ....	47
Abbildung 27: Produktbildung-Zeit-Diagramm der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion bei verschiedenen Reaktionstemperaturen und mit Verwendung von Olefin 21d (durchgezogene Linie) gegenüber Olefin 21c (gestrichelte Linie) <sup>[164]</sup> . ....	49
Abbildung 28: Boc-Entschützung von DNA-Konjugat DNA-4 mit dem Blockcopolymer P1-BA-b in Wasser mit und ohne MgCl <sub>2</sub> . ....	58
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS-Spektrum (rechts) a) des Startmaterials DNA-10a und b) der Reaktionsmischung Tabelle 9 Eintrag 11 der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung. ....	74
Abbildung 30: Design der Affinitäts-Aufreinigung. ....	79
Abbildung 31: Vergleich der unterschiedlichen Trennmethode der Trägermaterialien. ....	80
Abbildung 32: Herstellung der Matrix-DNA-12a und der Kontroll-Matrix-DNA-12b über die CuAAC-Reaktion. ....	81



Abbildung 33:	Bilder der Matrix-DNA-12a in Filtersäulen (a) nach dem Hybridisieren von DNA-13b (b, c), dem Waschen mit verschiedenen Lösungsmitteln (d) und der Elution von DNA-13b mit wässriger NaOH-Lösung (e).....	82
Abbildung 34:	Prüfung verschiedener Elutionsbedingungen nach der Hybridisierung von DNA-13b an Matrix-DNA-12a.....	83
Abbildung 35:	Quantitative und qualitative Bestimmung der wiedergewonnenen Menge an DNA-13b mit Hilfe der analytischen HPLC und eines internen Standards (DNA-14a). ....	84
Abbildung 36:	Quantitative und qualitative Bestimmung der wiedergewonnenen Menge an DNA-13b mit Hilfe der analytischen HPLC und eines internen Standards (DNA-14a) und der MALDI-MS nach zweifacher Elution mit $\text{NH}_3(\text{aq.})$ . ....	85
Abbildung 37:	Wiedergewonnene Menge an DNA-13b nach der Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung nach einer Hybridisierung bei 25 – 95 °C bestimmt in Triplikaten mit Fehlerindikatoren. ....	88
Abbildung 38:	Wiedergewonnene Menge an DNA-13b nach der Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung nach einer Hybridisierung bei 35 °C mit unterschiedlichen Mengen an Matrix-DNA-12a und eingesetzter DNA-13b.....	89
Abbildung 39:	Wiedergewonnene Menge an DNA nach der Elution mit wässriger Ammoniak-Lösung nach einer Hybridisierung bei 35 °C mit unterschiedlichen DNA-Längen.....	90
Abbildung 40:	Vergleich der Aufreinigung einer Amidsynthese durch die ethanolische Fällung und die Affinitäts-Aufreinigung. ....	92
Abbildung 41:	Affinitäts-Aufreinigung einer Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion. ....	94
Abbildung 42:	Design der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL) bestehend aus 3 Zyklen.....	96
Abbildung 43:	Synthese des Primer-PEG(5)-Konjugats DNA-19. ....	100
Abbildung 44:	Visualisierung der MiDEL vor und nach der Affinitäts-Aufreinigung mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). ....	112
Abbildung 45:	Kodierschema der enzymatischen Ligationen der Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek.....	113
Abbildung 46:	Visualisierung der Kodierung der einzelnen Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel).....	114
Abbildung 47:	Selektionsexperiment einer DNA-kodierten Molekülbibliothek mit einem immobilisierten Protein ( <i>protein of interest</i> , POI, hier: PDB-Code: 6QFL) mit anschließender PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) und DNA-Sequenzierung zur Identifizierung möglicher bioaktiver Moleküle ( <i>Hits</i> ).....	115

Abbildung 48:	Schema der Polymerase-Kettenreaktionen PCR 1 - 3 für die Vervielfältigung und Verlängerung der DNA-Sequenzen der bindenden Moleküle aus dem Selektionsexperiment für das <i>next generation sequencing</i> .....	118
Abbildung 49:	Visualisierung der drei PCR-Vervielfältigungen der Selektionsexperimente (siehe Tabelle 15) mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). .....	119
Abbildung 50:	Copolymerstruktur und schematische Darstellung der nicht-funktionalisierten Copolymere. ....	123
Abbildung 51:	Bilder der Copolymer-DNA-Mischungen in verschiedenen Lösungsmitteln. .....	124
Abbildung 52:	Bilder der ersten Extraktion von Copolymer-DNA-Mischungen in Toluol mit $dH_2O$ und wässrigen NaCl-Lösungen.....	125
Abbildung 53:	UV-Vis-Spektren des Copolymers P4-a (schwarz), der Copolymer-DNA-Mischungen (grau) und der Subtraktionskurve (gelb) in verschiedenen Lösungsmitteln.....	128
Abbildung 54:	Schema der Stabilitätsuntersuchungen der Copolymer-vermittelten Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln gegenüber diversen Reagenzien. ....	129
Abbildung 55:	Etablierung der Copolymer-vermittelten a) Povarov-Reaktion; b) Boc-Entschützung; c) Pictet-Spengler-Reaktion und d) Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung an DNA-Konjugaten.....	135
Abbildung 56:	Affinitäts-Aufreinigung für den DEL-Syntheseprozess mit den optimierten Bedingungen.....	139
Abbildung 57:	Synthese der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek (MiDEL). ....	140
Abbildung 58:	Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Oligonukleotiden in organischen Lösungsmitteln. Löslichkeitsversuche, Analyse der Copolymer-DNA-Interaktion und Untersuchung der DNA-Degradierung gegenüber diversen Metallsalzen und organischen Reagenzien.....	141
Abbildung 59:	Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion. ....	213
Abbildung 60:	Kinetik der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat DNA-1a, 4- <i>tert</i> -Butylanilin 20b und <i>N</i> -Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol 21d bei 25 °C, siehe Tabelle 20. ....	214
Abbildung 61:	Kinetik der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat DNA-1a, 4- <i>tert</i> -Butylanilin 20b und <i>N</i> -Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol 21d bei 40 °C, siehe Tabelle 20. ....	215

Abbildung 62:	Kinetik der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat DNA-1a, 4- <i>tert</i> -Butylanilin 20b und <i>N</i> -Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol 21d bei 50 °C, siehe Tabelle 20.....	216
Abbildung 63:	Kinetik der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat DNA-1a, 4- <i>tert</i> -Butylanilin 20b und <i>N</i> -Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol 21d bei 60 °C, siehe Tabelle 20.....	217
Abbildung 64:	Untersuchung verschiedener Olefine 21d - f auf die Synthese von DNA-2b - 2d (siehe Tabelle 1).....	218
Abbildung 65:	Untersuchung verschiedener Amine auf die Synthese von DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin DNA-2b, -2e - af (siehe Tabelle 21).....	222
Abbildung 66:	Untersuchung verschiedener DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-1b - f auf die Synthese von DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin DNA-2ag - ak (siehe Tabelle 22).....	223
Abbildung 67:	Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung.....	224
Abbildung 68:	Copolymer P1-BA-b-vermittelte Boc-Entschützung von DNA-4 zur Bildung von DNA-5 ohne Additiv.....	224
Abbildung 69:	Copolymer P1-BA-b-vermittelte Boc-Entschützung von DNA-4 zur Bildung von DNA-5 mit dem Additiv 4- <i>tert</i> -Butylanilin 20b oder MgCl <sub>2</sub> .....	225
Abbildung 70:	Einfluss der Copolymer-Struktur und der Äquivalente des Copolymers auf die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung von DNA-4 zur Bildung von DNA-5 mit dem Additiv MgCl <sub>2</sub> .....	228
Abbildung 71:	Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion. .	229
Abbildung 72:	Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Copolymer P1-BA-a und Temperaturen auf die Pictet-Spengler-Reaktion mit dem DNA-1g-Konjugat und Tryptamin 42b.....	230
Abbildung 73:	Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Copolymer P2-BA und Temperaturen auf die Pictet-Spengler-Reaktion mit dem DNA-1g-Konjugat und Tryptamin 42b.....	231
Abbildung 74:	Variation des Co-Lösungsmittels, der Reaktionstemperatur und der Äquivalente des Tryptophanmethylesters 42c in der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion mit dem DNA-1g-Konjugat.....	233
Abbildung 75:	Untersuchung verschiedener Amine in der Pictet-Spengler-Reaktion mit DNA-1g (siehe Tabelle 26).....	235
Abbildung 76:	Variation der Reaktionstemperatur in der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion mit dem DNA-1a-Konjugat.....	236
Abbildung 77:	Untersuchung verschiedener Aldehyde in der Pictet-Spengler-Reaktion mit DNA-8a (siehe Tabelle 27).....	237

---

Abbildung 78: Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung.....	238
Abbildung 79: Effekt von verschiedenen Äquivalenten und Konzentrationen von Copolymer P3, sowie der Base auf die Suzuki-Miyaura-Reaktion mit dem DNA-10a-Konjugat, 4-(Trifluoromethyl)phenylboronsäure 59b und Phenylboronsäure 59c.....	242
Abbildung 80: Untersuchung verschiedener Boronsäuren 59a - m auf die Synthese von DNA-Bipyridin-Konjugaten DNA-11a - m (siehe Tabelle 29). ....	244
Abbildung 81: Startmaterialien für die Affinitäts-Aufreinigung. ....	245
Abbildung 82: Prüfung einer selektiven und unselektiven Bindung der DNA-12b an die Agarose-Matrix mit und ohne Cu/Ligand/Na-Ascorbat-Gemisch. ....	246
Abbildung 83: Prüfung verschiedener Waschbedingungen nach der CuAAC-Reaktion von Matrix-DNA-12b. ....	246
Abbildung 84: Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs DNA-13a und DNA-13b an der Matrix-DNA-12a. ....	247
Abbildung 85: Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs DNA-13b and die Matrix-DNA-12a in verschiedenen Puffern. ....	248
Abbildung 86: Prüfung verschiedener Elutionsbedingungen nach der Hyridisierung von DNA-13b an Matrix-DNA-12a. ....	250
Abbildung 87: CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b. ....	250
Abbildung 88: Prüfung verschieden konzentrierter wässriger NaOH-Lösungen für die Elution von DNA-13b. ....	251
Abbildung 89: Prüfung einer wässrigen Ammoniak-Lösung für die Elution von DNA-13b. ....	252
Abbildung 90: CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b und einmalige Wiederholung der CuAAC-Reaktion. ....	253
Abbildung 91: Variation der Hybridisierungstemperatur. ....	254
Abbildung 92: KNIME®-Arbeitsablauf für die Auswahl geeigneter Molekülbausteine.....	255
Abbildung 93: Einstellungen des Programms <i>SequenceGenerator</i> zur Generierung von DNA-Barcodes für die Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek. ....	255
Abbildung 94: Analyse der DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-20a - y des ersten Syntheszyklus der MiDEL-Synthese.....	271
Abbildung 95: Visualisierung der ersten Ligation der DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-20a - y mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel).....	272

---

Abbildung 96: Startmaterialien DNA-1a, e, f, h - s für die Validierung der DNA-Aldehyd-Konjugate und der Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion. ....	276
Abbildung 97: Validierung der Molekülbausteine DNA-1a, e, f, h - s in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion (siehe Tabelle 35).....	280
Abbildung 98: Validierung der Aniline 20ae - as in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion (siehe Tabelle 36). ....	282
Abbildung 99: Visualisierung der zweiten Ligation nach der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung der DNA-23a - ab mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). ....	286
Abbildung 100: Visualisierung der dritten Ligation mit den DNA-Konjugaten DNA-24a - dc mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). ....	293
Abbildung 101: Mikrotiterplatte mit den Produkten der Amidsynthese des dritten Syntheseschrittes der MiDEL-Synthese nach der dreifachen ethanolischen Fällung.....	294
Abbildung 102: Visualisierung der PCR-Vervielfältigung der Selektionsexperimente (siehe Tabelle 15) mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel).....	296
Abbildung 103: Visualisierung der Verlängerung der amplifizierten Proben der Selektionsexperimente (siehe Tabelle 15) mit Adapter-Sequenzen mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). ....	296
Abbildung 104: Visualisierung der Verlängerung der Selektionsexperimente (siehe Tabelle 15) mit Selektionsexperiment-spezifischen DNA-Barcodes mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). ....	297

## 9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion an DNA-1a durch Einsatz verschiedener Olefine 21d - f. <sup>a</sup> .....	50
Tabelle 2: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion an DNA-1a durch Einsatz verschiedener aromatischer Amine 20b - ad zur Bildung von DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin-Konjugaten DNA-2b, -2e - af. <sup>a</sup> .....	52
Tabelle 3: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion durch Einsatz verschiedener DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-1b - f. <sup>a</sup> .....	56
Tabelle 4: Untersuchung des Einflusses des Additives auf die Produktbildung und Degradierung der Copolymer P1-BA-b-vermittelten Boc-Entschützung der DNA-4. ....	61
Tabelle 5: Untersuchung des Einflusses der Copolymer-Struktur auf die Produktbildung und Depurinierung der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung der DNA-4. ....	62
Tabelle 6: Optimierung der Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an DNA-1g mit zwei verschiedenen Aminen 42b und 42c zum DNA- $\beta$ -Carbolin-Konjugat DNA-6a, b. <sup>a</sup> .....	66
Tabelle 7: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an DNA-1g durch Einsatz verschiedener Amine 42b - d und 40a - e. <sup>a</sup> .....	68
Tabelle 8: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an DNA-8a durch Einsatz verschiedener Aldehyde 6a, 6d - h. <sup>a</sup> .....	71
Tabelle 9: Optimierung der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion an einem DNA-Arylbromid DNA-10a mit zwei verschiedenen Boronsäuren 59b, c zum DNA-Biphenyl-Konjugat DNA-11a, b. <sup>a</sup> .....	73
Tabelle 10: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion an DNA-10a durch Einsatz verschiedener Boronsäuren 59a - m. <sup>a</sup> .....	75
Tabelle 11: Variation der verwendeten Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a für die CuAAC-Reaktion. ....	87
Tabelle 12: Amidsynthese der 25 Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren 64a und 64d - aa an die DNA-19. <sup>a</sup> .....	101
Tabelle 13: Validierung einiger DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-1a, e, f, h - s in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion. <sup>a</sup> .....	106

Tabelle 14: Validierung einiger Aniline 20ae - as in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion. <sup>a</sup> .....	108
Tabelle 15: Eingesetzten Proteine und verwendete Bedingungen für die Selektionsexperimente zur Identifizierung von <i>Hit</i> -Strukturen der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek, sowie die berechneten Stoffmengen der aufgereinigten PCR-3-Produkte .....	117
Tabelle 16: DLS-Messungen des Copolymers P4-a und der Copolymer-DNA-Mischungen in verschiedenen Lösungsmitteln.....	126
Tabelle 17: DNA-Stabilität von DNA-27 und DNA-28 nach Inkubation von diversen Metallsalzen in wässrigen Lösungsmittelgemischen und organischen Lösungsmitteln mit und ohne Copolymer P4-a. <sup>a[224]</sup> .....	131
Tabelle 18: DNA-Stabilität von DNA-27 und DNA-28 nach Inkubation von diversen organischen Reagenzien in organischen Lösungsmitteln unter Verwendung des Copolymers P4-a oder der festen Phase (CPG). <sup>a[224]</sup> .....	133
Tabelle 19: Synthese verschiedener DNA-Startmaterialien über die Amidsynthese auf fester Phase (CPG). .....	150
Tabelle 20: Variation der Reaktionszeit und Temperatur für die Synthese des DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin Konjugats DNA-2b.....	152
Tabelle 21: Verwendete Amine für die Etablierung der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese von Tetrahydrochinolin-Konjugaten.....	153
Tabelle 22: Verwendete DNA-Aldehyd-Konjugate für die Etablierung der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion.....	155
Tabelle 23: Variation der Additive und der Copolymer P1-BA-b-Konzentration auf die Boc-Entschützung des DNA-Konjugats DNA-4. ....	156
Tabelle 24: Untersuchung des Einflusses der Copolymer-Struktur auf die Produktbildung und Depurinierung der Copolymer-vermittelten Boc-Entschützung der DNA-4. ....	157
Tabelle 25: Effekt der Copolymer-Struktur, der Copolymer-Äquivalenten und der Reaktionstemperatur auf die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion von DNA-1g und Tryptamin 42b. ....	159
Tabelle 26: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an DNA-1g durch Einsatz verschiedener Amine 42b - d und 40a - e. <sup>a</sup> .....	159
Tabelle 27: Untersuchung des Substratspektrums der Copolymer P1-BA-a-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion an DNA-8a durch Einsatz verschiedener Aldehyde 6a, 6d - h. <sup>a</sup> .....	160
Tabelle 28: Optimierung der Äquivalente und Konzentration des Copolymer P3 und Variation der Base für die Suzuki-Miyaura-Reaktion des DNA-10a-Konjugats.....	162

Tabelle 29: Verwendete Boronsäuren 59a - m für die Etablierung der Copolymer P3-vermittelten Suzuki-Miyaura-Reaktion zur Synthese von DNA-Biphenyl-Konjugaten. ....	163
Tabelle 30: Die verwendeten DNA-Sequenzen für die Affinitäts-Aufreinigung. ....	164
Tabelle 31: Die verwendeten Puffer für die Affinitäts-Aufreinigung mit ihren Zusammensetzungen. ....	164
Tabelle 32: CuAAC-Reaktionsbedingungen mit Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b. ....	168
Tabelle 33: CuAAC-Reaktionsbedingungen mit Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b und Wiederholung der CuAAC-Reaktion. ....	170
Tabelle 34: Reaktionsschema und verwendete DNA-Sequenzen der enzymatischen Ligation des Primers' und der DNA-Barcodes //I' an die DNA-Aldehyd-Konjugate. ....	174
Tabelle 35: DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-1a, e, f, h - s für die Validierung in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion. ....	175
Tabelle 36: Aniline 20ae - as für die Validierung in der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion. ....	176
Tabelle 37: Reaktionsschema und verwendete DNA-Sequenzen der enzymatischen Ligation der DNA-Barcodes II/II' an die DNA-Povarov-Produkte. ....	178
Tabelle 38: Reaktionsschema und verwendete DNA-Sequenzen der enzymatischen Ligation der DNA-Barcodes III/III' an den kodierten DNA-Pool pool-DNA-23a - ao. ....	179
Tabelle 39: In den Selektionsassays eingesetzten Proteine, die verwendeten Puffer und ihre Zusammensetzungen. ....	180
Tabelle 40: Für die Polymerase-Kettenreaktion verwendete DNA-Oligonukleotide zur Kodierung der Selektionsexperimente. ....	181
Tabelle 41: Die verwendeten DNA-Sequenzen für die Copolymer-vermittelte Verwendung von DNA-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln. ....	183
Tabelle 42: Mittelwerte der UV-Vis-Absorption der Elution von DNA-13b mit verschieden konzentrierter wässriger NaOH-Lösung. ....	252
Tabelle 43: Mittelwerte der UV-Vis-Absorption der Elution von DNA-13b mit einfacher und zweifacher wässriger Ammoniak-Lösung. ....	252
Tabelle 44: Mittelwerte der UV-Vis-Absorption der Elution von DNA-13b mit zweifacher wässriger Ammoniak-Lösung mit Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b und einmalige Wiederholung der CuAAC-Reaktion (siehe Tabelle 33). ....	253



---

Tabelle 45: Amidsynthese der 25 verschiedenen Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren 64a und 64d - aa an die DNA-19 und der dazugehörige DNA-Barcode mit dem Mittelwert der gemessenen Absorption der aufgereinigten DNA-Konjugate. ....	256
Tabelle 46: Verwendete Amine 20c, g, i, w, x, ae - bn in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion für den zweiten Syntheseschritt der MiDEL-Synthese mit den dazugehörigen DNA-Barcodes und der Mittelwert der UV-Vis-Absorption nach der Boc-Entschützung.....	283
Tabelle 47: Verwendete Carbonsäuren 23a - dc in der Amidsynthese für den dritten Syntheseschritt der MiDEL-Synthese mit den dazugehörigen DNA-Barcodes.	287
Tabelle 48: Selektionsexperimente mit den zugeordneten DNA-Barcodes und der Mittelwert der UV-Vis-Absorption der aufgereinigten PCR-3-Produkte.....	295

## 9.5 Schemataverzeichnis

Schema 1: Synthese eines 3-Amino alkylierten Indols 8 über die Mannich-3-Komponenten-Reaktion. <sup>[111]</sup> .....	20
Schema 2: Synthese von 1,4-Dihydropyridinen 13 und ihre Aromatisierung zu Pyridinen 14 mit Hilfe des Tensids Triton X-100. <sup>[112]</sup> .....	20
Schema 3: Palladium-katalysierte Negishi-Kreuzkupplung in Wasser mit Hilfe des Tensids TPGS-750-M. ....	21
Schema 4: Gold(I)-katalysierten Cycloisomerisierung eines Allens zum Dihydrofuran mit Hilfe des amphiphilen Gold(I)-NHC-Komplex Block-Copolymers. ....	23
Schema 5: Säure-katalysierte Povarov-Reaktion eines aromatischen Amins 20, eines Olefins 21 und eines Aldehyds 6 zur Bildung eines 1,2,3,4-Tetrahydrochinolins 22. ....	26
Schema 6: Gegenüberstellung der linearen Synthese und der Multikomponenten-Reaktion. ....	26
Schema 7: Darstellung der Isocyanid-basierten a) Passerini-3-Komponenten-Reaktion und b) Ugi-4-Komponenten-Reaktion. ....	27
Schema 8: Postulierter schrittweiser Mechanismus der Lewis-Säure (LA)-katalysierten Povarov-Reaktion mit dem gezielten Abfangen der Zwischenprodukte 28 mit Ethanol. ....	27
Schema 9: Darstellung der möglichen Diastereomere der Lewis-Säure (LA)-katalysierten Povarov-Reaktion mit azyklischen Vinylethern. ....	28
Schema 10: ( <i>R</i> )-BINOL-katalysierte Povarov-Reaktion für die enantioselektive Synthese eines Tetrahydrochinolins. ....	28
Schema 11: Synthese von spiro-heterozyklische Strukturen 32 durch die Verwendung von zyklischen Ketonen 25 in der Säure-katalysierten Povarov-Reaktion. ....	29
Schema 12: Intramolekulare Povarov-Reaktion für die Synthese des Vorläufers 33 des Arzneistoffes Irinotecan 34. ....	29
Schema 13: Mechanismus der Säure-katalysierten Pictet-Spengler-Reaktion zur Bildung eines Tetrahydro- $\beta$ -carbolins 43. ....	32
Schema 14: Enantioselektive Pictet-Spengler-Reaktion unter Verwendung eines Thioharnstoff-Katalysators. ....	32
Schema 15: Stereoselektive Synthese von arylierten Alkenen 54 über die Palladium-katalysierte Suzuki-Miyaura-.....	34
Schema 16: Synthese eines a) Bradykinin-1-Antagonisten 58 und b) des Fungizids Boscalid 63 über die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung. ....	35

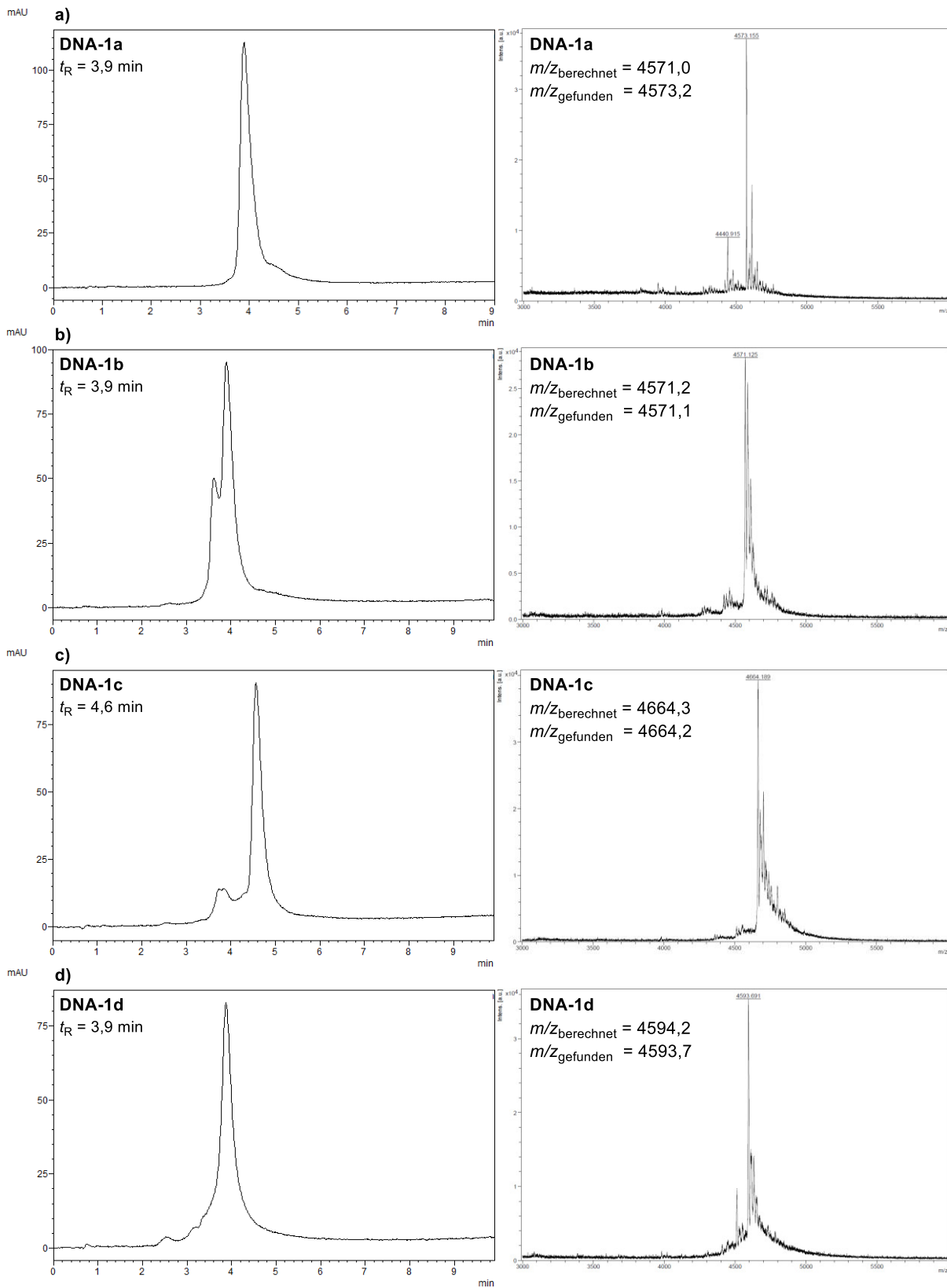
---

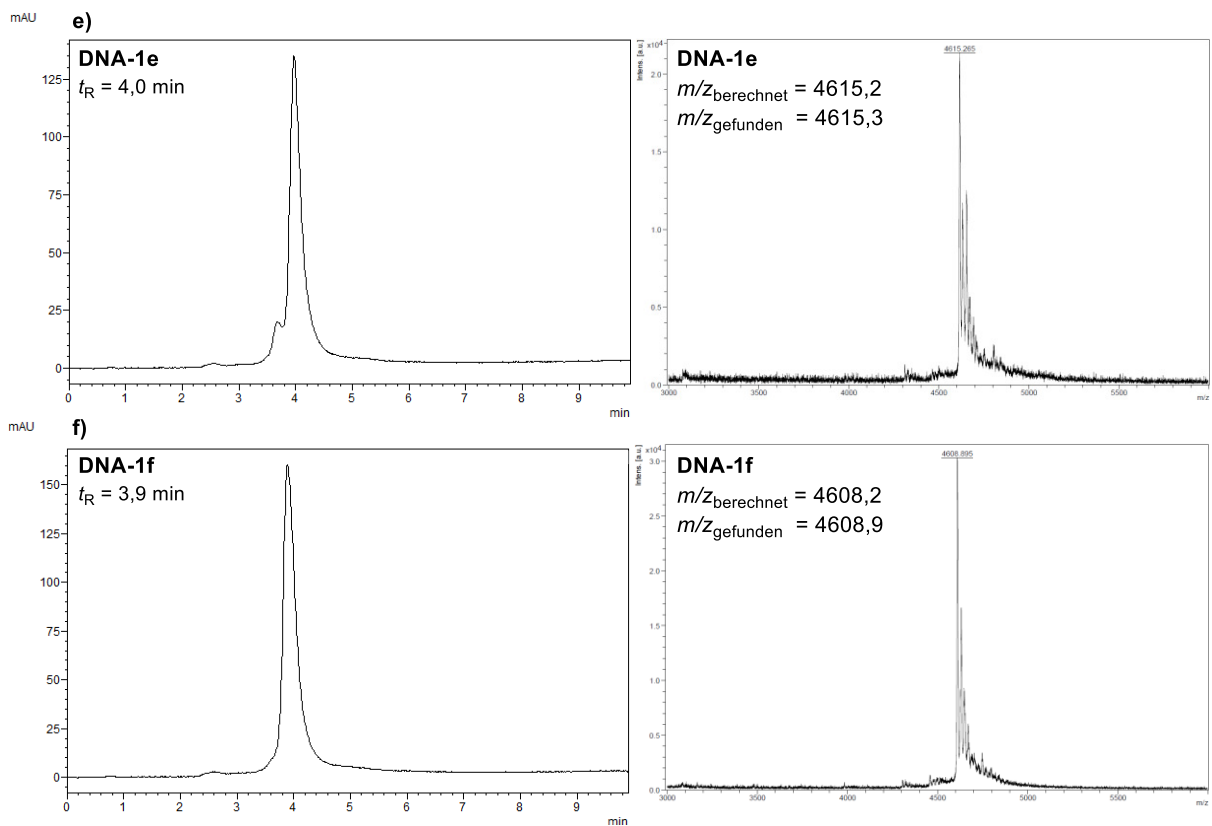
Schema 17: Optimierung der Reaktions-Zeit und -Temperatur der Copolymer P2-EA-a- vermittelten Povarov-Reaktion zur Synthese des DNA-Tetrahydro-1 <i>H</i> - pyrrolo[3,2- <i>c</i> ]chinolin Konjugats DNA-2b. ....	49
Schema 18: Reaktionsschema der Pictet-Spengler-Reaktion mit dem DNA-Aldehyd-Konjugat DNA-1a und Tryptophanmethylester 42c.....	70
Schema 19: Reaktionsschema der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion und Boc- Entschützung für den zweiten Synthesezyklus der Molekülbibliothek mit dem DNA-Aldehyd- <i>pool</i> DNA-20a-y und den Aminen 20c, g, i, w, x, ae - bn als Molekülbausteine. ....	110
Schema 20: Reaktionsschema der Amidsynthese für den dritten Synthesezyklus der Molekülbibliothek mit dem <i>pool</i> -DNA-23a - ao und den Carbonsäuren 23a - dc als Molekülbausteine.....	111
Schema 21: Reaktionsschema der Amidsynthese eines Polyethylenglykol-Linkers an eine DNA-Sequenz. ....	149
Schema 22: CuAAC-Reaktion der DNA-12a (oben) und DNA-12b (unten) an die Agarose- Matrix. ....	165
Schema 23: CuAAC-Reaktion der DNA-12a (oben) und DNA-12b (unten) an magnetische Kügelchen. ....	165
Schema 24: Reaktionsschema der Amidsynthese des DNA-PEG(5)-Konjugats DNA-19. .	173

# Anhang

## Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion

### Startmaterialien

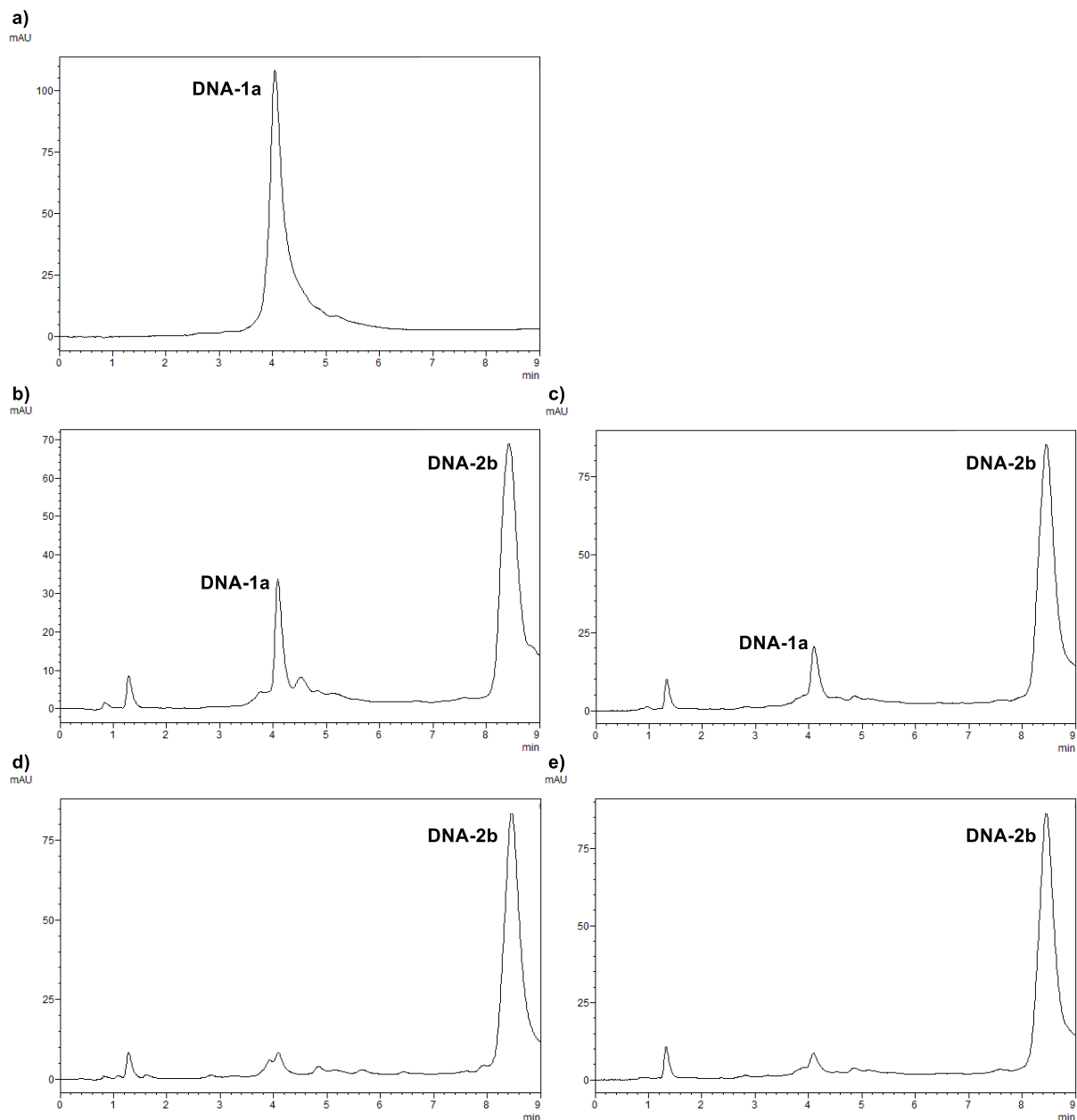




**Abbildung 59:** Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Povarov-Reaktion. Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des a) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1a**; b) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1b**; c) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1c**; d) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1d**; e) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1e**; f) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1f**.

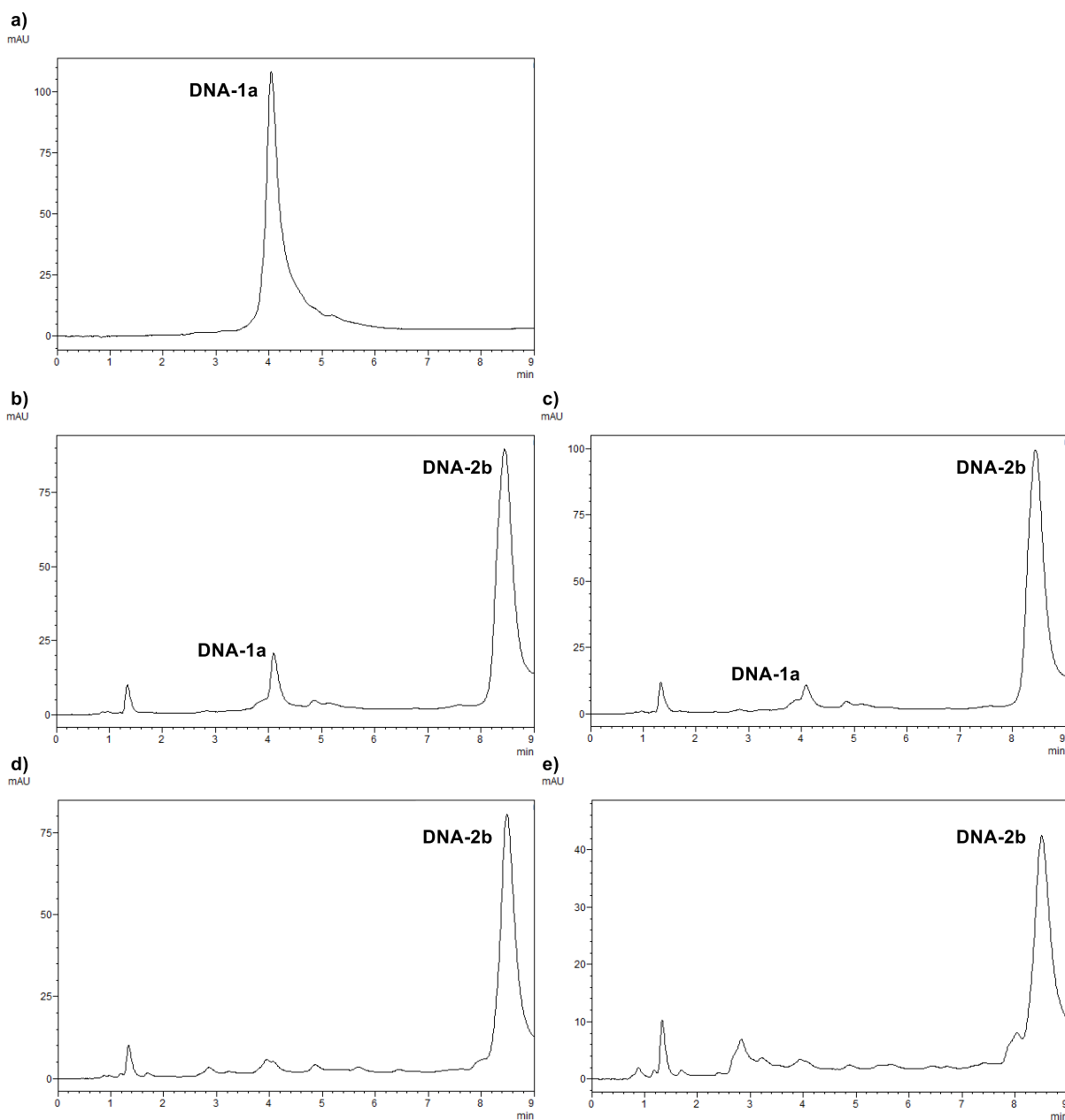
## Optimierung der Reaktionsbedingungen der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion

### Optimierung der Reaktionszeit und Temperatur der Copolymer P2-EA-a-vermittelten Povarov-Reaktion



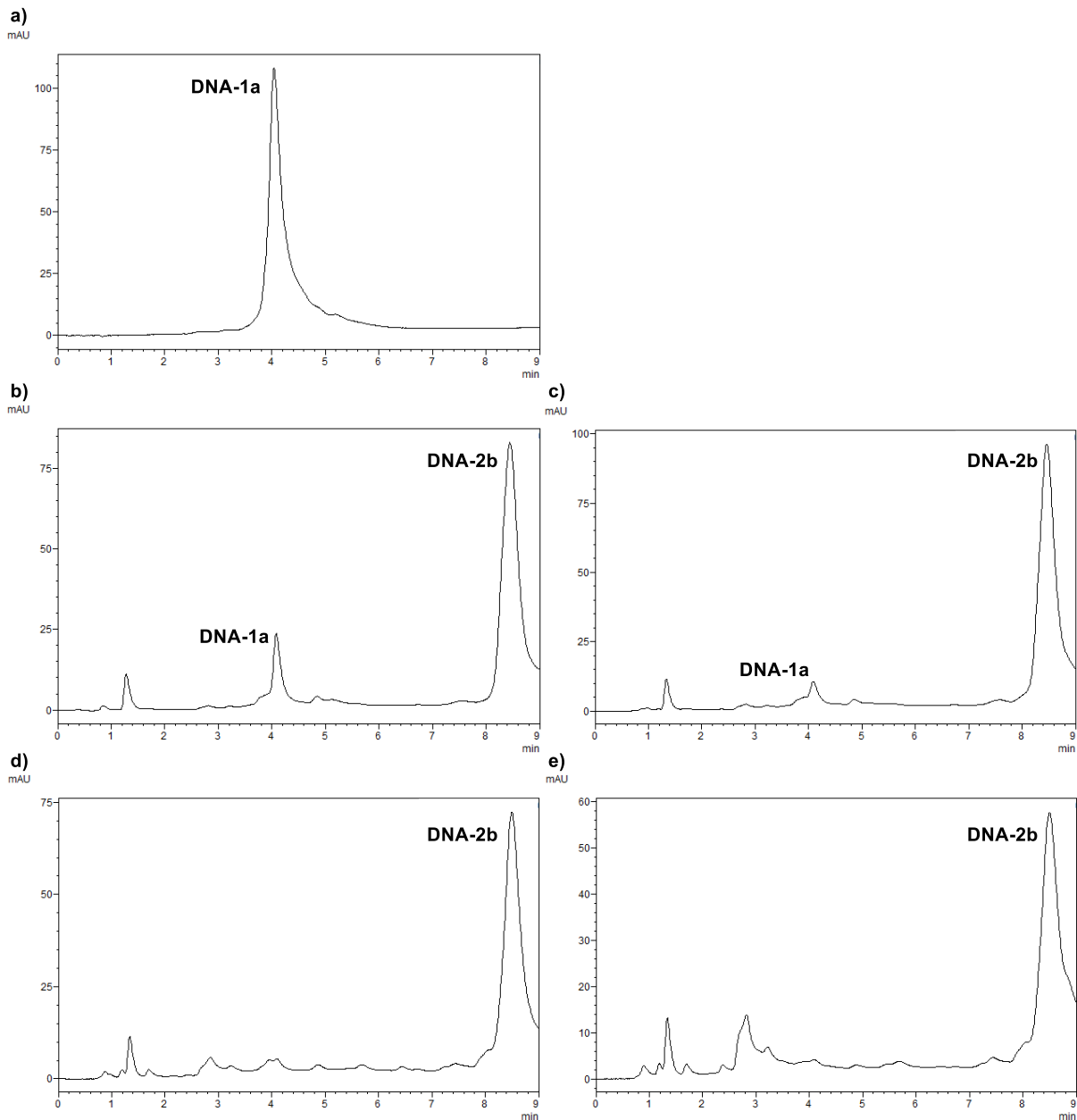
**Abbildung 60:** Kinetik der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat **DNA-1a**, 4-*tert*-Butylanilin **20b** und *N*-Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol **21d** bei 25 °C, siehe **Tabelle 20**.

a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1a**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 1; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 2; d) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 3; e) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 4.



**Abbildung 61:** Kinetik der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat **DNA-1a**, 4-*tert*-Butylanilin **20b** und *N*-Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol **21d** bei 40 °C, siehe **Tabelle 20**.

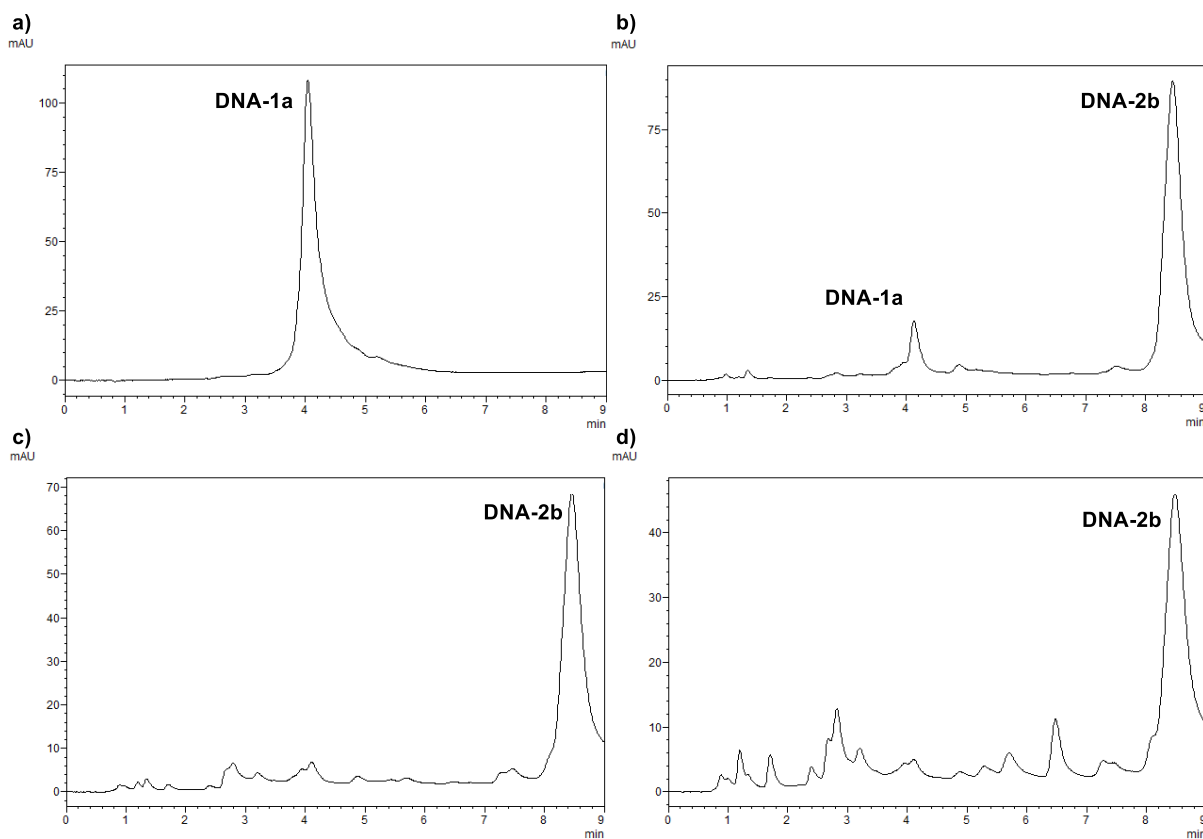
a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-1a**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 5; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 6; d) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 7; e) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 8.



**Abbildung 62:** Kinetik der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat **DNA-1a**, 4-*tert*-Butylanilin **20b** und *N*-Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol **21d** bei 50 °C, siehe **Tabelle 20**.

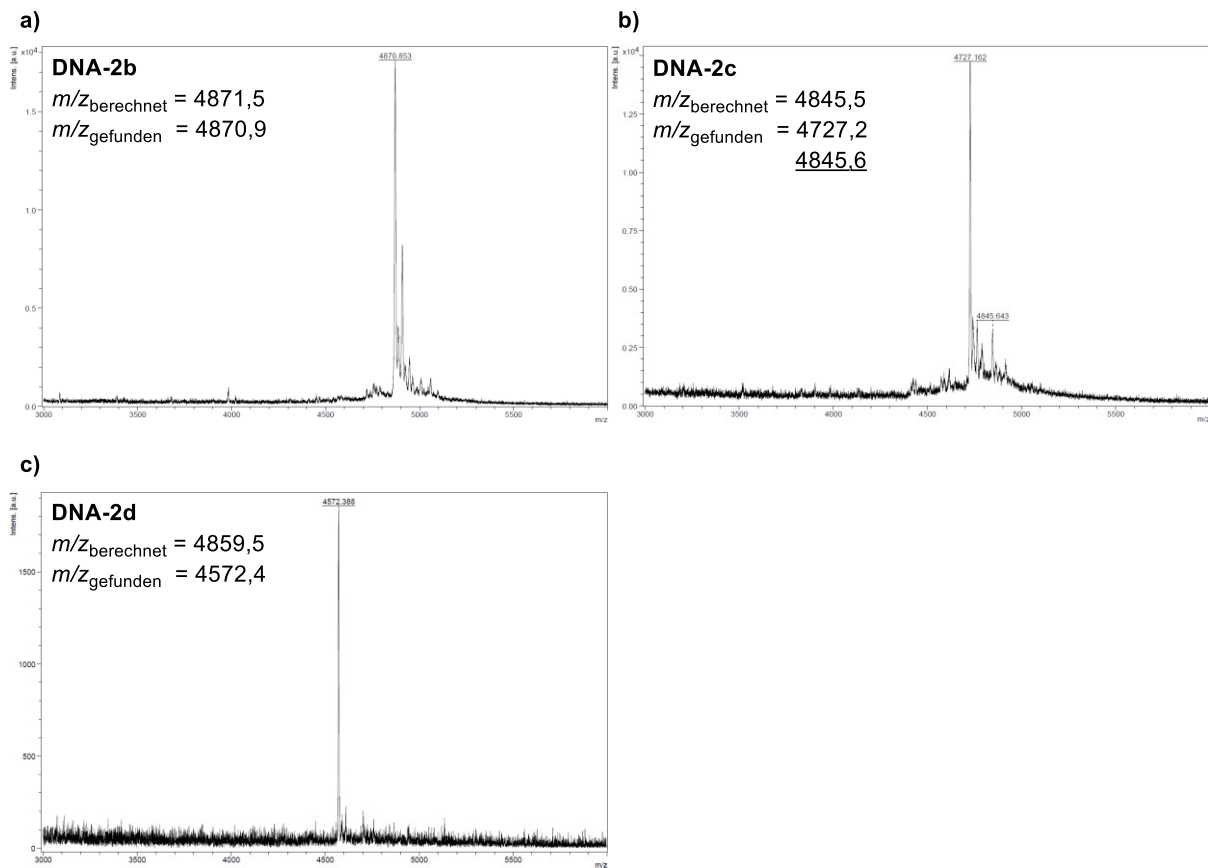
a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-1a**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 9; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 10; d) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 11; e) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 12.





**Abbildung 63:** Kinetik der Copolymer **P2-EA-a**-vermittelten Povarov-Reaktion mit dem DNA-Konjugat **DNA-1a**, 4-*tert*-Butylanilin **20b** und *N*-Boc-2,3-dihydro-1H-pyrrol **21d** bei 60 °C, siehe **Tabelle 20**.

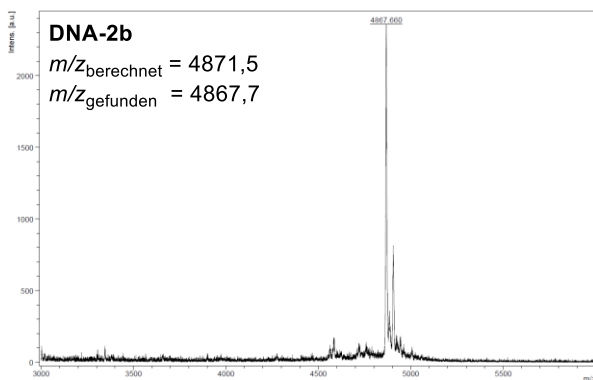
a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-1a**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 13; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 14; d) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 15.

**Variation der Olefin-Komponente**

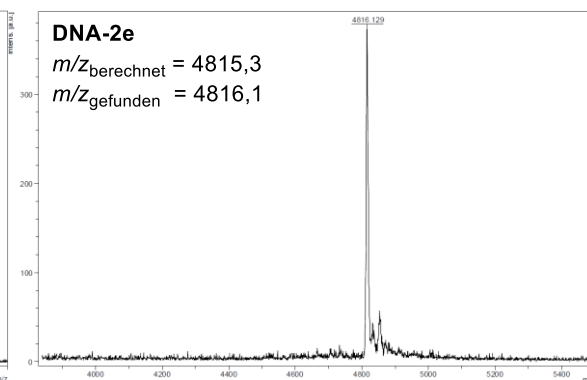
**Abbildung 64:** Untersuchung verschiedener Olefine **21d - f** auf die Synthese von **DNA-2b - 2d** (siehe **Tabelle 1**). a) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2b**; b) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2c**; c) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2d**.

**Variation der Amin-Komponente**

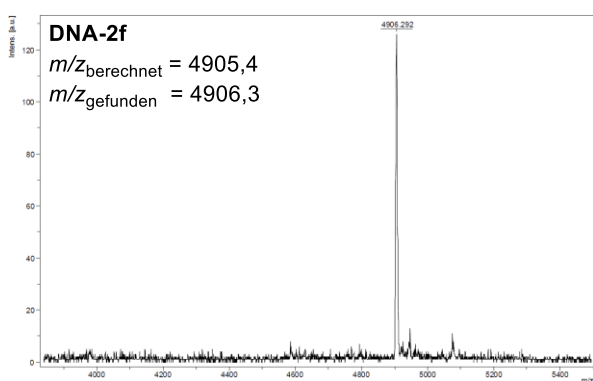
a)



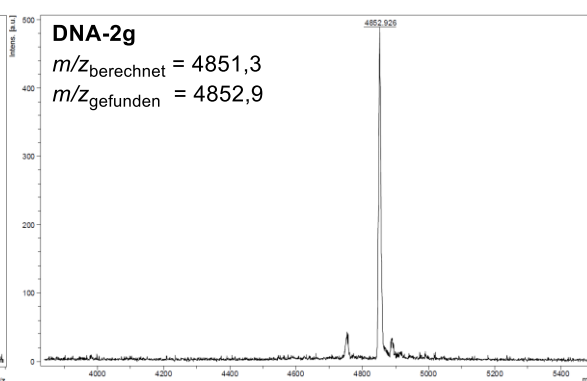
b)



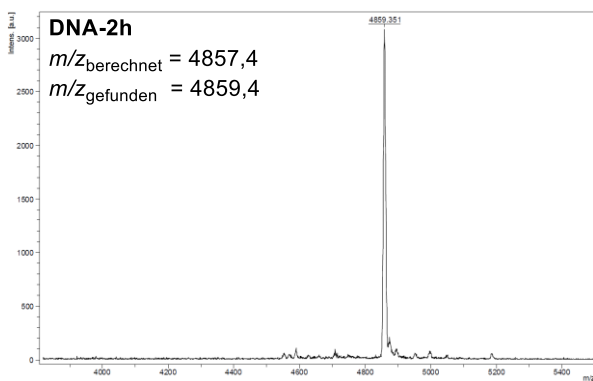
c)



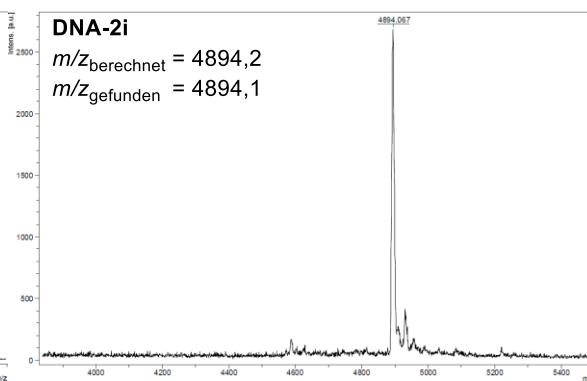
d)



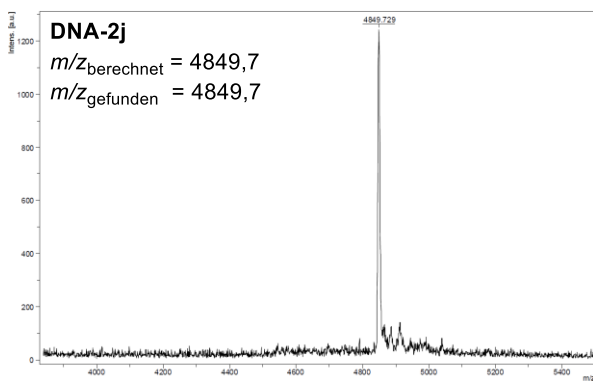
e)



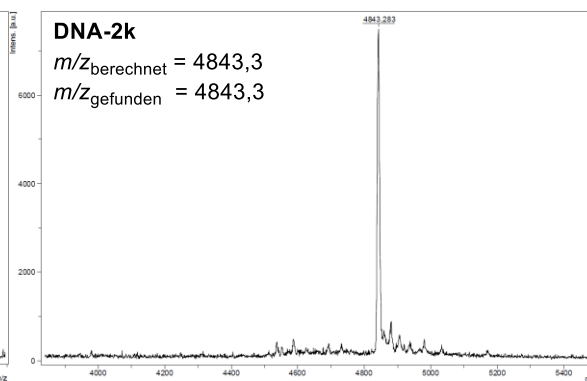
f)

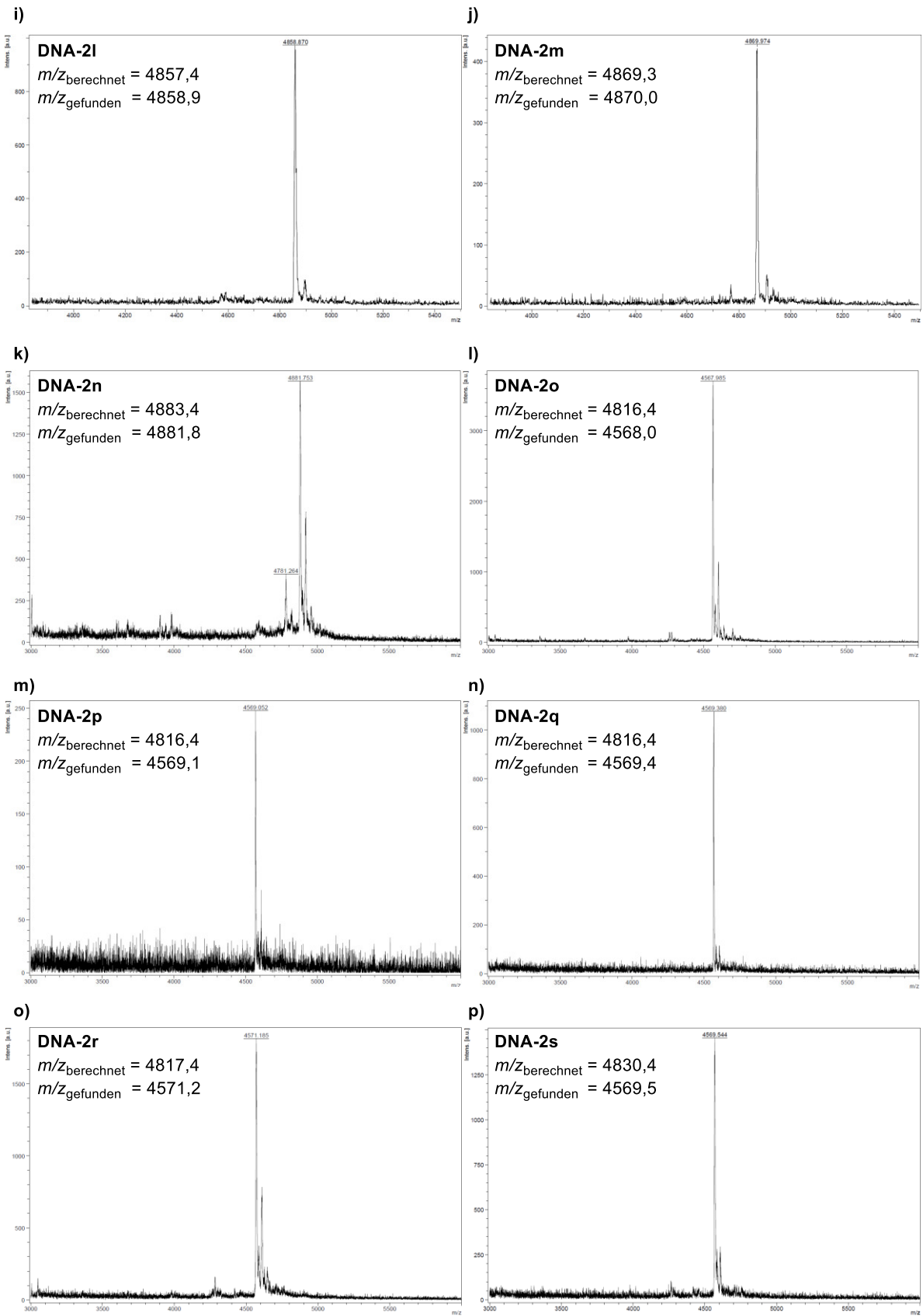


g)

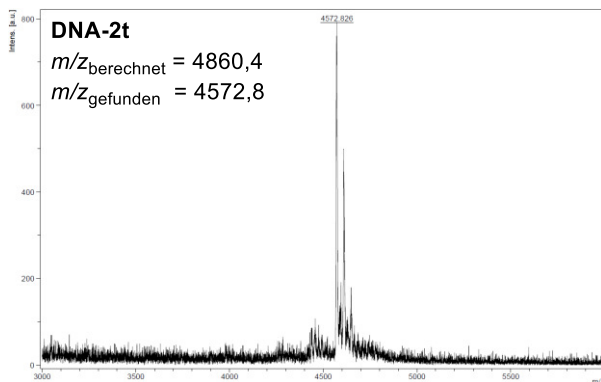


h)

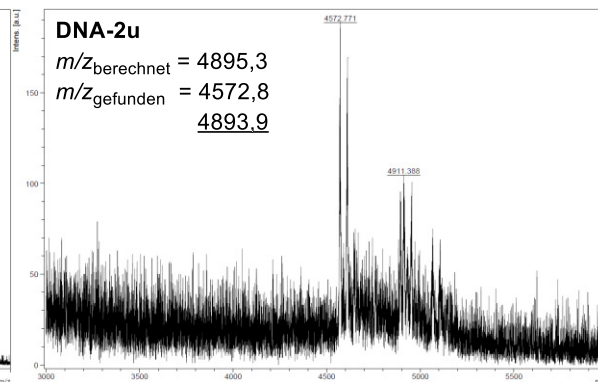




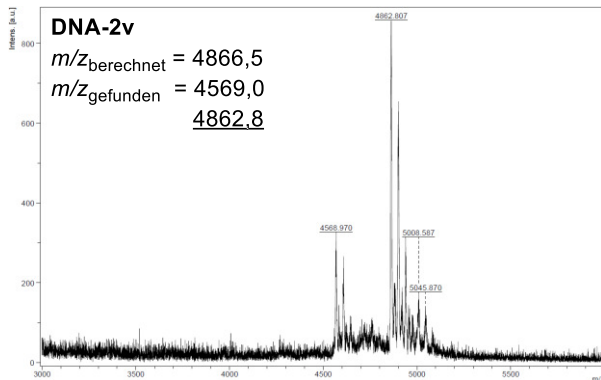
q)



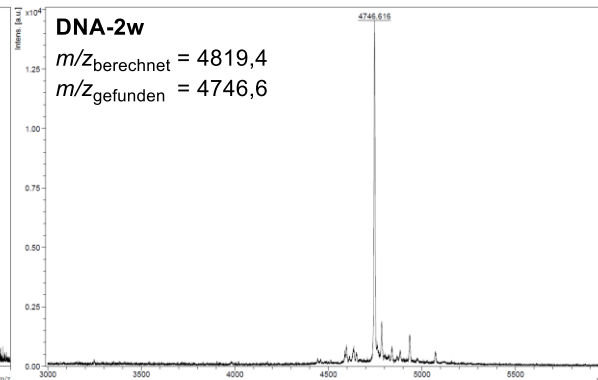
r)



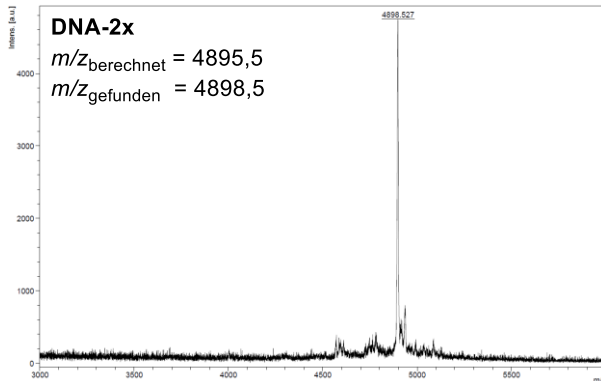
s)



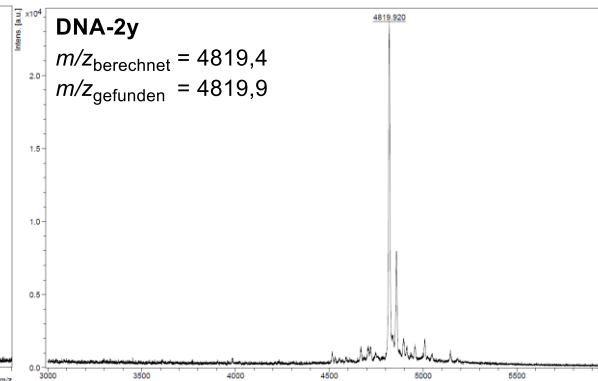
t)



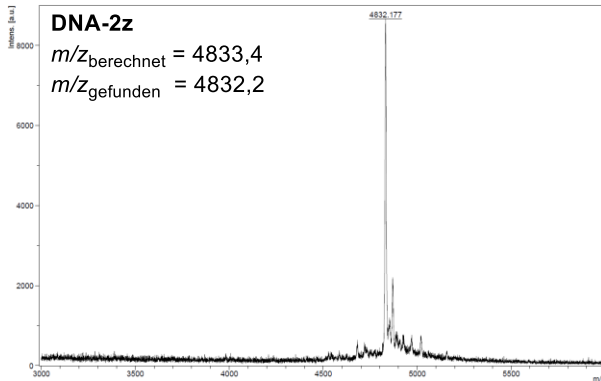
u)



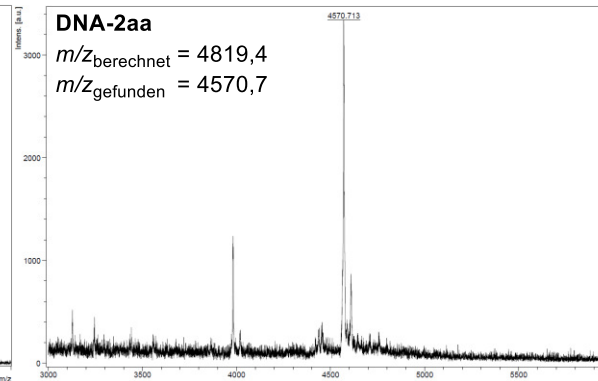
v)

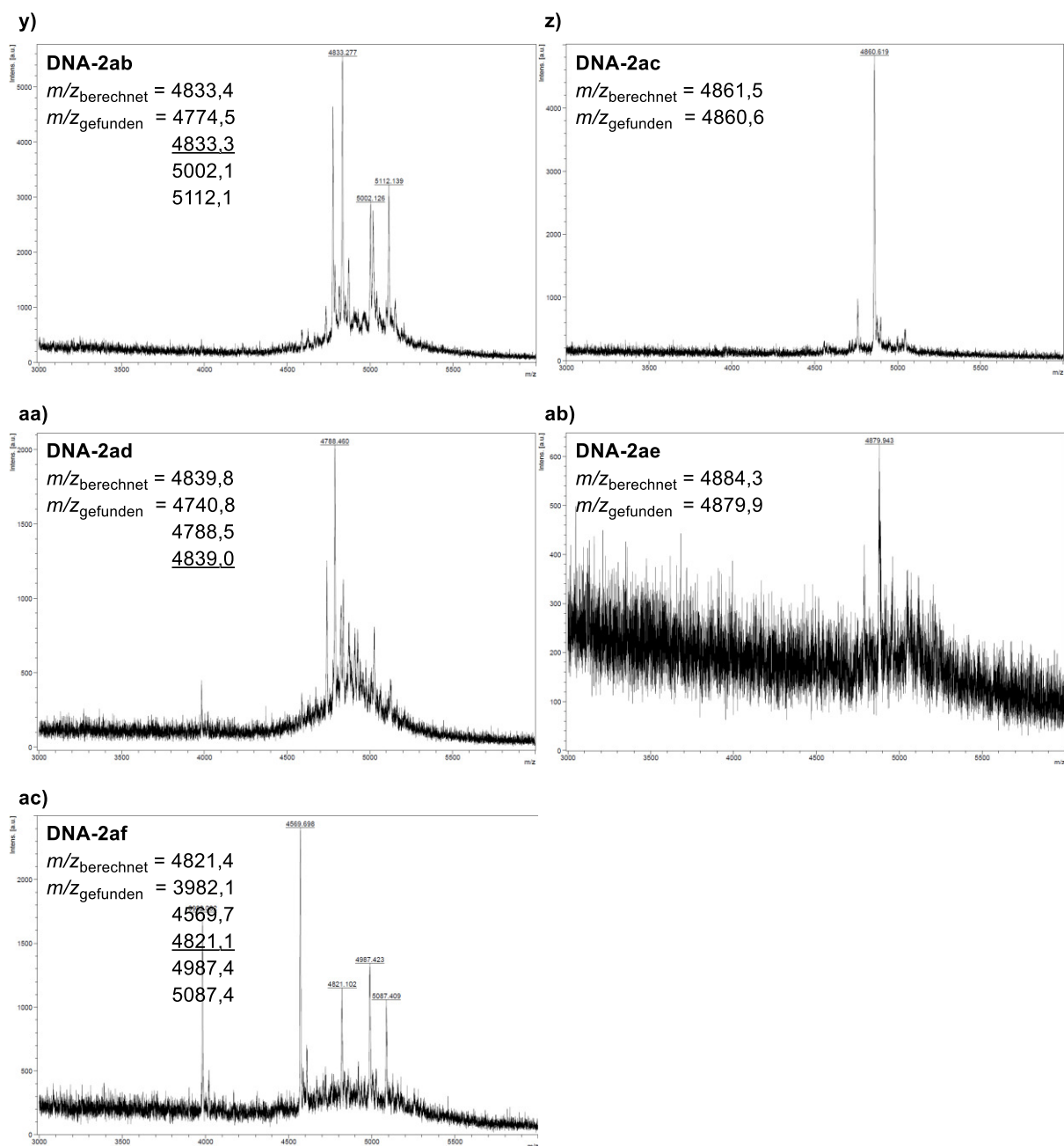


w)



x)

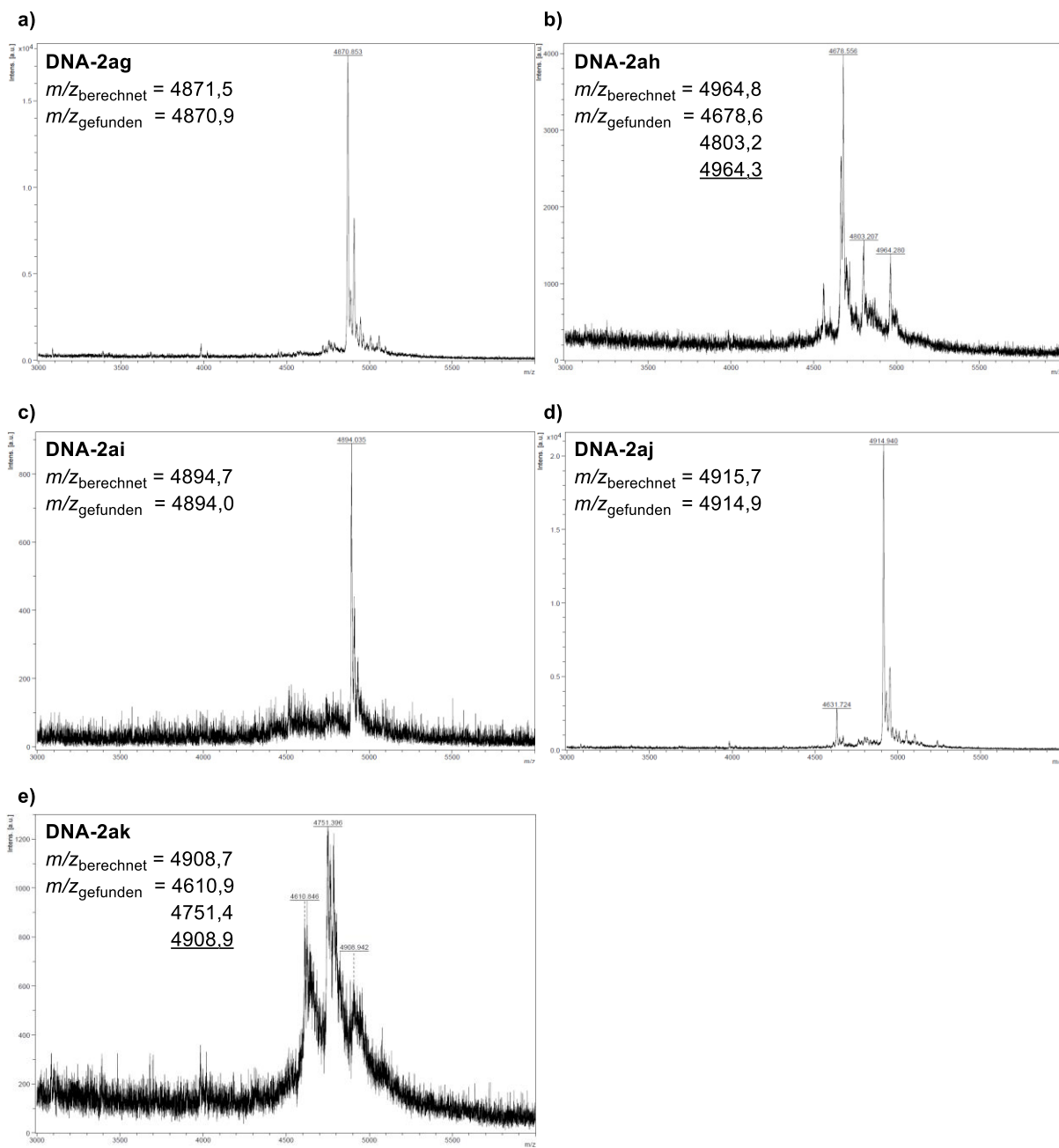




**Abbildung 65:** Untersuchung verschiedener Amine auf die Synthese von DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin **DNA-2b**, **-2e** - **af** (siehe **Tabelle 21**).

a) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2b**; b) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2e**; c) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2f**; d) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2g**; e) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2h**; f) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2i**; g) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2j**; h) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2k**; i) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2l**; j) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2m**; k) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2n**; l) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2o**; m) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2p**; n) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2q**; o) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2r**; p) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2s**; q) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2t**; r) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2u**; s) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2v**; t) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2w**; u) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2x**; v) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2y**; w) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2z**; x) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2aa**; y) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ab**; z) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ac**; aa) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ad**; ab) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ae**; ac) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2af**.

## Variation des DNA-Aldehyd-Konjugates

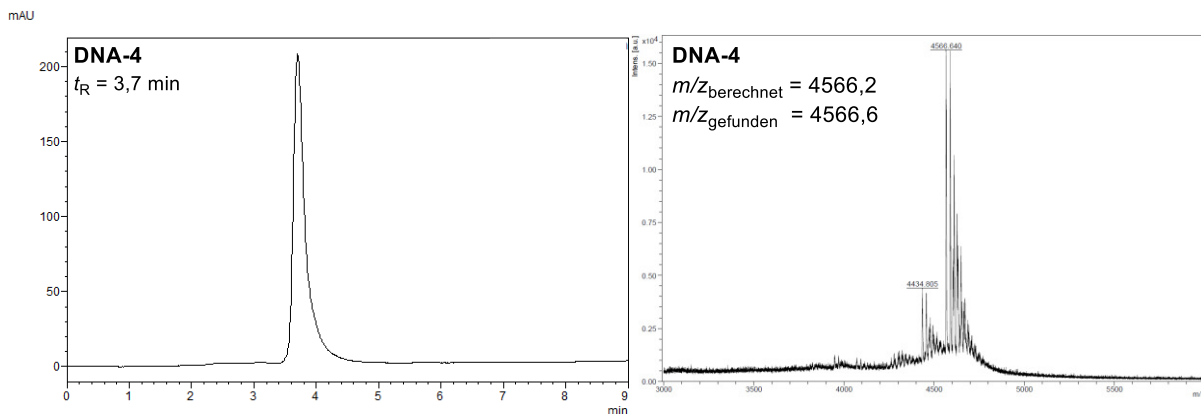


**Abbildung 66:** Untersuchung verschiedener DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-1b - f** auf die Synthese von DNA-Tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2-*c*]chinolin **DNA-2ag - ak** (siehe **Tabelle 22**).

a) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ag**; b) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ah**; c) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ai**; d) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2aj**; e) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-2ak**.

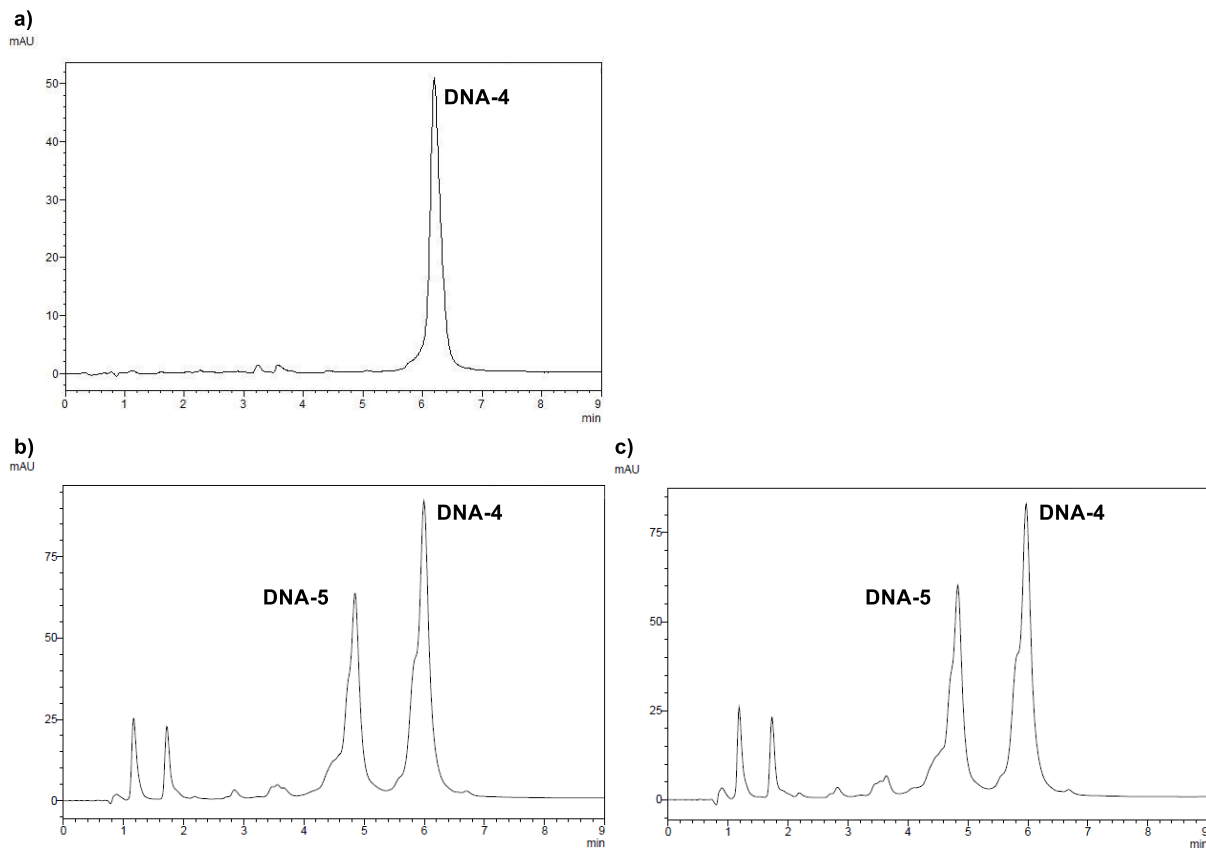
## Copolymer-vermittelte Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

### Startmaterialien



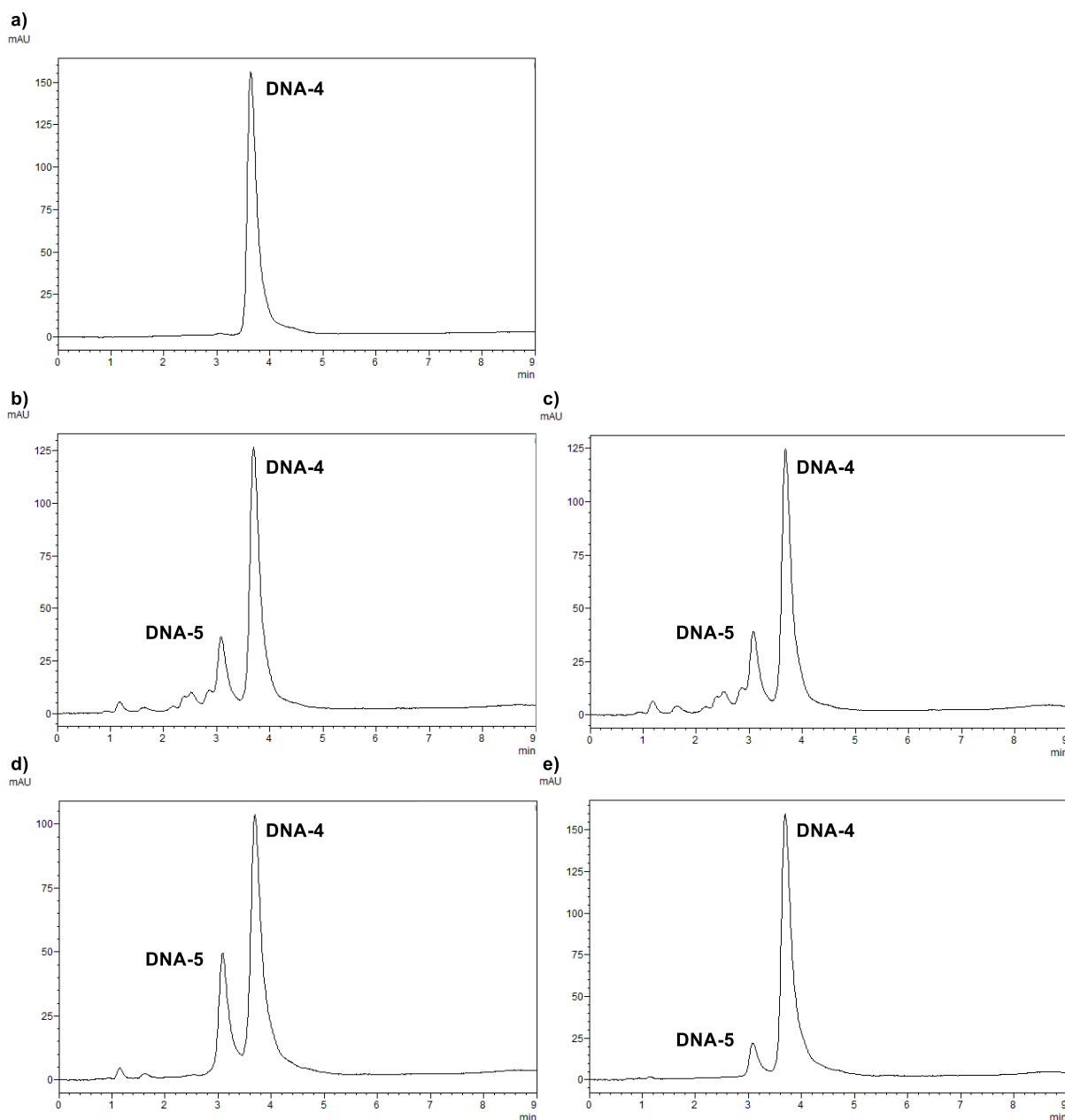
**Abbildung 67:** Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung. Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des DNA-Konjugats **DNA-4**.

### Variation des Additivs



**Abbildung 68:** Copolymer **P1-BA-b**-vermittelte Boc-Entschützung von **DNA-4** zur Bildung von **DNA-5** ohne Additiv. Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 23**. a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-4**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 1; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 4.

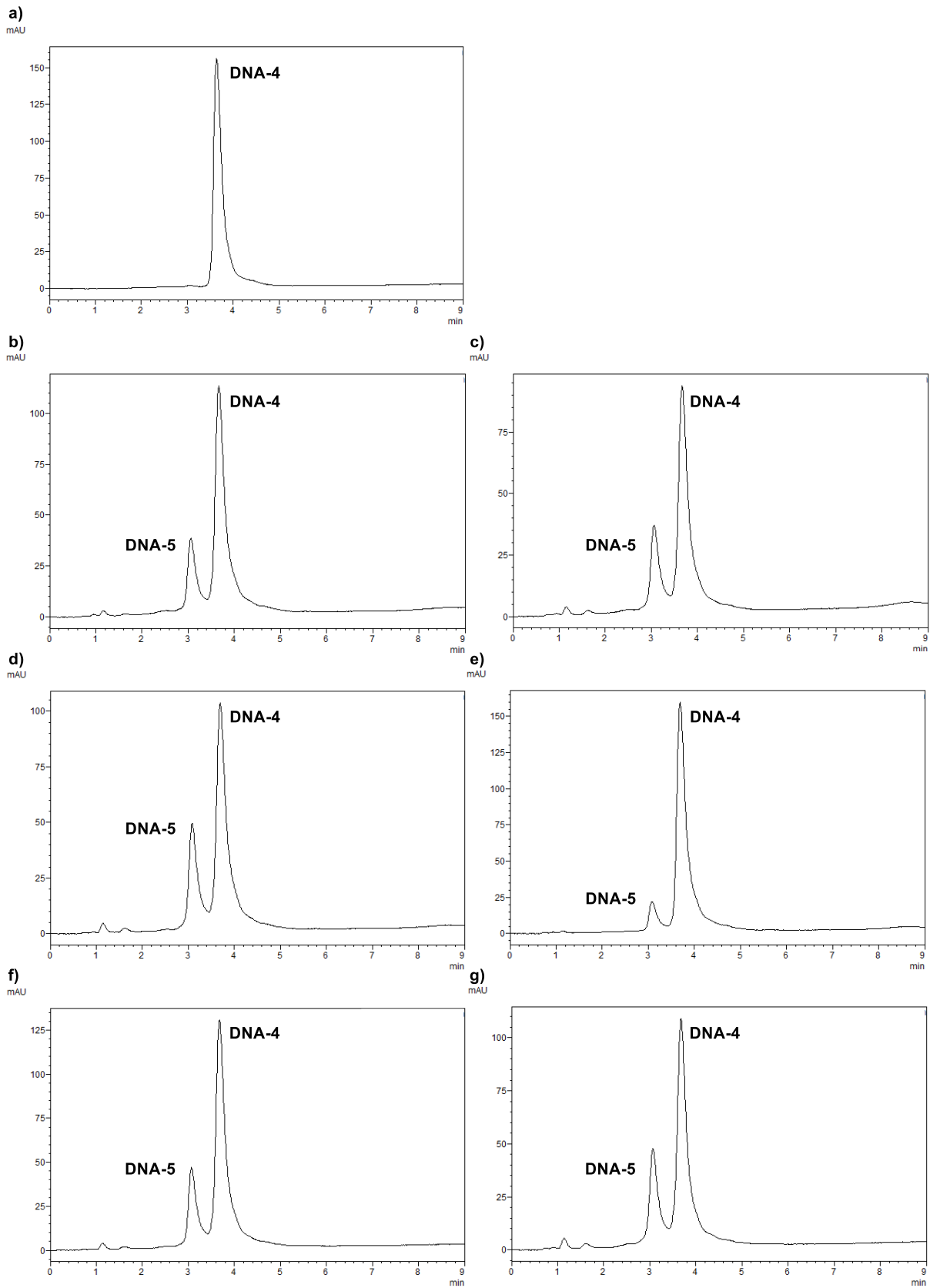




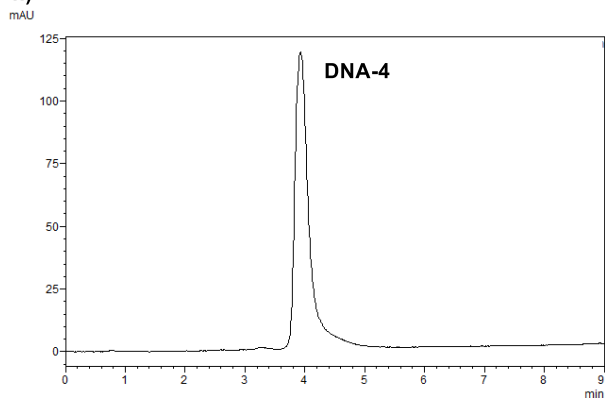
**Abbildung 69:** Copolymer **P1-BA-b**-vermittelte Boc-Entschützung von **DNA-4** zur Bildung von **DNA-5** mit dem Additiv 4-*tert*-Butylanilin **20b** oder  $\text{MgCl}_2$ .

Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 23**. a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-4**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 2; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 5; d) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 3; e) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 6.

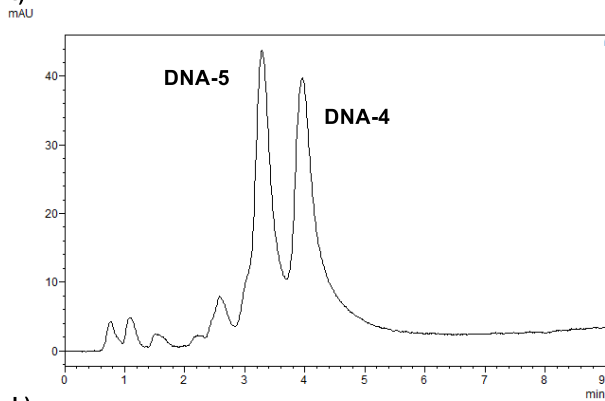
**Variation der Copolymer-Struktur und der Äquivalente des Copolymers**



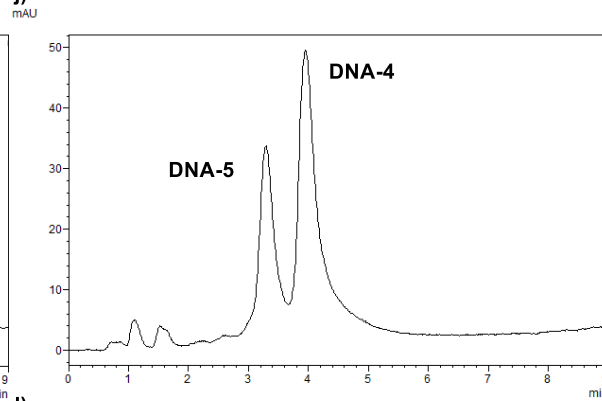
h)



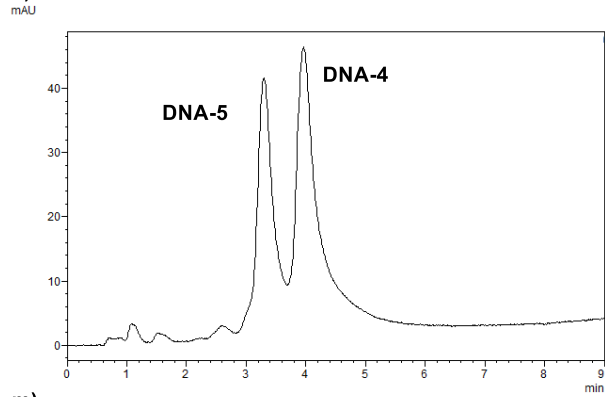
i)



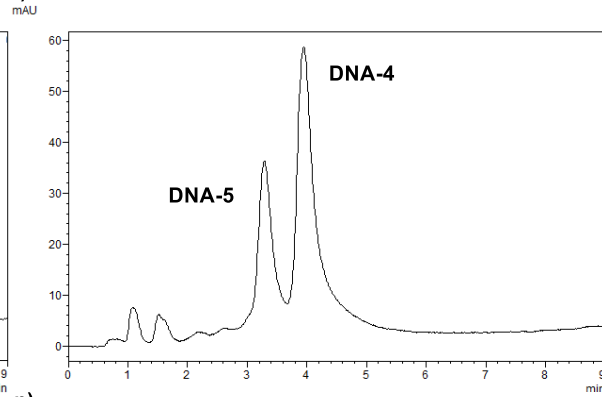
j)



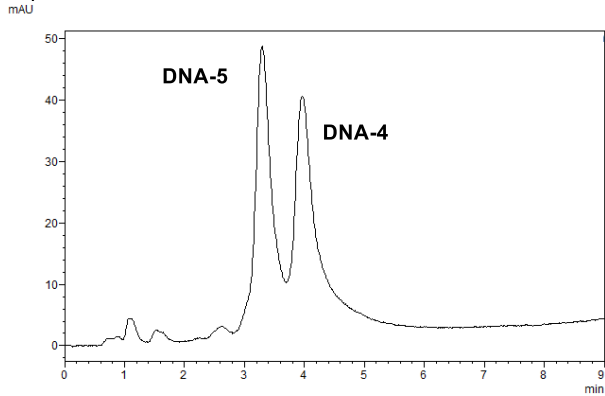
k)



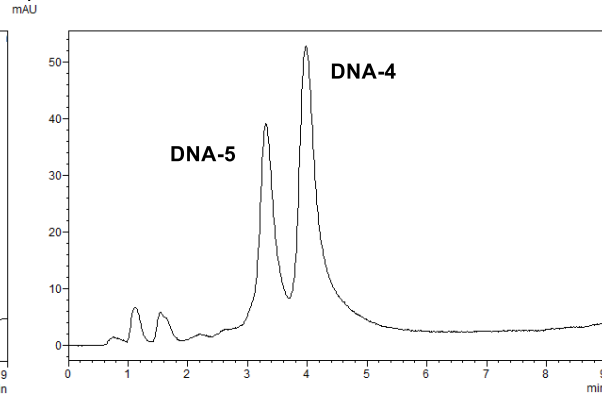
l)

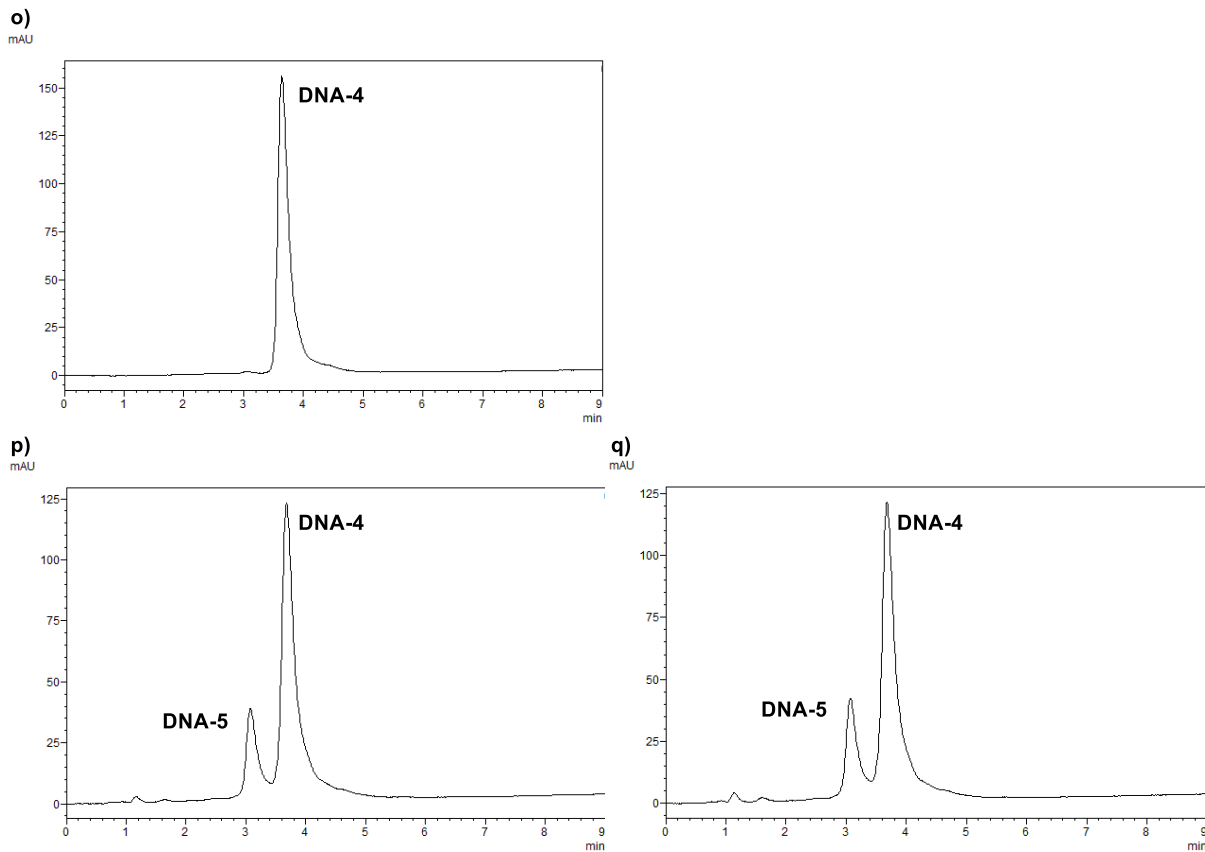


m)



n)



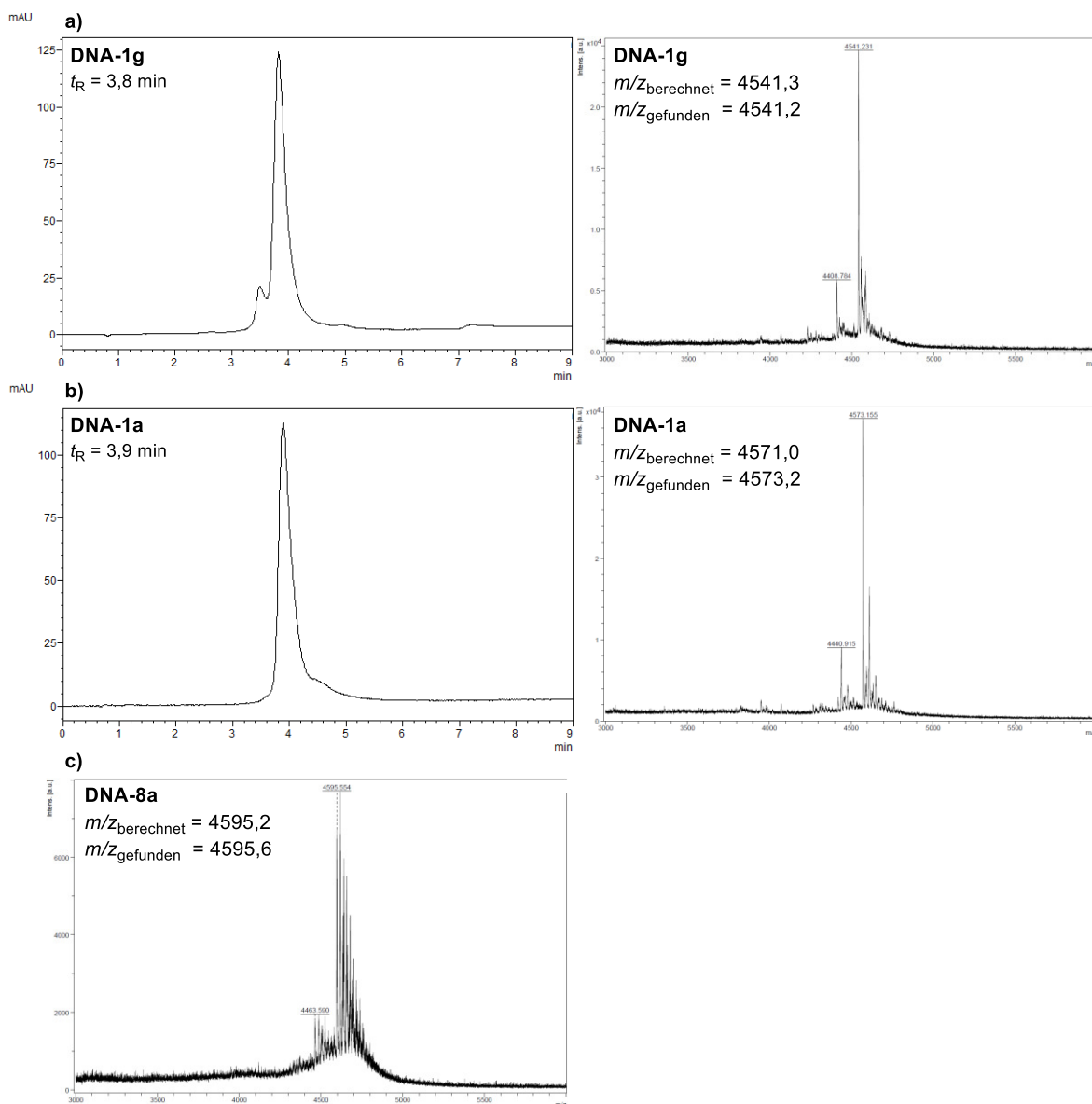


**Abbildung 70:** Einfluss der Copolymer-Struktur und der Äquivalente des Copolymers auf die Copolymer-vermittelte Boc-Entschützung von **DNA-4** zur Bildung von **DNA-5** mit dem Additiv  $\text{MgCl}_2$ .

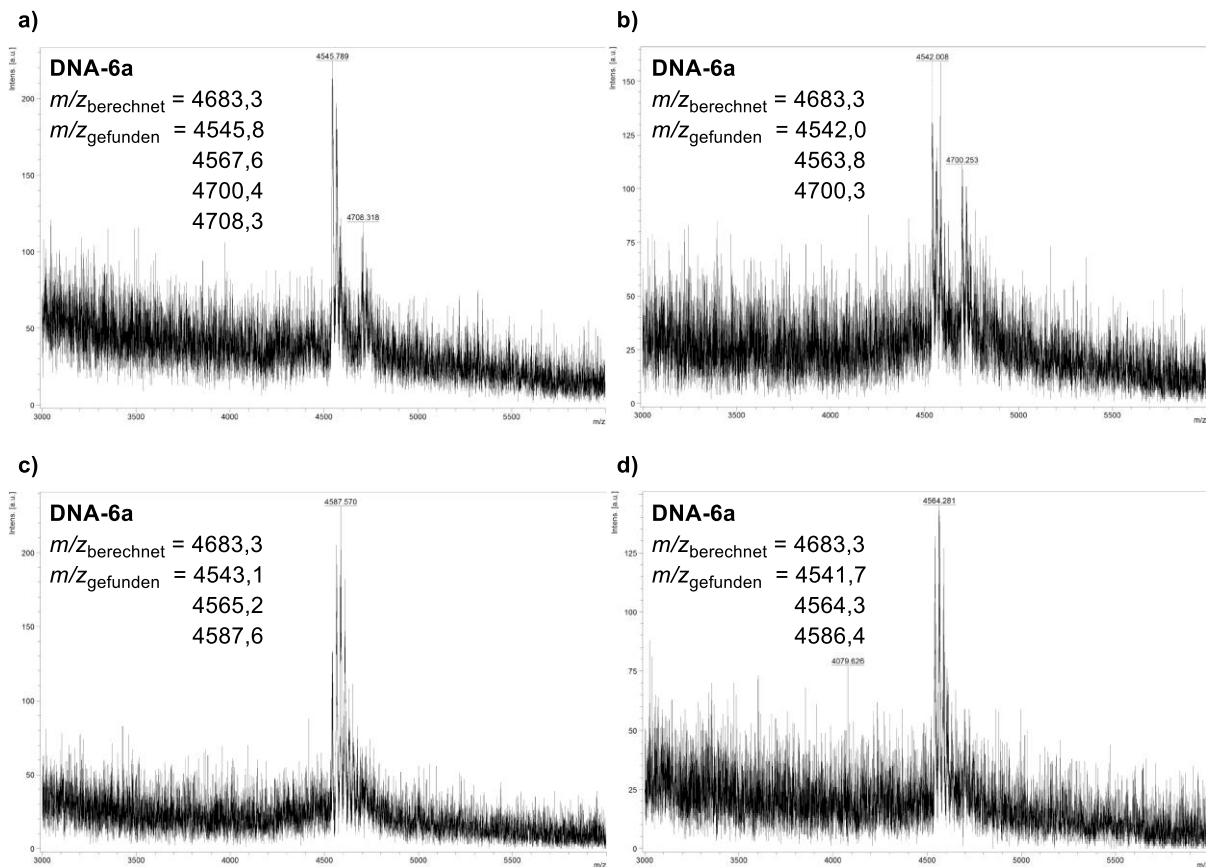
Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 24**. a) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-4**; b) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 1; c) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 2; d) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 3; e) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 4; f) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 5; g) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 6; h) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-4**; i) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 7; j) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 8; k) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 9; l) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 10; m) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 11; n) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 12; o) HPLC-Chromatogramm des DNA-Konjugats **DNA-4**; p) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 13; q) HPLC-Chromatogramm des Experiments Eintrag 14.

## Copolymer-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion

### Startmaterialien

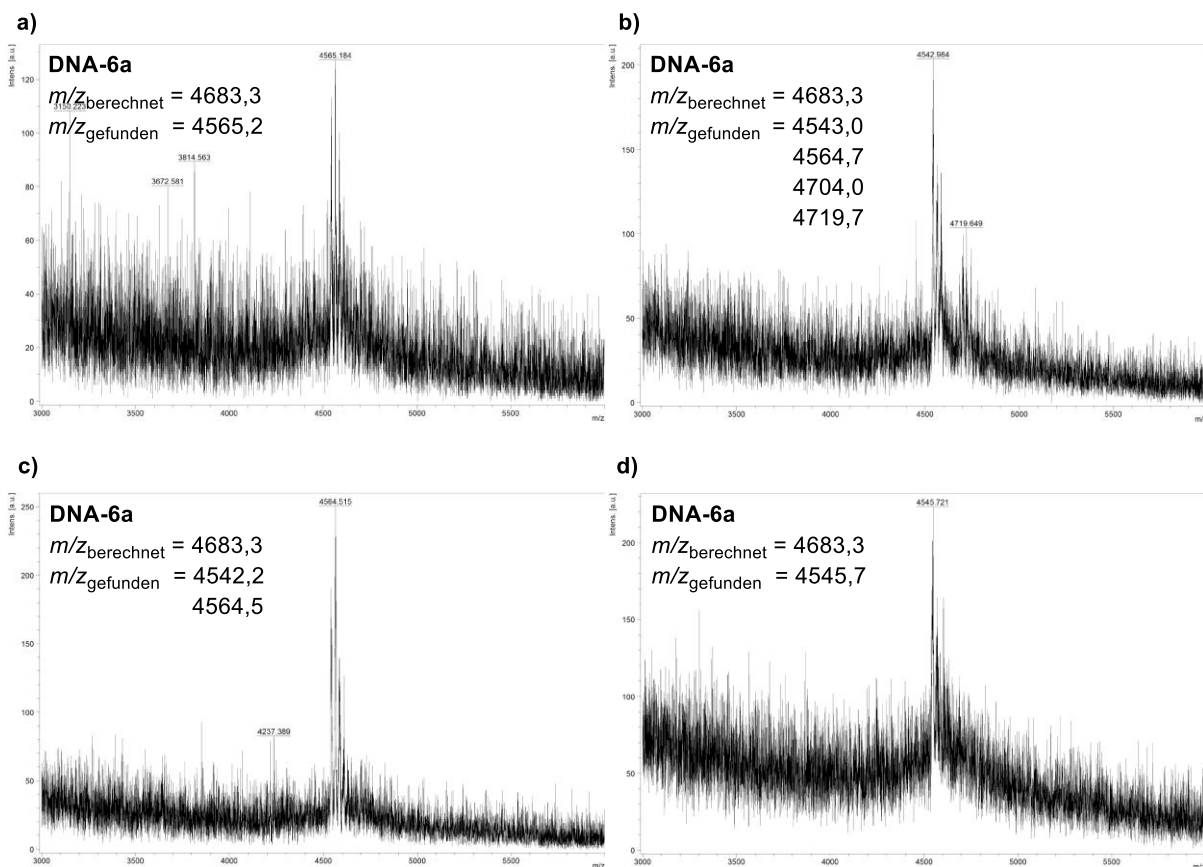


**Abbildung 71:** Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Pictet-Spengler-Reaktion. Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des a) DNA-Konjugats **DNA-1g**; b) DNA-Konjugats **DNA-1a**; c) DNA-Konjugats **DNA-8a**.

**Optimierung der Reaktionsbedingungen****Variation der Konzentrationen des Copolymer P1-BA-a und der Reaktionstemperatur**

**Abbildung 72:** Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Copolymer **P1-BA-a** und Temperaturen auf die Pictet-Spengler-Reaktion mit dem **DNA-1g**-Konjugat und Tryptamin **42b**. Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 25**. a) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 1; b) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 2; c) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 3; d) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 4.

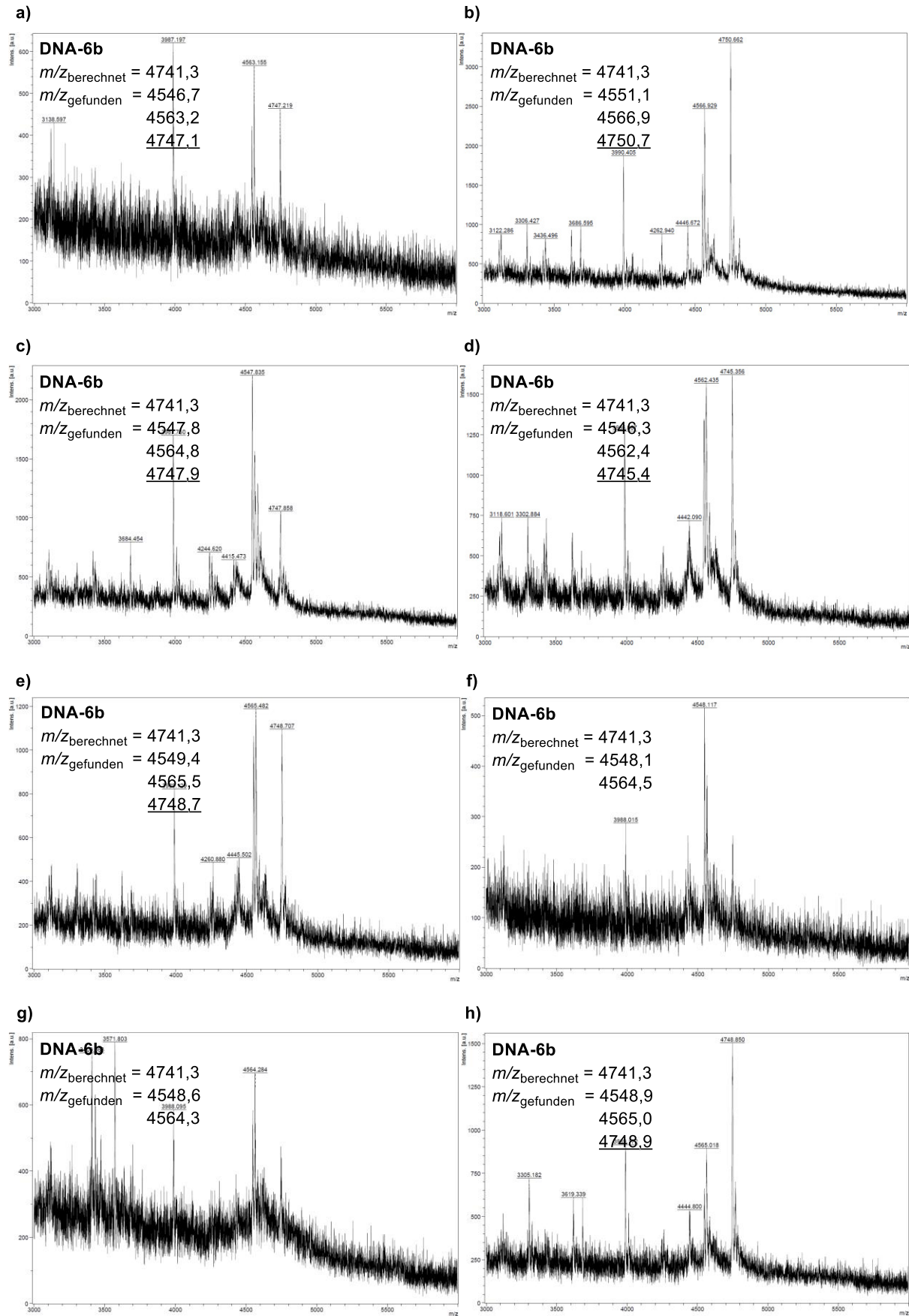
## Variation der Konzentrationen des Copolymers P2-BA und der Reaktionstemperatur



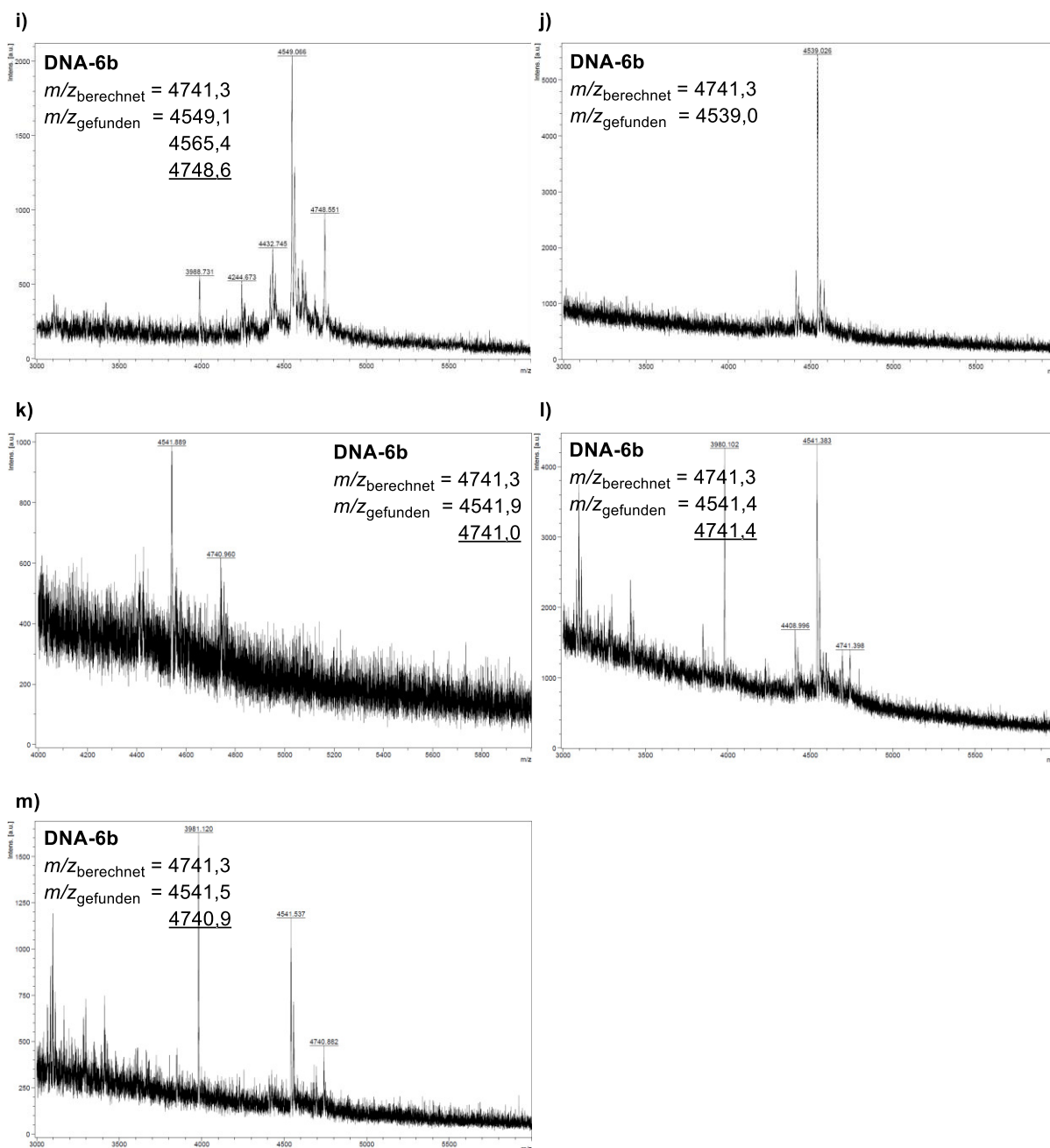
**Abbildung 73:** Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Copolymer **P2-BA** und Temperaturen auf die Pictet-Spengler-Reaktion mit dem **DNA-1g**-Konjugat und Tryptamin **42b**.

Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 25**. a) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 5; b) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 6; c) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 7; d) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 8.

Variation des Co-Lösungsmittels, der Reaktionstemperatur und der Äquivalente des Tryptophanmethylesters 42c



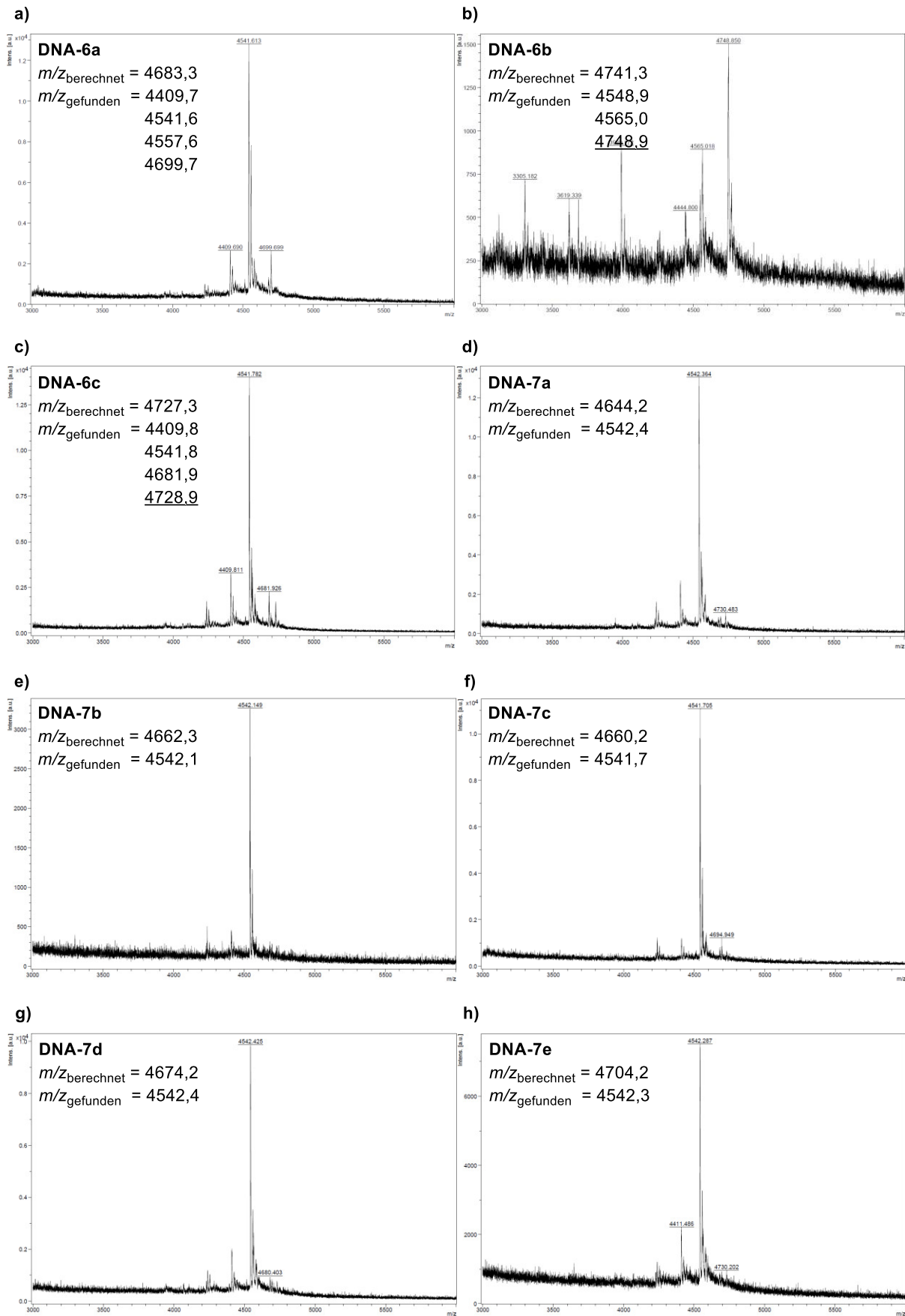


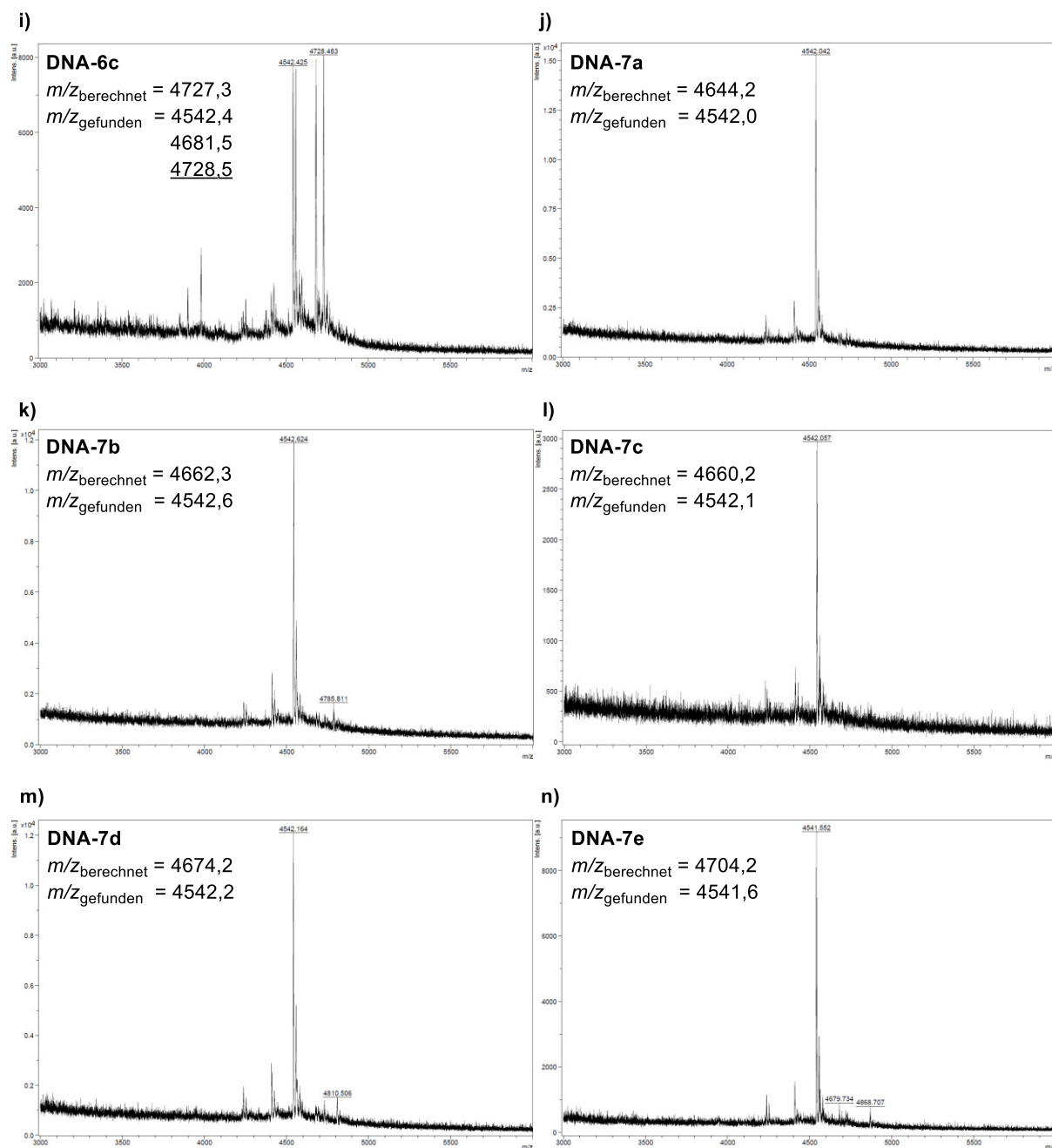


**Abbildung 74:** Variation des Co-Lösungsmittels, der Reaktionstemperatur und der Äquivalente des Tryptophanmethylesters **42c** in der Copolymer **P1-BA-a**-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion mit dem **DNA-1g**-Konjugat.

Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 25**. a) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 9; b) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 10; c) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 11; d) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 12; e) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 14; f) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 15; g) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 16; h) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 17; i) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 18; j) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 19; k) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 20; l) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 21; m) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 22; n) MALDI-MS-Spektrum des Experiments Eintrag 23.

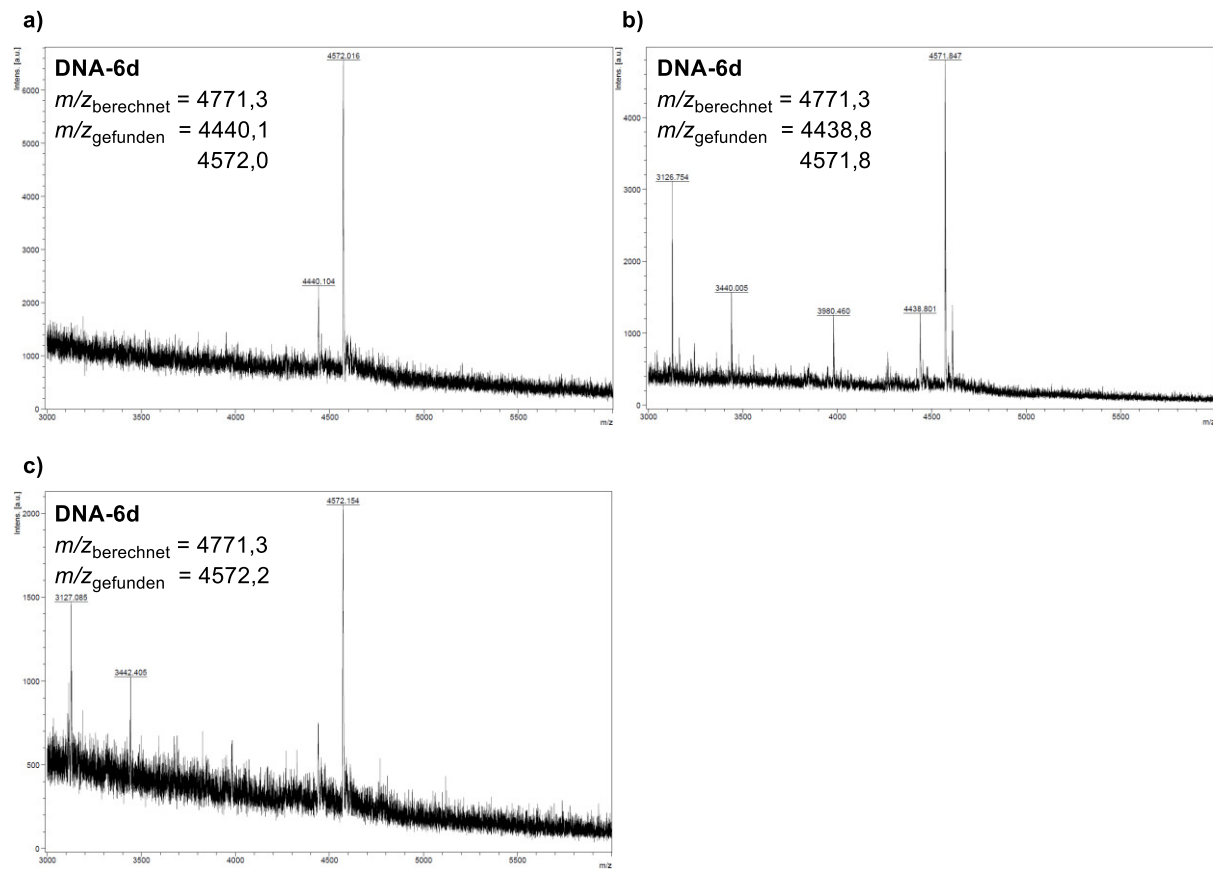
**Variation der Amin-Komponente**





**Abbildung 75:** Untersuchung verschiedener Amine in der Pictet-Spengler-Reaktion mit **DNA-1g** (siehe **Tabelle 26**).

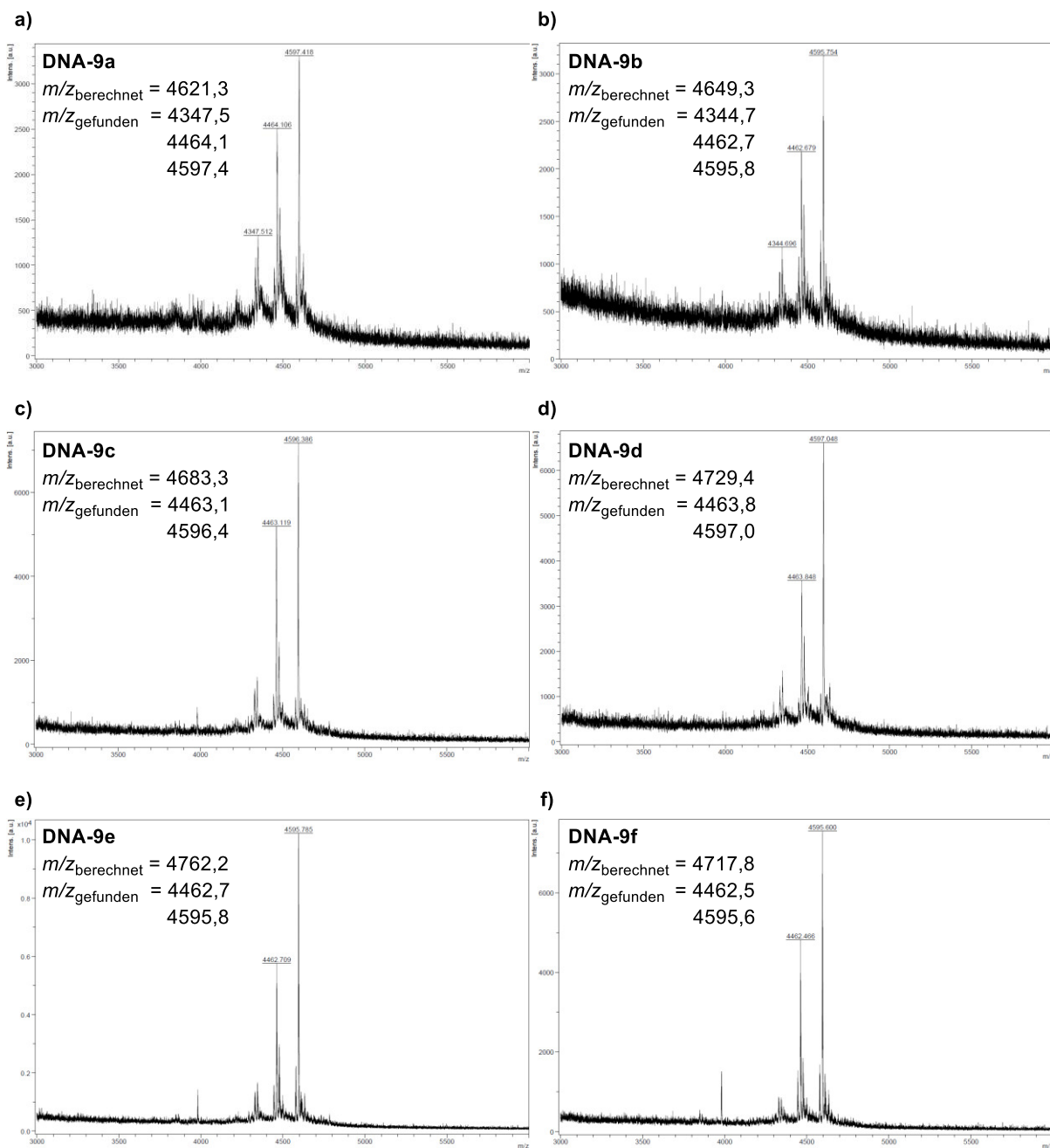
a) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-6a**; b) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-6b**; c) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-6c**; d) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7a**; e) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7b**; f) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7c**; g) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7d**; h) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7e**; i) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-6c** nach vier Tagen Reaktionszeit; j) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7a** nach vier Tagen Reaktionszeit; k) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7b** nach vier Tagen Reaktionszeit; l) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7c** nach vier Tagen Reaktionszeit; m) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7d** nach vier Tagen Reaktionszeit; n) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-7e** nach vier Tagen Reaktionszeit.

**Variation des DNA-Startmaterials****Variation der Reaktionstemperatur mit dem DNA-1a-Konjugat**

**Abbildung 76:** Variation der Reaktionstemperatur in der Copolymer **P1-BA-a**-vermittelten Pictet-Spengler-Reaktion mit dem **DNA-1a**-Konjugat.

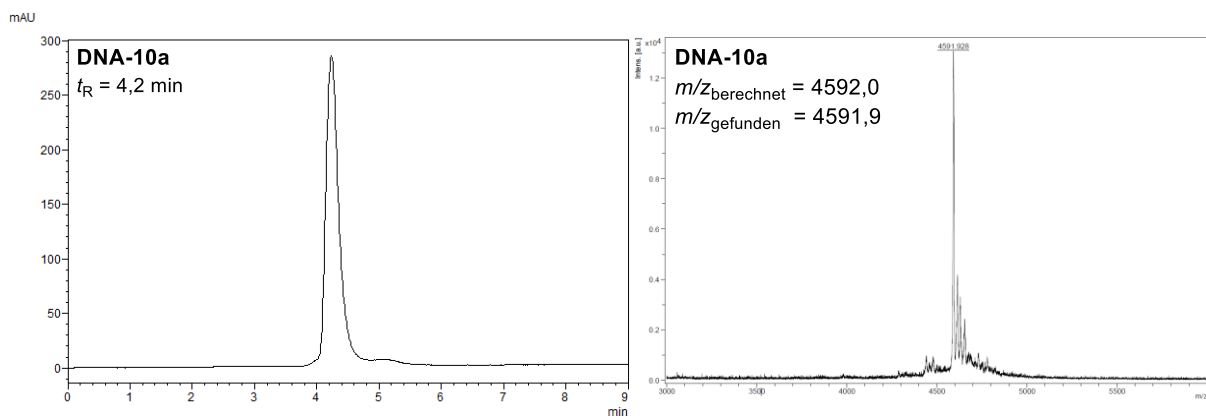
a) MALDI-MS-Spektrum des Experiments mit einer Reaktionstemperatur von 25 °C; b) MALDI-MS-Spektrum des Experiments mit einer Reaktionstemperatur von 40 °C; c) MALDI-MS-Spektrum des Experiments mit einer Reaktionstemperatur von 50 °C.

## Variation des Aldehyds mit dem DNA-8a-Konjugat



**Abbildung 77:** Untersuchung verschiedener Aldehyde in der Pictet-Spengler-Reaktion mit **DNA-8a** (siehe **Tabelle 27**).

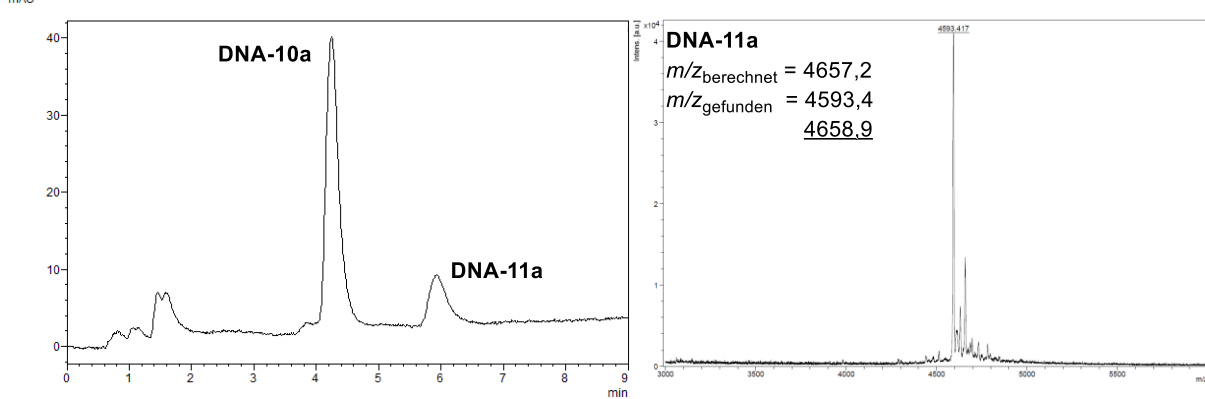
a) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-9a**; b) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-9b**; c) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-9c**; d) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-9d**; e) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-9e**; f) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-9f**.

**Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Reaktion****Startmaterialien**

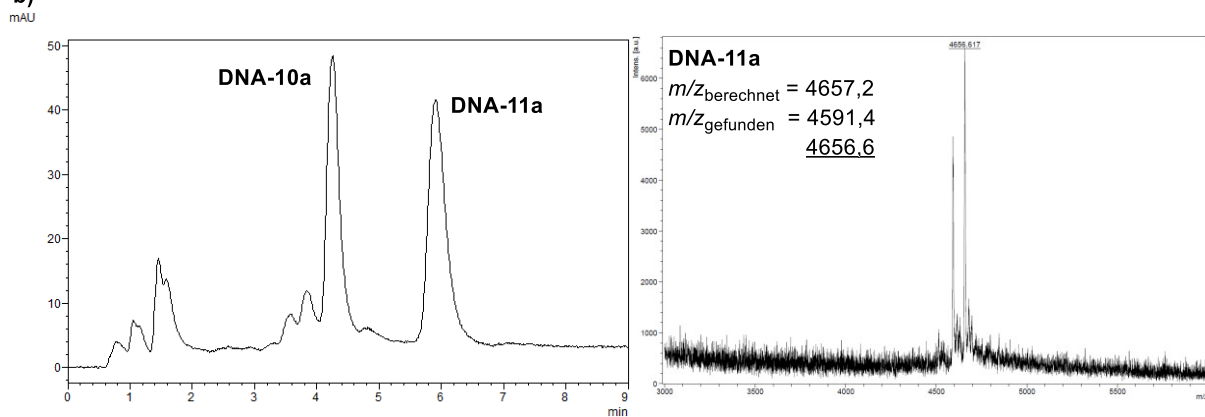
**Abbildung 78:** Startmaterialien für die Copolymer-vermittelte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung. Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des DNA-Konjugats **DNA-10a**.

**Optimierung der Reaktionsbedingungen****Variation der Äquivalente und Konzentrationen des Copolymers P3, sowie der verwendeten Base**

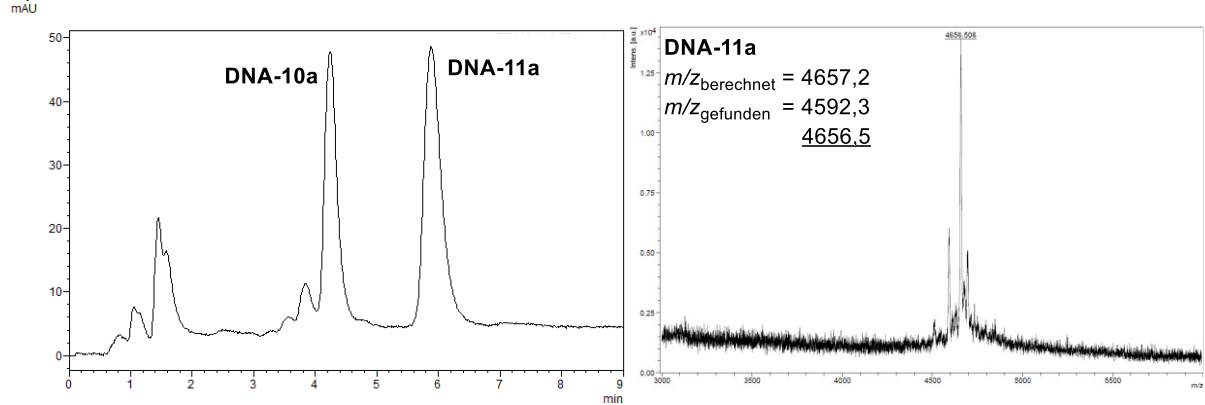
a)



b)

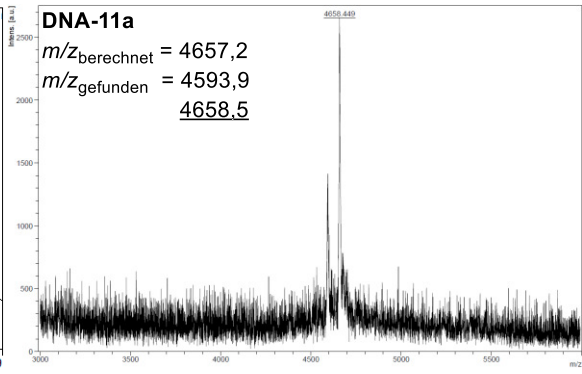
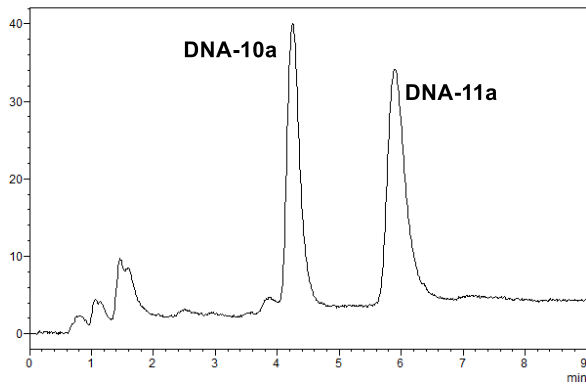


c)



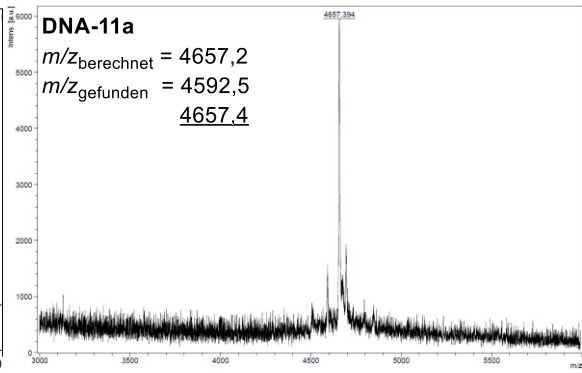
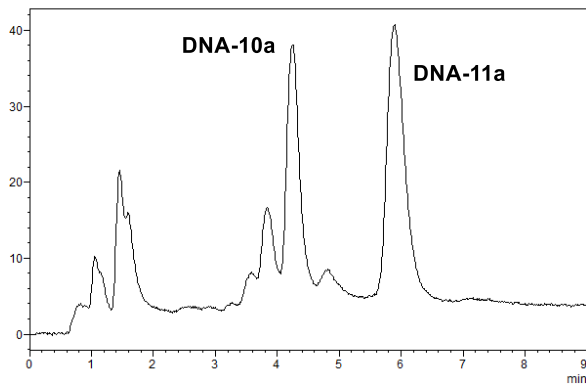
d)

mAU



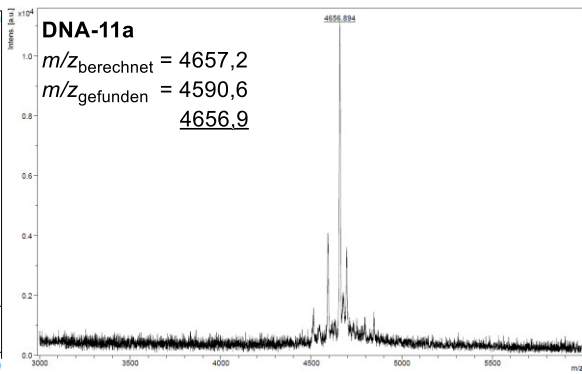
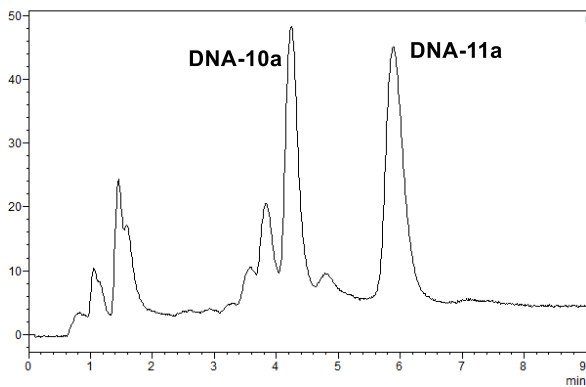
e)

mAU



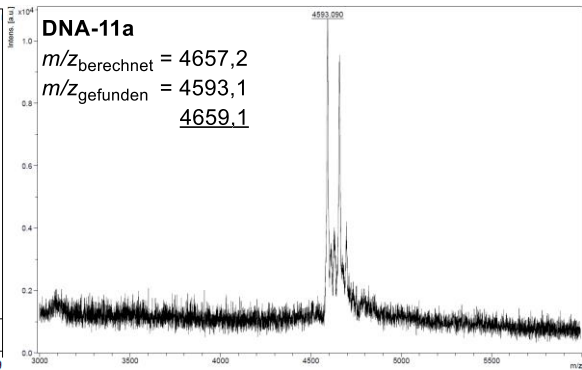
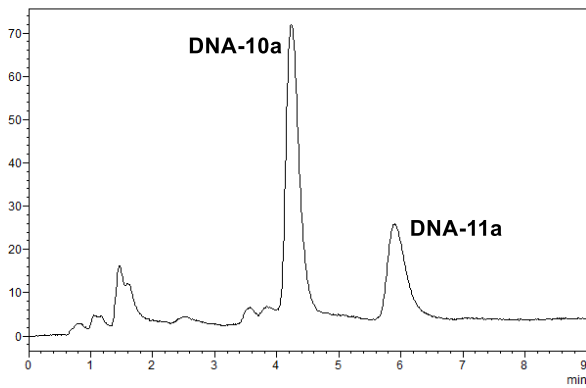
f)

mAU



g)

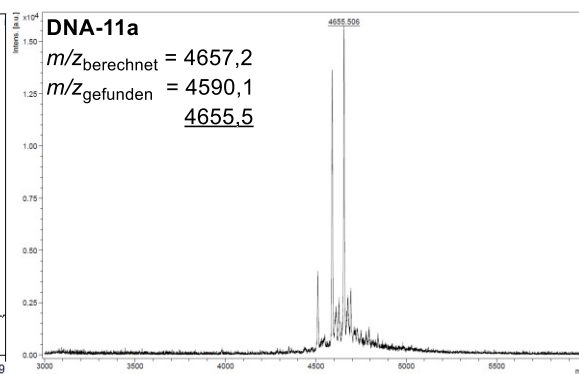
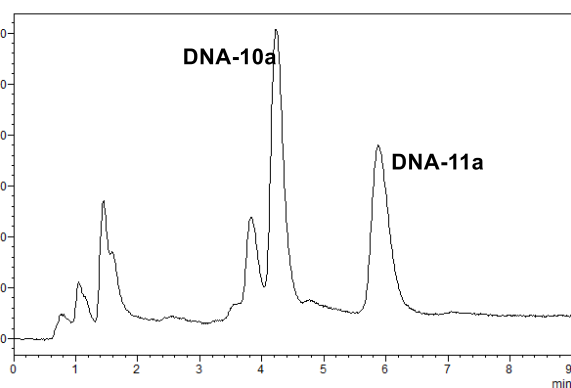
mAU





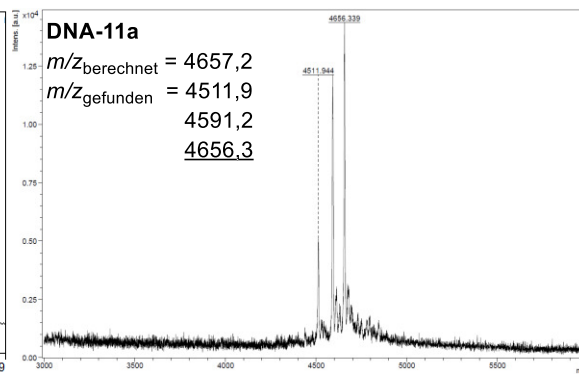
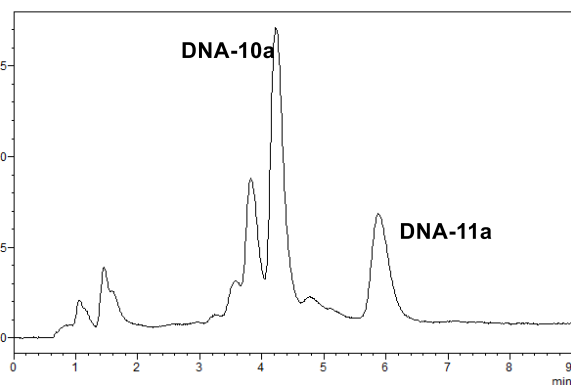
h)

mAU



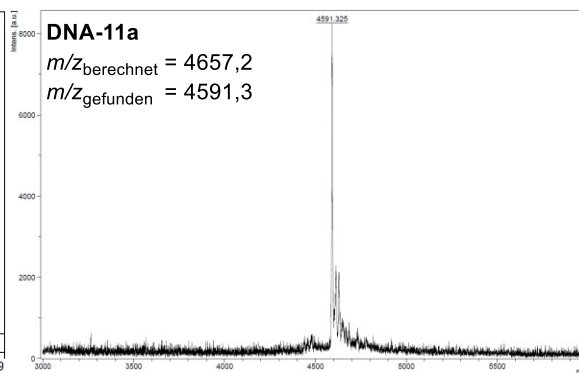
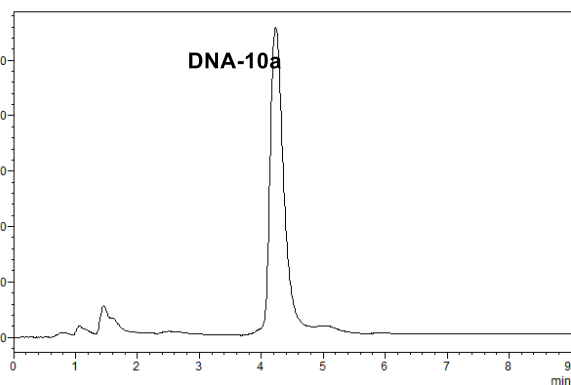
i)

mAU



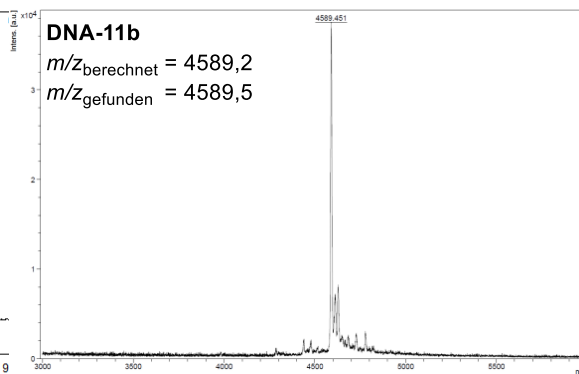
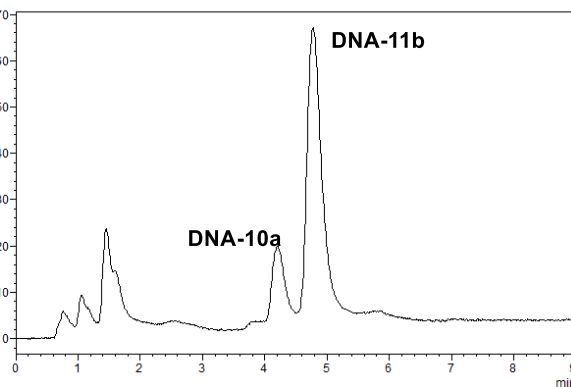
j)

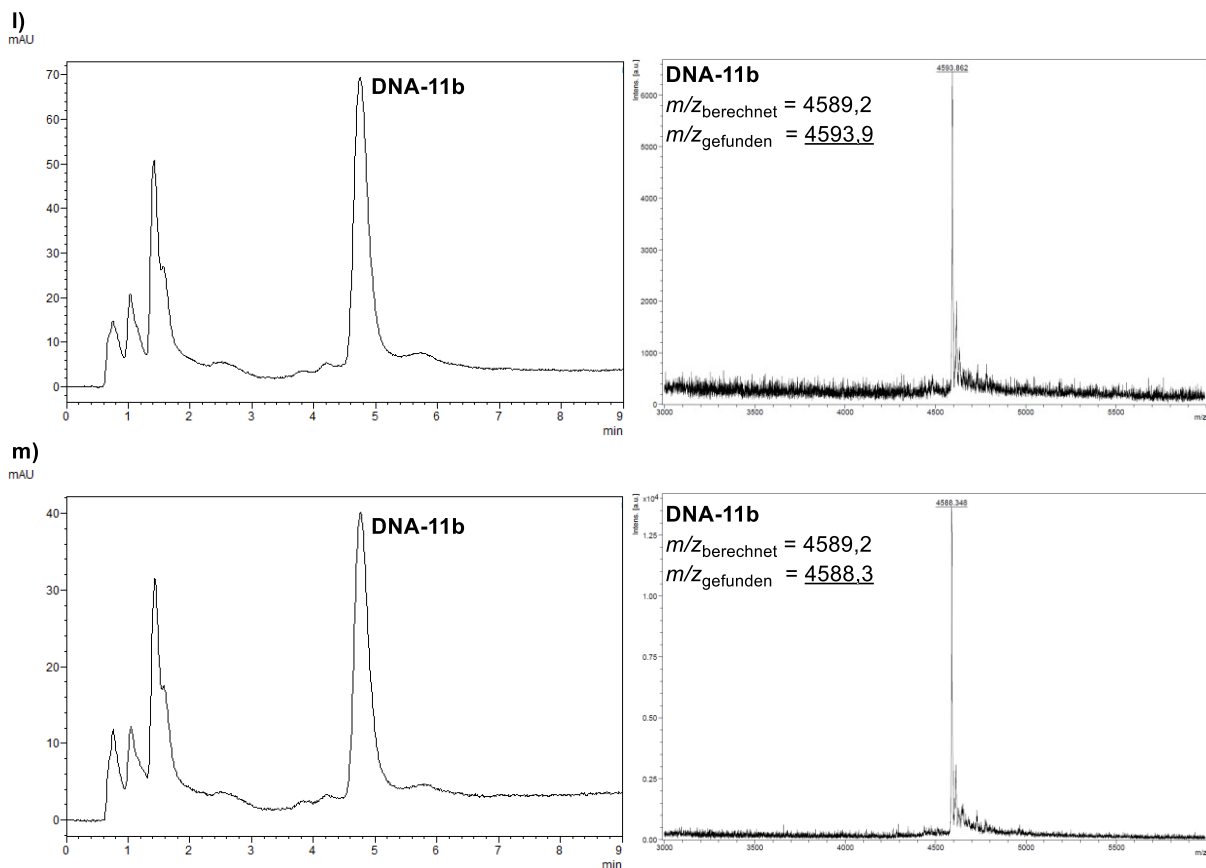
mAU



k)

mAU



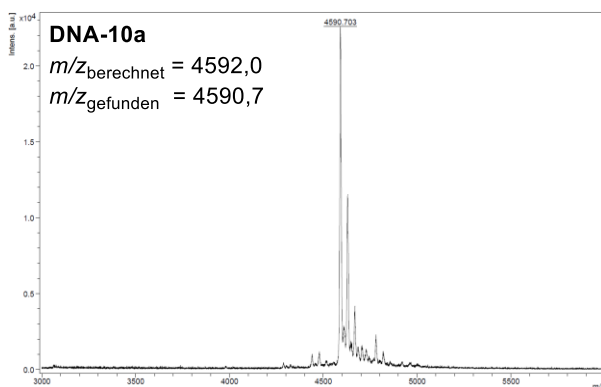


**Abbildung 79:** Effekt von verschiedenen Äquivalenten und Konzentrationen von Copolymer **P3**, sowie der Base auf die Suzuki-Miyaura-Reaktion mit dem **DNA-10a**-Konjugat, 4-(Trifluoromethyl)phenylboronsäure **59b** und Phenylboronsäure **59c**.

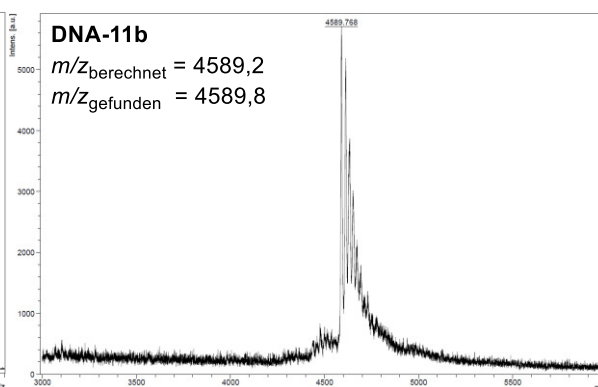
Für Reaktionsbedingungen siehe **Tabelle 28**. a) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 1; b) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 2; c) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 3; d) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 4; e) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 5; f) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 6; g) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 7; h) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 8; i) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 9; j) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 10; k) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 11; l) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 12; m) HPLC-Chromatogramm (links) und MALDI-MS (rechts) von Experiment Eintrag 13.

**Variation der Arylboronsäure**

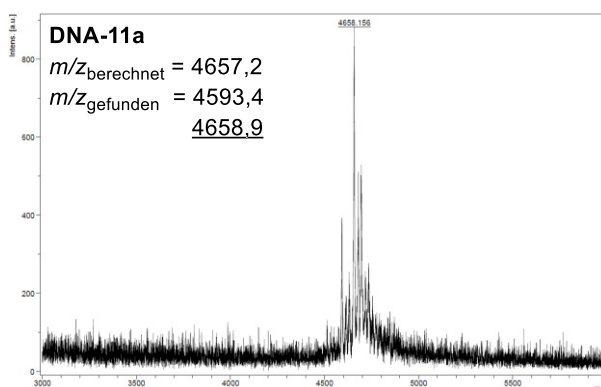
a)



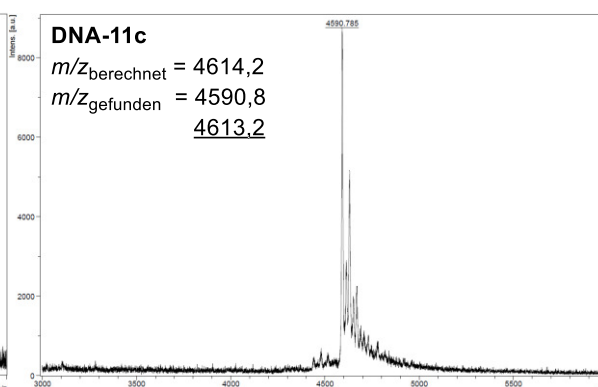
b)



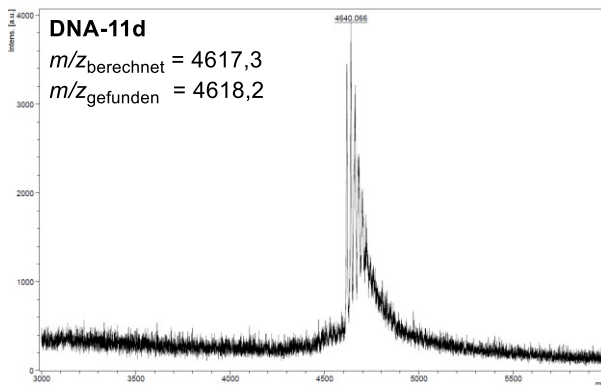
c)



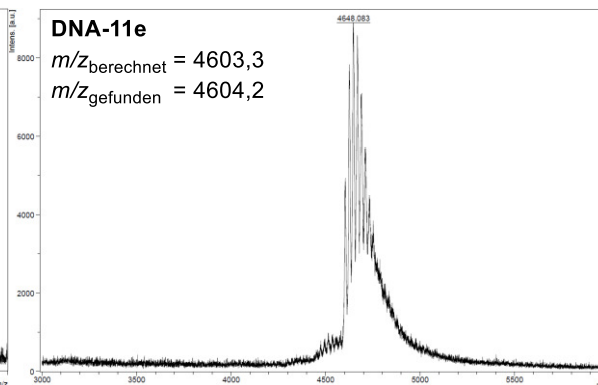
d)



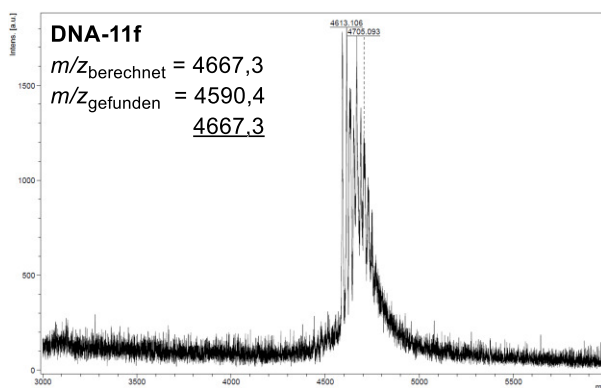
e)



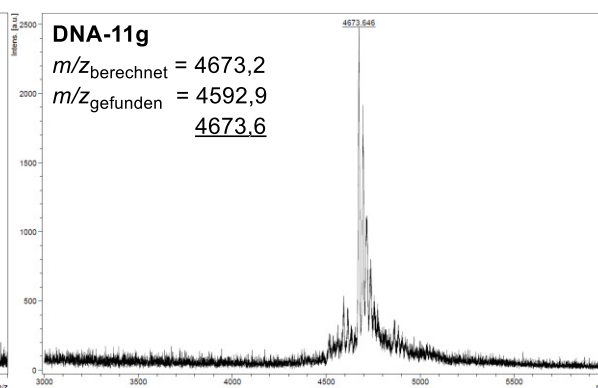
f)

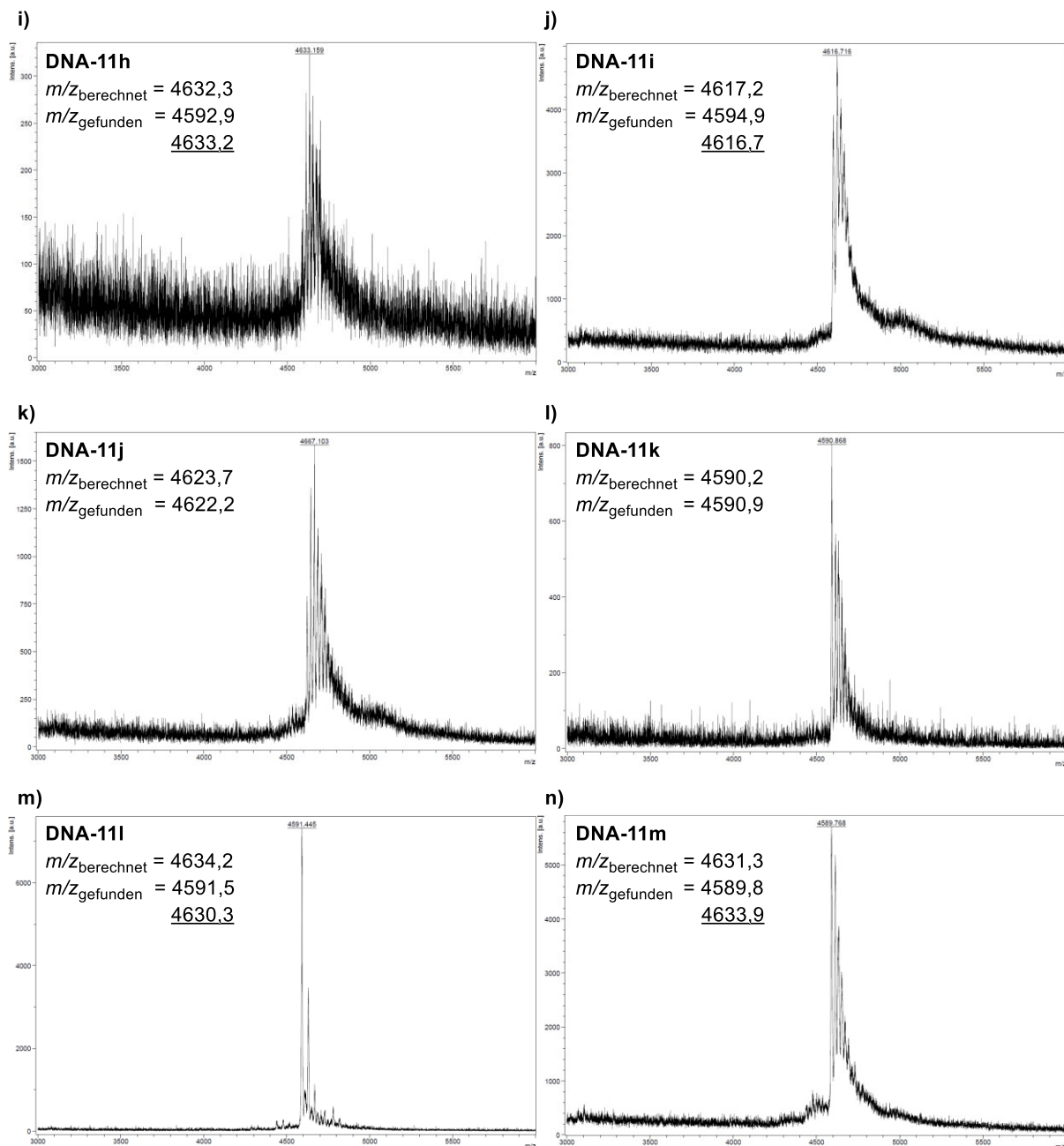


g)



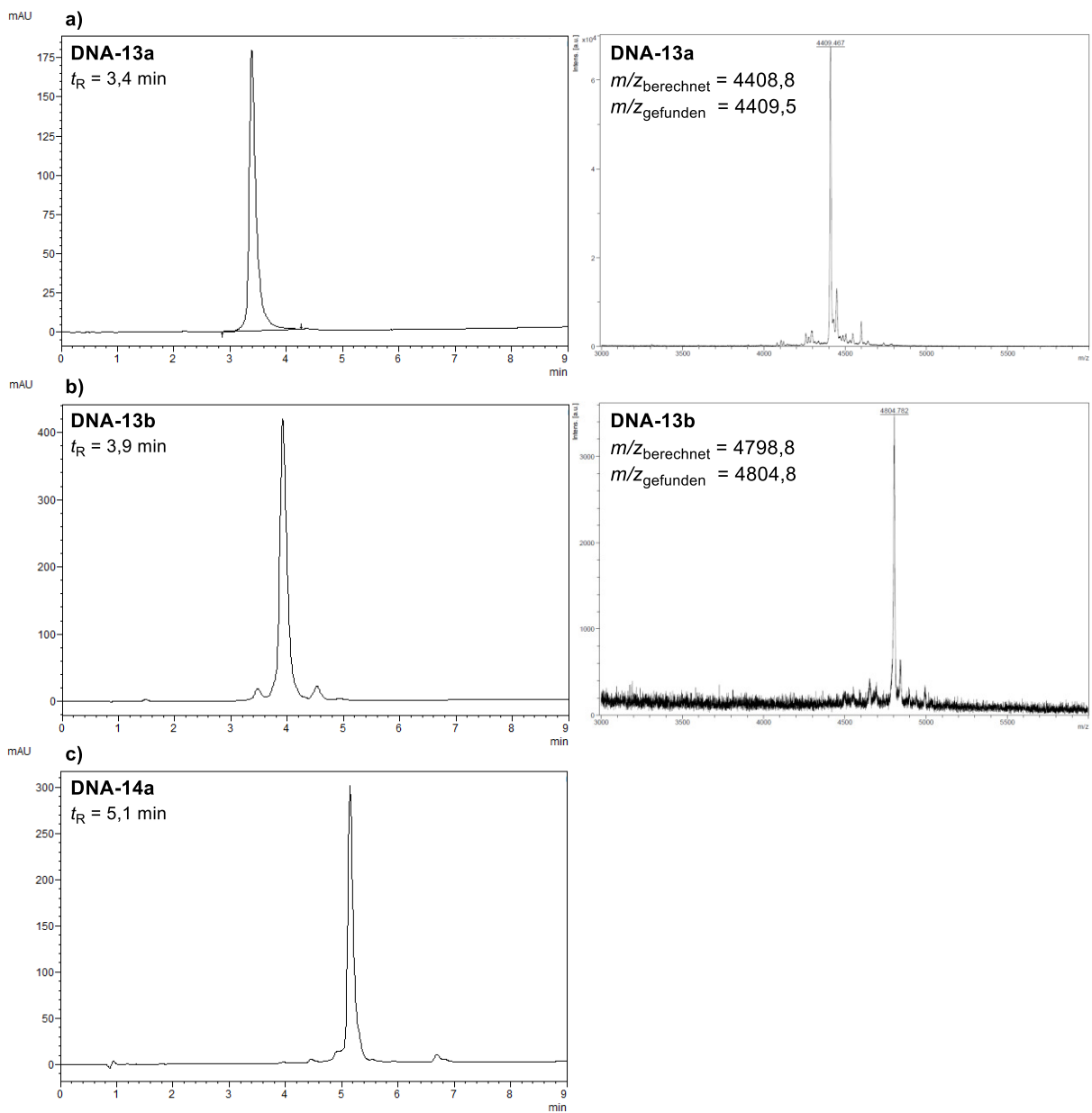
h)





**Abbildung 80:** Untersuchung verschiedener Boronsäuren **59a - m** auf die Synthese von DNA-Bipyridin-Konjugaten **DNA-11a - m** (siehe **Tabelle 29**).

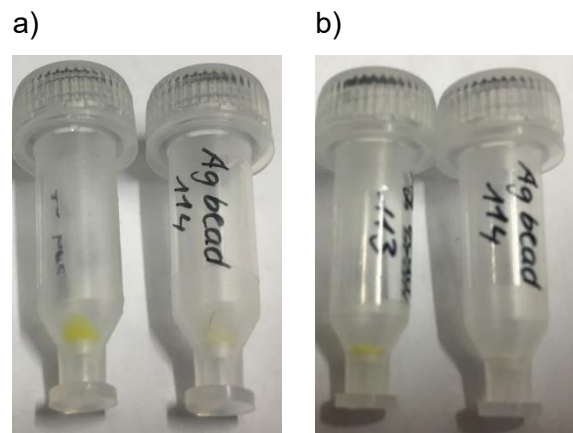
a) MALDI-MS-Spektrum des Startmaterials **DNA-10a**; b) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11b**; c) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11a**; d) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11c**; e) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11d**; f) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11e**; g) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11f**; h) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11g**; i) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11h**; j) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11i**; k) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11j**; l) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11k**; m) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11l**; n) MALDI-MS-Spektrum des Roh-Konjugats **DNA-11m**.

**Affinitäts-Aufreinigung****Startmaterialien**

**Abbildung 81:** Startmaterialien für die Affinitäts-Aufreinigung. Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des a) DNA-Konjugats **DNA-13a**; b) DNA-Konjugats **DNA-13b**; c) DNA-Konjugats **DNA-14a**.

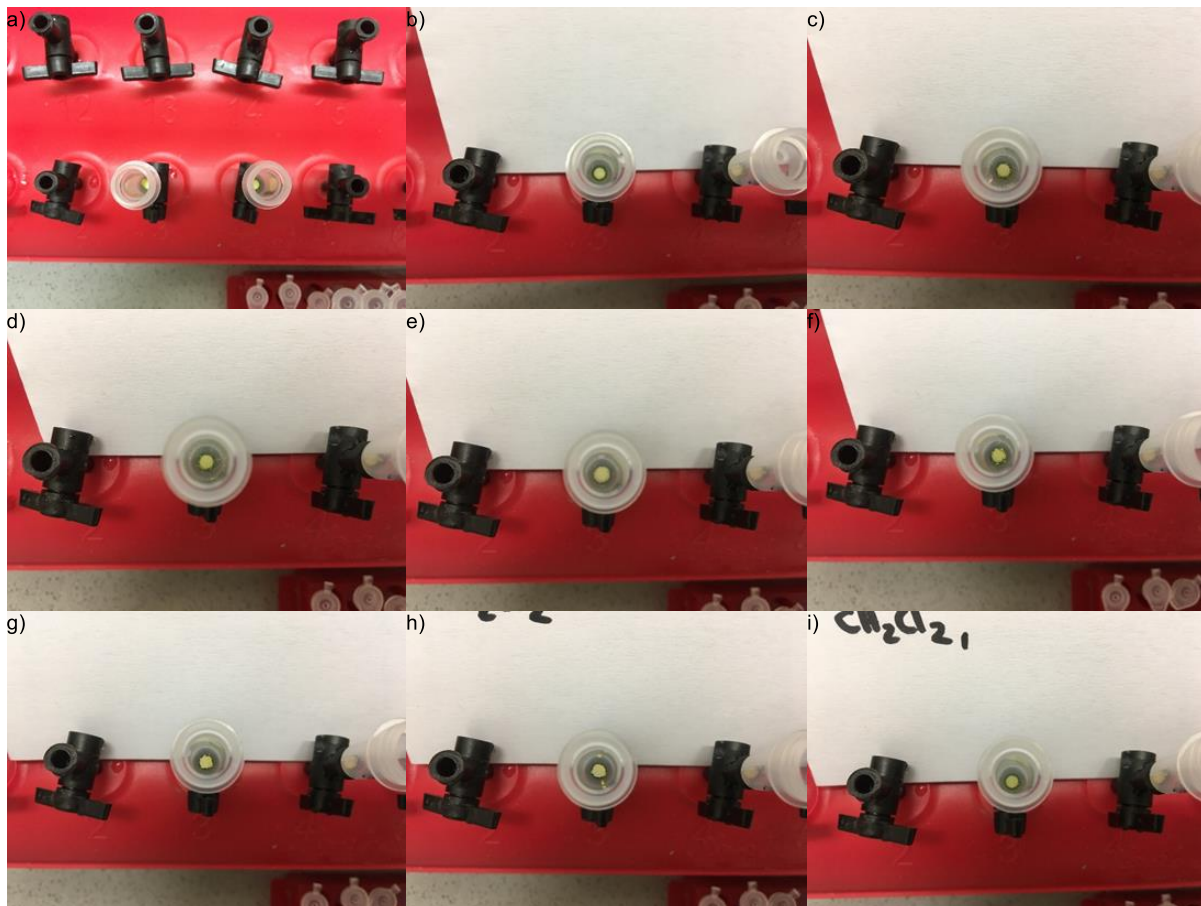
### Etablierung der Affinitäts-Aufreinigung

Prüfung einer selektiven und unselektiven Bindung der DNA-12b an die Agarose-Matrix mit und ohne Cu/Ligand/Na-Ascorbat-Gemisch



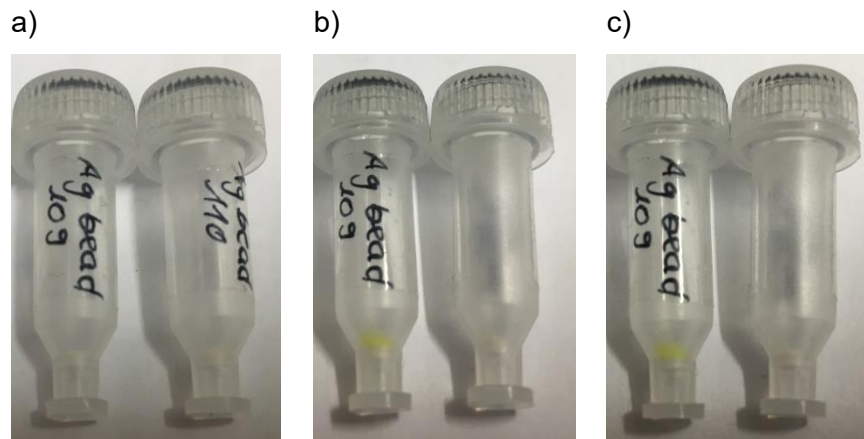
**Abbildung 82:** Prüfung einer selektiven und unselektiven Bindung der **DNA-12b** an die Agarose-Matrix mit und ohne Cu/Ligand/Na-Ascorbat-Gemisch. Bilder der Mobicols a) mit der **Matrix-DNA-12b** nach der CuAAC-Reaktion (113) und ohne CuAAC-Reagenzien (114); b) mit der **Matrix-DNA-12b** nach dem dreifachen Waschen mit dH<sub>2</sub>O, EDTA (0,1 M) und dH<sub>2</sub>O.

Prüfung verschiedener Waschbedingungen nach der CuAAC-Reaktion von Matrix-DNA-12b



**Abbildung 83:** Prüfung verschiedener Waschbedingungen nach der CuAAC-Reaktion von **Matrix-DNA-12b**. Bilder der Mobicols mit der **Matrix-DNA-12b** (112, 113) a) vor dem Waschen; nach dem Waschen mit b) dH<sub>2</sub>O; c) EDTA (0,1 M); d) dH<sub>2</sub>O; e) DMF; f) MeOH; g) MeCN; h) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und i) dH<sub>2</sub>O.

### Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs DNA-13a und DNA-13b an der Matrix-DNA-12a



**Abbildung 84:** Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs **DNA-13a** und **DNA-13b** an der **Matrix-DNA-12a**.

Bilder der Mobicols a) mit der **Matrix-DNA-12a** nach der CuAAC-Reaktion; b) nach dem Hybridisieren von **DNA-13b (109)** und **DNA-13a (110)** an die **Matrix-DNA-12a**; c) dem dreifachen Waschen mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$ .

## Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs DNA-13b and die Matrix-DNA-12a in verschiedenen Puffern

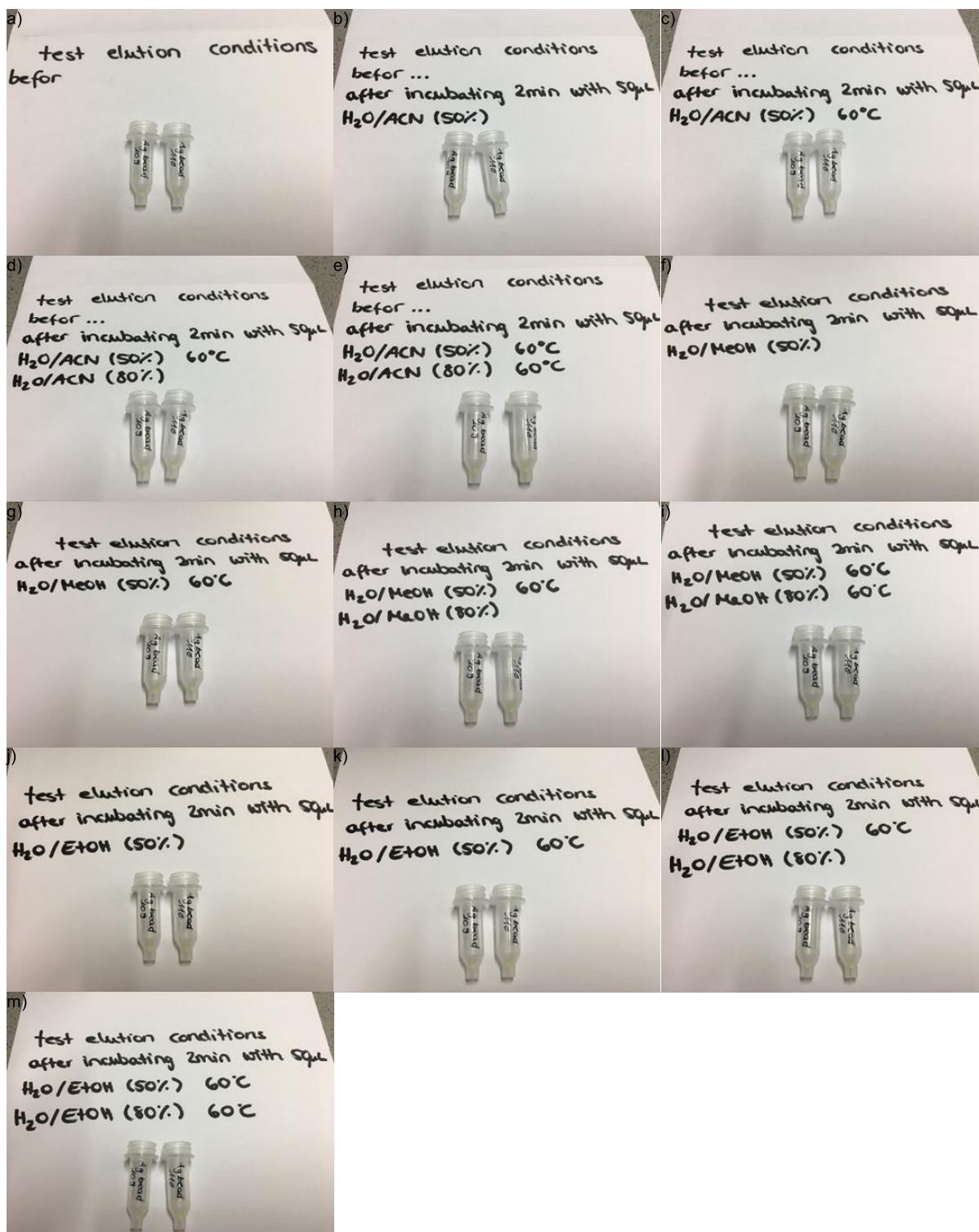


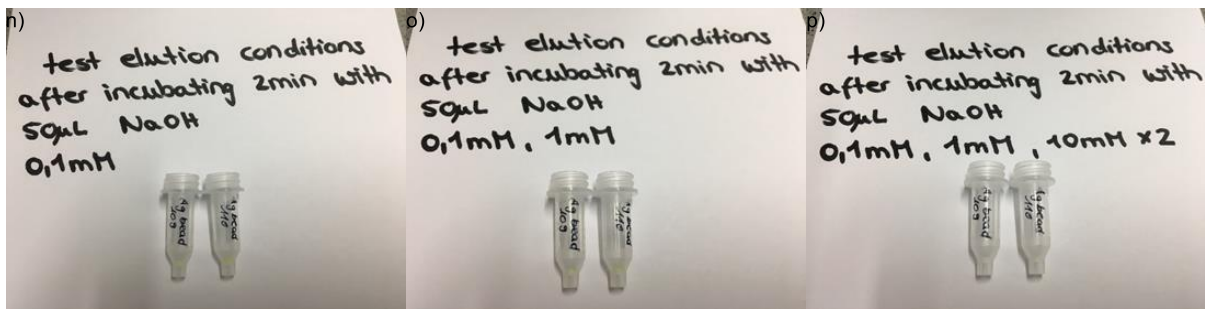
**Abbildung 85:** Hybridisieren eines komplementären DNA-Strangs **DNA-13b** and die **Matrix-DNA-12a** in verschiedenen Puffern.

Bilder der Mobicols mit der **Matrix-DNA-12a** und **Matrix (111)**. a) vor dem Hybridisieren; b) nach der Zugabe von **DNA-13b** zu der **Matrix-DNA-12a** mit dem T4-Ligase Puffer (10-fach, **110**), Hybridisierungs-Puffer (1-fach: **108**, **111**; 10-fach: **109**); c) nach dem Hybridisieren; d) nach dem Waschen mit  $dH_2O$ ; e) nach dem zweifachen Waschen mit  $dH_2O$ ; f) nach dem Waschen mit EDTA (0,1 M); g) nach dem Waschen mit  $dH_2O$ ; h) nach dem Waschen mit DMF; i) nach dem Waschen mit MeOH; j) nach dem Waschen mit MeCN; k) nach dem Waschen mit  $CH_2Cl_2$ ; l) nach dem Waschen mit  $dH_2O$ .



Prüfung verschiedener Elutionsbedingungen nach der Hybridisierung von DNA-13b an Matrix-DNA-12a



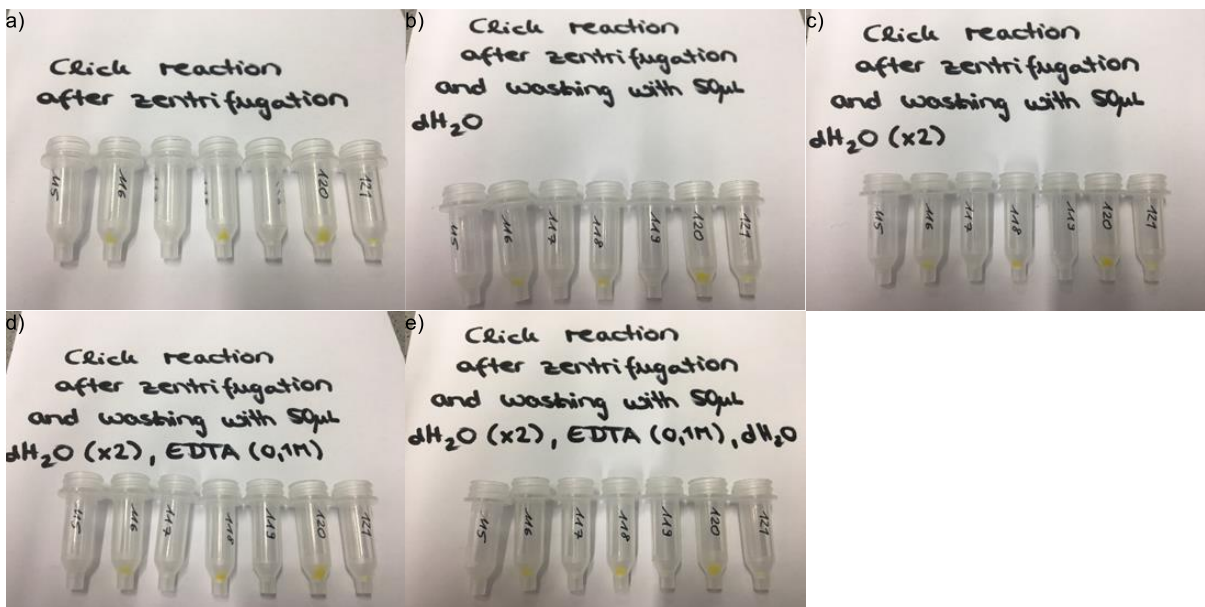


**Abbildung 86:** Prüfung verschiedener Elutionsbedingungen nach der Hybridisierung von **DNA-13b** an **Matrix-DNA-12a**.

Bilder der Mobicols mit der **Matrix-DNA-12a** a) nach dem Hybridisieren und Waschen von **DNA-13b** mit dem T4-Ligase Puffer (10-fach, **110**) und Hybridisierungs-Puffer (10-fach: **109**). Die Elution erfolgte durch die Inkubation (2 min) mit b) - e)  $dH_2O$  : MeCN (50 % oder 80 % org. Lösungsmittel) bei Raumtemperatur und 60 °C; f) - i)  $dH_2O$  : MeOH (50 % oder 80 % org. Lösungsmittel) bei Raumtemperatur und 60 °C; j) - m)  $dH_2O$  : EtOH (50 % oder 80 % org. Lösungsmittel) bei Raumtemperatur und 60 °C; n) - p) wässriger NaOH-Lösung (0,1 mM, 1 mM, 10 mM).

### Optimierung der Affinitäts-Aufreinigung

#### **CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b**



**Abbildung 87:** CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b**.

Bilder der Mobicols mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** (115-121) hergestellt mit den Bedingungen in **Tabelle 32** a) nach dem Waschen; nach dem Waschen mit b)  $dH_2O$ ; c)  $dH_2O$ ; d) EDTA (0,1 M); e)  $dH_2O$ .

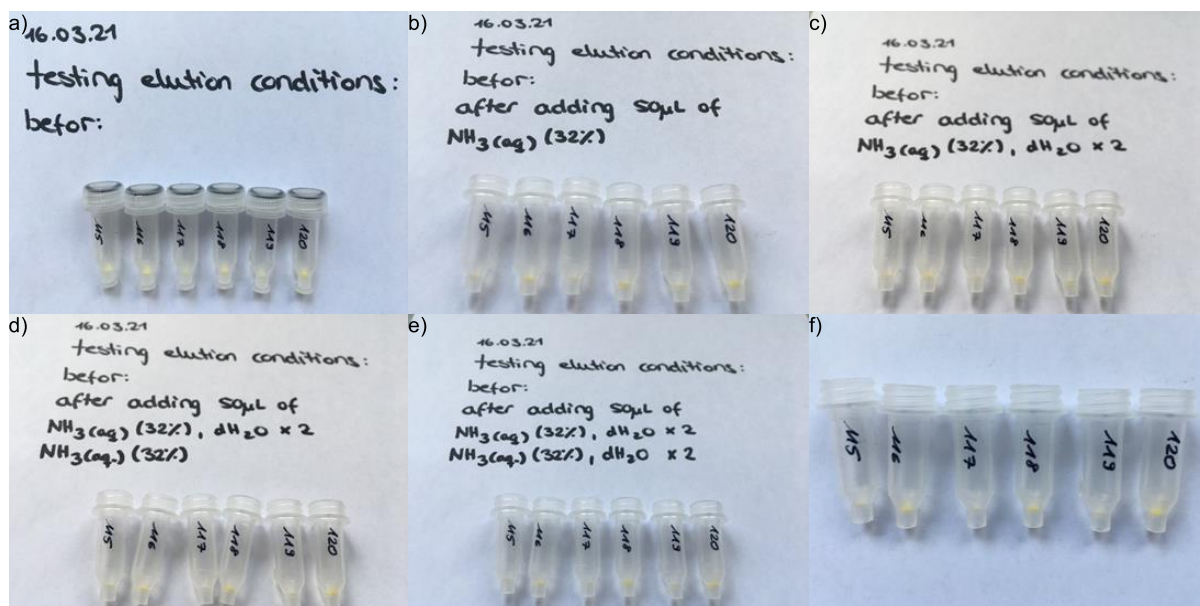
## Prüfung verschieden konzentrierter wässriger NaOH-Lösungen für die Elution von DNA-13b



**Abbildung 88:** Prüfung verschieden konzentrierter wässriger NaOH-Lösungen für die Elution von DNA-13b. Bilder der Mobicols mit der Matrix-DNA-12a/12b (115-121) hergestellt mit den Bedingungen in Tabelle 32 a) vor der Elution und nach der Inkubation (2 min) mit b) - d) wässriger NaOH-Lösung (1 mM); e) - g) wässriger NaOH-Lösung (5 mM); h) - j) wässriger NaOH-Lösung (10 mM); k) - m) wässriger NaOH-Lösung (100 mM).

**Tabelle 42:** Mittelwerte der UV-Vis-Absorption der Elution von **DNA-13b** mit verschieden konzentrierter wässriger NaOH-Lösung.

Eintrag	wässrige NaOH-Lösung	1 mM	5 mM	10 mM	100 mM	1 M
	<b>115</b>		0,23	0,06	0,07	0,44
<b>116</b>		0,25	0,08	0,11	0,36	0,15
<b>117</b>		0,13	0,08	0,03	0,80	0,32
<b>118</b>		0,54	0,03	0,40	0,74	0,11
<b>119</b>		0,54	0,05	0,03	1,31	0,22
<b>120</b>		0,56	0,39	0,04	0,17	0,26
<b>121</b>		0,61	0,19	0,09	0,04	0,13

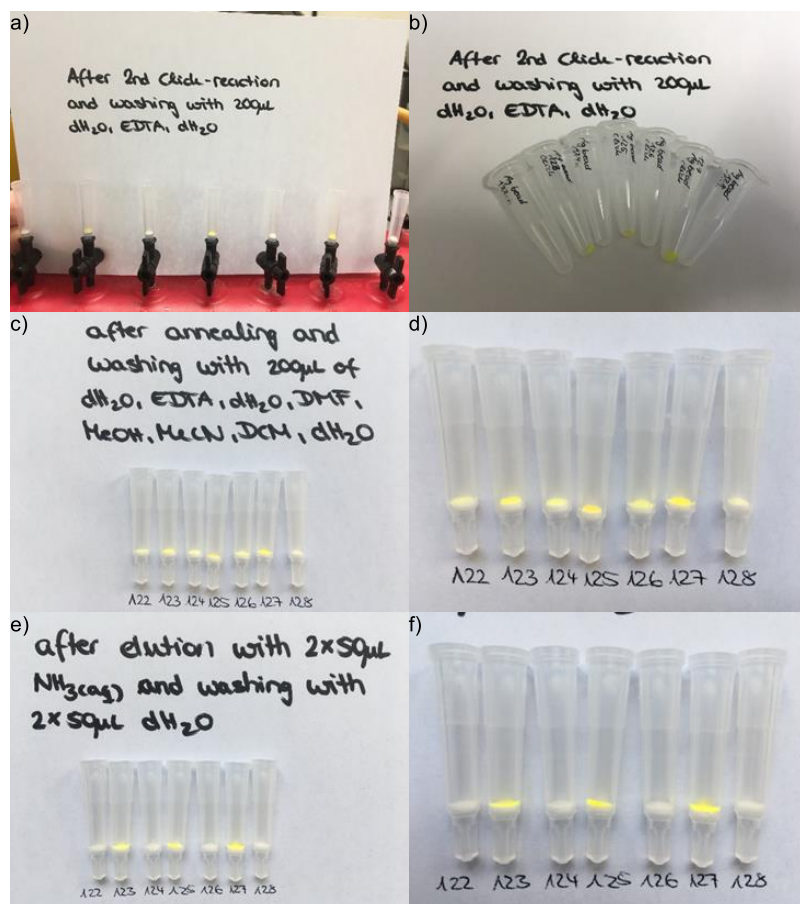
**Prüfung einer wässrigen Ammoniak-Lösung für die Elution von DNA-13b****Abbildung 89:** Prüfung einer wässrigen Ammoniak-Lösung für die Elution von **DNA-13b**.

Bilder der Mobicols mit der **Matrix-DNA-12a/-12b** (115-120) hergestellt mit den Bedingungen in **Tabelle 32 a)** vor der Elution und nach der Inkubation (2 min) mit b) wässriger Ammoniak-Lösung (32 %); c) mit nachfolgendem Wachsen mit  $dH_2O$ ; d) wässriger Ammoniak-Lösung (32 %); e) mit nachfolgendem Wachsen mit  $dH_2O$ ; f) nach der Elution.

**Tabelle 43:** Mittelwerte der UV-Vis-Absorption der Elution von **DNA-13b** mit einfacher und zweifacher wässriger Ammoniak-Lösung.

wässrige $NH_3$ -Lösung	Eintrag	<b>115</b>	<b>116</b>	<b>117</b>	<b>118</b>	<b>119</b>	<b>120</b>
	1 x 50 $\mu L$		1,20	1,49	1,15	1,28	1,05
2 x 50 $\mu L$		0,29	0,23	0,46	0,37	0,31	0,32

### CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und DNA-12a/-12b und einmalige Wiederholung der CuAAC-Reaktion



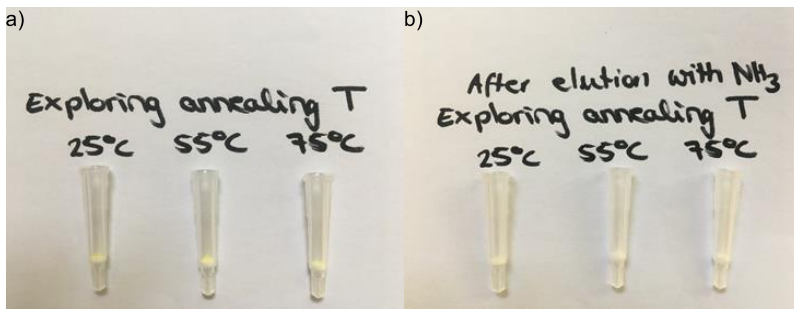
**Abbildung 90:** CuAAC-Reaktion: Variation der Menge an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** und einmalige Wiederholung der CuAAC-Reaktion.

Bilder der Mobicols mit der **Matrix-DNA-12a/-12b (122-128)** hergestellt mit den Bedingungen in **Tabelle 33 a)** nach der zweiten CuAAC-Reaktion und dem Waschen mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M) und  $dH_2O$ ; b) und dem transfer in ein neues Reaktionsgefäß; c) und d) nach dem Hybridisieren mit **DNA-13b** und Waschen mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$ ; e) und f) nach der Elution (2 x 2 min) mit wässriger Ammoniak-Lösung (32 %) und  $dH_2O$ .

**Tabelle 44:** Mittelwerte der UV-Vis-Absorption der Elution von **DNA-13b** mit zweifacher wässriger Ammoniak-Lösung mit Variation der Menge an Agarose-Matrix und **DNA-12a/-12b** und einmalige Wiederholung der CuAAC-Reaktion (siehe **Tabelle 33**).

Eintrag	122	123	124	125	126	127	128
$\bar{E}_{260 \text{ nm}}$	1,58	1,60	1,57	1,21	1,99	1,80	0,42

### Variation der Hybridisierungstemperatur



**Abbildung 91:** Variation der Hybridisierungstemperatur.

Bilder der Filtersäulen mit **Matrix-DNA-12a/-12b** nach der Hybridisierung von **DNA-13b** bei den Temperaturen 25 °C, 55 °C und 75 °C und a) nach dem Waschen mit  $dH_2O$ , EDTA (0,1 M),  $dH_2O$ , DMF, MeOH, MeCN,  $CH_2Cl_2$  und  $dH_2O$  und b) nach der Elution (2 x 2 min) mit wässriger Ammoniak-Lösung (32 %) und  $dH_2O$ .

## Copolymer-vermittelte DNA-kodierte Molekülbibliothek

### Computer-gestützte Auswahl der Molekülbausteine und Generierung der DNA-Barcodes

#### KNIME®-Arbeitsablauf für die Auswahl geeigneter Molekülbausteine

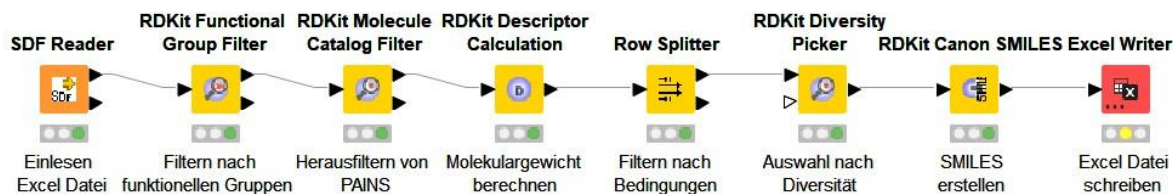


Abbildung 92: KNIME®-Arbeitsablauf für die Auswahl geeigneter Molekülbausteine.

#### Generierung der DNA-Barcodes

##### String dissimilarity measure

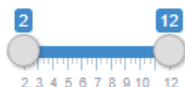
- Hamming distance
- Levenshtein distance

Properties of the to be generated sequences:

Lengths of the wanted sequences, seperated by commas

8

Minimum and maximum string dissimilarity measure



Amount of sequences (min. 1, same for each length)

500

Adding optional constraints:

Maximum quantity of the base Guanin (G) within one sequence

4

Maximum quantity of the base Adenin (A) within one sequence

4

Maximum quantity of the base Thymin (T) within one sequence

4

Maximum quantity of the base Cytosin (C) within one sequence

4

Maximum length of a part of the sequence containing only the base Guanin (G)

2

Maximum length of a part of the sequence containing only the base Adenin (A)

2

Maximum length of a part of the sequence containing only the base Thymin (T)

2

Maximum length of a part of the sequence containing only the base Cytosin (C)

2

Abbildung 93: Einstellungen des Programms *SequenceGenerator* zur Generierung von DNA-Barcodes für die Molekülbausteine der Copolymer-vermittelten DNA-kodierten Molekülbibliothek.

**Zyklus 1****Auflistung der kodierten Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren 64a und 64d - aa**

**Tabelle 45:** Amidsynthese der 25 verschiedenen Aldehyd-funktionalisierten Carbonsäuren **64a** und **64d - aa** an die **DNA-19** und der dazugehörige DNA-Barcode mit dem Mittelwert der gemessenen Absorption der aufgereinigten DNA-Konjugate.

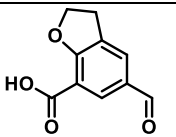
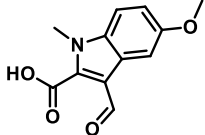
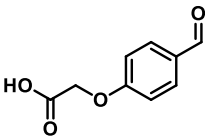
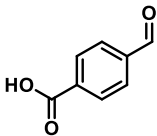
Aldehyd-funktionalisierte Carbonsäure	Produkt	DNA-Barcode / (5' -CTCT - XXXXXXXX - ACCT -3')	$\bar{E}_{260 \text{ nm}}$	
	<b>DNA-20a</b>	CTCTCAAC	61,7	
	<b>DNA-20b</b>	CTTCTCTC	54,4	
	<b>DNA-20c</b>	CCTAATTC	61,9	
	<b>DNA-20d</b>	TAACTTCA	61,7	
	<b>DNA-20e</b>	CACCATCA	41,0	
	<b>DNA-20f</b>	TTAATTCC	51,8	
	<b>DNA-20g</b>	TTCACATT	n.d.	
	<b>DNA-20h</b>	TTTATACC	52,2	
	<b>DNA-20i</b>	CTCCAATC	55,1	



## Fortsetzung Tabelle 45

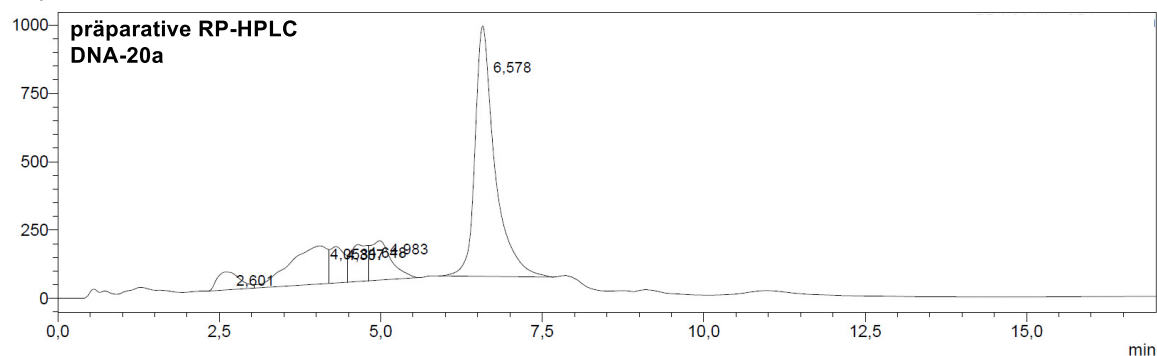
64o		DNA-20j	TCTTCCAC	40,7
64p		DNA-20k	CTATTACC	41,7
64f		DNA-20l	TATCACAC	56,1
64q		DNA-20m	AACTCCAC	45,2
64r		DNA-20n	CTTCACTA	36,0
64s		DNA-20o	CCAACTAT	35,8
64t		DNA-20p	ACCATCCA	35,4
64u		DNA-20q	TTAATCCT	44,2
64v		DNA-20r	ACACTTCA	49,6
64w		DNA-20s	TAACATCT	49,2
64x		DNA-20t	CTACACTT	44,3
64y		DNA-20u	TAATCTTC	15,1

## Fortsetzung Tabelle 45

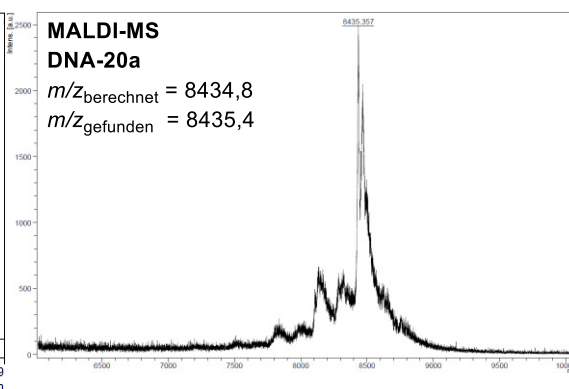
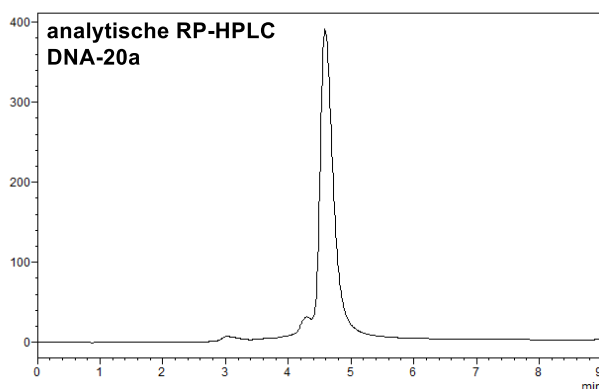
64z		DNA-20v	AACCTCCT	13,9
64aa		DNA-20w	ATCCACCA	44,1
64a		DNA-20x	TTCTATAA	50,6
64g		DNA-20y	TATTCCTC	51,8

## DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-20a - y

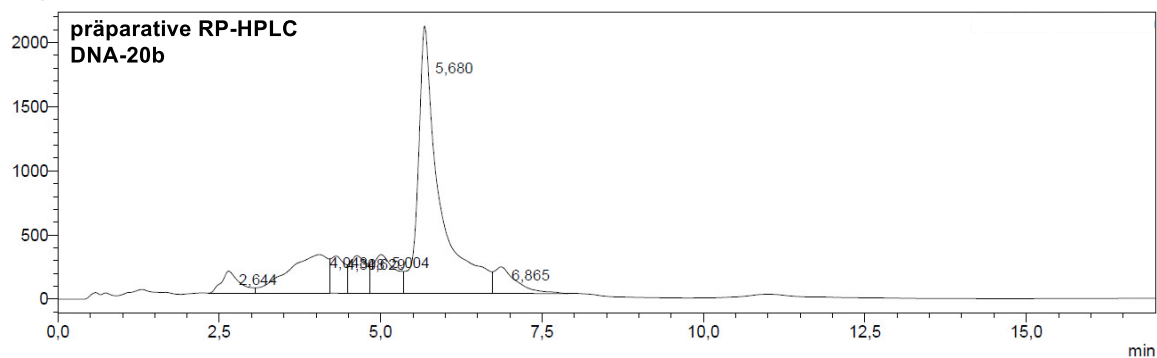
mAU a)



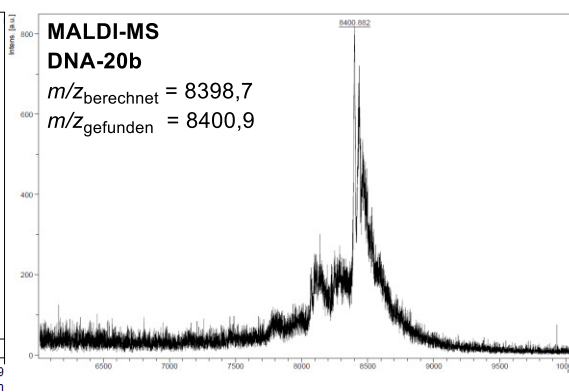
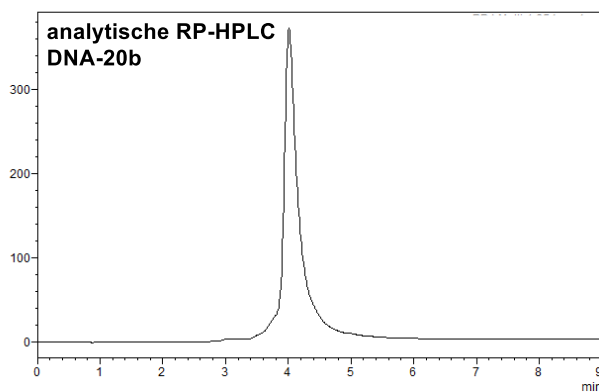
mAU



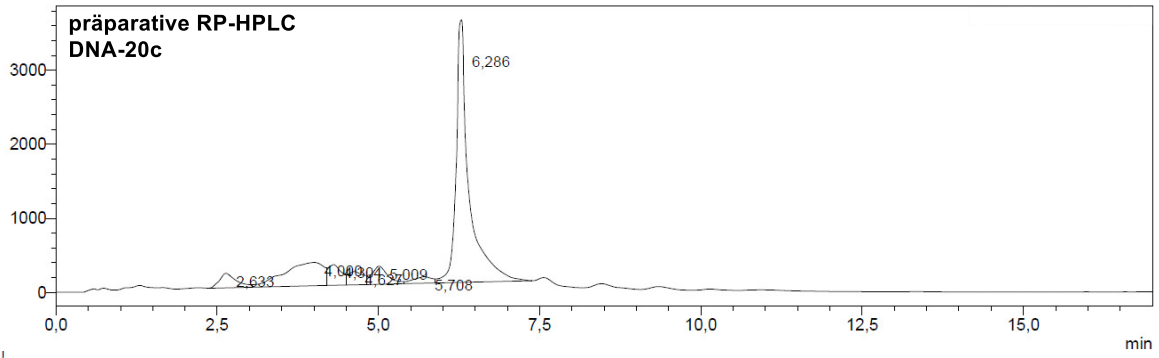
mAU b)



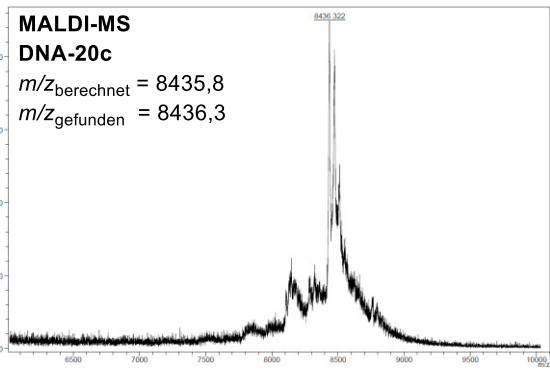
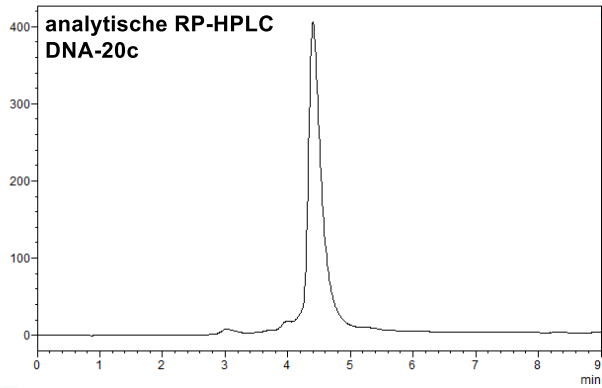
mAU



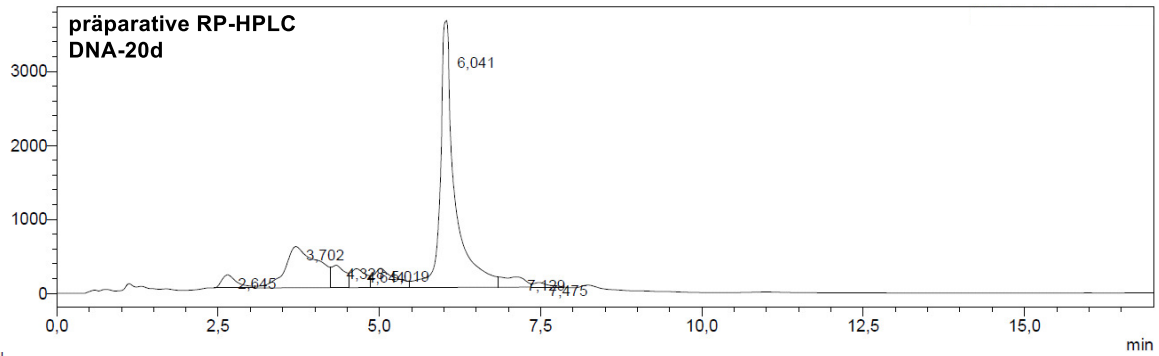
mAU c)



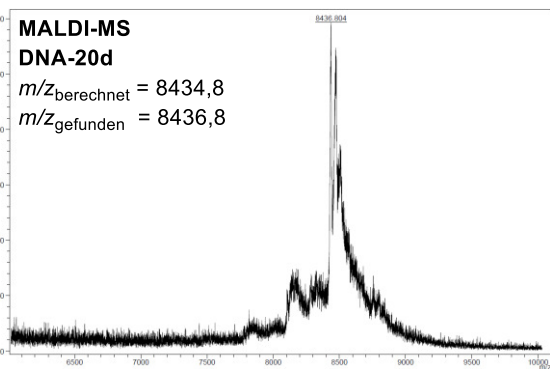
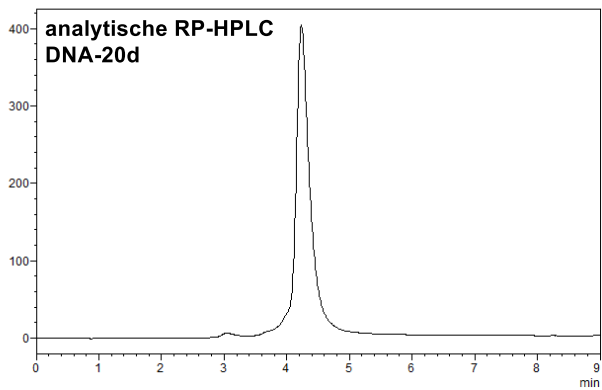
mAU



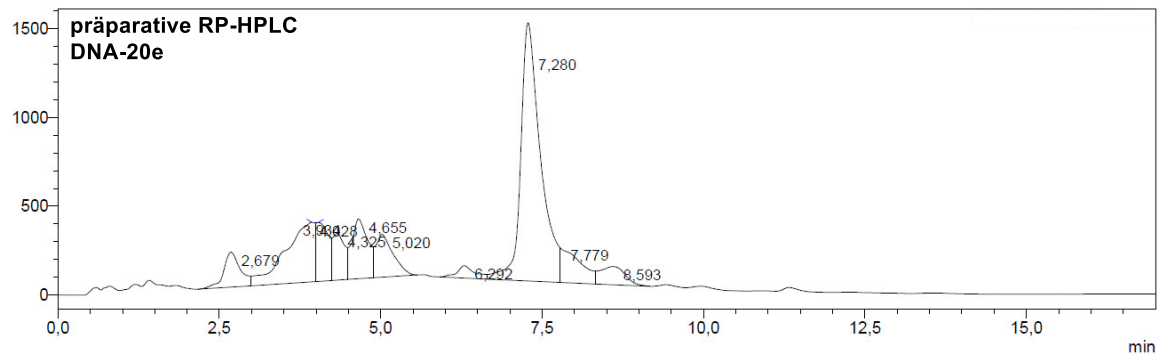
mAU d)



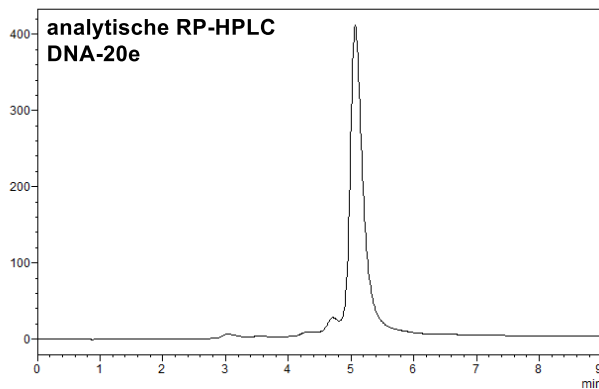
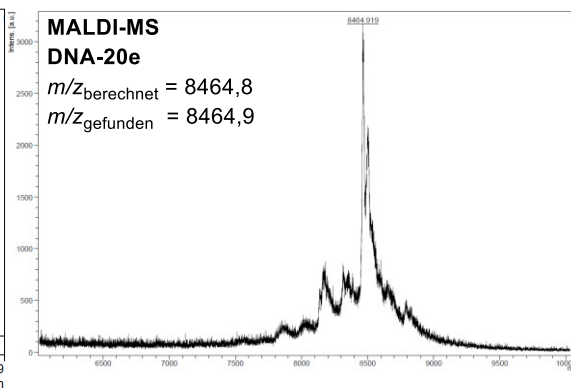
mAU



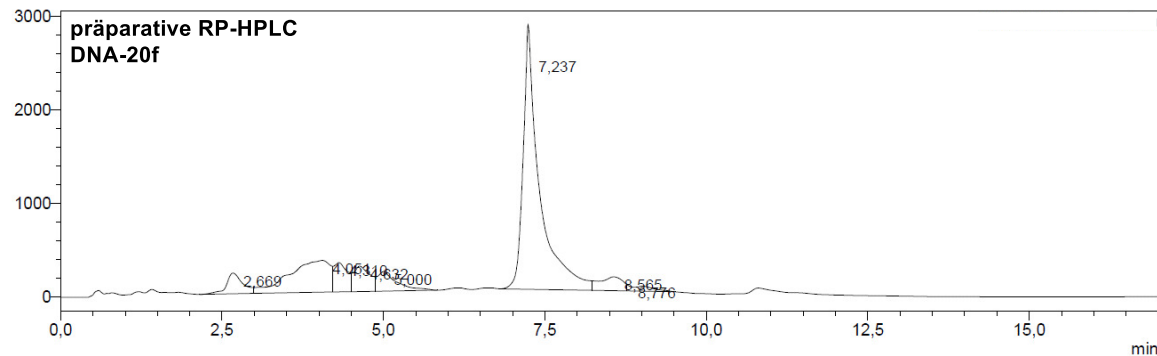
mAU e)



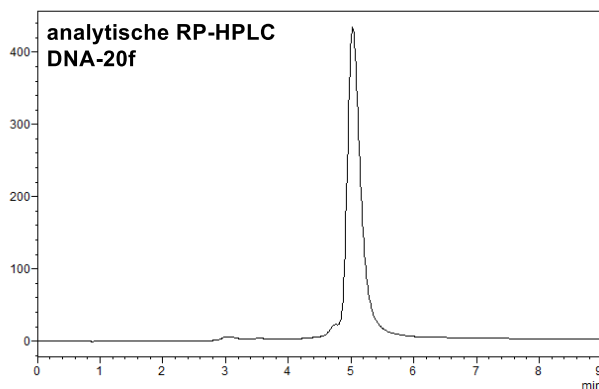
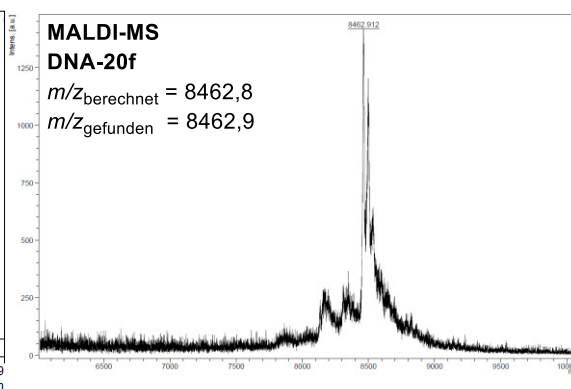
mAU

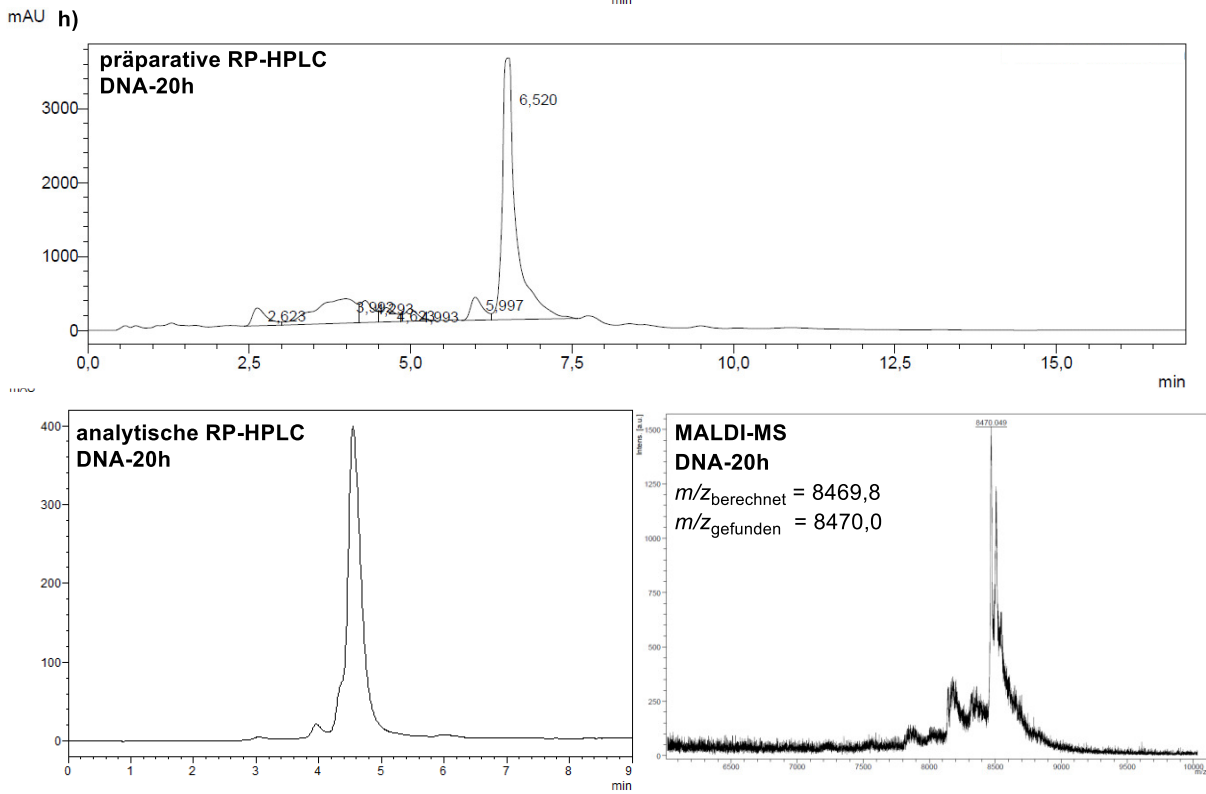
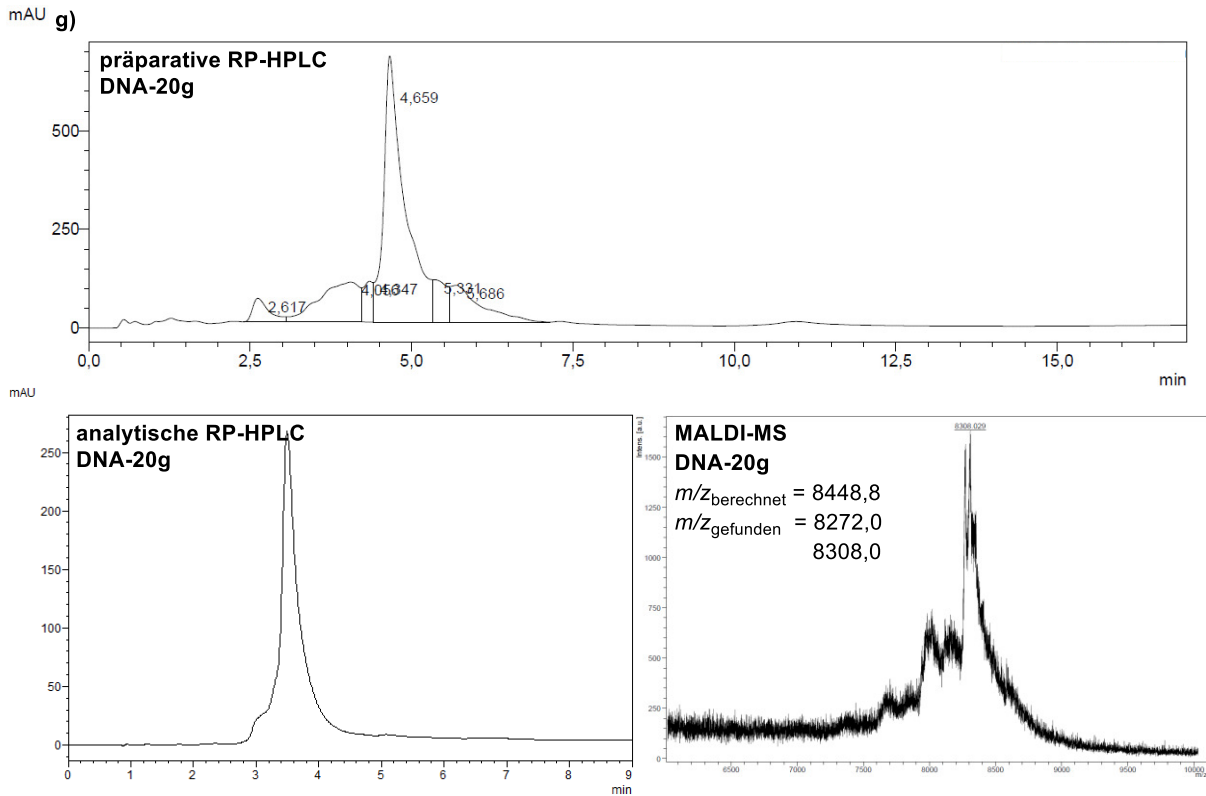
**MALDI-MS  
DNA-20e** $m/z_{\text{berechnet}} = 8464,8$   
 $m/z_{\text{gefunden}} = 8464,9$ 

mAU f)

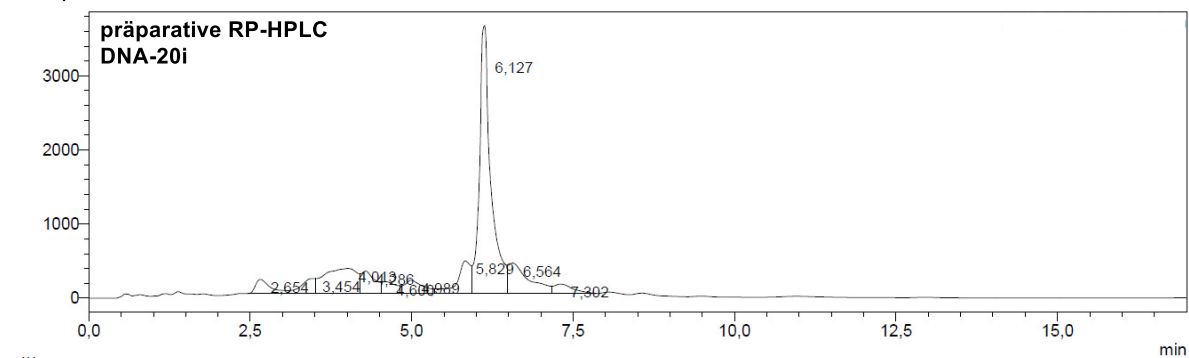


mAU

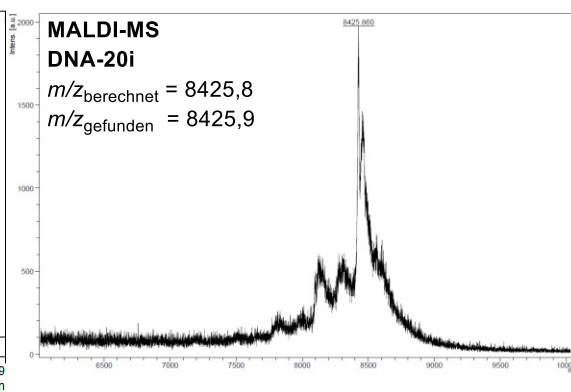
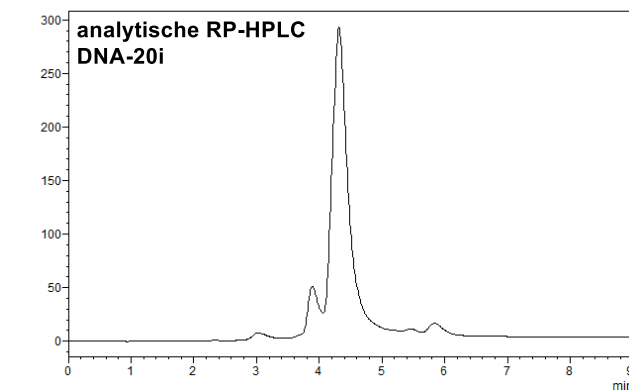
**MALDI-MS  
DNA-20f** $m/z_{\text{berechnet}} = 8462,8$   
 $m/z_{\text{gefunden}} = 8462,9$ 



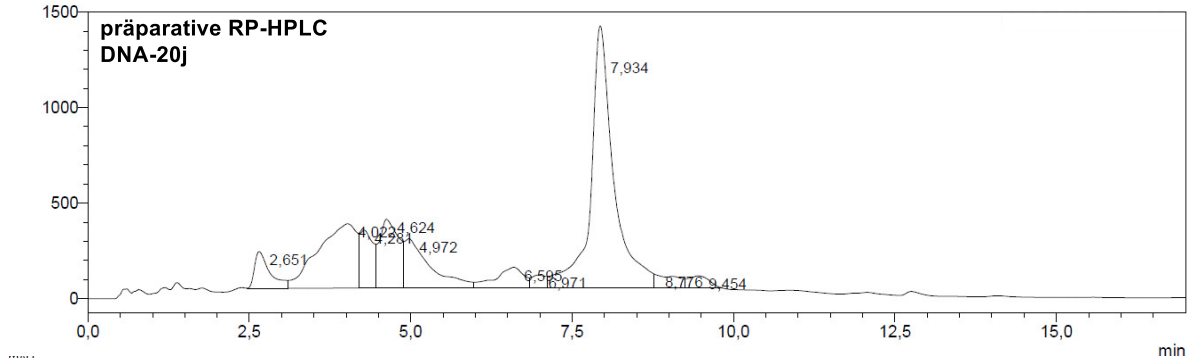
mAU i)



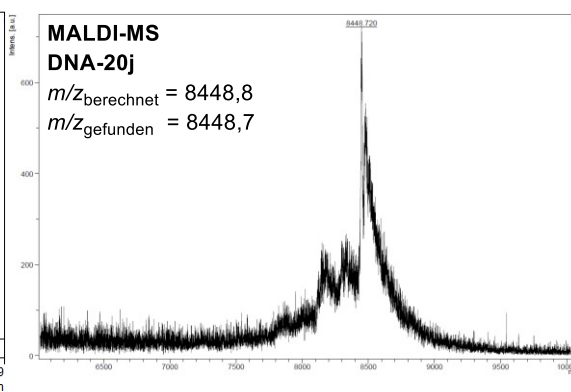
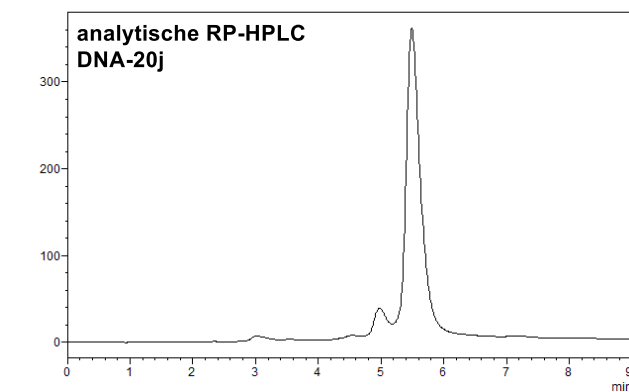
mAU



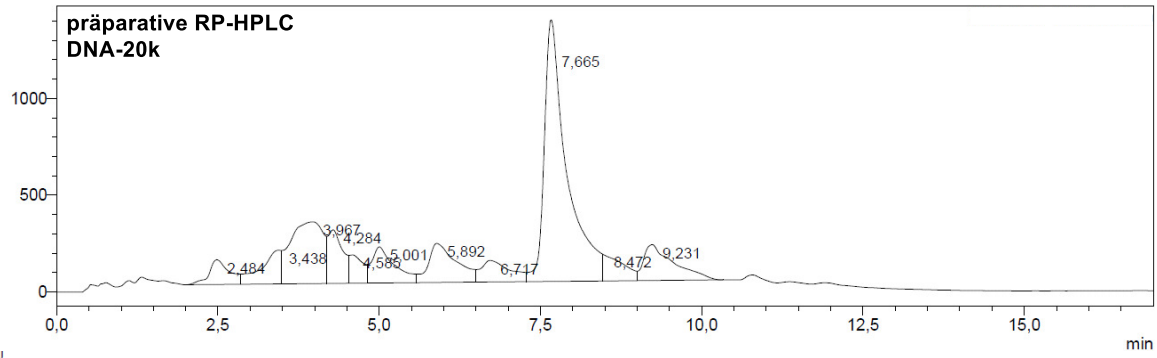
mAU j)



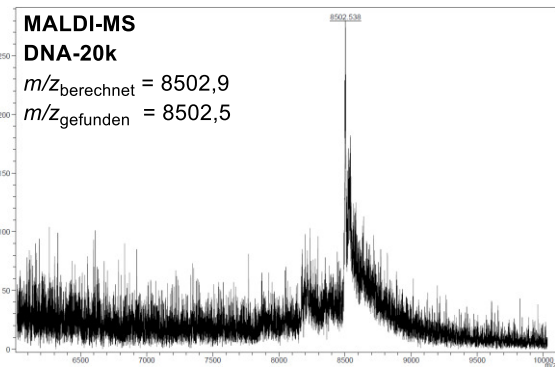
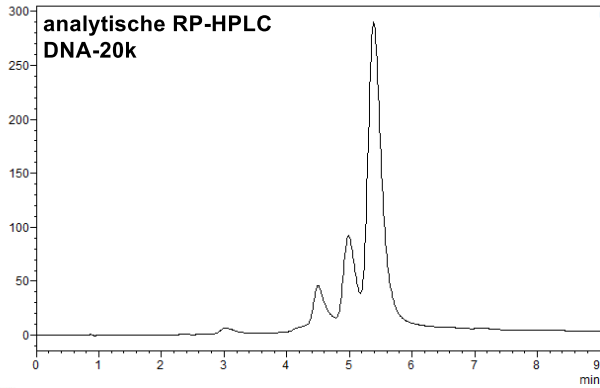
mAU



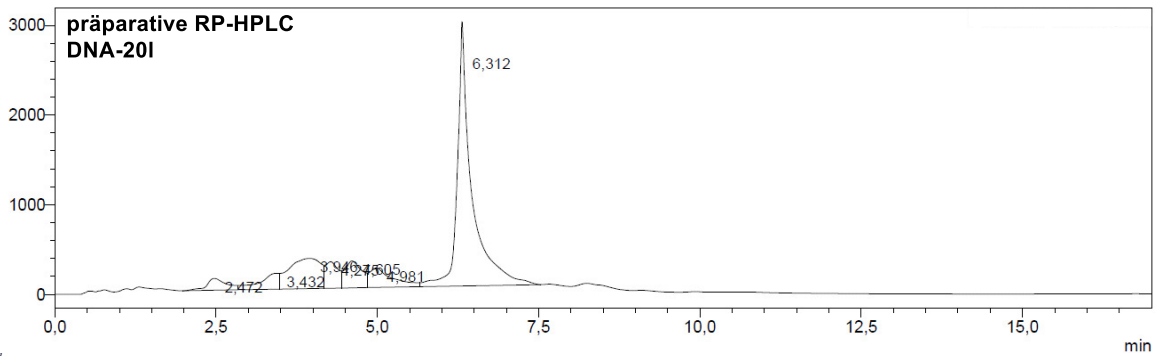
mAU **k)**



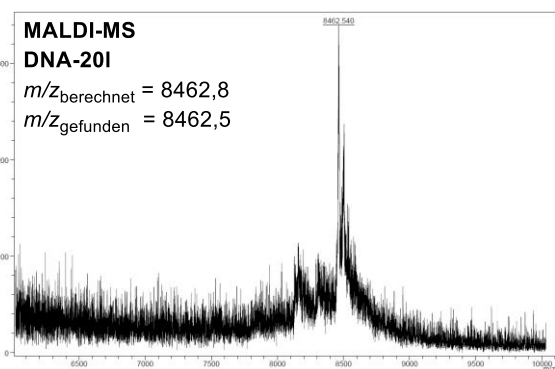
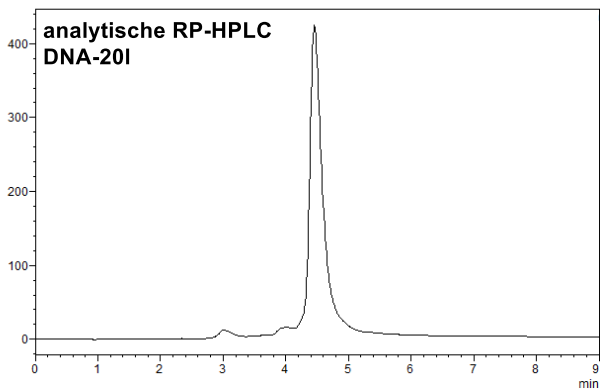
mAU



mAU **l)**

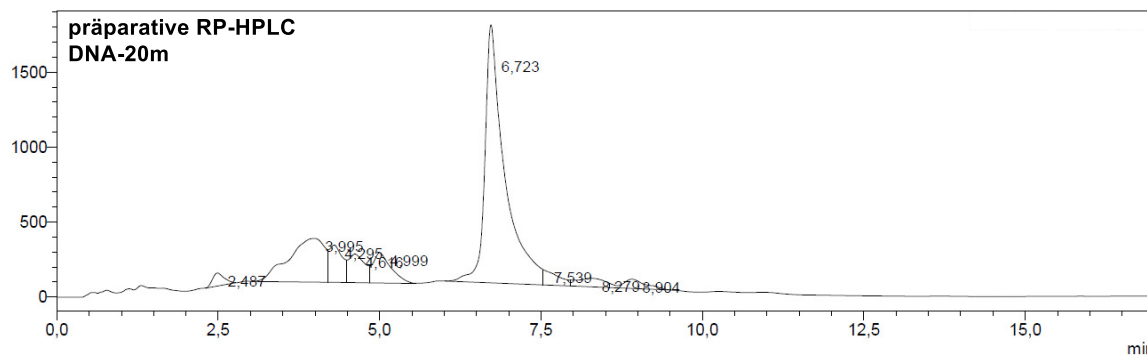


mAU

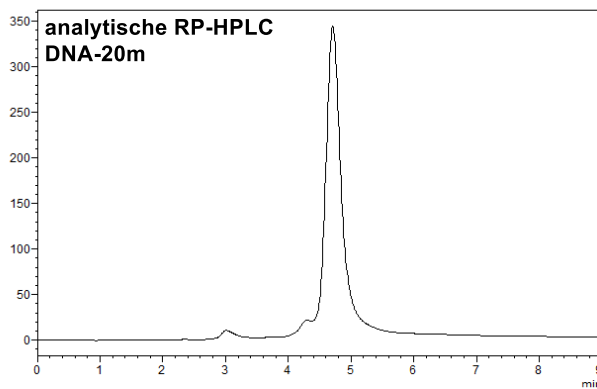
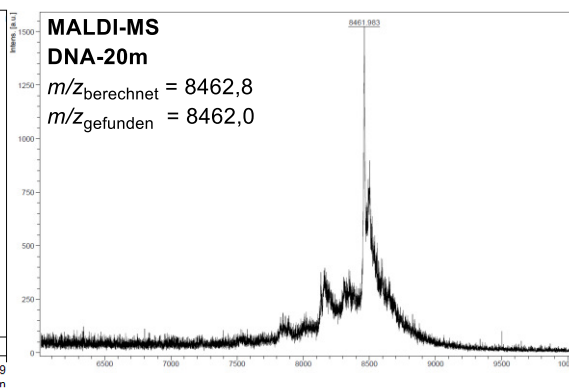




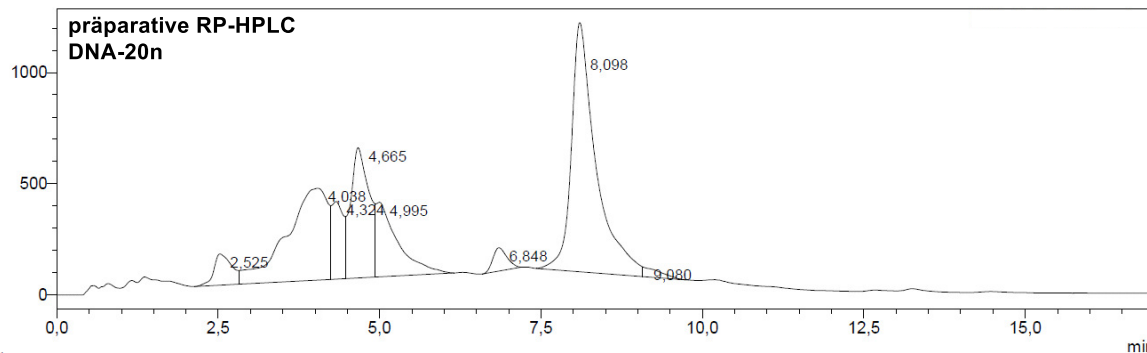
mAU m)



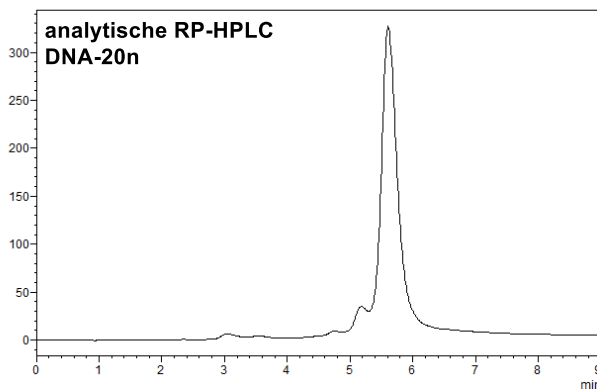
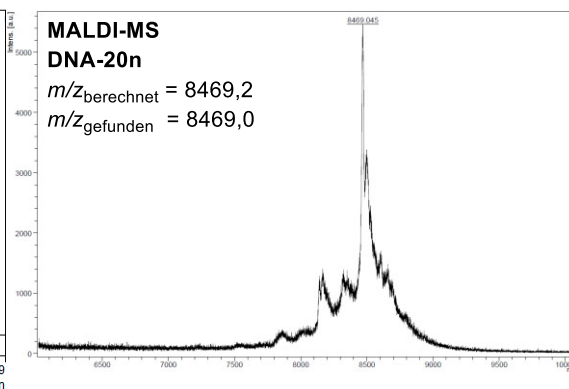
mAU

**MALDI-MS  
DNA-20m** $m/z_{\text{berechnet}} = 8462,8$  $m/z_{\text{gefunden}} = 8462,0$ 

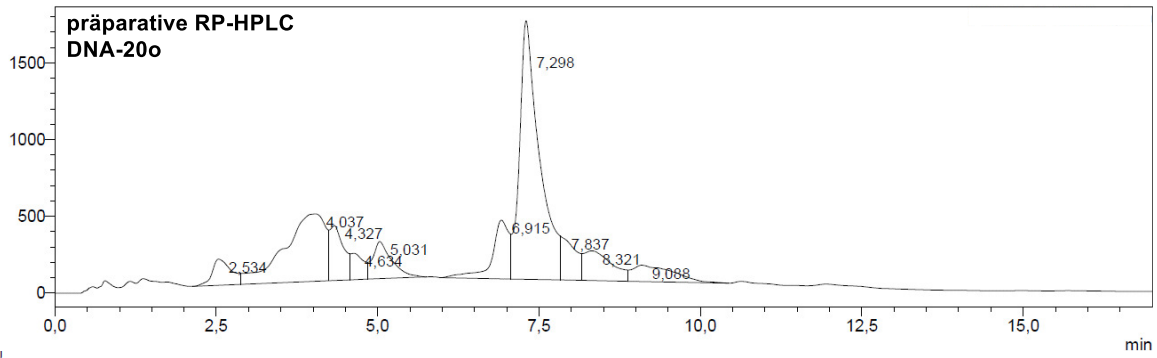
mAU n)



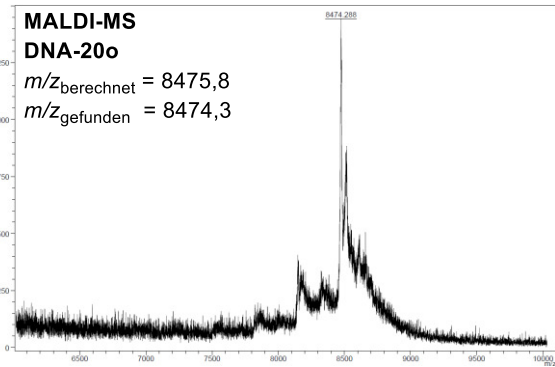
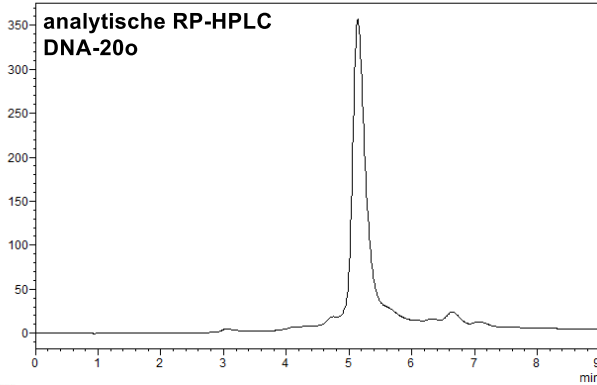
mAU

**MALDI-MS  
DNA-20n** $m/z_{\text{berechnet}} = 8469,2$  $m/z_{\text{gefunden}} = 8469,0$ 

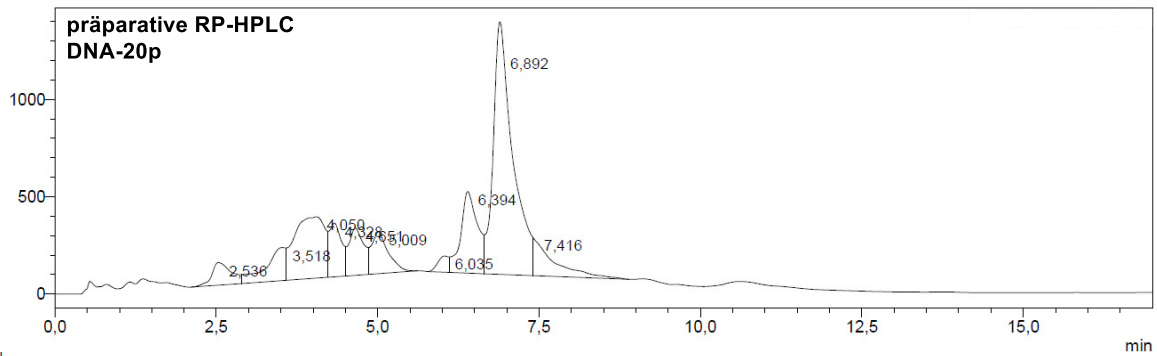
mAU o)



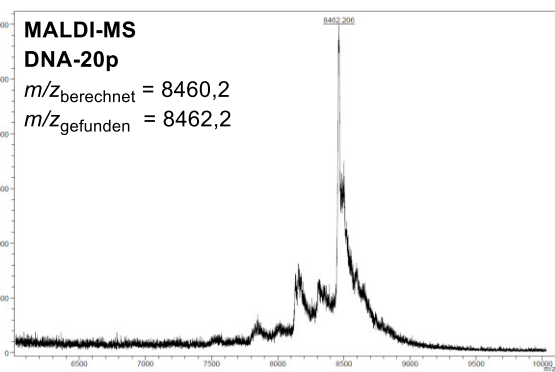
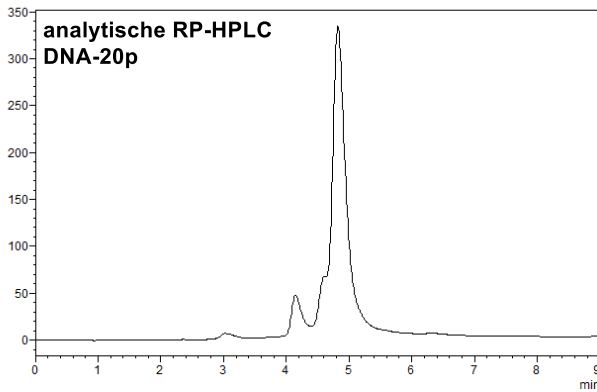
mAU

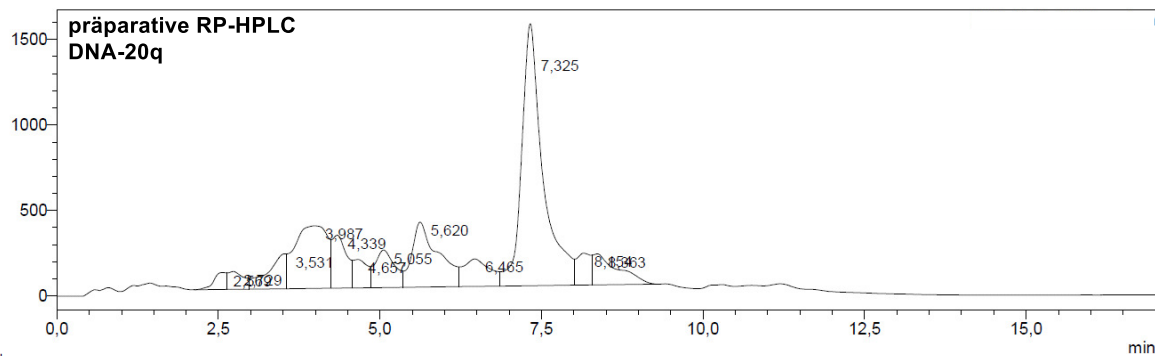


mAU p)

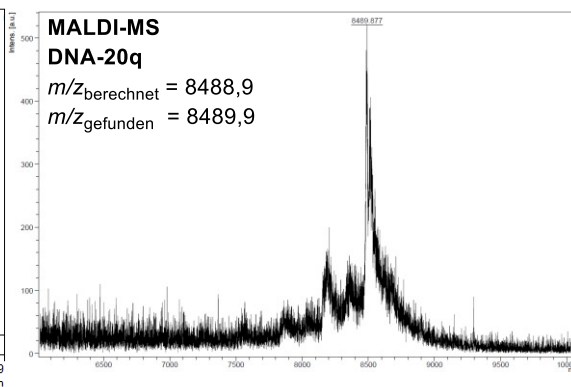
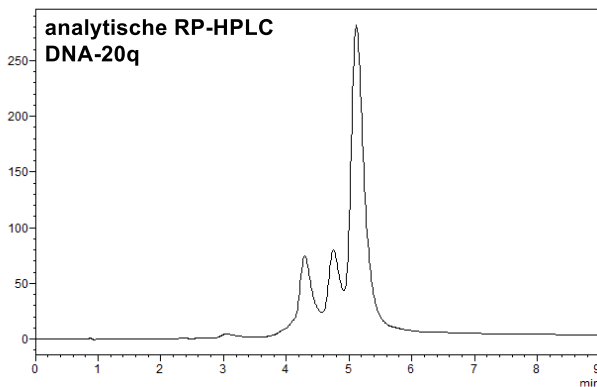
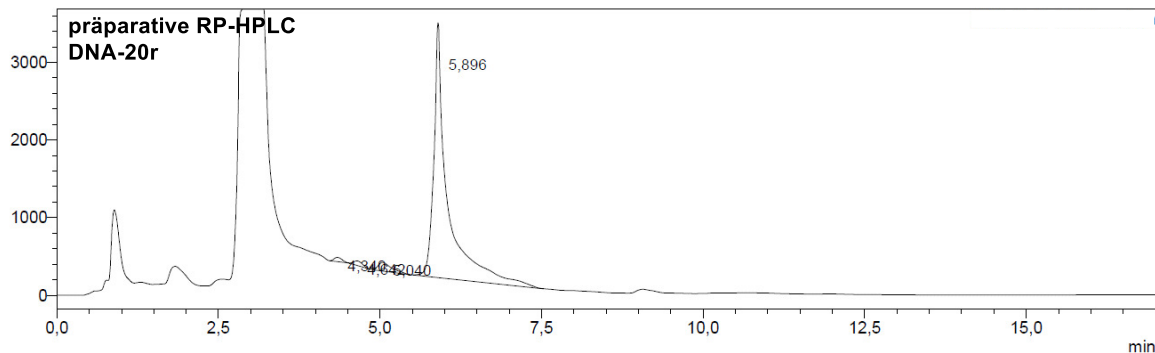


mAU

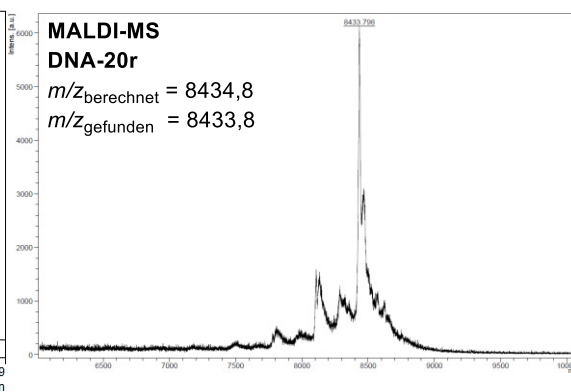
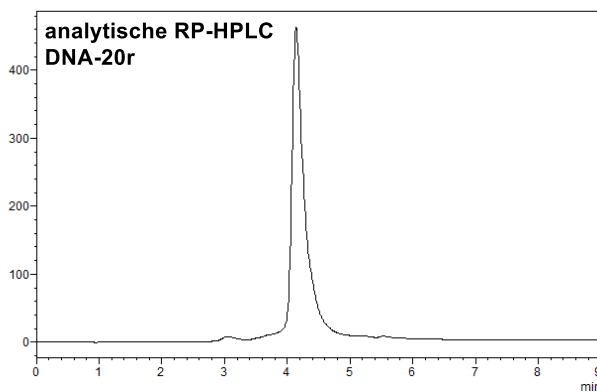


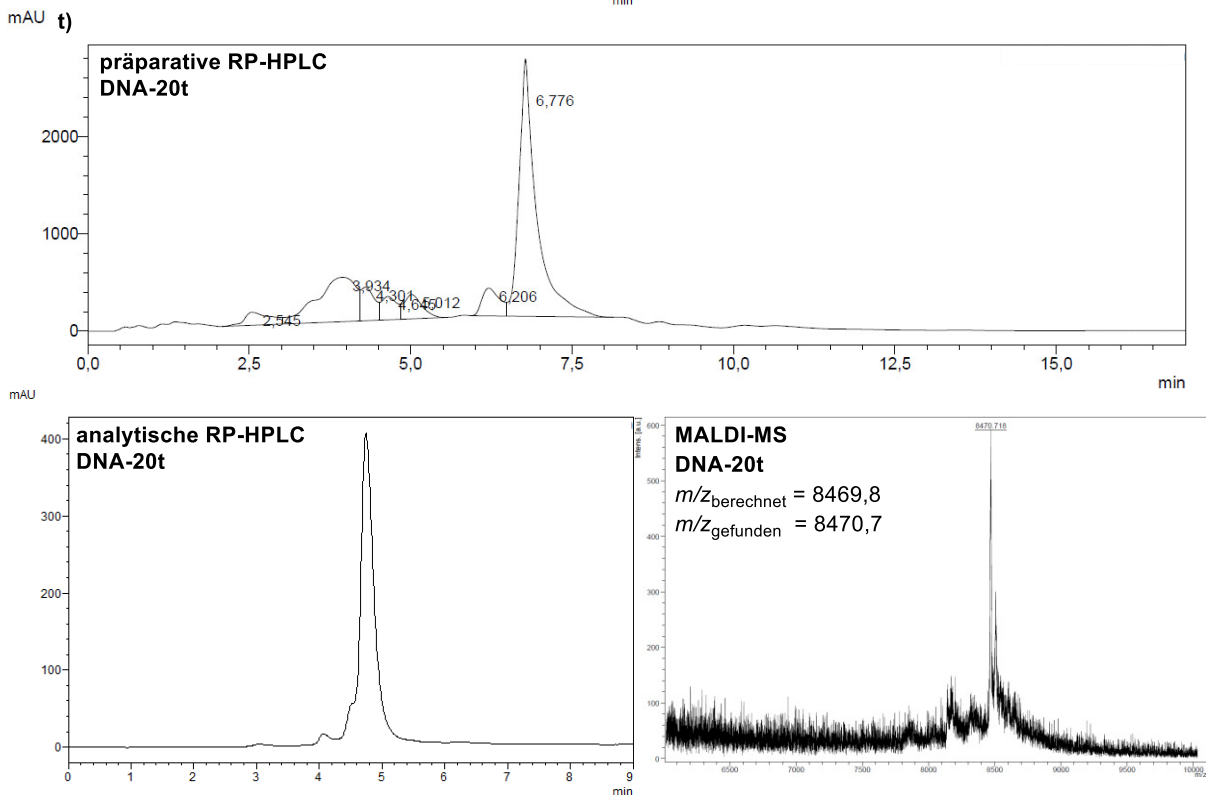
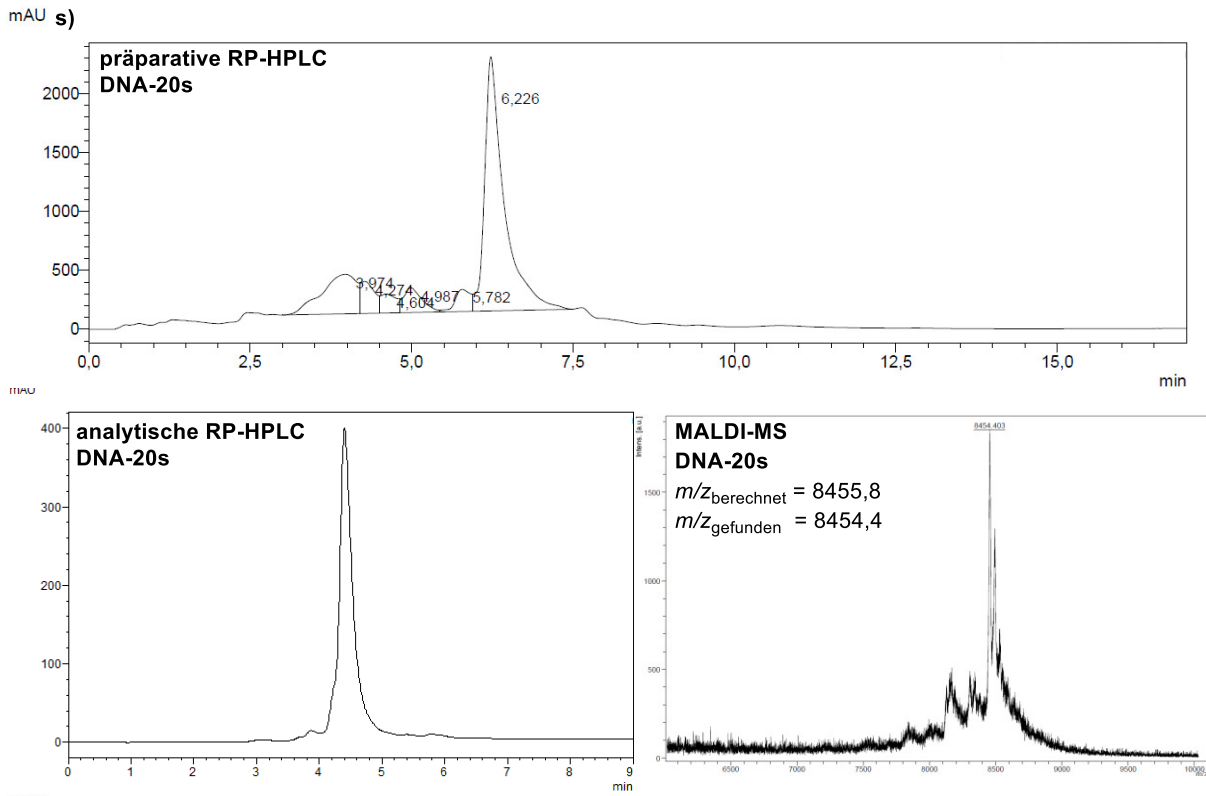
mAU **q)**

mAU

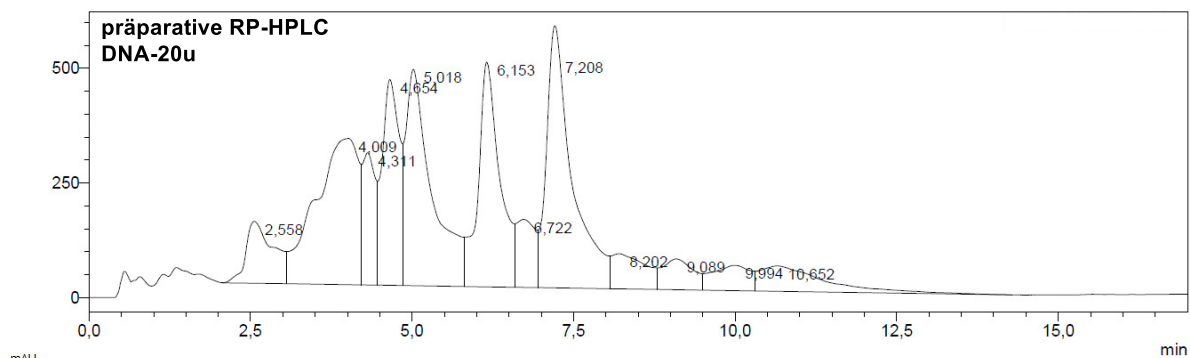
mAU **r)**

mAU

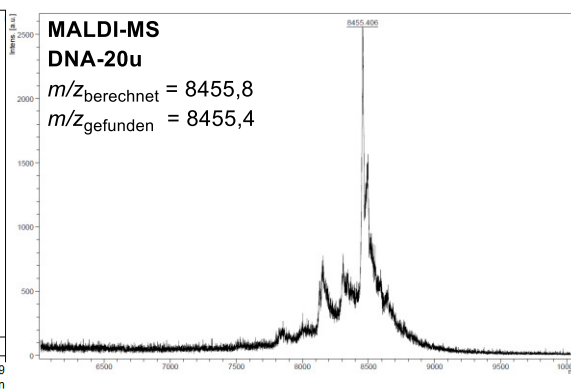
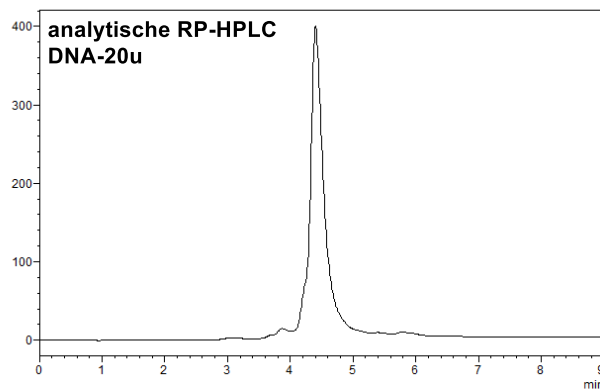




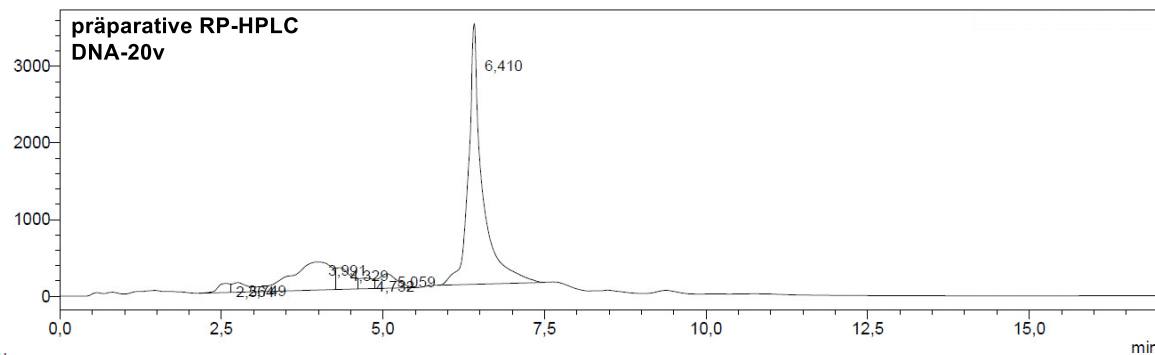
mAU u)



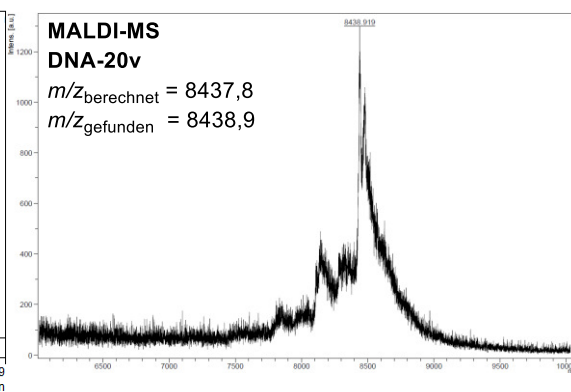
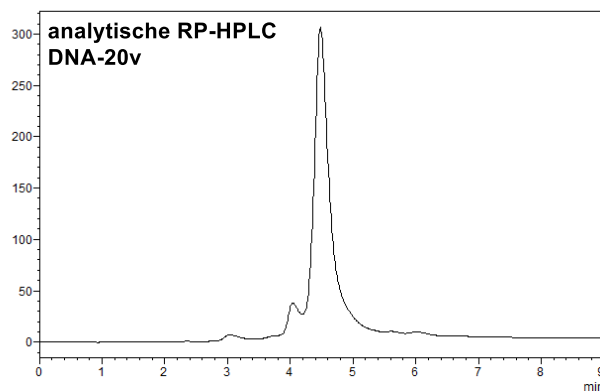
mAU



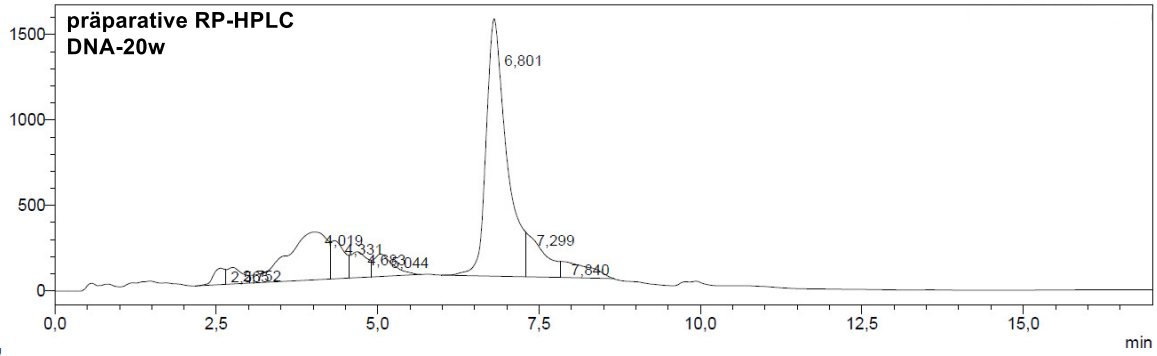
mAU v)



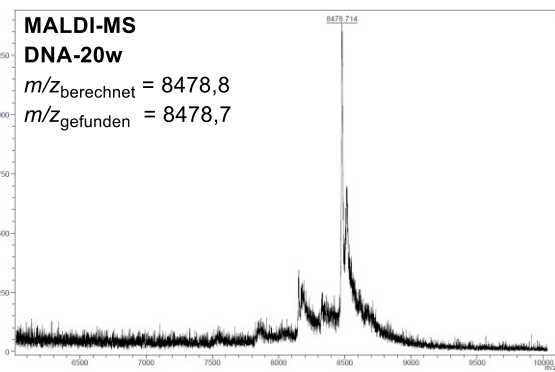
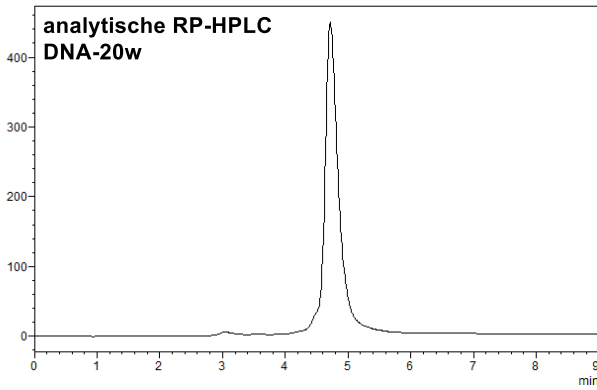
mAU



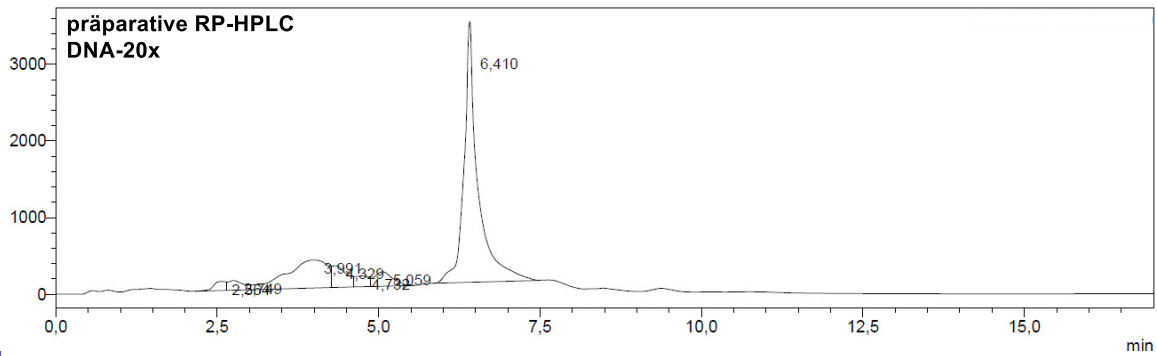
mAU w)



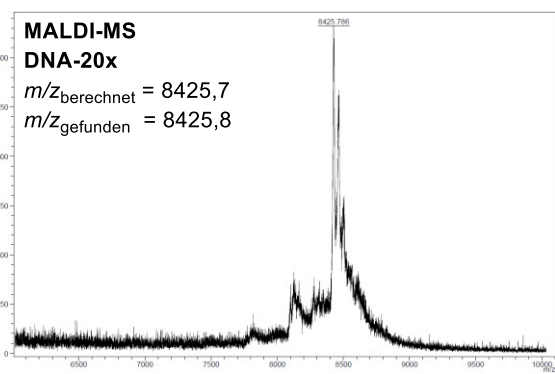
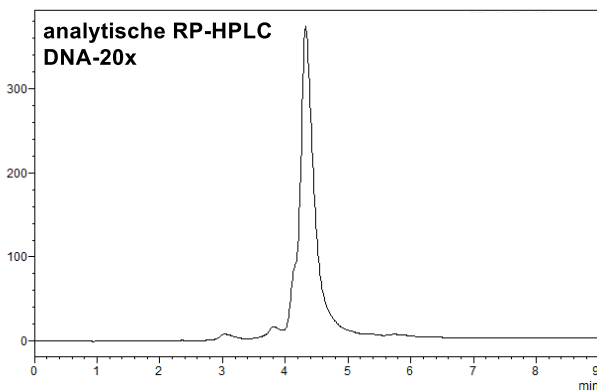
mAU

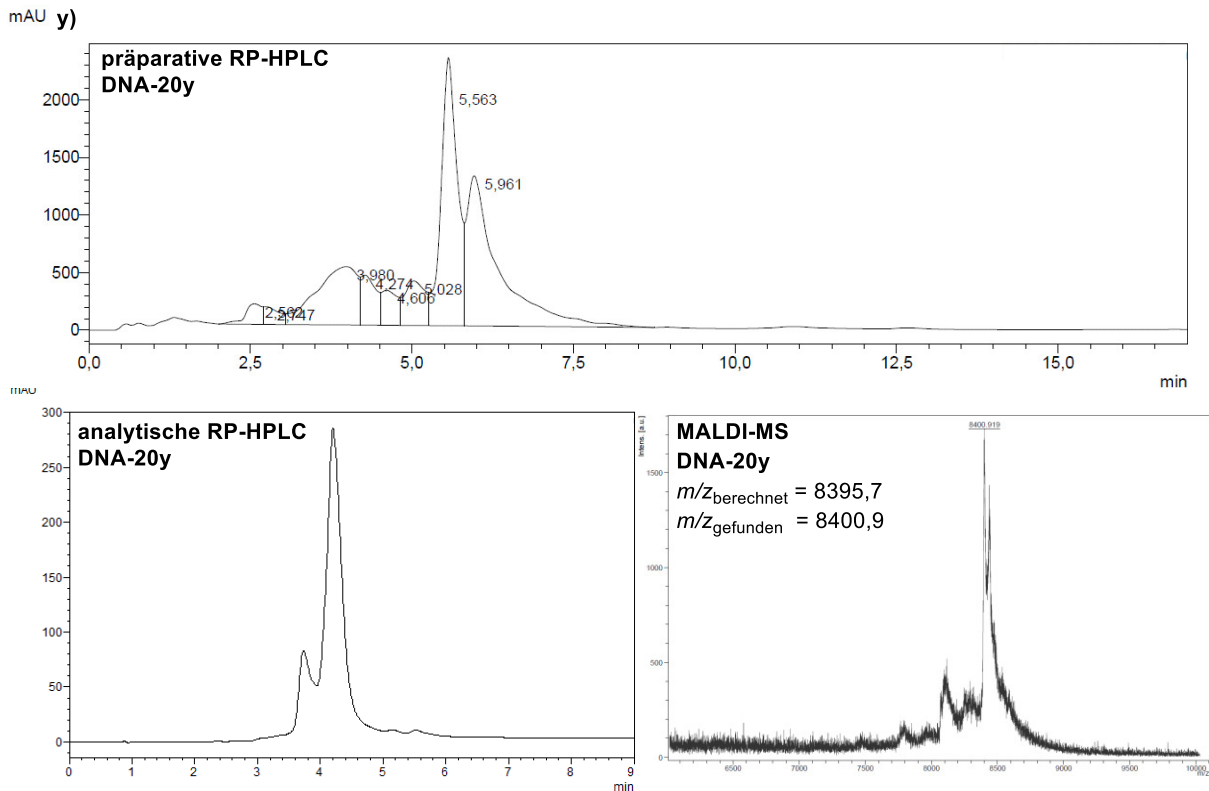


mAU x)



mAU

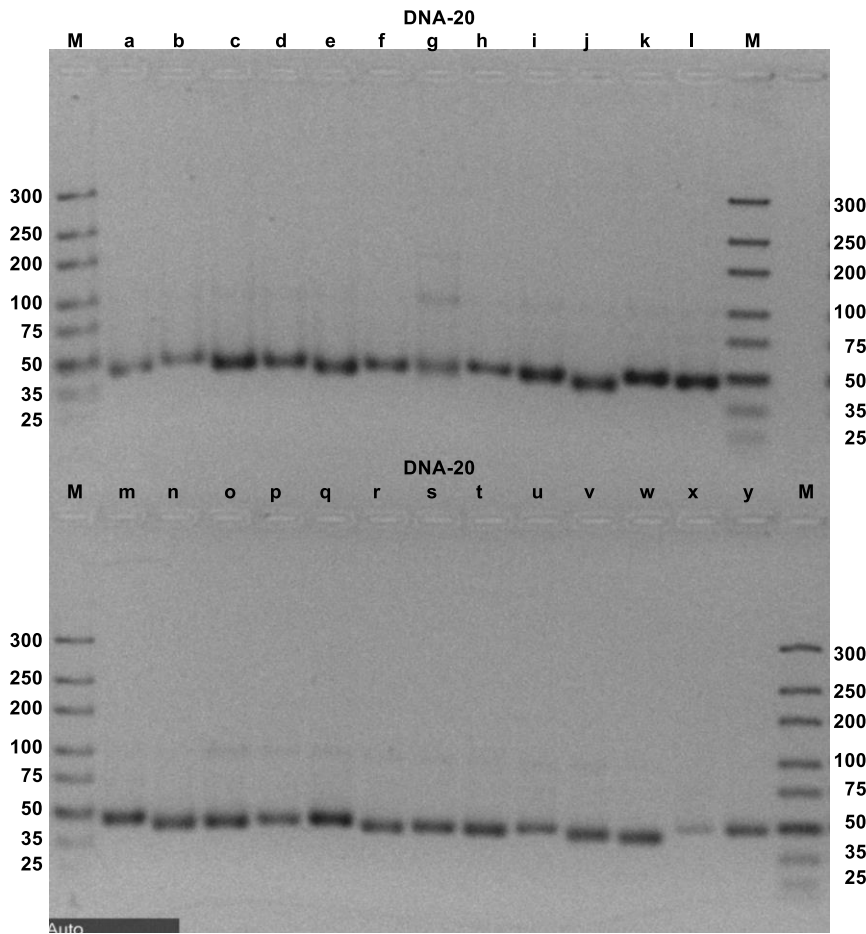




**Abbildung 94:** Analyse der DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-20a - y** des ersten Synthesesyklus der MiDEL-Synthese (siehe **Anhang Tabelle 45**).

Präparative HPLC (oben), analytische HPLC (unten, links) und MALDI-MS (unten, rechts) des a) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20a**; b) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20b**; c) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20c**; d) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20d**; e) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20e**; f) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20f**; g) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20g**; h) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20h**; i) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20i**; j) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20j**; k) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20k**; l) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20l**; m) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20m**; n) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20n**; o) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20o**; p) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20p**; q) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20q**; r) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20r**; s) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20s**; t) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20t**; u) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20u**; v) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20v**; w) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20w**; x) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20x**; y) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-20y**.

**Enzymatische Ligation der DNA-Aldehyd-Konjugate DNA-20a - y**

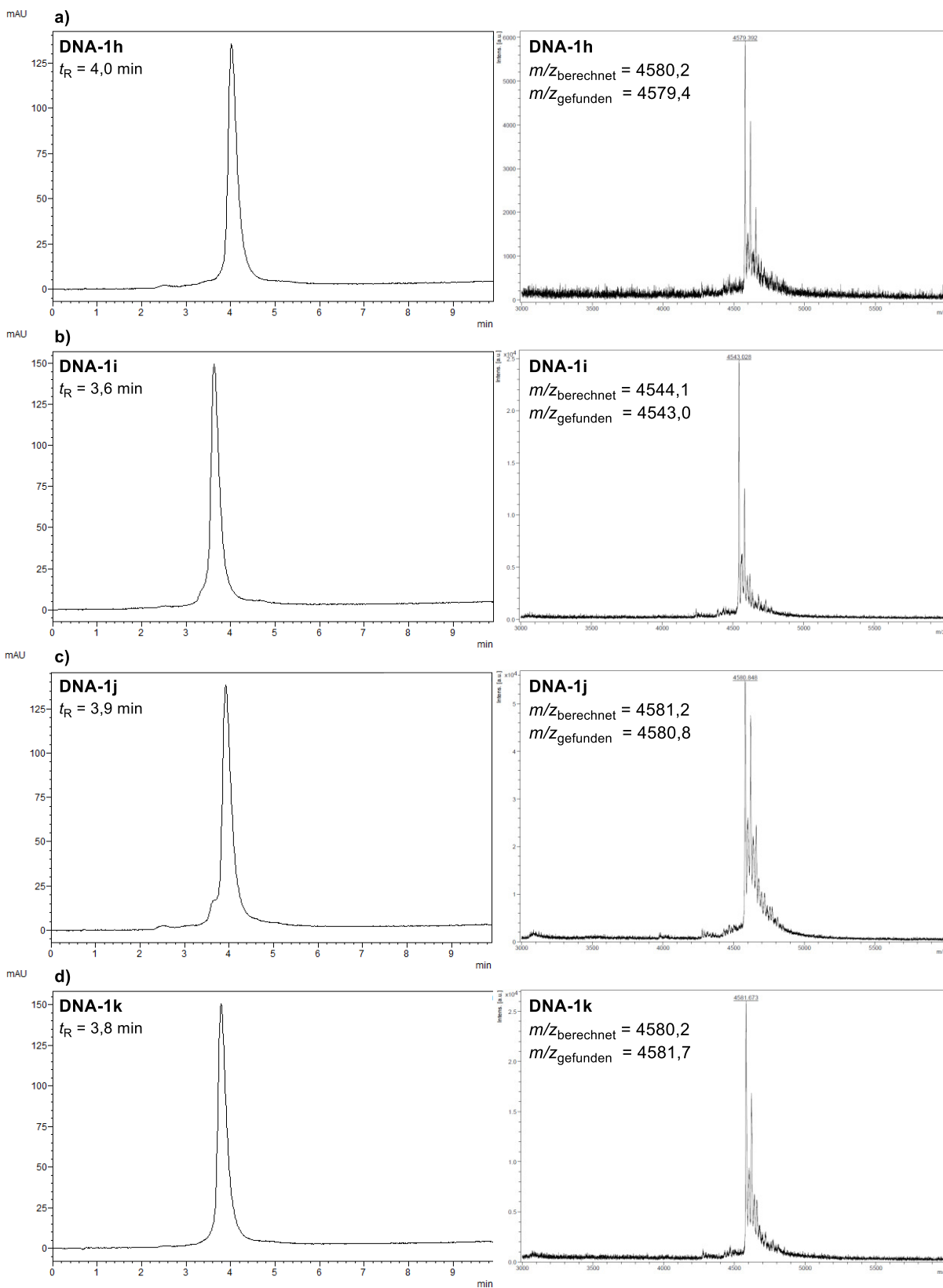


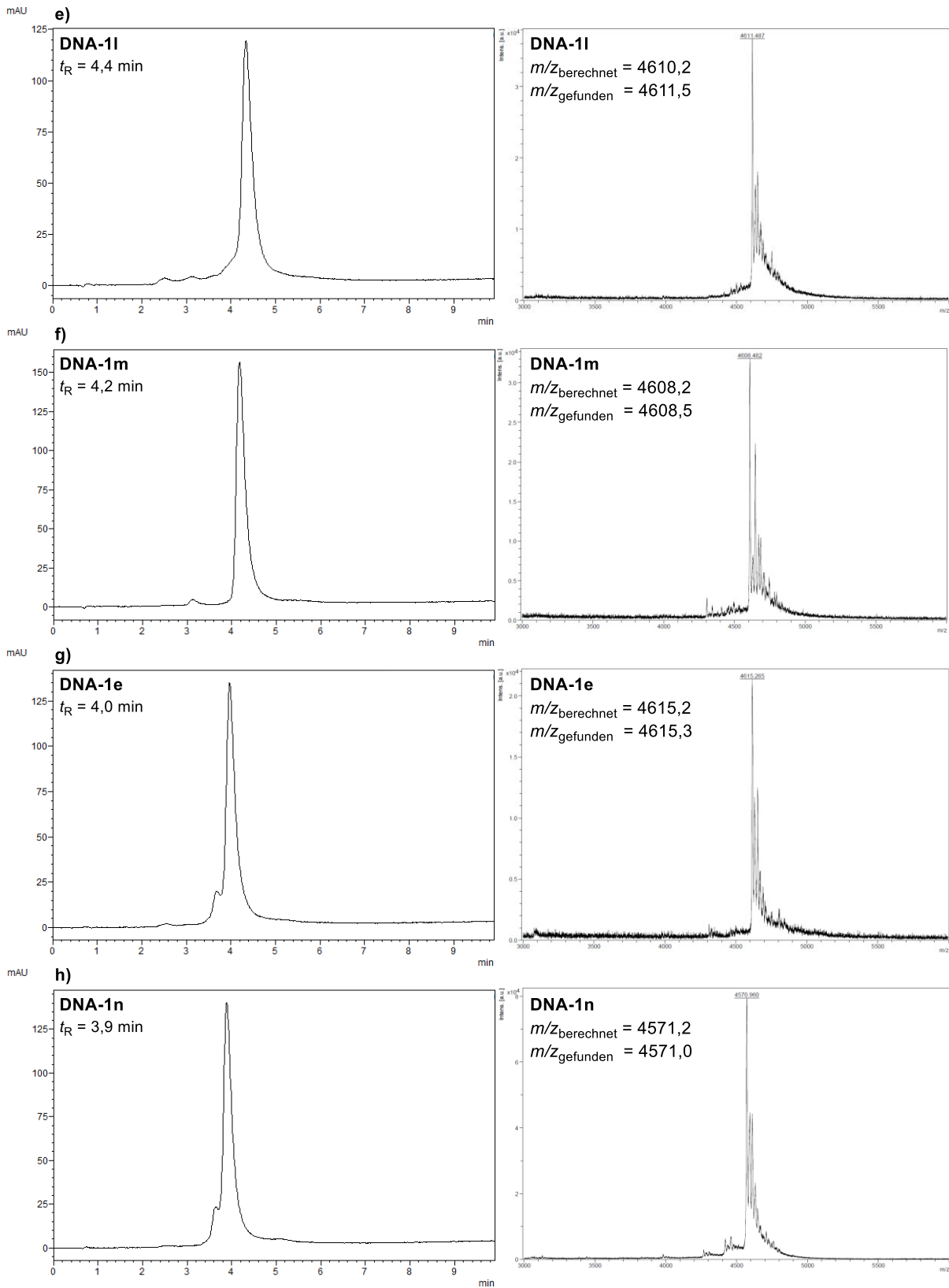
**Abbildung 95:** Visualisierung der ersten Ligation der DNA-Aldehyd-Konjugate **DNA-20a - y** mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel) (siehe **Anhang Tabelle 45**).  
 M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*).

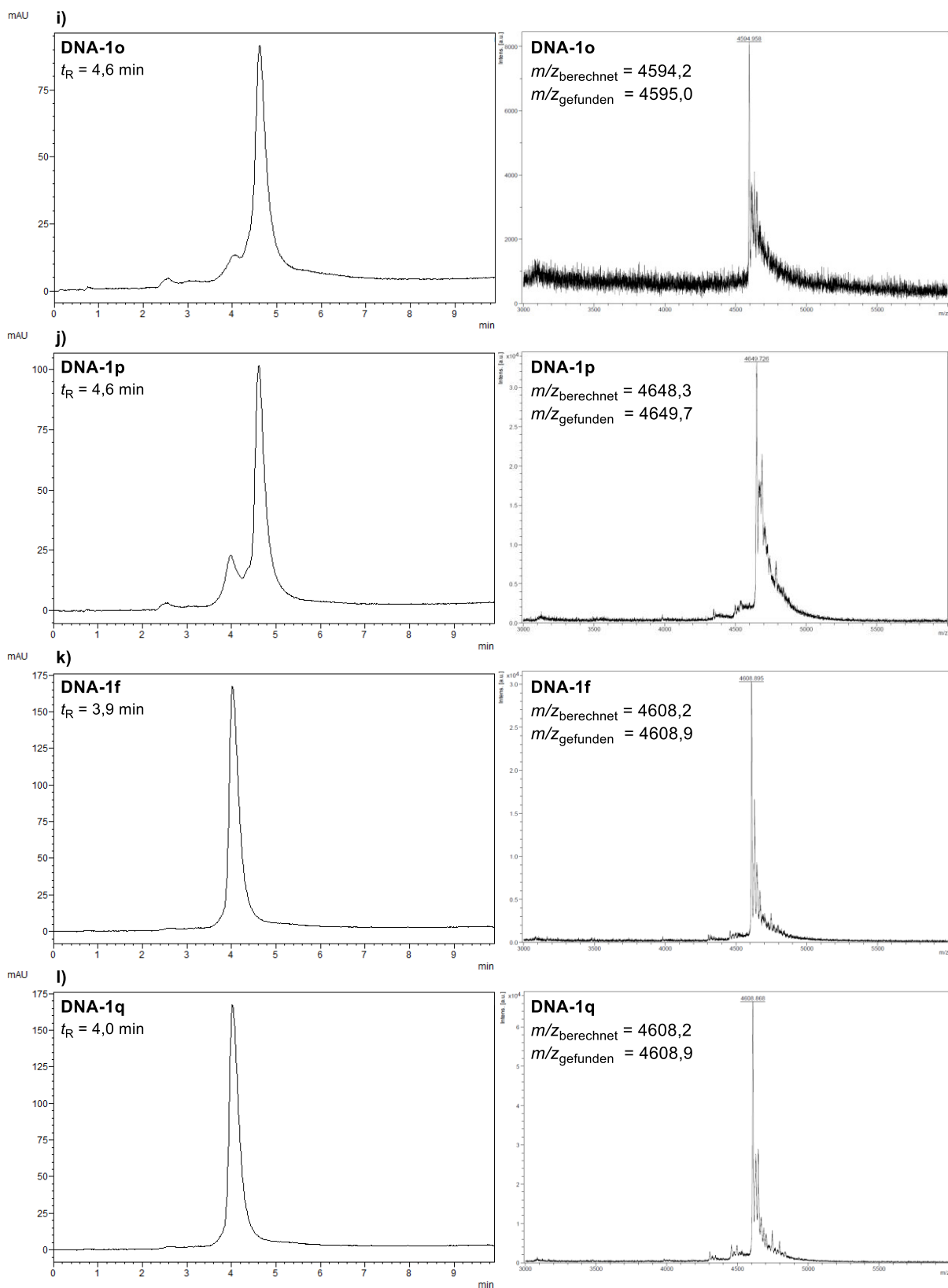


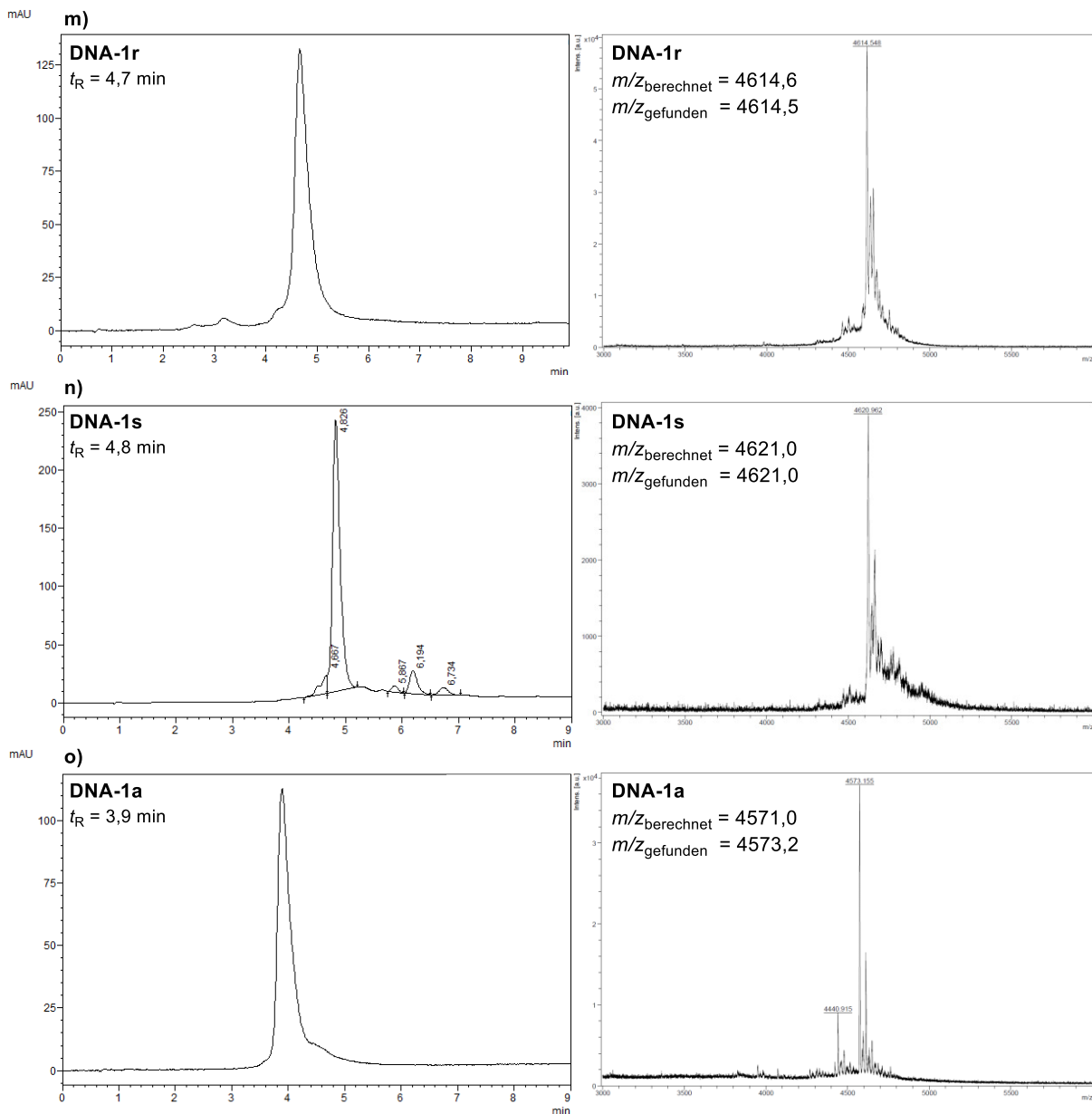
**Zyklus 2**

Startmaterialien DNA-1a, e, f, h - s für die Validierung der DNA-Aldehyd-Konjugate und der Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion





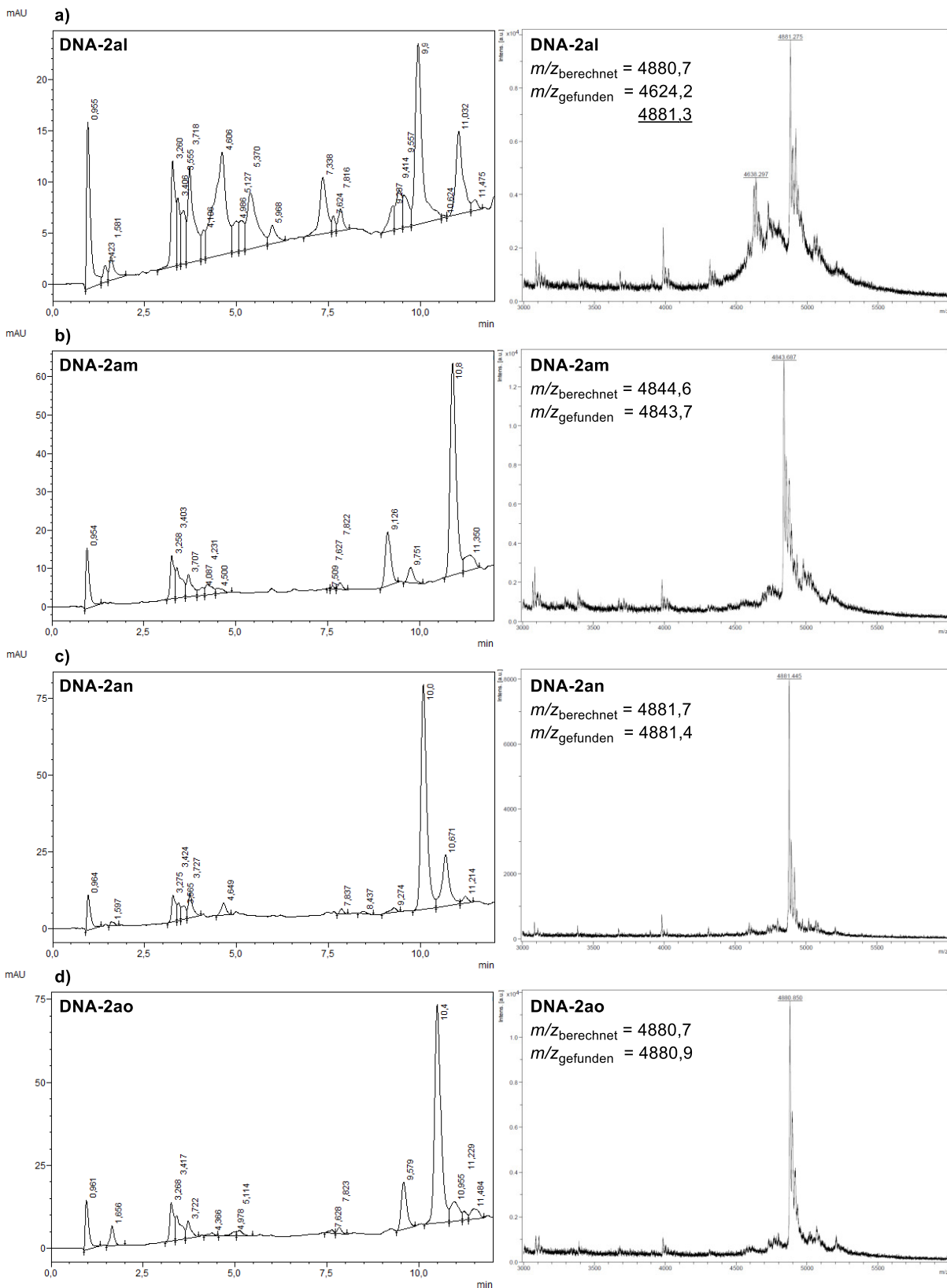


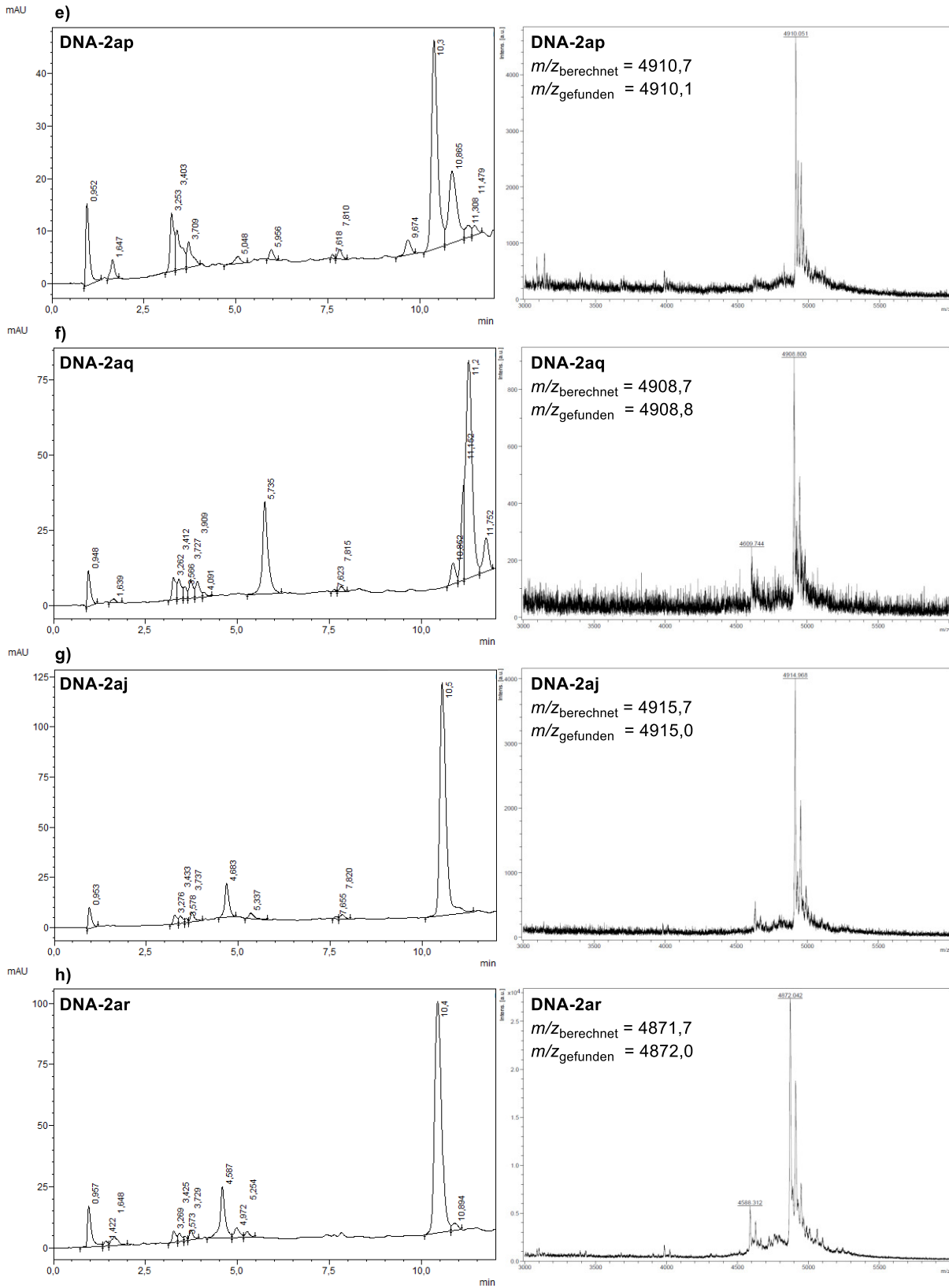


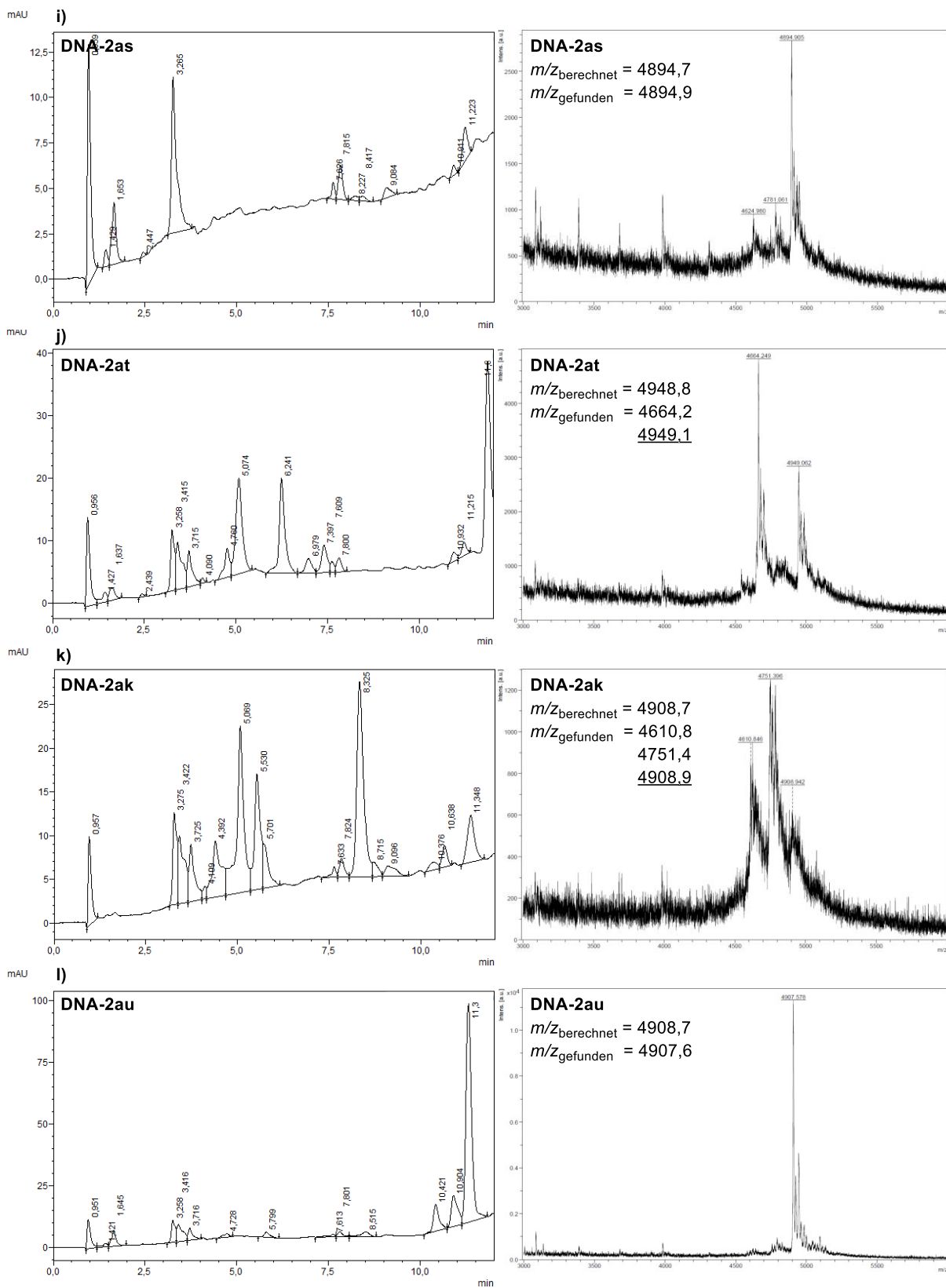
**Abbildung 96:** Startmaterialien **DNA-1a, e, f, h - s** für die Validierung der DNA-Aldehyd-Konjugate und der Aniline in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion (siehe **Tabelle 35**).

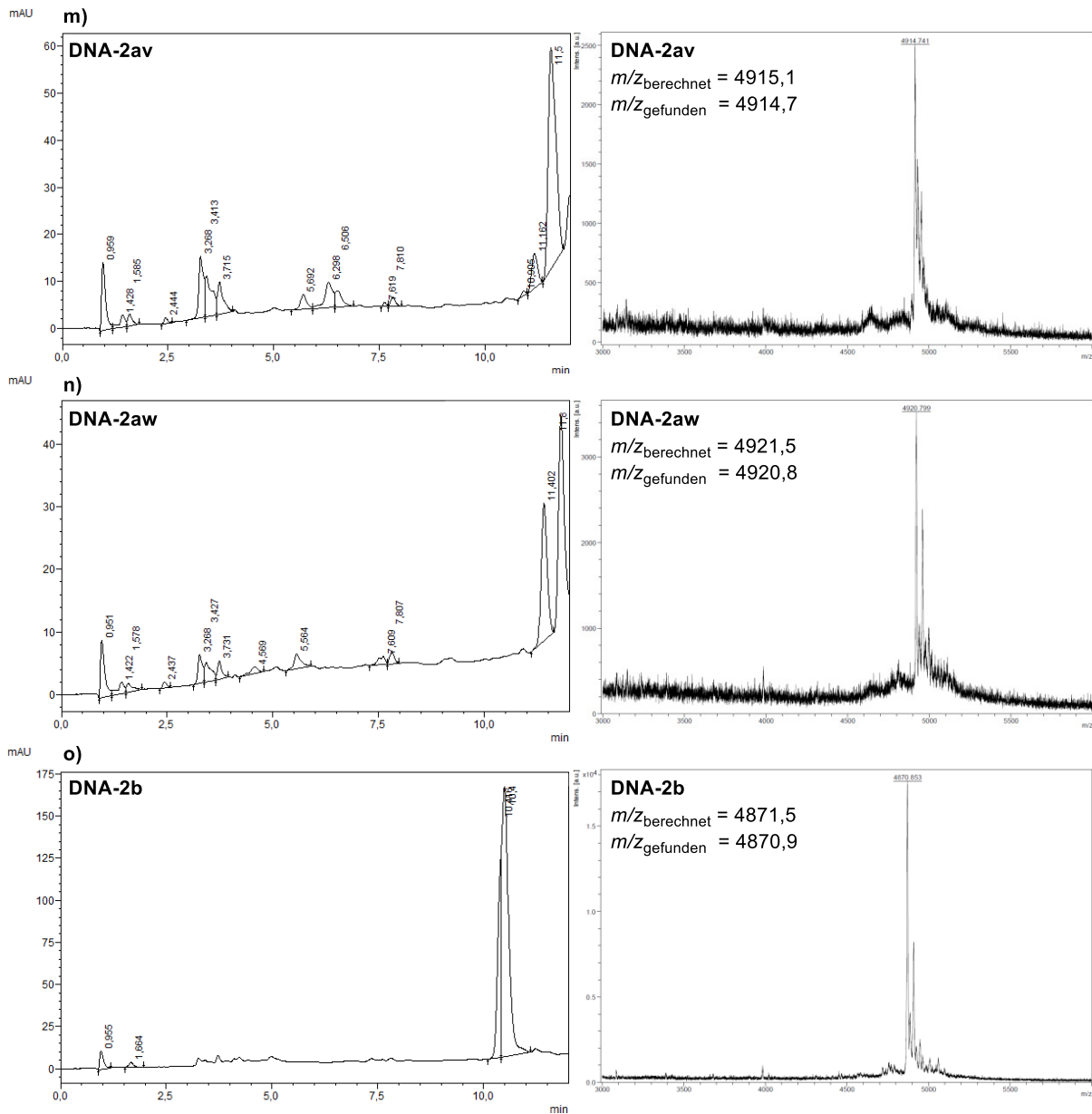
Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des a) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1h**; b) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1i**; c) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1j**; d) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1k**; e) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1l**; f) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1m**; g) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1e**; h) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1n**; i) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1o**; j) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1p**; k) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1f**; l) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1q**; m) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1r**; n) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1s**; o) DNA-Aldehyd-Konjugats **DNA-1a**.

## Validierung der Molekülbausteine DNA-1a, e, f, h - s in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion







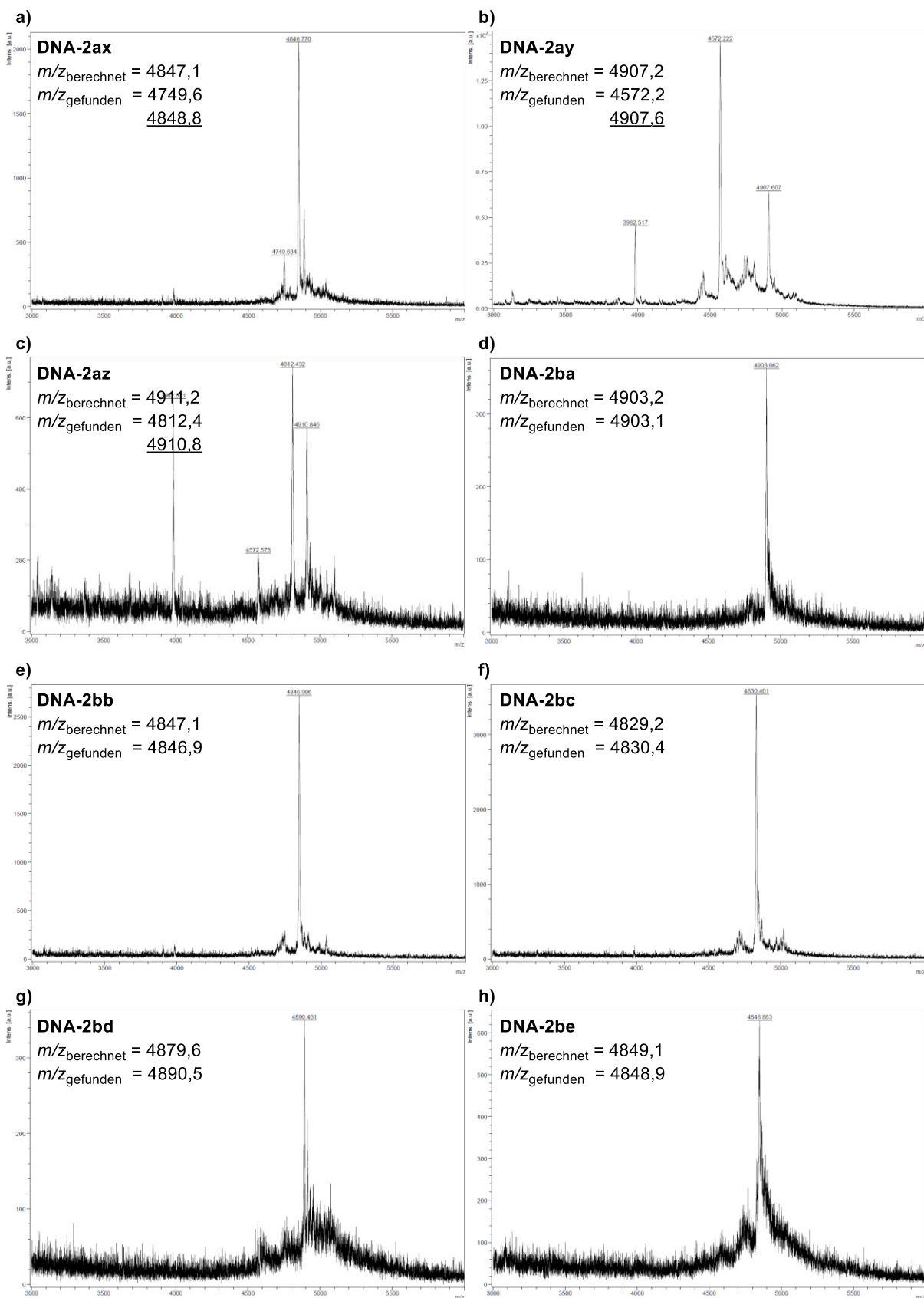


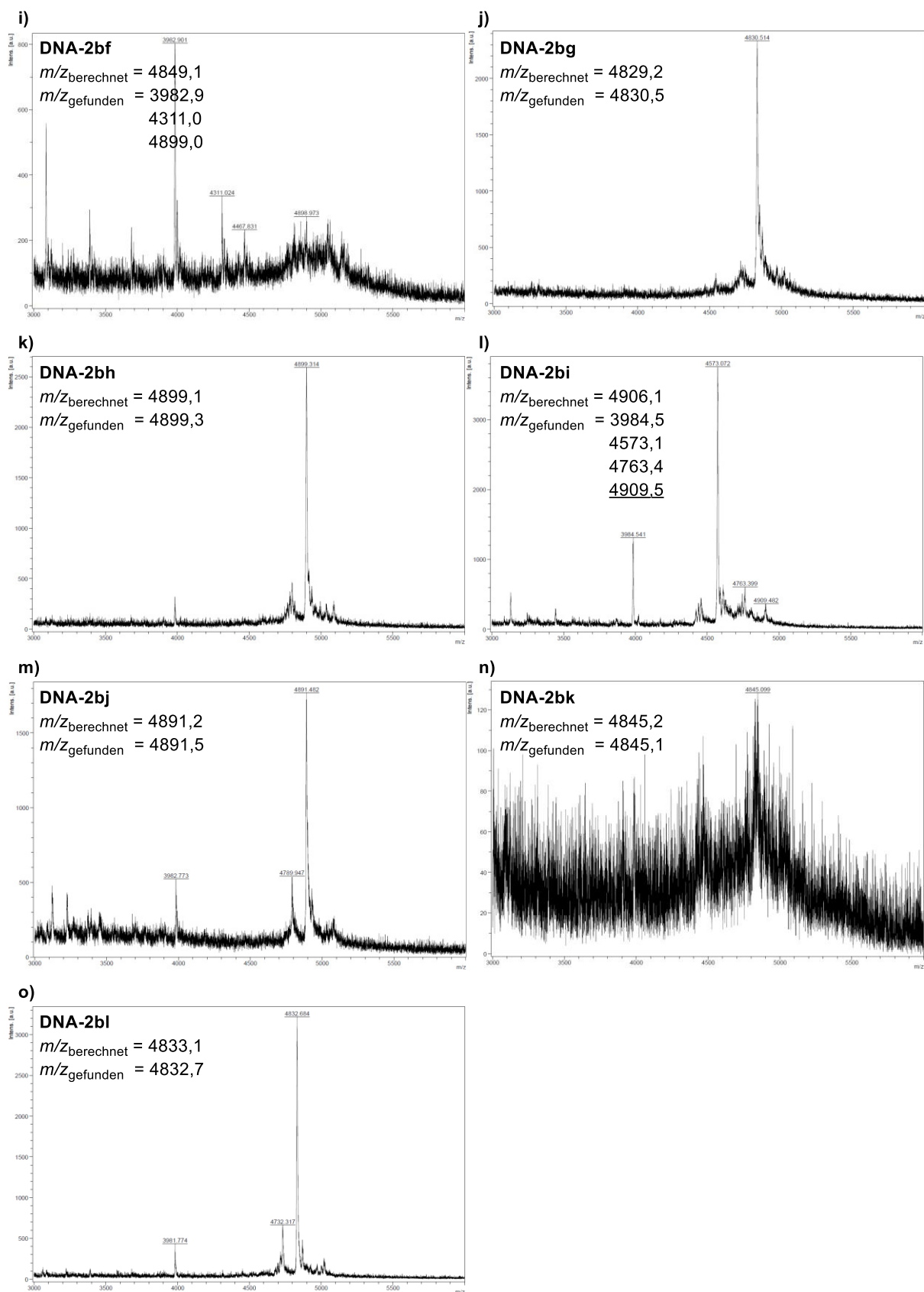
**Abbildung 97:** Validierung der Molekülbausteine **DNA-1a**, **e**, **f**, **h - s** in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion (siehe **Tabelle 35**).

Analytische HPLC (links) und MALDI-MS (rechts) des a) Roh-Konjugats **DNA-2al**; b) Roh-Konjugats **DNA-2am**; c) Roh-Konjugats **DNA-2an**; d) Roh-Konjugats **DNA-2ao**; e) Roh-Konjugats **DNA-2ap**; f) Roh-Konjugats **DNA-2aq**; g) Roh-Konjugats **DNA-2aj**; h) Roh-Konjugats **DNA-2ar**; i) Roh-Konjugats **DNA-2as**; j) Roh-Konjugats **DNA-2at**; k) Roh-Konjugats **DNA-2ak**; l) Roh-Konjugats **DNA-2au**; m) Roh-Konjugats **DNA-2av**; n) Roh-Konjugats **DNA-2aw**; o) Roh-Konjugats **DNA-2b**.



## Validierung der Aniline 20ae - as in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion



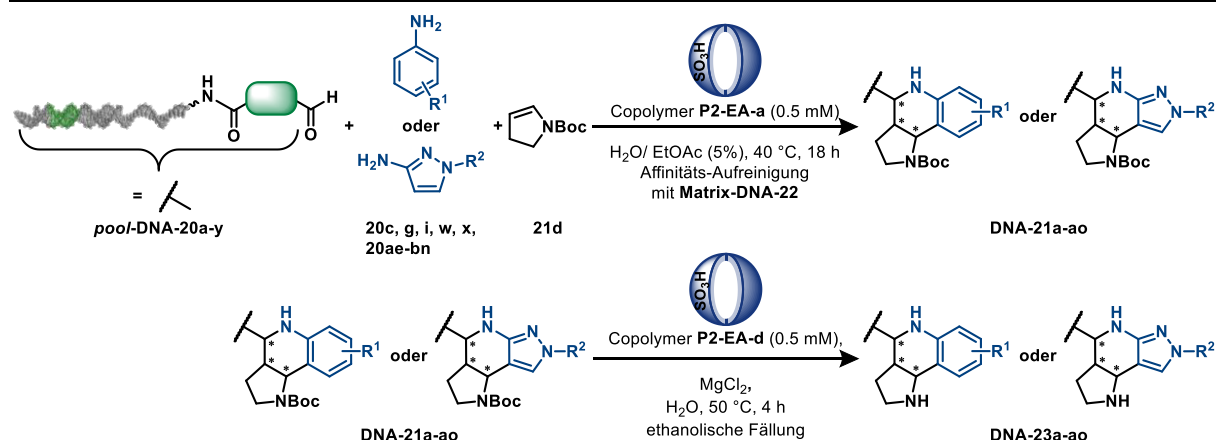


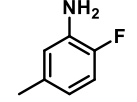
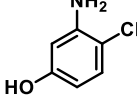
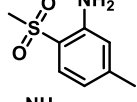
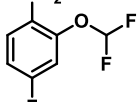
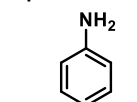
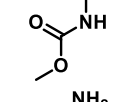
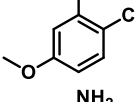
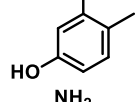
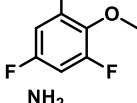
**Abbildung 98:** Validierung der Aniline **20ae - as** in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion (siehe **Tabelle 36**).

MALDI-MS des a) Roh-Konjugats **DNA-2ax**; b) Roh-Konjugats **DNA-2ay**; c) Roh-Konjugats **DNA-2az**; d) Roh-Konjugats **DNA-2ba**; e) Roh-Konjugats **DNA-2bb**; f) Roh-Konjugats **DNA-2bc**; g) Roh-Konjugats **DNA-2bd**; h) Roh-Konjugats **DNA-2be**; i) Roh-Konjugats **DNA-2bf**; j) Roh-Konjugats **DNA-2bg**; k) Roh-Konjugats **DNA-2bh**; l) Roh-Konjugats **DNA-2bi**; m) Roh-Konjugats **DNA-2bj**; n) Roh-Konjugats **DNA-2bk**; o) Roh-Konjugats **DNA-2bl**.

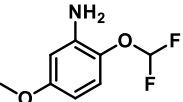
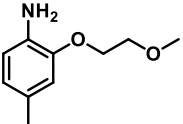
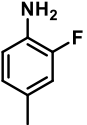
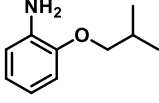
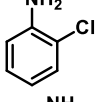
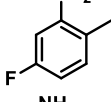
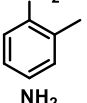
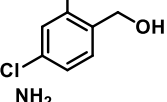
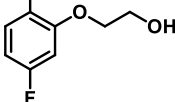
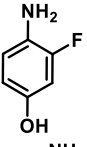
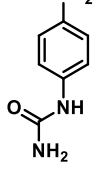
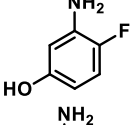
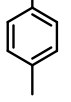
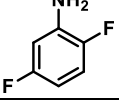
### Auflistung der kodierten Amin-Komponente 20c, g, i, w, x, ae - bn

**Tabelle 46:** Verwendete Amine 20c, g, i, w, x, ae - bn in der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion für den zweiten Syntheseschritt der MiDEL-Synthese mit den dazugehörigen DNA-Barcodes und der Mittelwert der UV-Vis-Absorption nach der Boc-Entschützung.



Amin	DNA-Barcode // (5' -GTAT - XXXXXXXX- 3')	$\bar{E}_{260 \text{ nm}}$	Produkt	
20ae		GGGACCAA	5,61	<b>DNA-21a</b>
20at		CACGTTTT	5,44	<b>DNA-21b</b>
20af		CGGAATAT	4,98	<b>DNA-21c</b>
20ag		ATTGACGA	4,82	<b>DNA-21d</b>
20au		GCGGGTAT	5,71	<b>DNA-21e</b>
20av		CACTGTCA	3,12	<b>DNA-21f</b>
20aw		GTGTCATC	5,89	<b>DNA-21g</b>
20ax		GGCAGTCC	5,33	<b>DNA-21h</b>
20ay		AGCCTGAC	5,68	<b>DNA-21i</b>


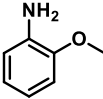
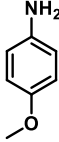
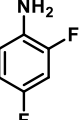
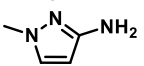
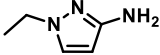
Fortsetzung Tabelle 46

20g		TTAGCCTC	5,00	DNA-21j
20ah		GGTCCTTT	5,39	DNA-21k
20ai		TGATACCC	5,83	DNA-21l
20az		GGGCCTAG	5,36	DNA-21m
20ba		TACTGCCT	4,91	DNA-21n
20bb		GACAGATT	5,41	DNA-21o
20aj		GCGGCCTT	5,56	DNA-21p
20ak		TGCCGCTT	5,22	DNA-21q
20bc		AGGTCGCC	5,64	DNA-21r
20al		CCGCGGCG	5,91	DNA-21s
20bd		GAACGGCT	5,85	DNA-21t
20am		TGTCATGG	5,42	DNA-21u
20an		ATTCCAAT	5,36	DNA-21v
20be		CTTTACCG	5,08	DNA-21w

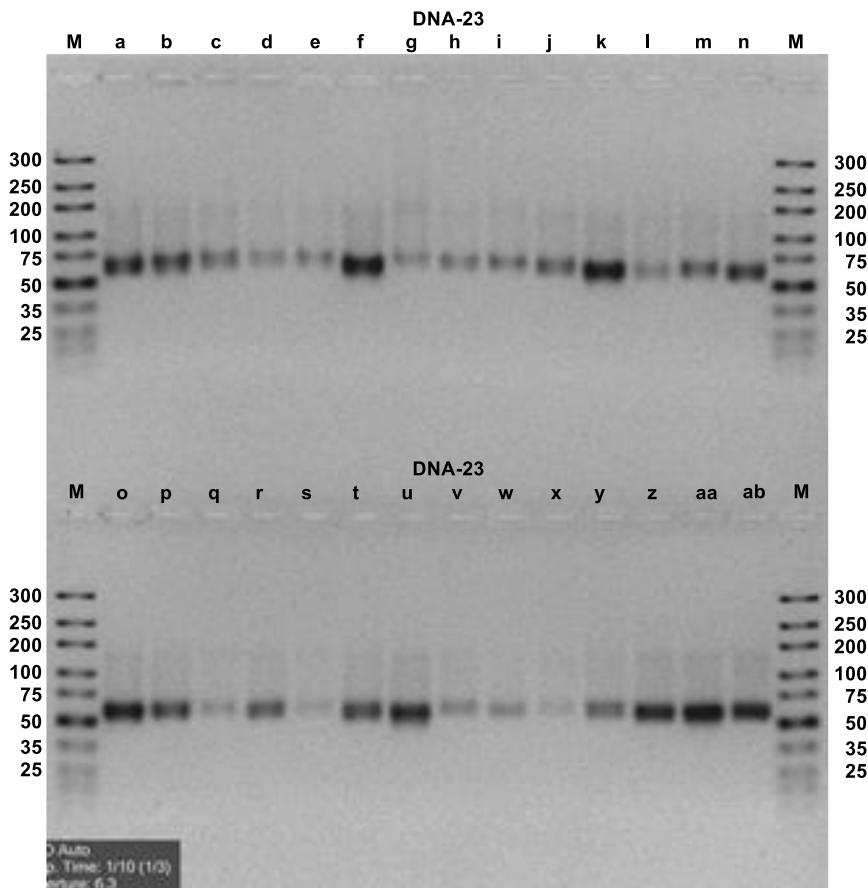
## Fortsetzung Tabelle 46

20bf		TGATTGGG	5,15	DNA-21x
20bg		CCCGTCAG	5,36	DNA-21y
20bh		TTCCGATC	5,39	DNA-21z
20bi		TGCGTGGC	4,88	DNA-21aa
20ao		GGATAGTA	5,13	DNA-21ab
20ap		TCATCAGG	5,42	DNA-21ac
20aq		AGGAGTCG	4,97	DNA-21ad
20ar		TATCCGGT	5,01	DNA-21ae
20as		ATTGCGTA	5,49	DNA-21af
20i		TATTGGTA	5,39	DNA-21ag
20bj		AGCTACGC	5,34	DNA-21ah
20bk		ACAGCTAT	5,33	DNA-21ai

## Fortsetzung Tabelle 46

20c		GGGTACAG	5,50	DNA-21aj
20bl		GTCAACAG	5,24	DNA-21ak
20bm		AGTTAATT	5,42	DNA-21al
20bn		TGACCGCC	5,43	DNA-21am
20w		CTGCGGTA	5,02	DNA-21an
20x		ACGCAGAA	5,48	DNA-21ao

## Enzymatische Ligation der DNA-Konjugate DNA-23a - ab

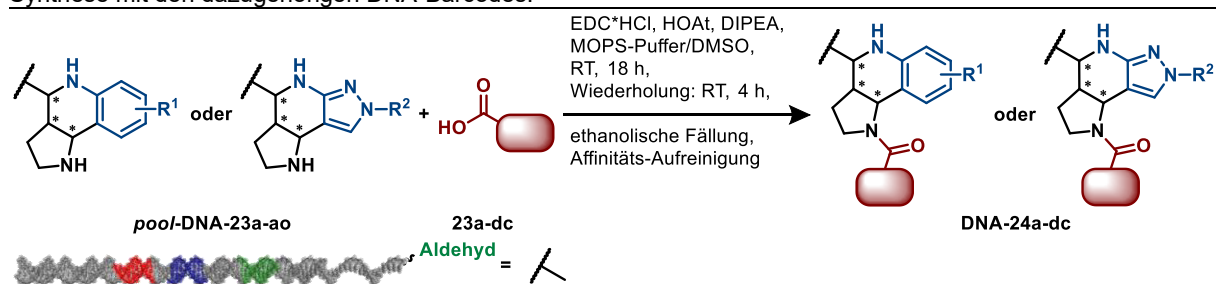


**Abbildung 99:** Visualisierung der zweiten Ligation nach der Copolymer-vermittelten Povarov-Reaktion und Boc-Entschützung der **DNA-23a - ab** mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel) (siehe **Anhang Tabelle 46**).

M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*).

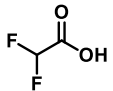
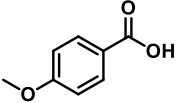
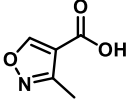
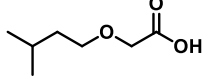
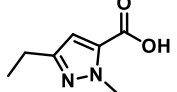
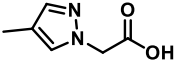
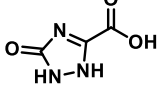
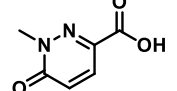
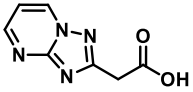
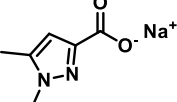
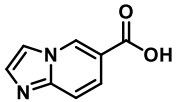
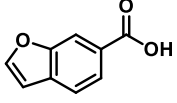
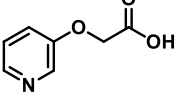
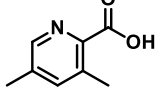
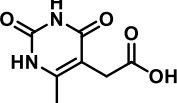
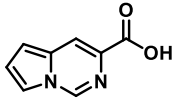
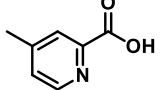
**Zyklus 3****Auflistung der kodierten Carbonsäuren 23a - dc**

**Tabelle 47:** Verwendete Carbonsäuren **23a - dc** in der Amidsynthese für den dritten Syntheseschritt der MiDEL-Synthese mit den dazugehörigen DNA-Barcodes.



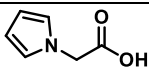
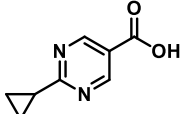
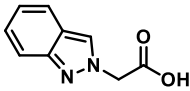
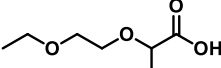
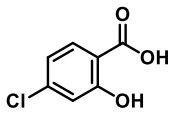
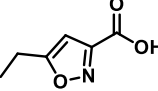
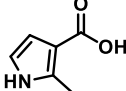
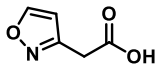
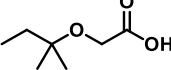
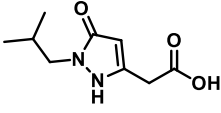
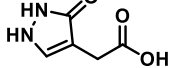
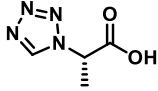
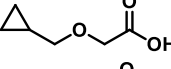
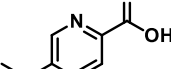
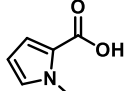
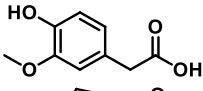
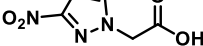
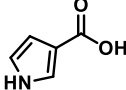
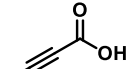
	Carbonsäure	DNA-Barcode III (5' -CCTA - XXXX XXXX- 3')
23b		GGGCTGAA
23c		ACCAGCAC
23d		TAGGTAAA
23e		TGGTGATA
23f		GCGATCGT
23g		ATCGGTTC
23h		ATCCCTCT
23i		AAACTTCC
23j		TGCGGTCA
23k		TAGAGAGT
23l		CGATCACT
23m		ATATACGT
23n		TCGCTTAG
23o		ATCGGACT

## Fortsetzung Tabelle 47

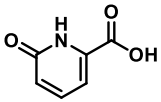
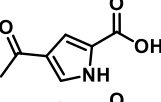
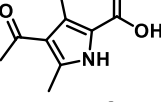
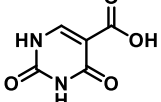
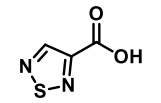
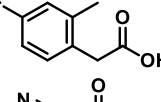
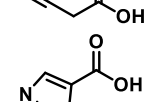
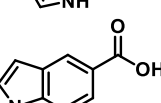
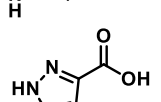
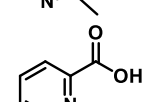
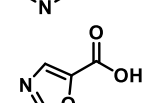
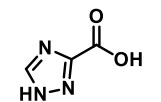
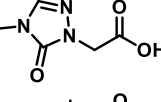
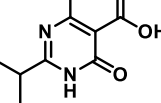
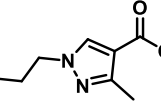
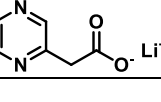

23p		CGACAGAC
23q		CTTACCGA
23r		AACACTGT
23s		GCGTCCCA
23t		AGGGTTGC
23u		AAAGCGCG
23v		TCCATTAC
23w		GGGACTGT
23x		TTTGCTAG
23y		TTTTAGAA
23z		GCTATCCC
23aa		TGATGAGC
23ab		TCGCCACA
23ac		GTTCTTCG
23ad		TGAGAAAG
23a		AGTGCTCA
23ae		CAGCAATA



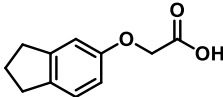
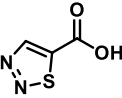
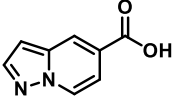
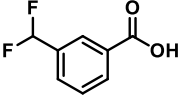
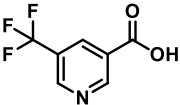
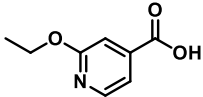
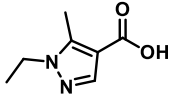
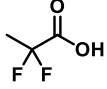
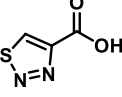
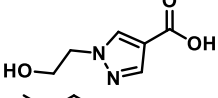
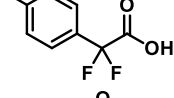
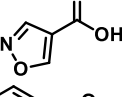
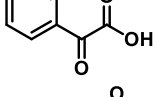
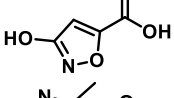
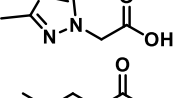
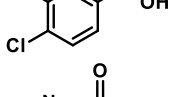
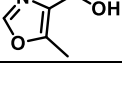
Fortsetzung Tabelle 47

23af		TATGTAGC
23ag		AAAAGGGT
23ah		TCCAACAT
23ai		AAATCTCA
23aj		AGGGCTTG
23ak		TGCGCGTA
23al		AGTGTAGA
23am		TTCTCGAG
23an		TGGCACTC
23ao		CCTAACTT
23ap		ACCGTTGT
23aq		CCCCGATT
23ar		TCTCTATG
23as		GCAGACTC
23at		GAAAGGTA
23au		CCGGCTGT
23av		TATTATGC
23aw		AGAGAGCT
23ax		CACACGTC

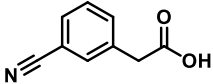
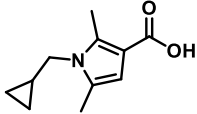
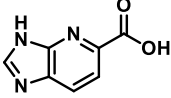
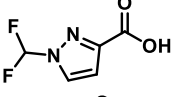
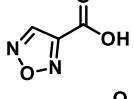
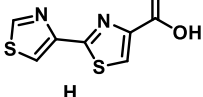
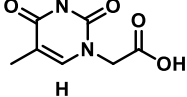
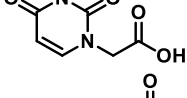
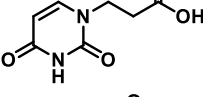
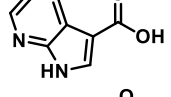
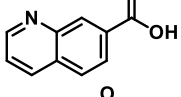
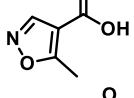
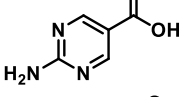
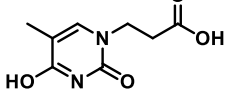
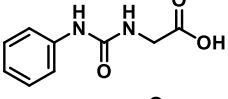
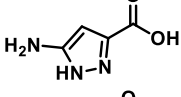
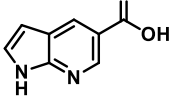
## Fortsetzung Tabelle 47

23ay		CAGGGATG
23az		GGCTGCCG
23ba		TAAATTGG
23bb		CCTCGCTA
23bc		ACAGGCGA
23bd		GGCCATGA
23be		GACGTTAA
23bf		AATGGAAG
23bg		TCCGAGCA
23bh		AGCAGGGC
23bi		TTACTCTG
23bj		CTATGAAC
23bk		AGTATGTA
23bl		CAAGAGTG
23bm		ACGGGCTG
23bn		GCTGAAGA
23bo		GGGTTCTT

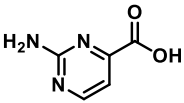
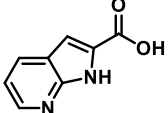
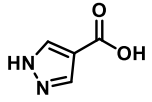
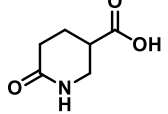
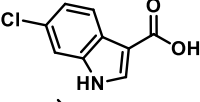
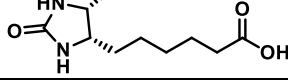
Fortsetzung Tabelle 47

23bp		GGTAAGCA
23bq		CCGCTCGG
23br		CTAGCGAC
23bs		TCCCGTCT
23bt		ACGCCCAT
23bu		GGCTCAAG
23bv		CCCGGAGA
23bw		AGTAGAAC
23bx		TGGGTCGA
23by		ACTATCAG
23bz		TAGGCTCT
23ca		CCATCCAG
23cb		CTATTCAA
23cc		CGAGTGCC
23cd		CAGGTGCA
23ce		TGTGCAGG
23cf		ATGACTAG

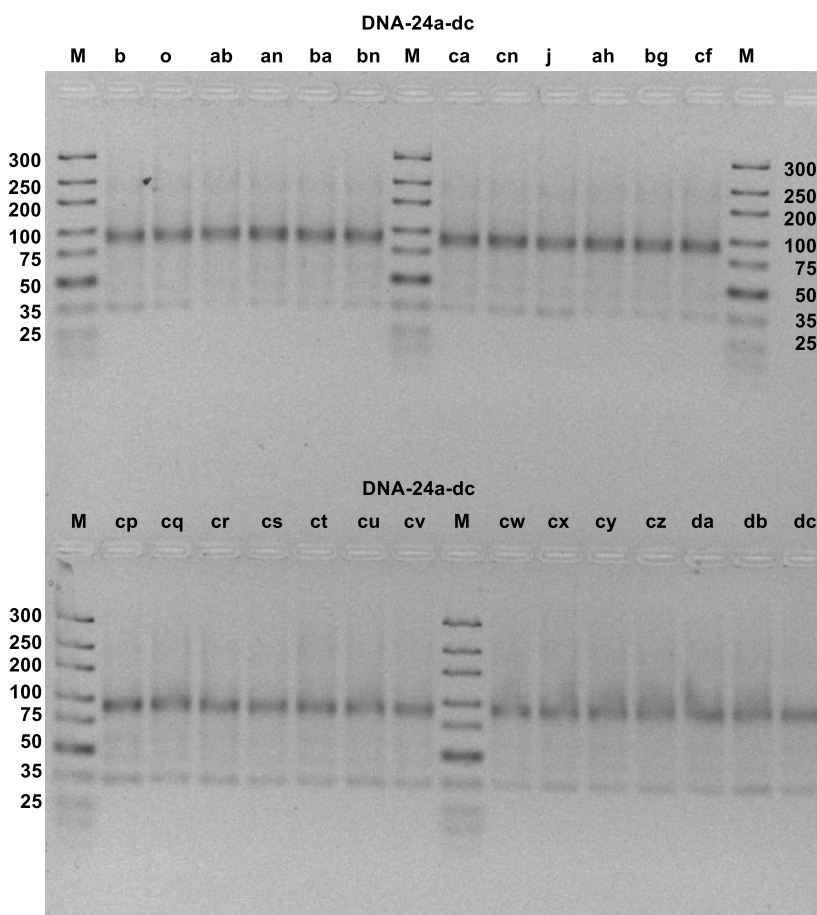
## Fortsetzung Tabelle 47

23cg		CCGAAAGA
23ch		ACCACATT
23ci		GTTAATTA
23cj		GTTATAGT
23ck		TAGGGCCG
23cl		GCACGCGC
23cm		TACAGCGG
23cn		AGCATATG
23co		TCAGGGAA
23cp		TGGAAGAT
23cq		TGCTTAGA
23cr		TGCTGTGT
23cs		TGCGCTCA
23ct		TGCCTTAG
23cu		TGCCTCTA
23cv		TGCCTACT
23cw		TGCACCTT

## Fortsetzung Tabelle 47

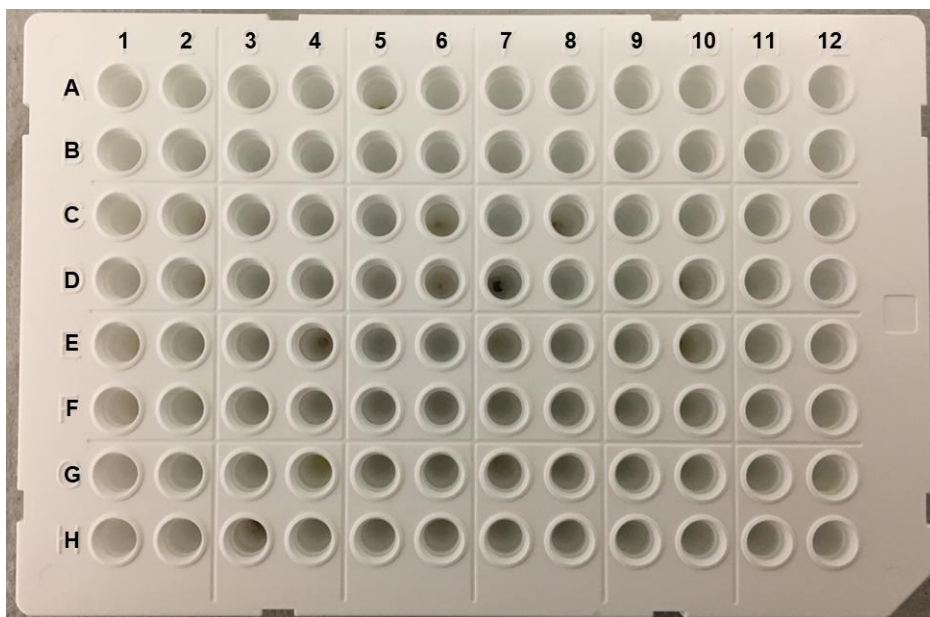
23cx		TGATGCTT
23cy		TGATAAGG
23cz		TGAGGAGC
23da		TGACATGT
23db		TGACACTG
23dc		TGTTAGGT

## Enzymatische Ligation der DNA-Konjugate DNA-24a - dc



**Abbildung 100:** Visualisierung der dritten Ligation mit den DNA-Konjugaten **DNA-24a - dc** mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel) (siehe **Anhang Tabelle 47**).  
M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*).

**Amidsynthese der DNA-Konjugate DNA-24a - dc mit den Molekülbausteinen 23a - dc**



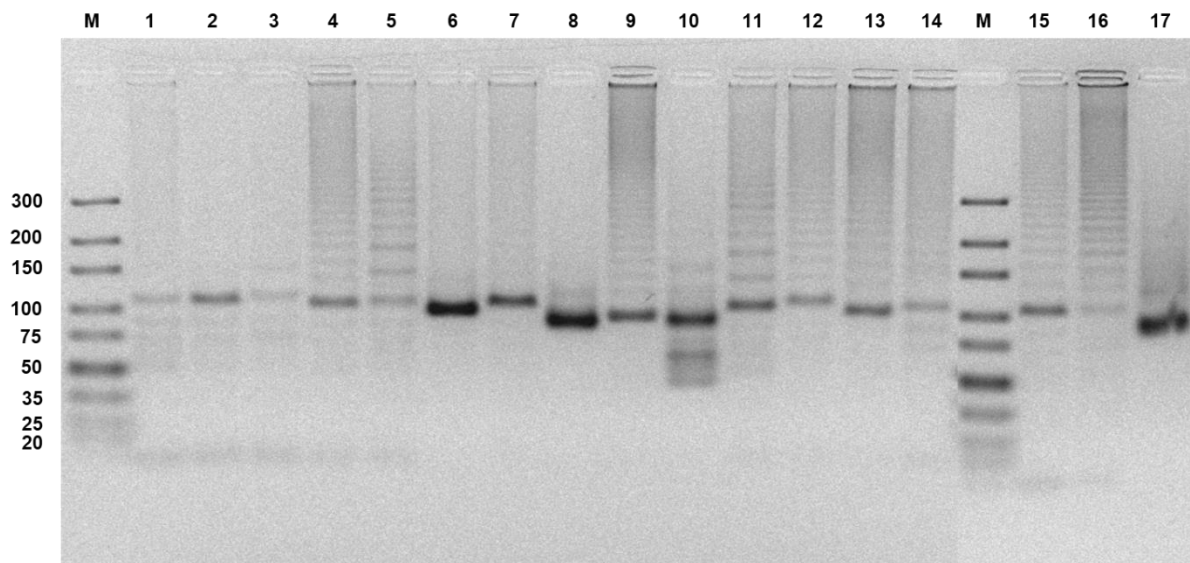
**Abbildung 101:** Mikrotiterplatte mit den Produkten der Amidsynthese des dritten Syntheseschrittes der MiDEL-Synthese nach der dreifachen ethanolischen Fällung (siehe **Anhang Tabelle 47**).

**Selektionsexperimente der Copolymer-vermittelten Molekülbibliothek****Selektionsexperiment-spezifische DNA-Barcodes****Tabelle 48:** Selektionsexperimente mit den zugeordneten DNA-Barcodes und der Mittelwert der UV-Vis-Absorption der aufgereinigten PCR-3-Produkte.

Protein	Abweichungen von den Standard-Bedingungen <sup>a</sup>	Sequenz Index i7	Sequenz Index i5	$\bar{E}_{260\text{ nm}}$
MKK-7		CTAGTACG	TATCCTCT	0,95
hTEAD4		TTCTGCCT	TATCCTCT	1,11
MDM2		GCTCAGGA	TATCCTCT	0,81
Bcl-xL		AGGAGTCC	TATCCTCT	1,52
XIAP		CATGCCTA	TATCCTCT	1,33
NKD2		TCGCCTTA	AGAGTAGA	1,42
CXCL4		CTAGTACG	AGAGTAGA	1,24
BAG3		TTCTGCCT	AGAGTAGA	1,41
-	kein immobilisiertes Zielprotein	GCTCAGGA	AGAGTAGA	1,61
-	Streptavidin-Kügelchen	AGGAGTCC	AGAGTAGA	1,40
hTEAD4palm.	palmityliertes hTEAD4	CATGCCTA	AGAGTAGA	1,28
hTEAD4	10 µg Protein	TCGCCTTA	GCGTAAGA	1,96
hTEAD4	500 fmol MiDEL	CTAGTACG	GCGTAAGA	1,92
hTEAD4	Wiederholung Eintrag Nr. 2	TTCTGCCT	GCGTAAGA	2,11
hTEAD4	Denaturierung des Proteins bei 80 °C für 5 min.	GCTCAGGA	GCGTAAGA	1,92
hTEAD4	3 aufeinanderfolgende Selektionsexperimente	AGGAGTCC	GCGTAAGA	1,65
-	amplifizierte MiDEL	CATGCCTA	GCGTAAGA	1,65

<sup>a</sup> Das Protein (5 µg) wurde an den magnetischen Kügelchen immobilisiert und anschließend mit der **MiDEL** (250 fmol) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die nicht-bindenden Moleküle durch Waschschrte entfernt und die gebundenen Moleküle durch eine Hitzedenaturierung bei 80 °C für 5 min eluiert. Die DNA-Sequenzen der gebundenen Moleküle wurden amplifiziert und aufgereinigt. <sup>b</sup> Die Menge der aufgereinigten PCR-3-Produkte wurde mit Hilfe der UV-Vis-Absorption bestimmt.

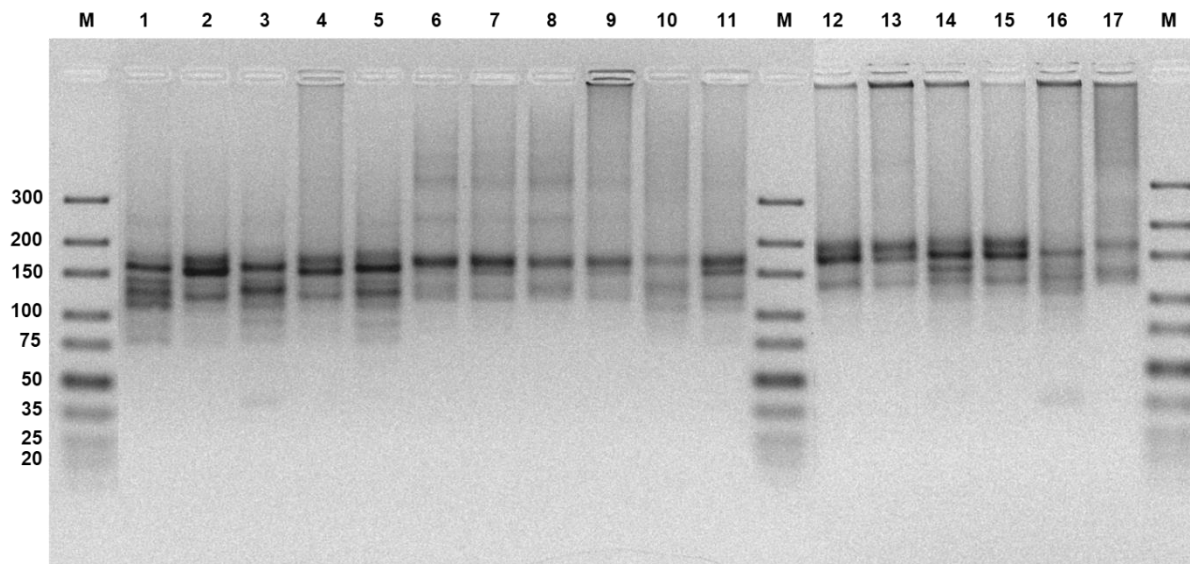
### PCR-Vervielfältigung (PCR 1)



**Abbildung 102:** Visualisierung der PCR-Vervielfältigung der Selektionsexperimente (siehe **Tabelle 15**) mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel).

M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*); 1 - 8 = Selektionsexperimente mit verschiedenen Proteinen (**Tabelle 15**, Eintrag 1 - 8); 9 = Selektionsexperiment mit magnetischen Kügelchen ohne immobilisiertes Protein; 10 = Selektionsexperiment mit Streptavidin-immobilisierten magnetischen Kügelchen; 11 - 16 = Selektionsexperimente mit dem Protein hTEAD unter verschiedenen Bedingungen (**Tabelle 15**, Eintrag 11 - 16); 17 = Copolymer-vermittelte Molekülbibliothek ohne Selektionsexperiment.

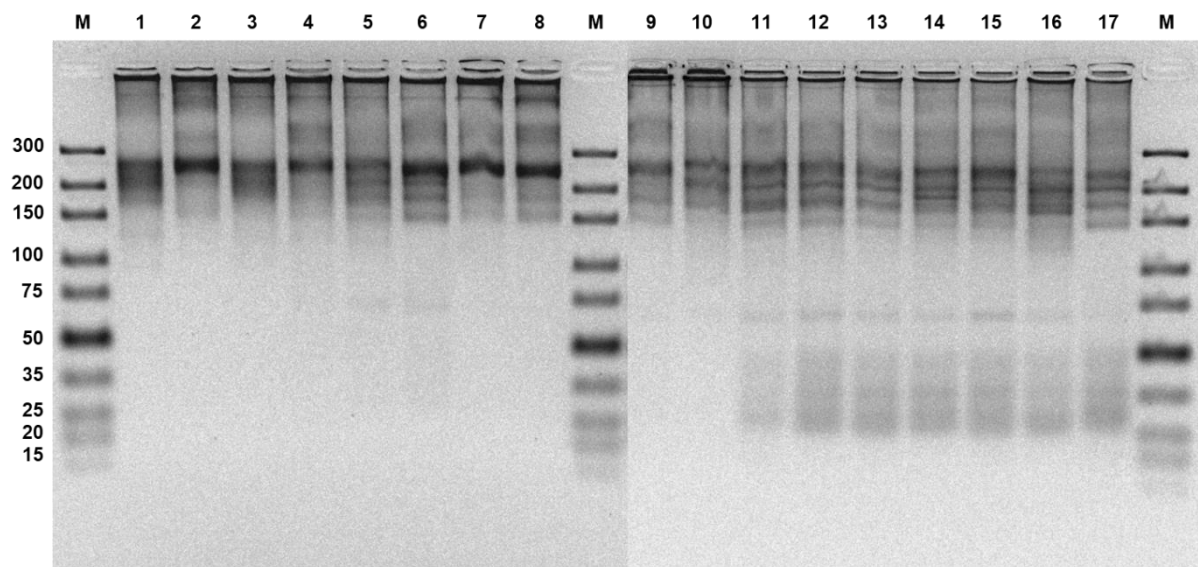
### Verlängerung der amplifizierten Proben der Selektionsexperimente mit Adapter-Sequenzen (PCR 2)



**Abbildung 103:** Visualisierung der Verlängerung der amplifizierten Proben der Selektionsexperimente (siehe **Tabelle 15**) mit Adapter-Sequenzen mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel).

M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*); 1 - 8 = Selektionsexperimente mit verschiedenen Proteinen (**Tabelle 15**, Eintrag 1 - 8); 9 = Selektionsexperiment mit magnetischen Kügelchen ohne immobilisiertes Protein; 10 = Selektionsexperiment mit Streptavidin-immobilisierten magnetischen Kügelchen; 11 - 16 = Selektionsexperimente mit dem Protein hTEAD unter verschiedenen Bedingungen (**Tabelle 15**, Eintrag 11 - 16); 17 = Copolymer-vermittelte Molekülbibliothek ohne Selektionsexperiment.



**Verlängerung mit Selektionsexperiment-spezifischen DNA-Barcodes (PCR 3)**

**Abbildung 104:** Visualisierung der Verlängerung der Selektionsexperimente (siehe **Tabelle 15**) mit Selektionsexperiment-spezifischen DNA-Barcodes mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (4 %iges Agarose-Gel). M = Marker (*GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder*); 1 - 8 = Selektionsexperimente mit verschiedenen Proteinen (**Tabelle 15**, Eintrag 1 - 8); 9 = Selektionsexperiment mit magnetischen Kügelchen ohne immobilisiertes Protein; 10 = Selektionsexperiment mit Streptavidin-immobilisierten magnetischen Kügelchen; 11 - 16 = Selektionsexperimente mit dem Protein hTEAD unter verschiedenen Bedingungen (**Tabelle 15**, Eintrag 11 - 16); 17 = Copolymer-vermittelte Molekülbibliothek ohne Selektionsexperiment.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn *PD Dr. Andreas Brunschweiger* für die herzliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis, für die Möglichkeit, an einem so interessanten Promotionsthema arbeiten zu dürfen, für das Vertrauen und die konstruktiven Gespräche bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* bedanke ich mich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats, sowie auch für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren. In dem Zuge möchte ich mich auch bei dem Arbeitskreis *Weberskirch*, insbesondere bei *Dr. Christian Gramse* und *Marvin Dieter*, für die tolle Kollaboration und natürlich den immerwährenden Nachschub an Copolymeren bedanken.

Ein weiterer Dank geht an den *Arbeitskreis Rauh* und das *Lead Discovery Center* für die Bereitstellung einiger Proteine für das Selektionsassay und an *Lukas Arendt*, *Ina Dormuth* und *Nils Jannik Schübler* (Prof. Dr. Jörg Rahnenführer und Prof. Dr. Roland Fried, Fakultät für Statistik, TU Dortmund) für die Entwicklung und Optimierung der Software *SequenceGenerator* für die Generierung von DNA-Barcodes und *ECEC* zur Analyse der Sequenzierungsdaten. Zudem möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Herbert Waldmann* und Herrn *Prof. Dr. Daniel Rauh* bedanken für den Zugang zu analytischen Instrumenten in den Arbeitsgruppen, sowie *Jens Warmers* für die Wartung und Reparatur dieser Instrumente. Ein weiterer Dank geht an das Sekretariat der Fakultät Chemie und Chemischer Biologie mit *Martina Reibner*, *Petra Alhorn* und *Maria Sergani*, sowie an *Silvia Lessing* für die Betreuung in Bezug auf alle bürokratischen Fragestellungen.

Ein großer Dank geht sowohl an die aktuellen als auch ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Brunschweiger *Dr. Mateja Klika Škopić*, *Dr. Marco Potowski*, *Dr. Verena Kunig*, *Dr. Silvia Chines*, *Dr. Suzanne Willems*, *Dr. Avinash Bhat* und *Dr. Elena Detta*. Ganz besonders möchte ich mich hier bei *Dr. Mateja Klika Škopić* für die Betreuung schon während meiner Masterarbeit, aber auch während der ersten Jahre meiner Promotion bedanken. Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei *Dr. Suzanne Willems* für die kritische und detaillierte Durchsicht des Manuskripts bedanken. Auch möchte ich mich bei den Studenten *Neele Haacke*, *Niklas Willeke*, *Fabian Lappann*, *Isabel Olbrich*, *Kendra Menze*, *Anna Schöne*, die ich während meiner Promotion betreuen durfte, bedanken. Ein großer Dank geht an *Robin Dinter* aus der *Arbeitsgruppe Kockmann* (TU Dortmund, Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen) und an seine Studenten *Leon Justen* und *Franziska Gronke* für die tolle Zusammenarbeit zur Automatisierung der Aufreinigungs-Methode.

Der wichtigste Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinem Partner *Felix* für die nie endende Unterstützung und das bedingungslose Vertrauen in mich während des gesamten Studiums und der Promotion.



# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Götte, Katharina

Name, Vorname  
(Surname, first name)

198281

Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

## Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

## Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

Amphiphile Block-Copolymere und eine Affinitäts-Aufreinigung für die  
DNA-kodierte Chemie

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

**\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)