

Wellenlängenverschiebende DNA- und RNA-Sonden zur bioanalytischen Anwendung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich



genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom Chemikerin

Carolin Holzhauser

aus Regensburg

Karlsruhe 2012

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2012

Meiner Familie und dem Team Zwergo.

*Ich überlege.
Mein Bauch entscheidet.*

Max Grunding

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2009 bis September 2010 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg, weiterhin von Oktober 2010 bis Juli 2012 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie für die umfangreiche wissenschaftliche Freiheit und sehr gute Arbeitsatmosphäre. Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit am KIT arbeiten zu können, bedanken.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Frau PD Dr. Ute Schepers (*Institut für Toxikologie und Genetik, KIT-Campus Nord*) für die erfolgreiche und sehr interessante Zusammenarbeit. Des Weiteren möchte ich mich für die Unterstützung bei der Verfassung der vorliegenden Arbeit bedanken. Für die Durchführung der Zelltests mit siRNA und den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im Zusammenhang mit *Gene-Silencing* von GFP in HeLa-Zellen möchte ich mich außerdem bei Chirstin Bednarek und Christoph Grün bedanken.
- Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich und Dr. Miriam Breunig (*Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg*) sowie Renate Liebl für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die Durchführung der Zelltests mit siRNA und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im Zusammenhang mit siRNA-Stabilitäten in HeLa-Zellen.
- Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall (*Institut für Anatomie, Universität Regensburg*) für die Möglichkeit die entwickelte Fluoreszenzsonde in der korrelativen Elektronen- und Lichtmikroskopie bioanalytisch einzusetzen. In diesem Zusammenhang besonders Sabrina Kracher und Uwe Devries, die sämtliche Zellexperimente durchführten und mir die dort entstandenen Aufnahmen zur Verfügung stellten.

- Frau Weck und vor allem Frau Sommer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die zuverlässige Messung meiner Proben.
- Pia Lang und Tanja Ohmer für die Messung meiner NMR-Proben am KIT.
- Josef Kiermeier und Wolfgang Söllner aus der Zentralen Analytik der Universität Regensburg für die Anfertigung der Massenspektren. Dabei möchte ich mich besonders bei Herrn Kiermeier für die Beratung und Hilfe auch nach dem Weggang aus Regensburg bedanken.
- Ingrid Roßnagel und Angelika Kernert für die Anfertigung meiner Massenspektren am KIT.
- Meinen Kollegen Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Peggy Bohländer, Dr. Sina Berndl, Dr. Christoph Beyer, Andreas Dittmer, Dr. Thomas Ehrenschwender, Phillip Ensslen, Annette Hochgesand, Fabio Krohm, Daniel Lachmann, Dr. Florian Menacher, Marcus Merkel, Alexander Penner, Dr. Christa Prunkl, Dr. Moritz Rubner, Wolfgang Schmucker, Sabrina Sezi, Claudia Stubinitzky, Dr. Reji Varghese, Michael Weinberger, Christian Wellner, Ulrike Wenge und Martin Weiser für die gute Zusammenarbeit, die gute Arbeitsatmosphäre und die schönen dreieinhalb Jahre im AK Wagenknecht.
- Meinen Laborkollegen Tom und Moritz (Spaßmurmeln, Krocher und vieles mehr), Claudia (das „L...“-Labor), Christa, Peggy und Werner für die herzliche und fröhliche Laboratmosphäre.

Ganz persönlich möchte ich mich bedanken bei:

- Ayline, Kreisl (zusammen bekannt auch als Sabreisl), dem großen Rubovnik, Gaudi-Claudi, dem Nierenspender, Stacheldachs (der kleine Süße mit den treuen Augen/Assogast), Sfeiffi und dem Tyrranois/Affi (zusammen bekannt auch als Baffi) für die schöne Zeit außerhalb des Labors. Ihr wart mir in der

Karlsruhe-Zeit eine große Stütze und seid mir sehr, sehr gute Freunde geworden. Unvergessen bleiben auch die lustigen Kochabende und die Einführung des Affenindex.

- Spritter dankt Benzina („Netter Nerd gesucht“) und dem Joshi für die KA-Integration.
- Meiner Regensburg-Crew (Susa, Josef & Vroni, Paul, Hanni, Andi H., Sanne, Doris, Daniel, Andi K.) die mich immer unterstützt haben und für mich da gewesen sind, auch nach dem Umzug nach Karlsruhe. Danke für eure unkomplizierte Freundschaft und die sau schöne Zeit!
- Moritz und Jul (dem zweit besten Team der Welt nach Team Zwergo) für den mords Spaß zusammen. Einfach sau guade Freund!
- Meiner Mama für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Ohne Euch wäre die Anfertigung dieser Arbeit und vieles mehr nicht möglich gewesen.

Zuletzt gilt mein Dank meinem „Teampartner“ und „Aufpasser“ für die unglaublich schöne Zeit zusammen, seine Unterstützung und dafür dass er so verrückt ist wie ich. Beach statt Boeckhstrasse und 20.000 gemeinsame Tage für das beste Team der Welt!!!

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Motivation | 1 |
| 2 | Themenstellung | 3 |
| 3 | Theoretischer Hintergrund | 7 |
| 3.1 | Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer..... | 7 |
| 3.2 | Wellenlängenverschiebende DNA-Sonden..... | 14 |
| 3.2.1 | <i>Molecular Beacons</i> | 14 |
| 3.2.2 | Multichromophor-DNA-Sonden..... | 20 |
| 3.3 | Cyaninfarbstoffe: TO und TR als nicht kovalent gebundene DNA-Sonden...23 | |
| 3.4 | Kovalente Modifikation von DNA/RNA Oligonukleotiden | 25 |
| 3.4.1 | Oligonukleotidmodifikation während der Festphasensynthese | 25 |
| 3.4.2 | Postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden | 27 |
| 4 | <i>DNA Traffic Lights</i>: Konzept und Optimierung | 33 |
| 4.1 | Synthese der DNA/RNA-Basenanaloga TR und TO..... | 34 |
| 4.2 | Einfluss der Chromophor-Chromophor Orientierung | 36 |
| 4.3 | Einfluss des Chromophor-Chromophor-Abstands | 40 |
| 4.4 | Einfluss der Chromophor-DNA Konjugation | 43 |
| 4.4.1 | Klick-Reaktion von Thiazolorange an DNA..... | 43 |
| 4.4.2 | Vergleich Linker- und Klick-Konjugation | 45 |
| 5 | <i>DNA Traffic Lights</i>: Anwendung in der Bioanalytik | 49 |
| 5.1 | <i>Molecular Beacons</i> | 49 |
| 5.1.1 | Charakterisierung der im Stamminneren markierten MBs | 49 |
| 5.1.2 | Verschiedene TO-TR markierte MBs im Vergleich | 53 |
| 5.1.3 | <i>Proof of Concept: DNA Traffic Lights</i> im Vergleich | 56 |
| 5.1.4 | SNP-Detektion..... | 59 |
| 5.2 | Aptasensoren..... | 63 |
| 5.2.1 | Design und Strukturoptimierung | 64 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.2.2 | Sensitivität und Selektivität | 67 |
| 6 | CylQ als ET-Donor für TR | 69 |
| 6.1 | CylQ-TR Interstrang-Dimere | 70 |
| 6.2 | CylQ-TR Intrastrang-Dimere als lineare DNA-Sonden | 73 |
| 7 | Wellenlängenverschiebende RNA-Sonden | 77 |
| 7.1 | Konzeptübertragung: <i>RNA Traffic Lights</i> | 77 |
| 7.1.1 | Einfluss der Chromophor-Chromophor-Orientierung | 78 |
| 7.1.2 | Einfluss der RNA-Sequenz | 82 |
| 7.2 | Hintergrund zur siRNA-Technologie | 85 |
| 7.3 | Duplexstabilität modifizierter siRNA in HeLa-Zellen | 87 |
| 7.4 | <i>Gene-silencing</i> : Regulierung der GFP Expression in HeLa-Zellen | 91 |
| 8 | Korrelative Elektronen- und Lichtmikroskopie | 93 |
| 9 | Postsynthetische Modifikation von RNA | 97 |
| 9.1 | Klick-Reaktion an RNA | 97 |
| 9.2 | Spektroskopische Charakterisierung | 98 |
| 10 | Zusammenfassung | 101 |
| 11 | Materialien, Methoden und Synthesen | 105 |
| 11.1 | Materialien, Geräte und allgemeine Methoden | 105 |
| 11.2 | Optische Spektroskopie | 109 |
| 11.3 | Fluoreszenzmikroskopie | 110 |
| 11.3.1 | Stabilität modifizierter siRNA in HeLa-Zellen | 110 |
| 11.3.2 | <i>Gene-silencing</i> : Regulierung der GFP Expression in HeLa-Zellen | 111 |
| 11.4 | Synthesen | 112 |
| 11.4.1 | Synthese von Thiazolrot | 112 |
| 11.4.2 | Synthese des Thiazolorange Azids | 118 |
| 11.5 | DNA-Synthese | 120 |
| 11.5.1 | Synthese modifizierter DNA | 120 |
| 11.5.2 | Aufarbeitung und Reinigung | 123 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 11.5.3 | Charakterisierung modifizierter DNA | 124 |
| 11.6 | RNA-Synthese | 125 |
| 11.6.1 | Synthese modifizierter RNA..... | 125 |
| 11.6.2 | Aufarbeitung und Reinigung | 127 |
| 11.6.3 | Charakterisierung modifizierter RNA | 128 |
| 11.7 | Klickreaktion | 129 |
| 11.7.1 | Klickreaktion an modifizierte DNA | 129 |
| 11.7.2 | Klickreaktion an modifizierte RNA | 130 |
| 11.8 | Liste verwendeter DNA- und RNA-Sequenzen | 131 |
| 11.8.1 | DNA-Sequenzen..... | 131 |
| 11.8.2 | RNA-Sequenzen..... | 135 |
| 11.9 | Im Hauptteil nicht dargestellte DNA/RNA-Spektren | 136 |
| 11.9.1 | Titrationenversuche mit MB 2 – MB 4 | 136 |
| 11.9.2 | Titration von MB 1 zu MB 1c mit einer verkürzten Wartezeit | 137 |
| 12 | Literaturverzeichnis..... | 139 |
| | Curriculum Vitae | 152 |
| | Publikationsliste | 153 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| 2-AP | 2-Aminopurin |
| A | Adenin, 2'-Desoxyadenosin |
| A | Akzeptor |
| abs. | absolut |
| APT | Aptamer |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| B | Helligkeit (<i>brightness</i> ; $B = \epsilon \cdot \Phi$) |
| C | Cytosin, 2'-Desoxycytidin |
| CD | Circulardichroismus |
| CI | Chemische Ionisation |
| CPG | <i>Controlled Pore Glass</i> |
| CylQ | <i>Cyanine Indole Quinoline</i> |
| D | Donor |
| d | Dublett, Schichtdicke |
| Da | Dalton = g/mol |
| dA | 2'-Deoxyadenosin |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| dG | 2'-Deoxyguanosin |
| d. h. | das heißt |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMT | 4,4'-Dimethoxytrityl |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ds | doppelstrangig |
| d. Th. | der Theorie |

| | |
|----------|--|
| ECHO | <i>Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotides</i> |
| entspr. | entspricht, entsprechend |
| EI | Elektrische Ionisation |
| em | Emission |
| ESI | Elektrosprayionisation |
| ET | Energie Transfer |
| exc | Anregung (<i>excitation</i>) |
| FAB | <i>Fast Atom Bombardment</i> (Ionisierungsmethode in der MS) |
| FIT | <i>Forced Intercalation</i> |
| FRET | Fluoreszenzresonanz-Energietransfer |
| GNA | <i>Glycol Nucleic Acid</i> |
| GPC | Gel-Permeations-Chromatographie (entspricht SEC) |
| isokrat. | isokratisch |
| <i>J</i> | Kopplungskonstante |
| kU | klick-Uridin (2'-O-Propargyl-Uridin) |
| h | Stunde |
| HOMO | höchstes besetztes Molekülorbital |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HR-MS | Hochauflösende Massenspektroskopie (HR = <i>high resolution</i>) |
| Hz | Hertz |
| i.a. | im allgemeinen |
| i. d. R. | in der Regel |
| IR | Infrarot ($\lambda = 780 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$), Infrarotspektroskopie |
| LC | <i>Liquid Chromatography</i> |
| LUMO | niedrigstes unbesetztes Molekülorbital |
| m | Multipllett |
| M | molar; mol/L |
| MALDI | <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> |
| MB | <i>Molecular Beacon</i> |

| | |
|-------------------|--|
| mbar | Millibar |
| MeCN | Acetonitril |
| MeOH | Methanol |
| mg | Milligramm |
| min. | Minute |
| mL | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MS | Massenspektrometrie |
| m/z | Verhältnis Masse zu Ladung |
| n_D^{20} | Brechungsindex bei 20 °C und Deuteriumlampe |
| Na-P _i | Natriumphosphatpuffer |
| NIR | Nahes Infrarot ($\lambda = 780 \text{ nm} - 3 \text{ }\mu\text{m}$) |
| nm | Nanometer |
| NMR | Kernspinnagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| ODF | <i>Oligodeoxyfluorosides</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PNA | <i>Peptide Nucleic Acid</i> |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| QF-MB | <i>Quencherfree Molecular Beacon</i> (MBs ohne Fluoreszenzlöscher) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RP | <i>Reversed Phase</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| rpm | <i>rotations per minute</i> |
| s | Singulett, Sekunde |
| SEC | <i>Size Exclusion Chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie) veraltete Bezeichnung für GPC |
| s. o. | siehe oben |
| T | Thymin, 2'-Desoxythymidin |
| T _m | Schmelztemperatur der DNA [°C] |
| TBTA | tris-(Benzyltriazolylmethyl)amine |

| | |
|--------|---|
| TO | Thiazolorange |
| TOF | <i>Time of Flight</i> |
| TOTAB | Thiazolorange – Thiazolrot Heterodimer |
| TR | Thiazolrot |
| UV/Vis | Ultraviolettes- und sichtbares Lichtspektrum (190 – 800 nm) |
| u.a. | unter anderem |
| V | Volt |
| vgl. | vergleiche |
| Vol. | Volumen |
| WED | <i>White-Light-Emitting DNA</i> |
| WW | Wechselwirkungen |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden *kursiv* gedruckt.

¹ Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

² a) IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1971**, *10*, 3983-4004.
b) IUPAC-IUB (CBN); Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 455-477.

1 Motivation

DNA-Forschung. Ein Begriff, mit dem die Mehrheit der Menschen die gentechnische Veränderung von Lebensmitteln oder das „Klonschaf Dolly“ verbindet. Tatsächlich hat sich dieses Forschungsgebiet in den letzten Jahrzehnten in die unterschiedlichsten Richtungen entwickelt. DNA ist nicht länger nur Träger des menschlichen Erbgutes, sondern wird als intelligentes Konstruktionsmaterial genutzt. Durch den Einsatz natürlicher als auch modifizierter DNA können neuartige, funktionelle Materialien hergestellt werden. *N. Seeman* verwendete in diesem Zusammenhang das erste Mal den Begriff der sog. DNA-Nanobiotechnologie.^[1] Der Aufbau zwei- und dreidimensionaler Konstrukte mit Hilfe von DNA^[2] ist ebenso möglich wie die Entwicklung molekularer Motoren und Roboter.^[3] Enorme Fortschritte konnten auch im Bereich der Medizin gemacht werden: durch die geschickte Wahl der DNA-Sequenz können modifizierte Oligonukleotide sowohl als Diagnosewerkzeug, als auch als Therapeutika eingesetzt werden.^[4-5] Mit der Beendigung des Humangenomprojekts 2003 und der damit verbundenen, vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms wurde die Grundlage der molekularen Medizin geschaffen. Dabei sind Sequenzunterschiede von nur 0.1 % von Mensch zu Mensch verantwortlich für unsere Individualität und Einzigartigkeit,^[6] aber auch für die Ausprägung bestimmter Krankheiten wie beispielsweise Krebs^[7] oder Morbus Alzheimer.^[8] Auch die Wirkung von Medikamenten kann dadurch beeinflusst werden.^[9-11] Um Oligonukleotid basierende Therapeutika zur Heilung dieser Krankheiten herstellen bzw. individuell abgestimmte Medikamente bereitstellen zu können, ist ein umsichtiges Verständnis der in der Zelle stattfindenden, biologischen Prozesse erforderlich. Die ständige Weiterentwicklung von Diagnosewerkzeugen im Bereich der Nukleinsäureanalytik ist somit von zwingender Notwendigkeit. Viele in diesem Zusammenhang verwendete DNA-Sonden basieren auf der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, weil die Fluoreszenzmikroskopie mit zu den empfindlichsten Methoden zählt, um zwischenmolekulare Interaktionen zu beobachten.

Die DNA-Forschung stellt damit einen unverzichtbaren und zugleich faszinierenden Bereich der Wissenschaft dar, in dem ständig neue Erkenntnisse mit der Hoffnung, grundlegende Fragestellungen beantworten zu können, gewonnen werden.

2 Themenstellung

Im ersten Teil dieser Arbeit soll das Konzept der *DNA Traffic Lights* entwickelt werden. Dieses Konzept basiert auf einer Doppelmarkierung von Oligonukleotiden mit den Cyaninfarbstoffen Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR). Durch einen Energietransfer (ET) von TO auf TR kann eine Wellenlängenverschiebung von 140 nm erreicht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit werden mehrere bioanalytische Anwendungsmöglichkeiten des entwickelten Konzepts vorgestellt.

A. Entwicklung des Konzepts *DNA Traffic Lights*

Durch die Kombination von TO und TR als fluoreszentes FRET-Paar in Oligonukleotiden sollen hybridisierungssensitive DNA/RNA-Sonden hergestellt werden. Anschließend soll das erarbeitete Konzept an Hand der erhaltenen Resultate optimiert werden. Dabei soll wie folgt vorgegangen werden:

1) Synthese des FRET-Paares als DNA/RNA-Basenersatz

Die Chromophore TO und TR sollen synthetisiert und als Ersatz natürlicher DNA-Basen über einen acyclischen Linker ins Oligonukleotidrückgrat integriert werden (Abb. 2.1).

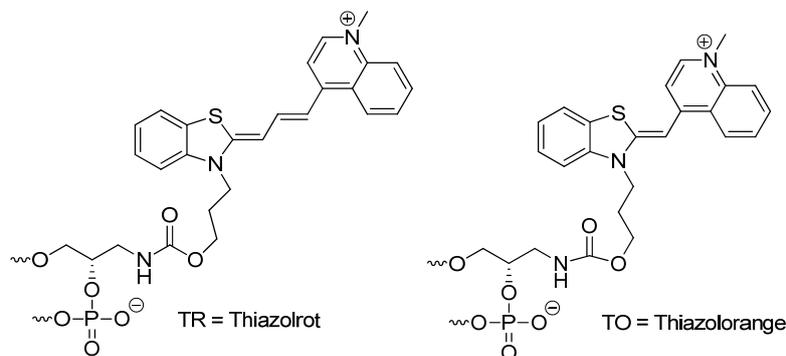


Abb. 2.1: Struktur der mit DNA verknüpften Farbstoffe Thiazolrot (TR) und Thiazolorange (TO).

2) Kontrastoptimierung

Die Effizienz des Energietransfers von TO auf TR kann durch das Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} angegeben werden (dabei entspricht I_{λ} der Fluoreszenzintensität bei der entsprechenden Wellenlänge). Da ET-Prozesse i.a.

eine starke Orientierungs-/Abstandsabhängigkeit von Donor und Akzeptor zeigen, soll dieses Verhältnis optimiert werden durch:

- Variation der relativen Chromophor-Chromophor Orientierung
- Variation des Chromophor-Chromophor-Abstands

3) Alternative DNA-Konjugation

Zur weiteren Konzeptoptimierung soll der Einfluss der DNA-Chromophor-Konjugation untersucht werden. Zu diesem Zweck soll ein azidmodifiziertes TO-Derivat synthetisiert und mittels kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition postsynthetisch an ein 2'-O-propargyl-modifiziertes Uridin gekoppelt werden (Abb. 2.2).

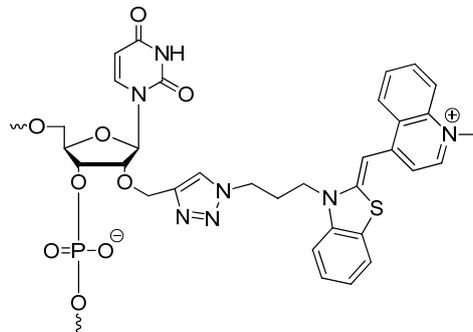


Abb. 2.2: Nucleosid-Zielstruktur nach postsynthetischer TO-Modifikation.

4) Erhöhung der Photostabilität

Um die Belichtungsdauer zu verbessern, soll TO durch den photostabileren Styrylfarbstoff CyIQ ersetzt werden. Außerdem soll eine lineare, hybridisierungssensitive DNA-Sonde entwickelt werden.

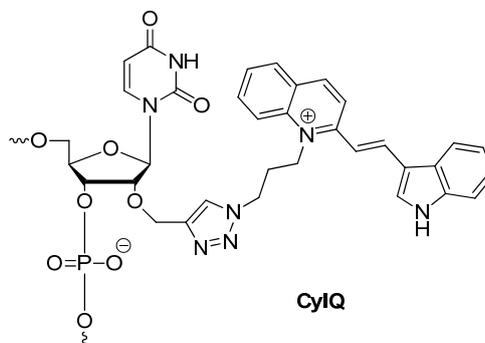


Abb. 2.3: Nucleosid-Zielstruktur nach postsynthetischer CyIQ-Modifikation.

B. Anwendung des Konzepts *DNA Traffic Lights* in der Bioanalytik

Um die bioanalytische Relevanz des entwickelten Konzepts zu zeigen, sollen hybridisierungssensitive Oligonukleotidsonden entwickelt, und in verschiedenen Anwendungsgebieten eingesetzt werden.

1) *Molecular Beacons* zur SNP-Detektion

Durch die Wahl unterschiedlicher Stämmmlängen und Schleifengrößen soll das Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} zwischen Haarnadel- und Duplexform optimiert werden (Abb. 2.4). Ein Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen *Molecular Beacon* soll die Vorteile des entwickelten Konzepts aufzeigen.

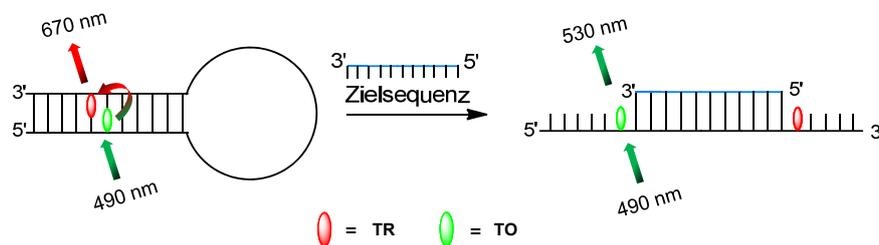


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des zu entwickelnden, wellenlängenverschiebenden *Molecular Beacons*.

2) Aptasensoren

Ein adenosinsensitiver und -selektiver Aptasensor auf Basis der *DNA Traffic Lights* soll die Anwendung des entwickelten Konzepts im Bereich der Analytik einzelner Moleküle demonstrieren (Abb. 2.5).

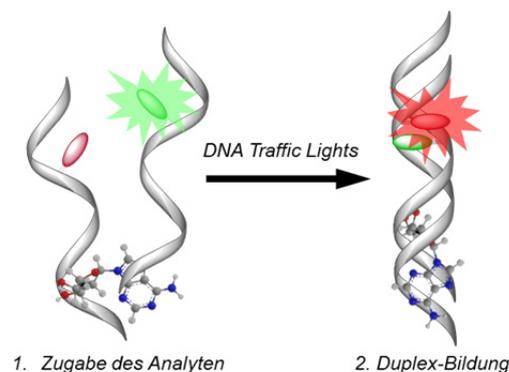


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des zu entwickelnden, adenosinsensitiven und -selektiven Aptasensors.

3) RNA-Interferenz (siRNA-Technologie)

Das Konzept *DNA Traffic Lights* soll auf die Anwendung in der siRNA-Technologie übertragen werden. Hierzu sollen verschiedene Oligonukleotide hergestellt und spektroskopisch untersucht werden. Anhand der erhaltenen Resultate soll ein siRNA-Duplex entwickelt und zur gezielten Ausschaltung der GFP-Expression in GFP-HeLa Zellen eingesetzt werden.

4) Korrelative Elektronen- und Lichtmikroskopie

Die korrelative Elektronen- und Lichtmikroskopie ist für Proteine eine häufig gebrauchte Methode und soll im Rahmen dieser Arbeit für Oligonukleotide etabliert werden. Mit Hilfe modifizierter DNA/RNA findet eine fluorophorgetriebene Photooxidation statt, wodurch eine Kontrastierung in Zellschnitten ermöglicht wird. Es sollen unterschiedliche Oligonukleotid-Sonden hergestellt werden:

- **TO-markierte DNA** (Chromophoranbindung über einen acyclischen Linker während der DNA-Festphasensynthese)
- **CyIQ-markierte RNA** (Chromophoranbindung durch postsynthetische Kopplung an ein 2'-O-propargyl-modifiziertes Uridin mittels kupfer-katalysierter, 1,3-dipolarer Cycloaddition).

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Fluoreszenzspektroskopie und Energietransfer

Photophysikalische Grundlagen und Begriffe

Wird ein Molekül durch die Absorption eines Photons elektronisch angeregt, so hat es die Möglichkeit die aufgenommene Energie in Form von Strahlung wieder abzugeben. Allgemein wird dieses Phänomen als Photolumineszenz bezeichnet, wobei man zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheiden kann. Die Anregung findet hierbei gemäß der Boltzmann-Verteilung hauptsächlich aus dem Schwingungsgrundzustand des S_0 -Energieniveaus in höher gelegene Schwingungszustände des S_1 - bzw. des S_2 -Energieniveaus statt. Die aufgenommene Energie kann entweder durch strahlungslose Relaxation oder lichtemittierende Prozesse abgegeben werden. Wird ein Elektron in höhere Energieniveaus, wie beispielsweise das S_2 Niveau angehoben, so kommt es zur *Internal Conversion* (IC), was bedeutet, dass das Elektron unter Erhalt der Spinmultiplizität in den niedrigsten elektronisch angeregten Zustand S_1 übergeht und anschließend weiter strahlungslos relaxiert, um in den Schwingungsgrundzustand dieser Energiestufe zu gelangen. Von dort aus kann die verbleibende Energie des Moleküls in Form von Licht durch einen direkten $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang abgegeben werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von Fluoreszenz; die dabei emittierte Wellenlänge ist auf Grund der bereits strahlungslos abgegebenen Energie daher immer zu höheren Wellenlängen, verglichen mit dem Absorptionsmaximum verschoben, was auch bei Betrachtung des Jablonski – Diagramm in Abb. 3.1 ersichtlich wird. Die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum wird als *Stokes-Verschiebung*^[12] bezeichnet. Neben strahlungsloser Relaxation von $S_1 \rightarrow S_0$ (SR, beispielsweise durch Rotation des Moleküls oder durch Zusammenstöße mit Lösungsmittelmolekülen) kann es außerdem durch *Intersystem Crossing* (ISC) zu einem strahlungslosen Übergang vom S_1 -Singulett-Zustand zum T_1 -Triplet-Zustand kommen. Prinzipiell sind Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizitäten verboten, können jedoch auf Grund einer schwach ausgeprägten Spin-Orbit-Kupplung in bestimmten Molekülen stattfinden. Wird die verbleibende Energie in Form von Licht durch einen $T_1 \rightarrow S_0$ -Übergang des Elektrons abgegeben, so spricht man von Phosphoreszenz. Durch den energetisch niedriger liegenden T_1 -Zustand (verglichen

mit dem S_1 -Zustand) ist das Emissionsmaximum der zu beobachtenden Phosphoreszenz zu höheren Wellenlängen verschoben (siehe Abb. 3.1).^[13-14] Cyaninfarbstoffe betreffend spielt ISC jedoch keine Rolle.

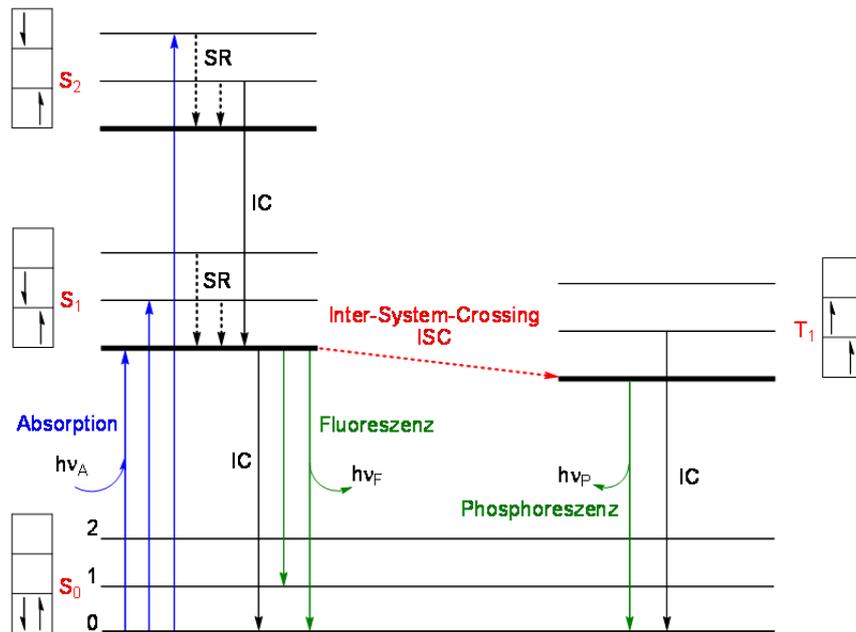


Abb. 3.1: Jablonski-Diagramm zur Vereinfachung der wichtigsten Relaxationsprozesse.

A = Absorption, F = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz, SR = Schwingungsrelaxation, IC = *Internal Conversion*, ISC = *Intersystem Crossing* (Singulett-Triplett Übergang), S = Singulett-Zustand, T = Triplett-Zustand.

Eine häufig verwendete Größe im Zusammenhang mit der Fluoreszenzspektroskopie ist die sog. Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Die Quantenausbeute gibt den Anteil emittierter Photonen im Verhältnis zur Gesamtanzahl der absorbierten Photonen an. Φ_F drückt den Anteil angeregter Moleküle aus, die während ihrer Rückkehr in den Grundzustand Photonen abgeben. Dies lässt sich wie folgt ausdrücken, wobei k für die Ratenkonstanten der unterschiedlichen Prozesse steht:

$$\Phi_F = \frac{k_{\text{Fluoreszenz}}}{\sum k_{\text{Relaxation}}} = \frac{I_{\text{emittiert}}}{I_{\text{absorbiert}}}$$

Neben der Quantenausbeute wird häufig zur Charakterisierung eines Fluorophors oder einer fluoreszenten Sonde die sog. Helligkeit (*Brightness* B) herangezogen.

Diese ist oft aussagekräftiger als Φ_F weil neben dem Emissionsverhalten auch das Absorptionsverhalten in Form des Extinktionskoeffizienten ε berücksichtigt wird. Dieser gibt Auskunft darüber, ob und in welchem Maße ein Molekül in der Lage ist Photonen aufzunehmen. Die Helligkeit ist verantwortlich dafür, wie gut sich ein Fluorophor von Hintergrundfluoreszenz abheben kann. Dies ist eine Grundvoraussetzung der fluoreszenten Bildgebung und wird bei den, in dieser Arbeit hergestellten Cyaninfarbstoffen, erfüllt.

$$B = \varepsilon \cdot \Phi_F$$

Die Fluoreszenzlebensdauer τ gibt an, wie lange ein Molekül durchschnittlich im angeregten Zustand verweilt, bevor es durch Fluoreszenzemission in den Grundzustand zurück fällt. Für Cyaninfarbstoffe ist die Fluoreszenzlebensdauer sehr kurz und liegt in einem Bereich von mehreren 100 ps. Dieser Wert kann durch die Polarität des Lösungsmittels, den pH-Wert sowie die Temperatur beeinflusst werden.^[15]

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{Fluoreszenz}}}$$

Für die Fluoreszenzintensität I_F gilt das Gesetz von Parker. Es besagt, dass zwischen I_F und der Stoffmengenkonzentration c des fluoreszierenden Moleküls ein linearer Zusammenhang besteht. Analog zum Lambert-Beerschen Gesetz für die Absorption gilt das Gesetz von Parker ebenfalls nur für niedrige Fluorophorkonzentrationen, da bei höheren Konzentrationen der lineare Zusammenhang nicht mehr gegeben ist.

$$I_F = I_0 \cdot \Phi_F \cdot k \cdot \varepsilon \cdot d \cdot c$$

Parametererklärung:

- I_F = Fluoreszenzintensität
- I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichts
- Φ_F = Fluoreszenzquantenausbeute
- k = Geometrieparameter
- ε = dekadisch molarer Extinktionskoeffizient
- d = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung
- c = Konzentration des Fluorophors

Anregungsspektren

Als Fluoreszenzanregungsspektrum bezeichnet man ein Spektrum, bei dem die Fluoreszenzintensität bei einer konstanten Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge gemessen wird. Ist nur ein einziger Fluorophor im Grundzustand zugegen, so sollte das Anregungsspektrum genauso aussehen wie dessen Absorptionsspektrum. Bildet dieser Fluorophor jedoch Grundzustandsaggregate oder –komplexe, so können sich Anregungs- und Emissionsspektrum erheblich unterscheiden, je nach dem aus welchem Zustand die Fluoreszenzemission bei einer bestimmten Wellenlänge stimuliert wird.^[13]

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Unter dem von Förster erstmals 1948 geprägten Begriff „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (FRET) versteht man einen strahlungslosen Energietransfer zwischen einem angeregten Donormolekül (D) und einem sich im Grundzustand befindlichen Akzeptormolekül (A).^[16] Die Energieübertragung findet hierbei durch Dipol-Dipol-Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor statt. Die Ratenkonstante dieses Prozesses lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:^[17]

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

$$\text{wobei: } R_0 = \left(\frac{8.79 \cdot 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{n^4} \right)^{\frac{1}{6}}$$

- mit:
- k_{FRET} : Ratenkonstante des Energietransfers
 - τ_D : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
 - R_0 : Förster Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)
 - r : Abstand zwischen Donor und Akzeptor
 - κ : Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor
 - Φ_D : Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
 - $J(\lambda)$: Spektrales Überlappintegral
 - n : Brechungsindex des Mediums zwischen den Chromophoren

Betrachtet man obige Gleichungen, so werden wichtige Grundvoraussetzungen für einen effizienten FRET deutlich:

1. Donoremission und Akzeptorabsorption müssen spektral überlappen, d.h. das Überlappintegral $J(\lambda)$ darf nicht Null sein:

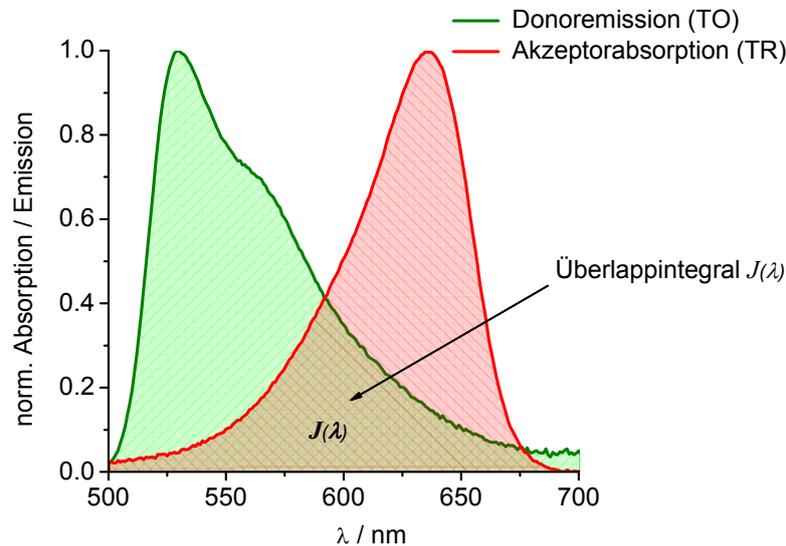


Abb. 3.2: Spektrales Überlappintegral zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption am Beispiel von TO (Donor) und TR (Akzeptor)

2. Donor und Akzeptor müssen sich in räumlicher Nähe befinden ($<10 \text{ nm}$); als Förster Radius R_0 wird die Distanz r bezeichnet, bei der ein Energietransfer mit einer Effizienz von 50 % stattfindet.

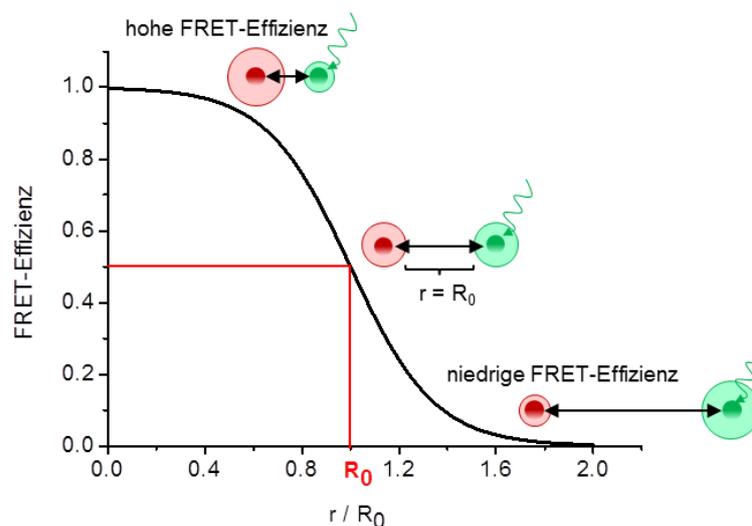


Abb. 3.3: Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor bei einem gegebenen Förster-Radius R_0

3. Donor und Akzeptor müssen sich in einer geeigneten geometrischen Anordnung zueinander befinden (κ -Faktor); κ^2 ist abhängig vom Winkel zwischen dem Donor- und dem Akzeptor-Übergangsdipolmoment. Für willkürlich orientierte Dipolmomente wird meist mit einem Durchschnittswert von $2/3$ für κ^2 für frei rotierende Dipolmomente gerechnet.^[18]

Auf Grund der oben beschriebenen Eigenschaften wird FRET häufig als „molekulares Lineal“ in der DNA / RNA-Analytik^[19] eingesetzt, um beispielsweise Abstände in einem Bereich von 20-80 Å zu bestimmen^[20-22], DNA/RNA-Faltungsgleichgewichte zu beobachten^[23-24] oder Interaktionen mit Proteinen^[25-26] anzuzeigen. Hierbei wird die Akzeptorfluoreszenz durch räumliche Nähe zu einem sog. Fluoreszenzlöcher reduziert oder wahlweise durch den Einsatz eines zweiten Fluorophors zu höheren Wellenlängen verschoben. Interessante Ergebnisse wurden hierzu von *Wilhelmsson et al.*^[22] erbracht: durch die Verwendung eines fluoreszenten Basenpaares wurde sowohl die Distanzabhängigkeit als auch die Orientierungsabhängigkeit der Übergangsdipolmomente auf die FRET-Effizienz untersucht. Die gewählten Fluorophore ersetzen einzelne Basen in der DNA-Doppelhelix und sind so durch ihre Fähigkeit, Wasserstoffbrücken auszubilden sowie hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen, in ihrer Orientierung festgelegt. Mit der DNA-Doppelhelix als Matrix können nun sowohl der Abstand zwischen Donor und Akzeptor als auch die relative Lage der Übergangsdipolmomente zueinander präzise festgelegt werden. Folgende Abstands-/Orientierungsabhängigkeit konnte erhalten werden:

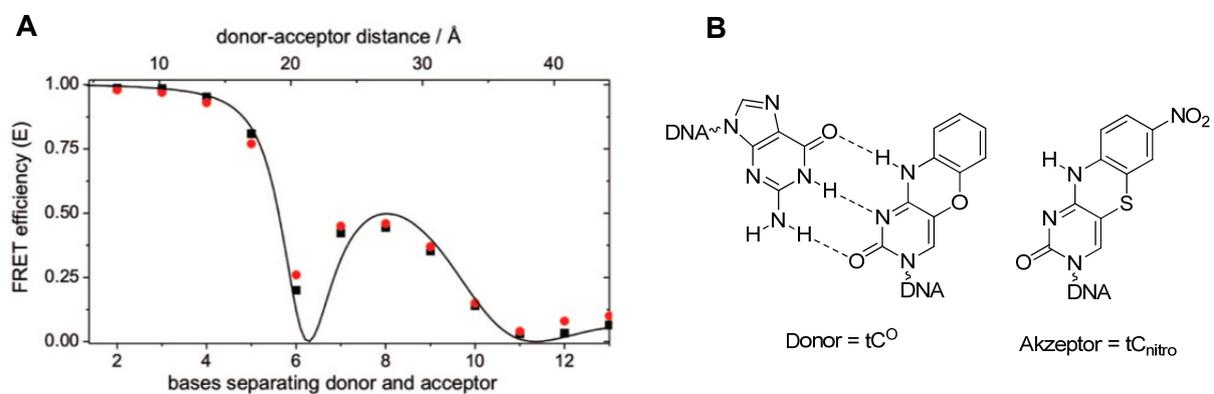


Abb. 3.4: **A:** FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Donor-Akzeptordistanz sowie der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente^[22] in der DNA-Doppelhelix. **B:** Struktur des G-tC⁰ Basenpaares (links, fluoreszenter Energiedonor) und des Cytosinanalogs tC_{nitro} (rechts, nicht-fluoreszenter Energieakzeptor).

Dexter-Energie-Transfer

Grundlage des Dexter-Energie-Transfers ist eine intramolekulare Überlappung der Donororbitale mit den Akzeptororbitalen. Durch die Anregung des Donors wird ein Elektron in ein energetisch höher liegendes Niveau (HOMO \rightarrow LUMO) gehoben und anschließend in das LUMO des Akzeptormoleküls übertragen. Gleichzeitig findet ein Elektronaustausch zwischen dem HOMO des Akzeptors und dem HOMO des Donors statt. Da dieser „doppelte Elektronenaustausch-Mechanismus“ nur möglich ist, wenn Donor- und Akzeptororbitale überlappen, ist der Dexter-Energie-Transfer auf kurze Distanzen ($<10 \text{ \AA}$) beschränkt. Bei verbotenen Übergängen zwischen Singulett- und Triplettzustand ist der Austauschmechanismus häufiger zu finden. In Abb. 3.5 ist der Unterschied zwischen Förster-Resonanz-Energie-Transfer und dem Dexter-Austausch-Mechanismus schematisch dargestellt. In der vorliegenden Arbeit spielt der Dexter-Energie-Transfer keine Rolle. Auf Grund der kurzen Distanz zwischen dem Donor- und Akzeptormolekül in der DNA kann jedoch eine eventuelle Beteiligung am Energietransfer nicht vollkommen ausgeschlossen werden, ist aber eher unwahrscheinlich.^[13]

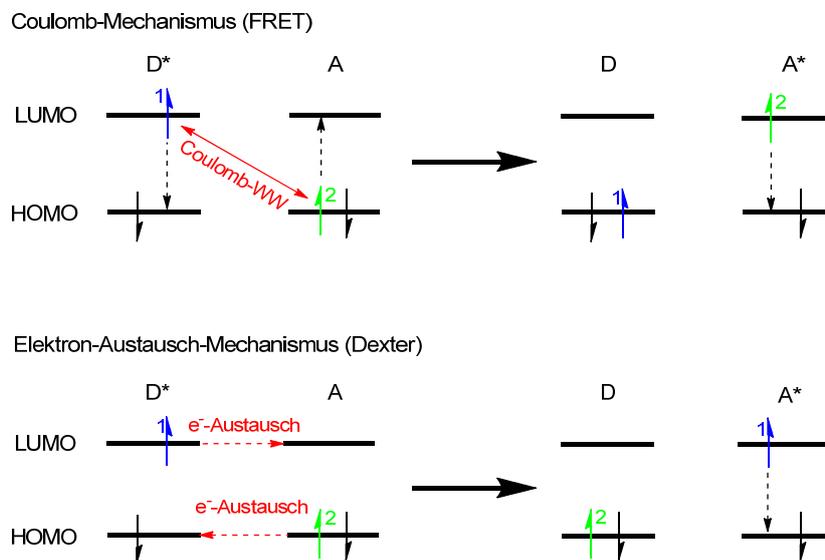


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Coulomb-Mechanismus (oben) sowie des Elektronen-Austausch-Mechanismus (unten); Energie-Donor (D), Energie-Akzeptor (A), höchstes besetztes Molekülorbital (HOMO), niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (LUMO); die Pfeile zeigen einzelne Elektronen (e^-).

3.2 Wellenlängenverschiebende DNA-Sonden

Die Entwicklung neuer Werkzeuge und Fluoreszenzsonden zur Anwendung in der Biosensorik, der Nukleinsäure-Analytik sowie zur Visualisierung einzelner Zellen/Zellbestandteile, ist ein in den letzten Jahren ständig wachsender Wissenschaftsbereich.^[27-31] Die derzeit größten Herausforderungen auf diesem Gebiet liegen in der Beobachtung der zellulären Aufnahme von DNA/RNA und der anschließenden sequenzspezifischen Hybridisierung sowie in der verlässlichen Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) durch Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.^[32] Werden Hybridisierungsnachweise jedoch im Inneren einer Zelle durchgeführt, so birgt die Auslesung einer einzelnen Fluoreszenzwellenlänge jedoch das Risiko eines falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisses, verursacht durch die Autofluoreszenz intrazellulärer Bestandteile oder durch unspezifische Fluoreszenzlöschung. Von entscheidender Bedeutung ist daher die Entwicklung neuer und leistungsfähiger DNA/RNA-Sonden, die im folgenden Teil kurz vorgestellt werden sollen. Hierbei stehen hauptsächlich DNA-Sonden im Mittelpunkt, deren Auslesung auf unterschiedlichen Wellenlängen beruht.

3.2.1 *Molecular Beacons*

Molecular Beacons (MB) sind ein häufig gebrauchtes Werkzeug in der Fluoreszenz-Bioanalytik von Nukleinsäuren.^[32-33] Der Begriff *Molecular Beacon* wurde erstmals von *Tyagi* und *Kramer* 1996 verwendet und beschreibt eine DNA-Haarnadelstruktur

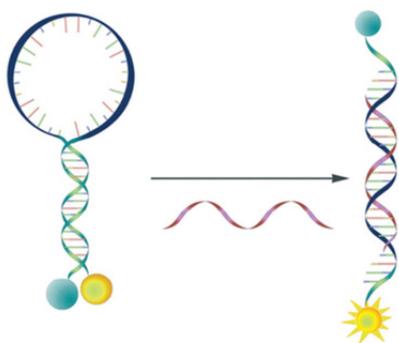


Abb. 3.6: Funktions- und Strukturprinzip eines klassischen *Molecular Beacons*.^[32]

die als Fluoreszenzsonde für verschiedenste Zwecke eingesetzt werden kann.^[34-35]

Klassische MBs sind zweifach endmodifizierte Oligonukleotide, die in Lösung aufgrund selbstkomplementärer Bereiche als Haarnadel vorliegen, wodurch die Fluoreszenz des Reporter-Chromophors (gelb) durch einen sich in räumlicher Nähe befindlichen Fluoreszenzlöcher (blau) durch FRET unterdrückt wird. In Gegenwart einer, zur

Schlaufenregion des MB komplementären Zielsequenz wird die Haarnadelstruktur durch stärkere intermolekulare Hybridisierung geöffnet, woraufhin die Fluoreszenz des Chromophors wieder hergestellt wird.^[32] Neben dieser „klassischen“ Variante der MBs, welche auf der Auslesung einer einzelnen Wellenlänge beruht, wurde in den letzten Jahren über eine Vielzahl neuer Varianten berichtet, die auf der Detektion unterschiedlicher Wellenlängen beruhen und so einigen Einschränkungen klassischer MBs aus dem Wege gehen. Eine Unterscheidung zwischen Abwesenheit der Zielsequenz und erfolgloser Zelltransfektion sollte bei einer, auf unterschiedlichen Wellenlängen basierenden Auslesung beispielsweise möglich sein. Im Folgenden werden die vielversprechendsten Weiterentwicklungen anhand einiger Beispiele kurz dargestellt.

Wellenlängenverschiebende MBs

Die Arbeitsgruppe um *Tyagi* berichtete erstmals im Jahr 2000 von einem sog. wellenlängenverschiebenden MB.^[36] Ziel dieser Arbeit war es, eine ganze Reihe von MB zu entwickeln, die alle mit der gleichen Lichtquelle angeregt werden und je nach Wahl der Fluorophore in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen ausgelesen werden können. Der prinzipielle Aufbau eines solchen wellenlängenverschiebenden MBs ist in Abb. 3.7 dargestellt.

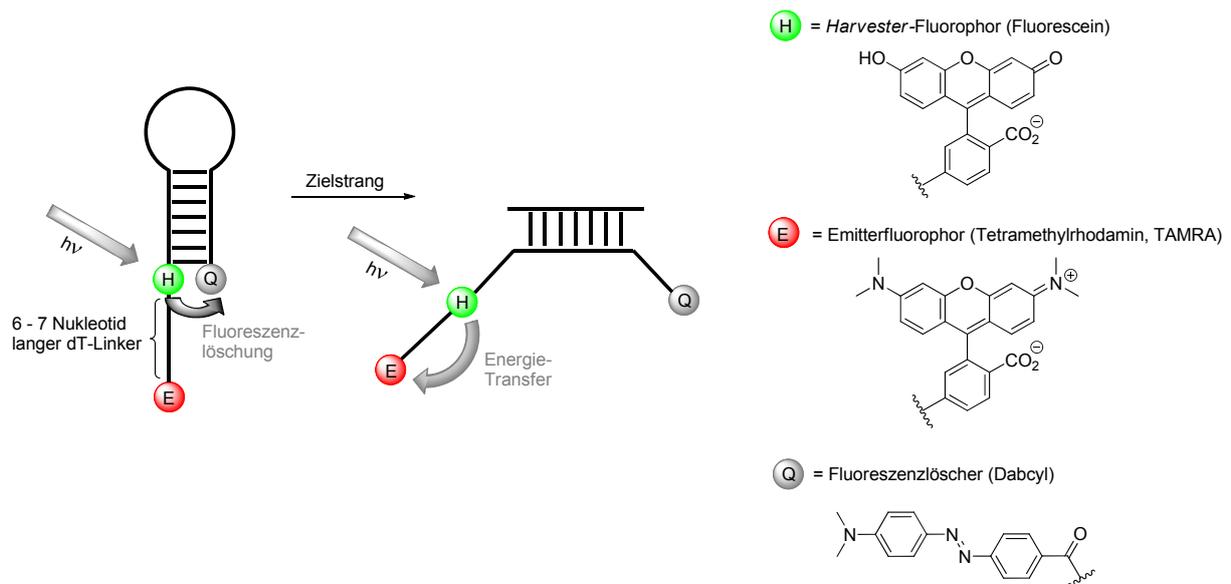


Abb. 3.7: Links: Prinzip eines wellenlängenverschiebenden *Molecular Beacons* mit den folgenden Modifikationen: Fluoreszenzlöscher am 3'-Ende (Q, grau), Lichtsammel-Fluorophor als interne Modifikation an der gegenüberliegenden Stelle des 5'-Armes (H, grün), emittierender Fluorophor am verlängerten 5'-Ende (E, rot). **Rechts:** Strukturformeln der verwendeten Fluorophore.

In der Haarnadelkonformation befinden sich Lichtsammel-Fluorophor und Fluoreszenzlöscher in direkter räumlicher Nähe zueinander, wohingegen der emittierende Fluorophor über zusätzliche Nukleotide distanziert ist. Durch eine Anregung des *Harvester Fluorophors* kommt es in Abwesenheit der Zielsequenz zur Fluoreszenzlöschung. Dies ist der Fall, da ein durch direkten Kontakt vermittelter Energietransfer schneller von statten geht als ein FRET zum etwas weiter entfernten Emitterfluorophor. Durch die Zugabe des Zielstrangs werden Lichtsammel-Fluorophor und Fluoreszenzlöscher voneinander entfernt und es kommt nicht, wie im klassischen MB, zu einer Wiederherstellung der Fluoreszenz des Lichtsammel-Fluorophor sondern zu einem FRET auf einen zweiten emittierenden Fluorophor, wodurch die Auslesungswellenlänge verschoben wird.

Neben dem Beispiel von *Tyagi et al.* findet man in der Literatur eine Vielzahl weiterer MBs, deren Detektionswellenlänge durch die Verwendung von zwei bzw. drei Fluorophoren und dem daraus resultierenden FRET verschoben wird.^[37-41]

MBs ohne Fluoreszenzlöscher

MBs ohne Fluoreszenzlöscher (QF-MBs) sind einfach fluorophormodifizierte Oligonukleotide die, analog klassischer MBs, in Abwesenheit einer Zielsequenz eine Haarnadelstruktur ausbilden, wobei sich die Modifikation sowohl am Stammende als auch in der Mitte der Haarnadelschleife (siehe Abb. 3.8) befinden kann.

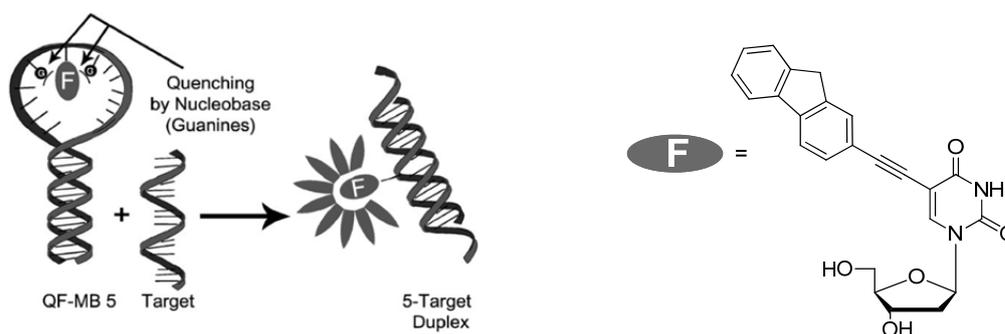


Abb. 3.8: Links: Funktionsprinzip eines MBs ohne Fluoreszenzlöscher (QF-MB): der Fluorophor (F = über einen kurzen Ethynyl-Linker an Uridin gekoppelt Fluoren) ist in der Mitte des Oligonukleotids angebracht und wird in der Haarnadelform durch flankierende Nucleobasen gelöscht.^[42] Rechts: Struktur des Fluorenbausteins.

Als Fluorophor wurde Fluoren verwendet, welches über einen kurzen Ethynyl-Linker an Uridin gekoppelt wurde und so die natürliche DNA-Basenpaarung der

Haarnadelschleife nicht beeinträchtigt.^[42-43] Liegt der MB in der Haarnadelform vor, wird die Fluoreszenz des Fluorens durch die benachbarten Nucleobasen gelöscht, wobei der zu beobachtende Effekt bei Guanin auf Grund seines Oxidationspotentials am größten ist. Liegt der MB als Duplex mit der gewünschten Zielsequenz vor, lässt sich ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachten. Dieser ist jedoch im Fall einer Einzelbasenmutationen weitaus geringer, was eine Unterscheidung zur vollständig komplementären Zielsequenz erlaubt.^[42-43] Durch die Einfachmodifikation lassen sich derartige MBs relativ leicht herstellen und bieten des Weiteren die Möglichkeit der Festphasen- / Partikelkonjugation (gegeben durch die unmodifizierten Termini der Oligonukleotide). Weil die den Fluorophor flankierende Basensequenz sowie Lösungsmittelleffekte einen sehr starken Einfluss auf die gemessene Fluoreszenzintensität haben, ist der Anwendungsbereich der QF-MBs jedoch deutlich limitiert.

MBs basierend auf Excimer- bzw. Excimer-artiger Fluoreszenz

Excimerartige-Fluoreszenz, wie sie beispielsweise für das Pyren- und Perylenbisimid-Dimer (PBI) beobachtet werden kann, hat den Vorteil, dass die Detektionswellenlänge verglichen mit einem „klassischen“ MB, nicht gelöscht wird sondern zu einer anderen Wellenlänge verschoben wird. Dadurch kann das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich verbessert und die Auslesung erleichtert werden. Im Folgenden werden unterschiedliche Ansätze anhand von ausgewählten Beispielen kurz vorgestellt:

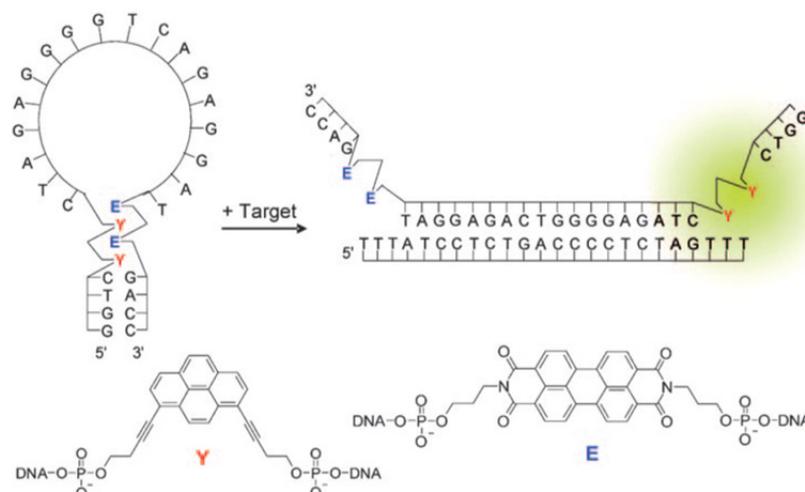


Abb. 3.9: Excimerkontrollierter MB; links: die Excimerbildung zwischen den benachbarten Pyrenmodifikationen (Y) wird in der Haarnadelform durch eine Einlagerung von Perylenbisimiddervaten (E) verhindert; rechts: Pyren-Excimerbildung in der Duplexform.^[44]

Häner et al. entwickelten einen MB, der neben zwei Pyreneinheiten zusätzlich zwei Perylenbisimide in der Stammregion enthält, welche in der Lage sind π - π -Wechselwirkungen miteinander einzugehen (siehe Abb. 3.9).^[44] Die beiden unterschiedlichen Modifikationen tragen zum einen zur Stabilisierung der Haarnadelstruktur bei, zum anderen wird ein stabiler Donor-Akzeptor-Komplex zwischen Pyren und Perylen gebildet, der die Hintergrundfluoreszenz durch Fluoreszenzlöschung, verglichen mit bisherigen Ansätzen,^[42, 45-49] minimiert. Durch Zugabe einer komplementären Zielsequenz wird der MB geöffnet. Dies lässt sich durch einen stetigen Anstieg der Excimer-Bande des Pyrens bei 520 nm beobachten.

Wie bereits oben genannt, zeigen auch Perylenbisimid-Dimere eine, im Vergleich zum Monomer rotverschobene excimerartige-Fluoreszenz. Durch den Ersatz zweier PBI-Monomere als Basensurrogat im Stamm des MB gelang es *F. Menacher* aus dem Arbeitskreis *Wagenknecht* MBs herzustellen, die in ihrer Haarnadelform die erwähnte excimerartige-Fluoreszenz bei ~ 680 nm zeigen (siehe Abb. 3.10).^[50]

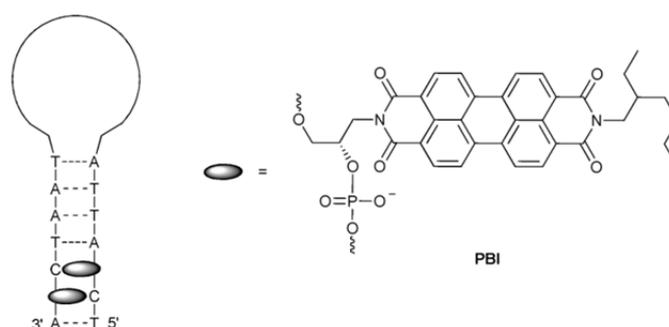


Abb. 3.10: Schematische Darstellung eines excimerkontrollierten, PBI modifizierten MB.^[50]

In Gegenwart der Zielsequenz lässt sich ein kontinuierlicher Abfall des Excimer-Signals beobachten. Dieser geht schrittweise einher mit einem Anstieg der feinstrukturierten PBI-Monomer Banden in einem Wellenlängenbereich von 530 – 630 nm; interessanterweise lassen sich zusätzlich Änderungen in der Feinstruktur der Perylenabsorption beobachten.

Die Arbeitsgruppe um *Asanuma* entwickelte ebenfalls einen, auf dem Unterschied zwischen Perylen-Monomer- und Perylen-Dimer-Emission basierenden MB (siehe Abb. 3.11) mit dem es ihnen möglich war, zwischen einem Wildtyp-Allel und einer

Deletionsmutante zu unterscheiden.^[51] Neben diesem Beispiel wurden von *Asanuma et al.* eine Vielzahl weiterer DNA-Sonden, die auf diesem Ausleseprinzip basieren, publiziert.^[52-53]

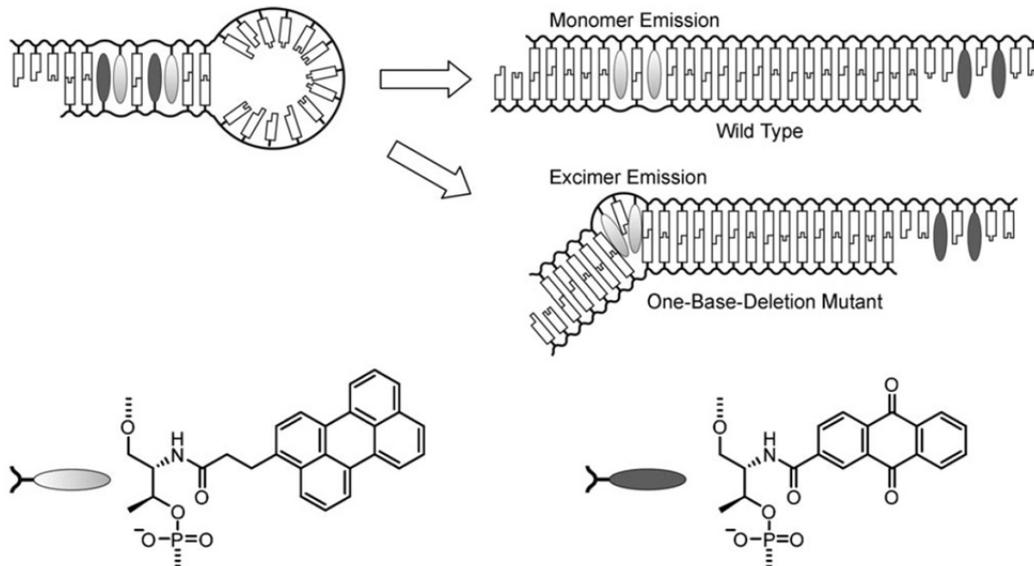


Abb. 3.11: Schematische Darstellung eines Perylen- / Anthrachinonmodifizierten MB zur Unterscheidung zwischen Wildtyp-Allel und Deletionsmutante.^[51]

Neben den häufig gebrauchten Pyren- und Perylenderivaten, wurde von S. Berndl der Cyaninfarbstoff Thiazolorange (TO) als Basensurrogate im Stamm eines MB eingesetzt und dessen Sequenz so gewählt, dass die beiden TO-Chromophore als diagonal angeordnetes Basenpaar sich in räumlicher Nähe befinden (Abb. 3.12).

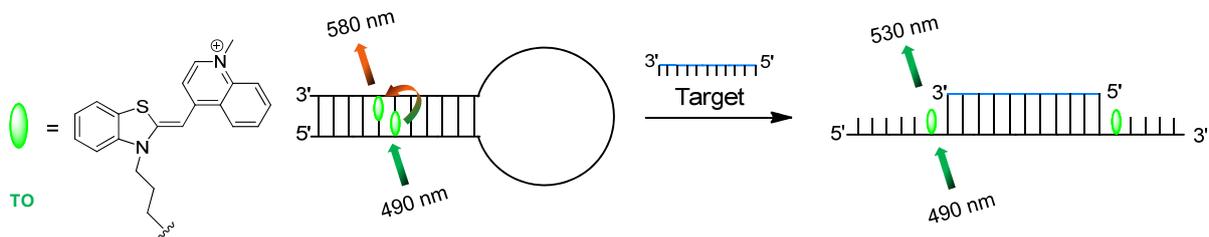


Abb. 3.12: Schematische Darstellung eines TO-Dimer modifizierten MB.

Liegt der MB als Haarnadel vor, so wird die für TO typische Emissionswellenlänge von 530 nm um 50 nm rotverschoben. Grund dafür ist die Ausbildung helikalverdrehter H-Aggregate zwischen den TO-Monomeren, welche durch die doppelhelikale Struktur der DNA unterstützt werden und ein charakteristisches Emissionsmaximum von 580 nm aufweisen. Durch die Hybridisierung mit einer

komplementären Zielsequenz werden die beiden Chromophore voneinander separiert, wodurch ein Farbwechsel von Orange (excimerartige Fluoreszenz bei 580 nm) nach Grün (Monomer-Fluoreszenz bei 530 nm) beobachtet werden kann.^[54]

Neben den genannten Beispielen existiert eine Vielzahl weiterer, im Folgenden nur kurz erwähnte Ansätze, um *Molecular Beacons* als Werkzeug der Bioanalytik gebrauchsfähiger zu machen sowie deren Einsatzgebiet zu erweitern:

- lichtaktivierbare MBs die eine geschützte Schleifensequenz tragen^[55]
- Stammlose PNA-MBs bzw. FIT-PNA Sonden mit TO als Fluorophor^[56-58]
- *in-stem* MBs, wodurch die Emission durch statische Fluoreszenzlöschung vermindert wird^[59]

3.2.2 Multichromophor-DNA-Sonden

Neben den unter 3.2.1 ausführlich besprochenen MBs gibt es eine Vielzahl weiterer DNA-Sonden, deren Ausleseprinzip auf einer Wellenlängenverschiebung durch die Kombination unterschiedlich vieler Chromophore beruht. Dieses Konzept lässt sich am Beispiel der von *Kool et al.* entwickelten ODF-Sonden (*Oligodeoxyfluorosides*) eindrucksvoll veranschaulichen (Abb. 3.13 und Abb. 3.14).^[60-64]

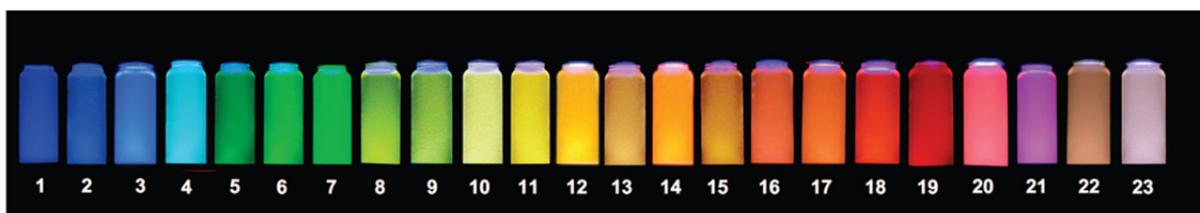


Abb. 3.13: ODF-Lösungen in Phosphatpuffer mit $\lambda_{\text{ex}} = 354 \text{ nm}$; Alle 23 ODF Sonden bestehen aus 4 gleichen Chromophoren in unterschiedlichen Kombinationen.^[60]

Durch unterschiedliche Kombinationen von Pyren, Perylen, Benzopyren und 4-(Dicyanomethylen)-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (Abb. 3.14 B) und dazwischen geschaltete *Spacer*-Nukleotide wurden Sonden hergestellt, die alle im langwelligen UV-Bereich (340 – 380 nm) angeregt werden können und Emissionen zeigen, die sich über den gesamten Bereich sichtbaren Lichts erstrecken (Abb. 3.13).

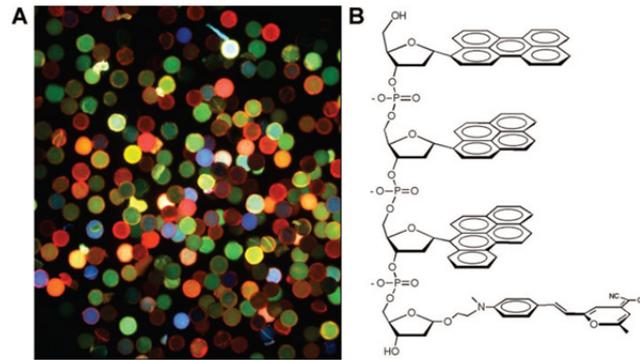


Abb. 3.14: Multispektrale ODFs. **A:** Bild einer ODF-Bibliothek bestehend aus 4096 Tetrameren und 8 Monomerbausteinen bei einem Anregungswellenlängenbereich von 340 – 380 nm. **B:** Struktur eines typischen ODF-Tetramers.^[60]

In Abhängigkeit von Anordnung, Anzahl und Kombinationsreihenfolge der einzelnen Chromophor-Monomere können unterschiedliche Emissionswellenlängen moduliert werden. Je nach Umgebung erfahren die einzelnen Chromophore unterschiedliche elektronische Kopplungen (teils im Grundzustand, teils im angeregten Zustand), d.h. es können beispielsweise Excimere, Exciplexe sowie FRET-Paare etc. ausgebildet werden, welche die Emissionseigenschaften verändern. Um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen sowie ungewollte Aggregation zu vermeiden, wurden zusätzlich sog. *Spacer*-Nukleotide am 5' Terminus eingebaut. Der Vorteil dieser Sonden liegt hauptsächlich darin, dass alle mit der gleichen Wellenlänge angeregt werden können, jedoch unterschiedliche Emissionswellenlängen besitzen, wodurch der apparative Aufwand für eine simultane Detektion verschiedener Emissionsfarben enorm erleichtert wird. *In vivo* Tests zur Biokompatibilität konnten bereits erfolgreich an HeLa Zellen sowie Zebrafisch-Embryos durchgeführt werden.

Okamoto et al. verfolgen mit den sog. ECHO-Sonden (*Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotides*)^[65-68] einen ähnlichen Ansatz, indem sie Oligonukleotide mit einem, über flexible Alkyl linker zweifach mit Thiazolorange modifizierten Deoxythymidin markierten. Im Einzelstrang bilden die TO-Monomere excitonisch gekoppelte, nicht fluoreszierende H-Aggregate aus, welche sich bei der Entstehung eines Duplexes wieder auflösen (Abb. 3.15). Dies kann durch einen Anstieg der TO-Monomer Fluoreszenz beobachtet werden. Eine parallele Detektion unterschiedlicher Zielsequenzen wird durch den Einsatz verschieden farbiger Chromophore ermöglicht.

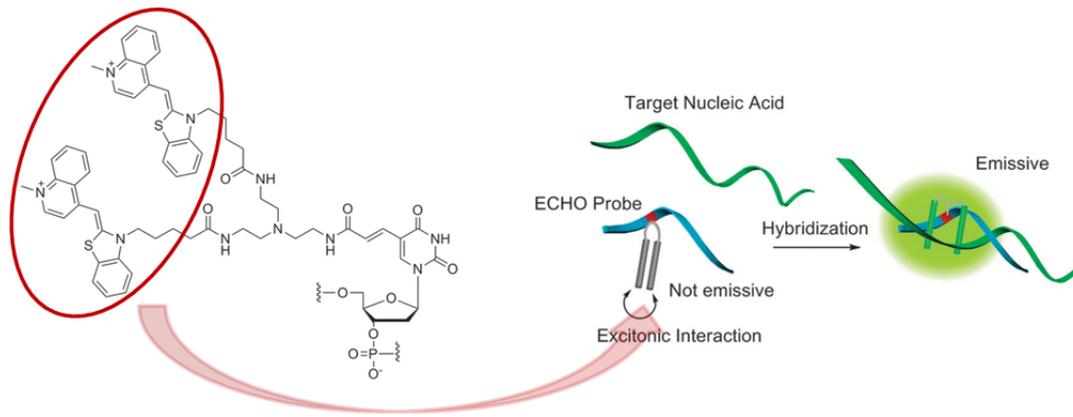


Abb. 3.15: Schematische Darstellung einer ECHO-Sonde für sequenzspezifische Detektion eines Zieloligonukleotids (rechts); Links: Struktur eines doppelt mit TO-modifizierten Oligonukleotids.^[65]

Die Gruppe *Wagenknecht et al.* entwickelte in diesem Zusammenhang die sog. WED-Sonde (*White-Light-Emitting DNA*):^[69] ein Oligomer wurde mit je einem Ethinylpyren- / Ethinylnilrot-modifizierten 2'-Deoxyuridin markiert, die sich in direkter Nähe zueinander befinden (Abb. 3.16). Durch die Anregung von Pyren im Einzelstrang findet ein effizienter FRET auf Nilrot statt und man kann die für Nilrot typische rote Emission beobachten. Wird ein Duplex ausgebildet, so kann ein Farbwechsel nach weiß beobachtet werden (Abb. 3.16). Durch die Ausbildung einer Doppelhelix werden die beiden Farbstoffe helikal verdrillt, wodurch sich die Orientierung der Übergangsdipole verändert. Da die FRET-Effizienz stark von der Lage der Dipolmomente abhängt, lässt sich die Farbänderung durch einen nur noch ineffizient stattfindenden FRET erklären.

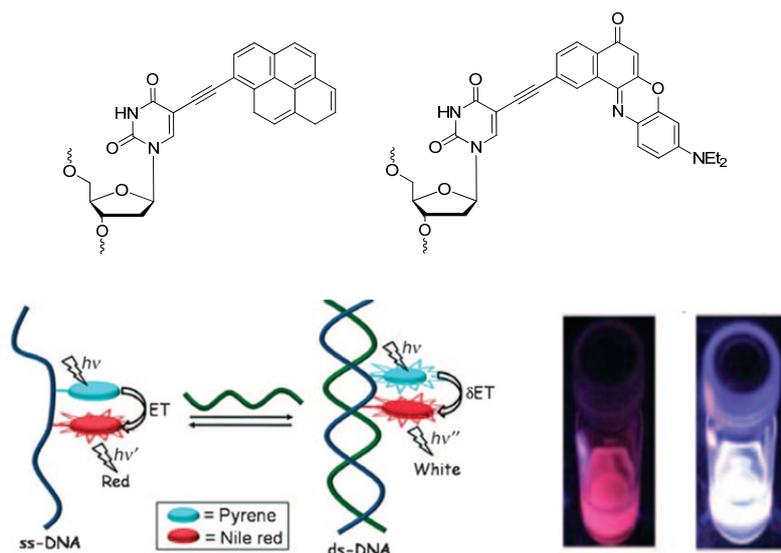


Abb. 3.16: Oben: Struktur der modifizierten 2'-Deoxyuridine. Links: Ethinylpyren; rechts: Ethinylnilrot. **Unten:** Schematische Darstellung eines Pyren und Nilrot modifizierten DNA-Sonde (WED, *White-Light-Emitting DNA*) die in Gegenwart des komplementären Zielstrangs weißes Licht aussendet.^[69]

3.3 Cyaninfarbstoffe: TO und TR als nicht kovalent gebundene DNA-Sonden

Die Verwendung von Cyaninfarbstoffen als fluoreszente Biomarker in der DNA-Analytik so wie der Proteinfärbung ist in den letzten Jahrzehnten nicht mehr wegzudenken.^[70-73] Als prominentestes Beispiel sei *SYBR Green* (Abb. 3.17)

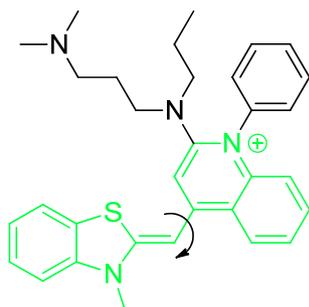


Abb. 3.17: Strukturformel von *SYBR Green*; in grün: TO-Grundgerüststruktur

genannt, welches kommerziell erhältlich ist und Verwendung sowohl in der PCR als auch der Echtzeit-PCR findet.^[74-76] Für die grüne Fluoreszenz des *SYBR Green*-Farbstoffs in Gegenwart doppelsträngiger DNA ist hauptsächlich das TO-Grundgerüst (in Abb. 3.17 in grün dargestellt) verantwortlich: auxochromer und antiauxochromer Teil des Farbstoffes sind über eine Monomethinbrücke verbunden, um welche das Molekül in Lösung rotieren kann.^[77] Auf Grund dieser

Flexibilität kann der Farbstoff eine Reihe unterschiedlicher Konformationen annehmen,^[78] wodurch die eingestrahlte Energie strahlungslos wieder abgegeben wird und Fluoreszenz nicht auftritt.^[79-81] In Gegenwart doppelsträngiger DNA kann sich der freie Farbstoff an die große bzw. kleine Furche des Duplexes anlagern, wodurch die Rotation um die Methinbrücke eingeschränkt wird und der Chromophor als planares Molekül in seiner, für den angeregten Zustand optimalen Geometrie vorliegt. Durch π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Bestandteilen des *SYBR Greens* und den DNA-Basen wird die planare Konformation zusätzlich fixiert.^[82] Bei Verwendung von *SYBR Green* in der PCR kann auf diese Weise die Entstehung doppelsträngiger DNA angezeigt sowie die Menge eingesetzter DNA/RNA quantifiziert werden.

Neben diesem herausragenden Beispiel ist eine Vielzahl weiterer Monomerinterkalatoren bekannt, die strukturelle Übereinstimmungen mit TO bzw. TR zeigen. Meist zeichnen sich diese Farbstoffe durch unterschiedlich modifizierte Alkyl- / Alkylaminoketten am Chinolinstickstoff bzw. Benzothiazolstickstoff aus.^[83-85]

Häufig werden neben Monomerinterkalatoren, wie *SYBR Green*, auch Bisinterkalatoren aus Cyaninfarbstoffen (wie beispielsweise das TOTO- oder das

TRTR-Dimer, Abb. 3.18) eingesetzt, die über eine Polyalkylaminokette verbrückt sind. In Gegenwart von DNA bilden diese Dimere stabile Komplexe mit der DNA-Helix aus, was durch einen enormen Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann. In Lösung hingegen wird die Fluoreszenz durch die Ausbildung excitonischer Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmonomeren stark gelöscht.^[86] Durch den kationischen Linker zwischen den beiden Chromophoren wird zudem die Bindungsaffinität der Bisinterkalatoren zur DNA erhöht.^[87-89]

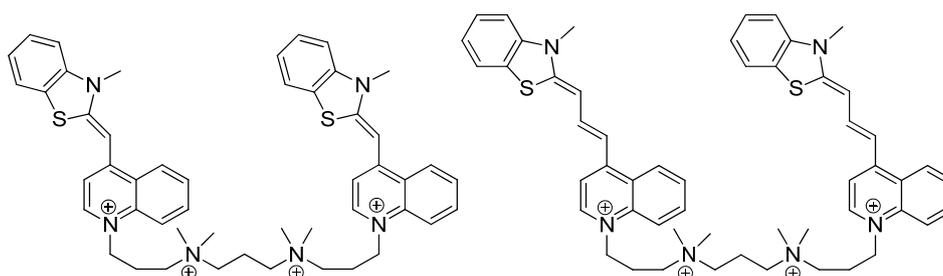


Abb. 3.18: TOTO-Dimer (links) sowie TRTR-Dimer (rechts) als Beispiele für Homodimerefarbstoffinterkalatoren.

Angewendet werden TOTO und TRTR beispielsweise in der Multiplexdetektion von DNA-Fragmenten in der Gel- und Kapillarelektrophorese,^[70, 90] in der Detektion sowie Quantifizierung von Oligonukleotiden in Lösung,^[91] der Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen^[92] oder in der Durchflusszytometrie.^[93]

Glazer et al. entwickelten die in Abb. 3.18 dargestellten Bisinterkalatoren weiter und ersetzten im TOTO-Dimer ein TO durch ein TR, wodurch das sog. TOTAB-Heterodimer erhalten werden konnte (Abb. 3.19).^[94-95] Das TOTAB-Dimer zeichnet sich dadurch aus, dass durch einen FRET von TO auf TR die Auslesungswellenlänge verschoben und so die Sensitivität erhöht werden kann.

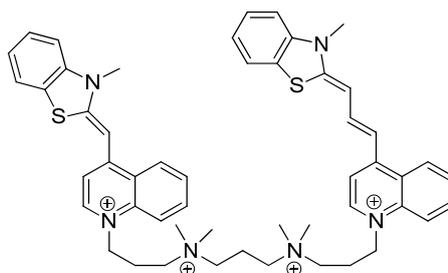


Abb. 3.19: Struktur des Thiazolorange – Thiazolrot Heterodimers (TOTAB).

Dervan et al. ersetzen die verbrückende Polyaminalkylkette durch eine Kombination aus Imidazol-Pyrrol-Derivaten, die über eine Alkylkette miteinander verbunden sind. Dadurch ist es gelungen einen sequenzspezifischen Bisinterkalator herzustellen, der zudem erhöhte DNA-Affinität aufweist.^[96-99] Da die Wahl der Sequenz jedoch durch vorgegebene Struktur motive nicht frei gestaltbar ist, ist die Anwendbarkeit solcher Sonden stark begrenzt.

3.4 Kovalente Modifikation von DNA/RNA Oligonukleotiden

Um eine sequenzspezifische Fluoreszenzdetektion auf der Basis von Cyaninfarbstoffen zu ermöglichen, muss die Sonde kovalent mit dem zur Zielsequenz komplementären Oligonukleotidstrang verknüpft werden. Dies kann durch Kopplung einer fluoreszenten Gruppe an ein natürliches Nukleosid oder durch den Einbau des Chromophors als künstlichen Basenersatz erreicht werden. Dabei kann die Modifikation während der Festphasensynthese oder postsynthetisch vorgenommen werden. Im folgenden Abschnitt werden beide Möglichkeiten kurz dargestellt.

3.4.1 Oligonukleotidmodifikation während der Festphasensynthese

In der Mehrzahl der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, wurden die Farbstoffe TO und TR über einen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker kovalent mit dem Zuckerphosphatrückgrat verknüpft (Abb. 3.20).^[100]

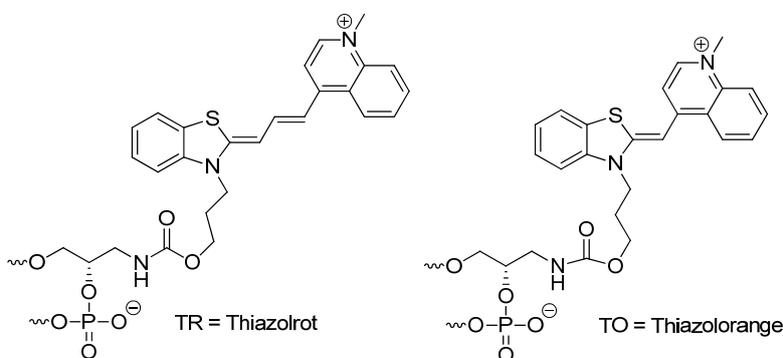


Abb. 3.20: Struktur der eingesetzten DNA-Basensurrogate. Die Ribose-Einheit wurde durch einen acyclischen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker ersetzt. Links: Thiazolrot (TR), rechts: Thiazolorange (TO).

Weil es sich bei den verwendeten Basensurrogaten um kationisch geladene TO-/TR-Derivate handelt, war der Schritt die sonst übliche Ribose-Einheit durch einen acyclischen Linker zu ersetzen, von entscheidender Bedeutung um die Hydrolyse der glykosidischen Bindung zu verhindern.^[101-102] Die erwähnten linkermodifizierten Cyaninfarbstoffe können mittels automatisierter DNA/RNA-Festphasensynthese ins Oligonukleotidrückgrat integriert werden.

Ein ähnliches Linkersystem verwendet *Meggers* in der von seiner Arbeitsgruppe entwickelten GNA (*Glycol Nucleic Acid*).^[103] Alle Ribose-Einheiten des Zuckerphosphatrückgrats werden durch einen Glykollinker ersetzt. GNA-Oligonukleotide zeigen im Duplex die übliche Watson-Crick-Basenpaarung, weisen jedoch höhere Schmelztemperaturen als deren DNA/RNA-Analoga auf.^[103-104]

Die Arbeitsgruppe um *Seitz* zeigte, dass das optische Verhalten von TO stark umgebungsabhängig ist, sobald der Chromophor über einen kurzen C-1-Linker in das PNA-Rückgrat integriert wird (Abb. 3.21). Dabei wird die TO-Emission durch benachbarte G-C Basenpaare stark gelöscht.^[105] Diese sog. FIT-PNA-Sonden (FIT = *Forced Intercalation*) bilden mit DNA stabile Duplexe und zwingen TO auf Grund des sehr kurz gewählten Linkers zur Interkalation. Änderungen der TO umgebenden Basensequenz sowie Basenfehlpaarungen in unmittelbarer Nachbarschaft zu TO können durch eine Änderung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Grund hierfür sind die unterschiedlichen Voraussetzungen zur Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen zwischen TO und den Nachbarbasen bzw. erhöhte konformative Freiheit des TO im Falle einer angrenzenden Basenfehlpaarung.^[57, 105]

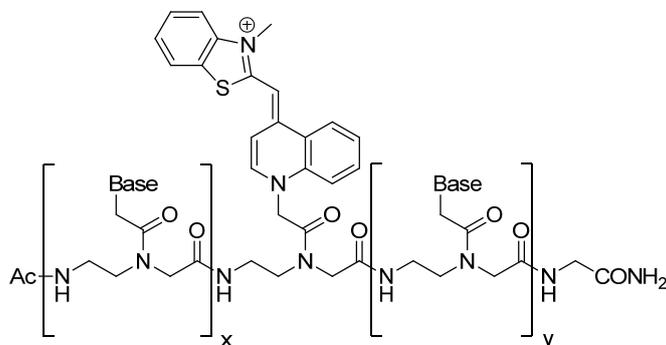


Abb. 3.21: Struktur der FIT-PNA nach Seitz et al.; TO wird über einen kurzen Linker an das PNA-Rückgrat geknüpft.^[57]

Seitz *et al.* versuchten außerdem, das für FIT-PNA-Sonden vorgestellte Konzept auf DNA-Sonden zu übertragen.^[106] Ziel war es, eine TO-modifizierte DNA-Sonde zu erhalten die im Einzelstrang wenig bzw. kaum Fluoreszenz zeigt, im Doppelstrang jedoch stark fluoresziert. Zudem sollte eine simultane Unterscheidung zwischen richtig und falsch gepaarten Duplexen möglich sein. Es wurden *R*-Glycerol sowie *D*- und *L*-Serinol mit unterschiedlich langen Alkylketten getestet (Abb. 3.22). Dabei stellte sich heraus dass nur *L*-Serinol mit einer kurzen Carboxymethyl-Einheit ($n = 1$) die gewünschten Anforderungen erfüllt. Dies liegt daran, dass genau die richtige Länge gewählt wurde, um die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen zwischen TO und den Nachbarbasen im Einzelstrang zu unterbinden. Gleichzeitig gewährt *L*-Serinol die nötige Flexibilität für TO im Doppelstrang, um starke elektronische Kopplungen zu den umgebenden Basen zu unterbinden, wodurch ein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist.

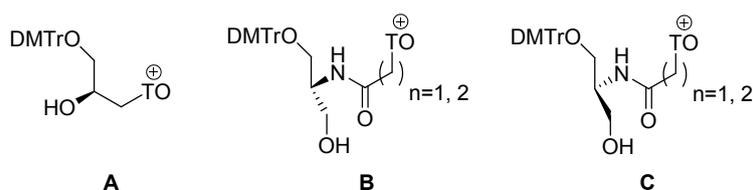


Abb. 3.22: Strukturen verschiedener acyclischer Ribose-Analoga zur TO-Modifikation des DNA-Rückgrats; **A:** *R*-Glycerol; **B:** *L*-Serinol mit $n = 1, 2$; **C:** *D*-Serinol mit $n = 1, 2$.

3.4.2 Postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden

Der postsynthetische Ansatz bietet den Vorteil, dass auch Moleküle die unter den Bedingungen der Festphasensynthese chemisch nicht stabil sind, in DNA/RNA-Oligomere eingebracht werden können. Dabei wird während der DNA-Festphasensynthese eine Reaktive Gruppe (RG) in das Oligonukleotidrückgrat integriert. Durch eine chemoselektive/bioorthogonale Reaktion kann später die Funktionalisierung stattfinden (Abb. 3.23). Im Allgemeinen verläuft eine bioorthogonale Reaktion unter milden Bedingungen vorzugsweise in Wasser, bei physiologischen Konditionen und liefert gute Ausbeuten. Des Weiteren sind die beteiligten Reaktanden inert gegenüber funktionelle Gruppen wie sie in der Natur

vorkommen.^[107] Für in vivo Experimente ist die Biokompatibilität sowie die Zelltoxizität zusätzlich von entscheidender Bedeutung.

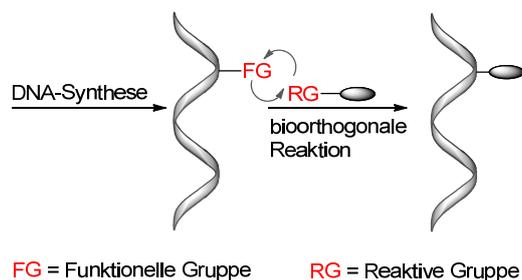


Abb. 3.23: Postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden durch Einbringen einer funktionellen Gruppe in das DNA-Rückgrat und anschließender Reaktion mit einer reaktiven Gruppe.

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Methoden für eine postsynthetische DNA-Modifikation etabliert. Diese können unter dem allgemeinen Begriff der „Klickreaktionen“ zusammengefasst werden. Nach der Definition von *K. B. Sharpless* gibt es eine ganze Klasse sog. „Klickreaktionen“, zu der beispielsweise Cycloadditionen an ungesättigte C-C-Bindungen (1,3-dipolare Cycloaddition sowie Diels-Alder-Reaktion), heterozyklische Ringöffnungsreaktionen (z.B. Epoxidöffnung) sowie Additionsreaktionen an C-C Doppelbindungen (z.B. die Reaktion zwischen Thiolen und Alkenen) zählen.^[108] Dabei wurden von *Sharpless et al.* folgende Grundvoraussetzungen gestellt: Die Reaktion muss

- i) baukastenartig aus einzelnen Modulen aufgebaut sein
- ii) einen weiten Anwendungsbereich haben
- iii) hohe Ausbeuten erzielen
- iv) Stereospezifisch sein
- v) So gestaltet werden, dass nur unschädliche Nebenprodukte auftreten, die ohne chromatographische Reinigung entfernt werden können.

Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Möglichkeiten zur postsynthetischen Modifikation von Oligonukleotiden näher erläutert. Eine ausführliche Beschreibung ist in einem Übersichtsartikel von *Marx et al.* zu finden.^[109]

Anknüpfung über Diels-Alder [4+2] Cycloaddition

Bei Diels-Alder [4+2] Cycloadditionen kommt es durch eine Reaktion zwischen Dien und Dienophil zur Ausbildung einer neuen C-C-Bindung. Sie laufen unter milden

Bedingungen ab und werden durch wässrige Medien beschleunigt. Die spezifische Reaktivität der beiden Funktionalitäten macht die Diels-Alder Cycloaddition für kovalente Biokonjugationen interessant.^[110-112] Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine Vielzahl an Bausteinen in denen Maleimid als Dienophil eingesetzt wird, kommerziell erhältlich ist. Erste Konjugationsversuche mit RNA zeigten, dass die Diels-Alder-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf prinzipiell für Biokonjugationen mit Nukleinsäuren eingesetzt werden kann.^[113-114] Erste postsynthetische DNA-Markierungen wurden mit Hilfe der Cyclohexadien- und acyclischen Hexadien-Phosphoramiditbausteine am 5'-Terminus durchgeführt.^[115] Versuche mit diversen maleimidfunktionalisierten Markern, sowie eine Optimierung der Reaktionsbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Temperatur und Marker-Konzentration führten zu vollständigen Konjugationen in Reaktionszeiten von 30 min bis mehreren Stunden. Außerdem konnten Oligonukleotide auf Oberflächen immobilisiert werden.^[116-117] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich auch Furan Gruppen als Dien-Baustein eignen.^[118]

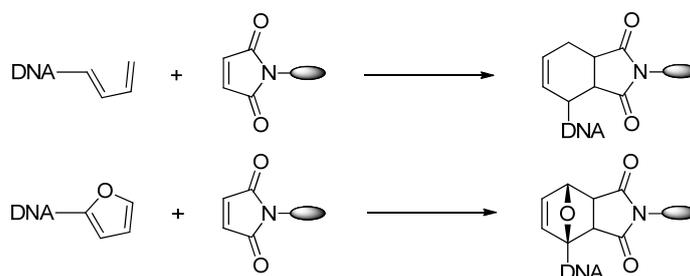


Abb. 3.24: Diels-Alder-Reaktionen mit normalem Elektronenbedarf an dienmodifizierten Oligonukleotiden

Ein Nachteil der dargestellten Diels-Alder-Reaktionen ist deren Reversibilität. Dieses Problem kann durch den Einsatz von Dienen und Dienophilen mit inversem Elektronenbedarf umgangen werden.^[119] Hierzu werden Norbonengruppen als Dienophile während der DNA-Festphasensynthese in die Oligonukleotide eingebaut. Eine Modifikation an beiden Termini, als auch an internen Positionen, ist durch den Einsatz verschiedener Bicyclo[2.2.1]hept-2-en-Derivate möglich. Die entschützten Oligonukleotide werden anschließend durch die Konjugation mit wasserstabilen Tetrazin-Dienen modifiziert. Durch den dabei frei werdenden Stickstoff wird die Rückreaktion verhindert.^[120] Da die inverse Diels-Alder-Reaktion unter milden Bedingungen mit geringen Konzentrationen der beteiligten Reaktanden abläuft, stellt

sie eine gute Alternative zur konventionellen Diels-Alder-Reaktion an Oligonukleotiden dar.

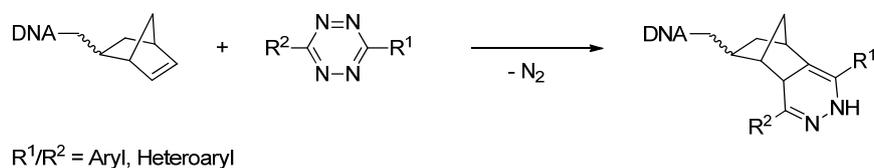


Abb. 3.25: Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf an dienophilmodifizierten Oligonukleotiden.

Diels-Alder-Reaktionen mit normalen, als auch mit inversem Elektronenbedarf laufen ohne den Zusatz von Übergangsmetallen als Katalysator ab und sind somit für den Einsatz in lebenden Zellen geeignet.

Anknüpfung über Thiol-Gruppen

Oligonukleotide mit freien Thiol-Gruppen können selektiv mit verschiedenen Partnern wie beispielsweise α -Halogenacetylen^[121-122], Maleimiden^[123] oder aktivierten Disulfiden^[124] reagieren. Des Weiteren kann die starke Bindung zu elementarem Gold herangezogen werden, um DNA-beschichtete Nanopartikel herzustellen oder Thiol-modifizierte Oligonukleotide auf Goldoberflächen zu immobilisieren.^[125] Da die verwendeten Thiol-Bausteine als Disulfide in die Oligonukleotide eingebaut werden, müssen sie zunächst reduziert werden und können erst anschließend zur Biokonjugation von verschiedenen Markern eingesetzt werden.

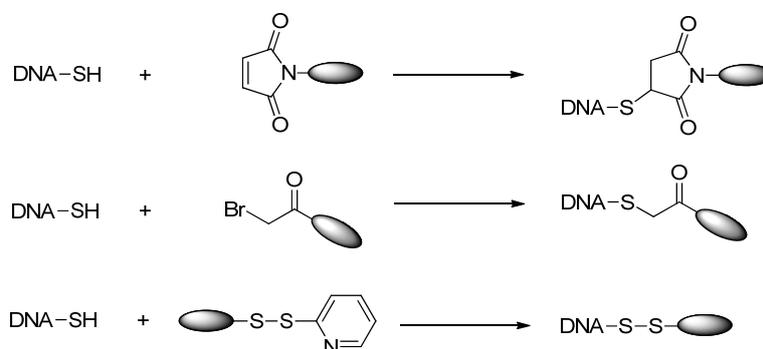


Abb. 3.26: Anknüpfungsmöglichkeiten an thiolmodifizierte Oligonukleotide.

Anknüpfung über Huisgen [3+2] Cycloaddition („Klick“-Reaktion)

Während der Festphasensynthese wird eine alkinmodifizierte DNA/RNA-Base eingeführt, die in Gegenwart von Azidgruppen in einer [2+3] Cycloaddition unter Ausbildung stabiler Triazole reagiert.^[126] Unter Cu(I)-Katalyse läuft die Reaktion bei Raumtemperatur und in wässrigen Lösungsmitteln ab; im Falle terminaler Alkine erhält man im Produkt eine definierte Regiochemie (Abb. 3.27 A und B).^[127-128] Die kupferkatalysierte Huisgen [3+2] Cycloaddition wird i.a. als sog. „Klick-Reaktion“ bezeichnet. Da der Einsatz von Cu(I) für Klick-Reaktionen in lebenden Zellen auf Grund seiner Zelltoxizität nicht geeignet ist, wurde von *Bertozzi et al.* die sog. kupferfreie Klick-Reaktion über Cyclooctin-Ringe entwickelt (Abb. 3.27 C).^[129] Da Cyclooctin-Ringe einer großen Ringspannung unterliegen,^[130-132] verläuft die Bildung des Triazolrings aus Alkin und Azid ohne den Zusatz eines Katalysators^[133] unter physiologischen Bedingungen.^[129, 134-138]

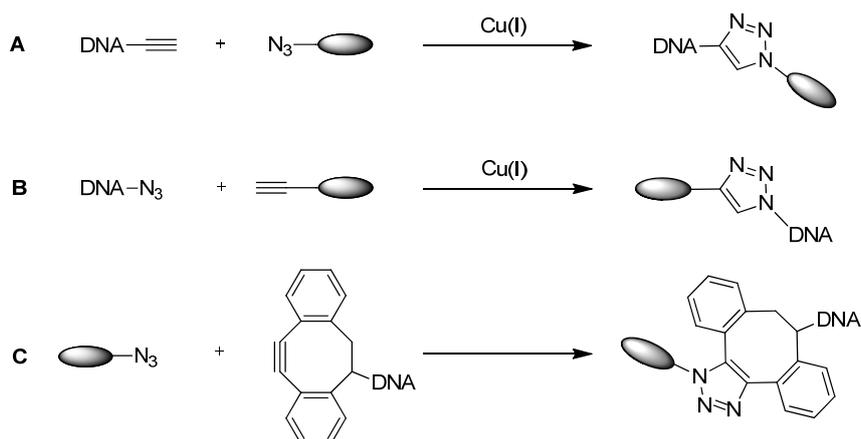


Abb. 3.27: Schematische Darstellung der „Klick-Reaktion“ an DNA. **A** und **B** zeigen Modifikationsansätze der Kupferkatalysierten-Klick-Reaktion; **C** zeigt die Kupferfreie-Variante über einen gespannten Cyclooctin-Ring.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die kupferkatalysierte Klick-Reaktion eingesetzt um ausgewählte DNA/RNA Oligonukleotide postsynthetisch zu modifizieren (Schema A in Abb. 3.27).

Da sowohl die Alkin- als auch die Azidfunktionalität bioorthogonal sind, findet die Klick-Chemie ein breites Anwendungsspektrum für Biokonjugationen.^[108, 139-143] Als alkinmodifizierte Bausteine für die DNA-Festphasensynthese wurden von den Arbeitsgruppen um *Carell* und *Seela* 5-Oktadiinyl-2'-deoxyuridin und die entsprechenden Derivaten der anderen Nucleoside eingesetzt und die Klickreaktion daran untersucht.^[144-145] *Carell et al./Armitage et al.* ist es außerdem gelungen

mehrfach modifizierte TO-DNA-Stränge mit Hilfe der Klick-Reaktion herzustellen, die nach Konjugation mit Antikörpern zur spezifischen Proteinfärbung in Zellen verwendet werden konnten. Durch den Einbau eines zweiten Chromophors im Gegenstrang (Cy5) konnte zudem die Wellenlänge mittels FRET rotverschoben werden.^[146]

Die Arbeitsgruppe *Wagenknecht* verwendet 2'-Alkin-funktionalisierte Uridine (Abb. 3.28 A) oder acyclische Basensurrogate (Abb. 3.28 B) für die Anknüpfung diverser Fluoreszenzsonden an DNA.^[147-149] Von der gleichen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es möglich ist alkinfunktionalisiertes Nilrot auf der festen Phase an in situ generierte Azid-DNA zu klicken.^[150]

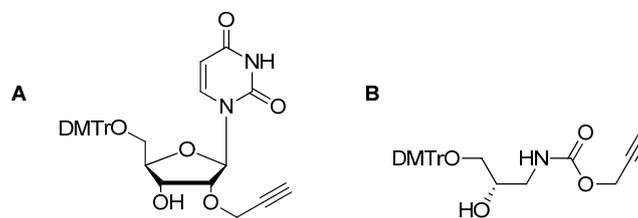


Abb. 3.28: Strukturformeln der im Arbeitskreis *Wagenknecht* verwendeten alkinmodifizierten Basensurrogate; **A:** 2'-Alkin funktionalisiertes Uridin; **B:** acyclischen Basensurrogat.

4 DNA Traffic Lights: Konzept und Optimierung

Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR) können über einen flexiblen, acyclischen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker ins DNA-Rückgrat integriert werden (Abb. 4.4) und ersetzen dabei eine natürliche Base. Bringt man TO und TR als diagonales Interstrang-Dimer in räumliche Nähe zueinander, fungiert TO als Energiedonor für TR. Dies ist auf Grund einer spektralen Überlappung der TO-Emission mit der TR-Absorption möglich (vgl. Kapitel 3.1). Durch die Kombination von TO und TR als Energietransfer (ET)-Paar lässt sich durch Anregung bei der für TO typischen Wellenlänge von 490 nm die Emission von 530 nm (grün) auf 670 nm (rot) verschieben (*DNA Traffic Lights*, Abb. 4.1). Durch diese enorme Wellenlängenverschiebung von 140 nm ist anzunehmen, dass exzellente Kontrastverhältnisse erhalten werden können, wodurch sich das TO/TR Chromophor-Paar hervorragend für einen Einsatz in der Bioanalytik eignet.^[100]

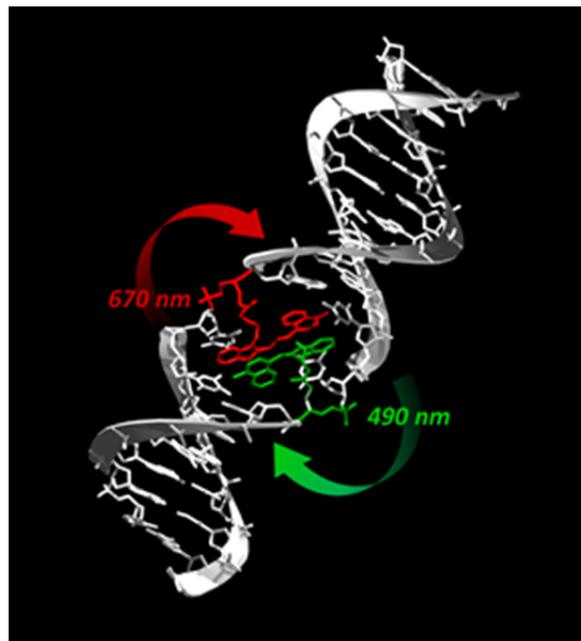


Abb. 4.1: Modell von TO und TR als künstliche DNA-Basensurrogate; *DNA Traffic Lights*: ET durch Anregung von TO ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$) auf TR ($\lambda_{\text{em max}} = 670 \text{ nm}$).

Im ersten Teil dieser Arbeit werden unterschiedliche Ansätze gezeigt wie sich das Konzept der *DNA Traffic Lights* für weitere Einsatzzwecke optimieren lässt. Dabei wurden hauptsächlich der Einfluss der Chromophor-Chromophor-Orientierung sowie die Abstandsabhängigkeit zwischen den beiden Farbstoffen untersucht und mit **DNA 1/2** (Abb. 4.5) verglichen.

4.1 Synthese der DNA/RNA-Basenanaloga TR und TO

Synthese des TR-Bausteins

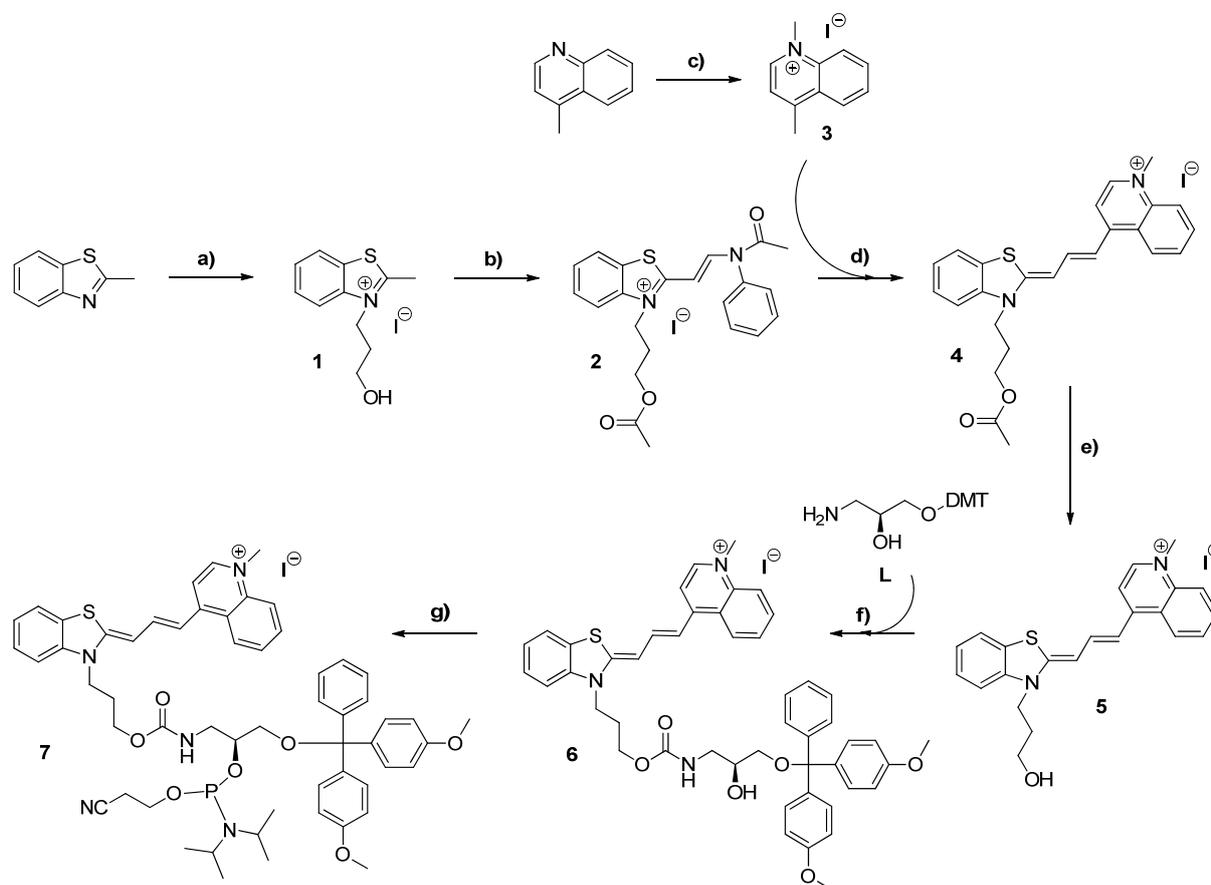


Abb. 4.2: Synthese des TR-Phosphoramidit-Bausteins 7: **a)** Iodopropanol in MeCN, 90 h, 110 °C, 79%; **b)** N,N'-Diphenylformamidin in Essigsäureanhydrid, 1 h, 160 °C, 64%; **c)** Methyljodid, Dioxan, 1 h, 120 °C, 100%; **d)** abs. DCM, Et₃N, 3 d, RT, 58%; **e)** MeOH/NH₃(32%) 1:2, 1) 4 h, 70 °C, 2) 12 h, RT, 51%; **f)** 1) CDI in abs. DCM, 2 d, RT; 2) L, 5 d, RT, 90%; **g)** 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosphoramidit / DIPEA in abs. DCM, 16 h, RT, 100%.

Zunächst wurde **1** durch eine nukleophile Substitutionsreaktion aus Iodopropanol und 2-Methylbenzothiazol hergestellt. Das verwendete Iodopropanol wurde zuvor in einer Finkelsteinreaktion^[151] aus Natriumiodid und Chloropropanol synthetisiert. Im zweiten Schritt folgte die Bildung des Hemicyanins **2**, aus **1** und N,N'-Diphenylformamidin mit Essigsäureanhydrid, das als Lösungsmittel dient und zusätzlich eine gute Abgangsgruppe für den nächsten Schritt generiert. **3** wurde durch eine einfache N-Methylierung von 4-Methylchinolin erhalten und zusammen mit **2** zum Cyanin **4** unter basischen Bedingungen gekoppelt. Die Acetylgruppe wurde anschließend in einer Mischung aus Methanol/wässr. Ammoniak 1:2 entfernt. Im nächsten Schritt wurde **5**

unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol über eine Carbamat-Brücke an den DMT-geschützten, acyclischen (S)-3-Amino-1,2-porpaniol Linker **L** gebunden (**6**). Die Synthese von **L** erfolgte nach Literaturvorschriften.^[152-154] Die Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **7** erfolgte nach etablierten Standardbedingungen.^[100, 153, 155-157] Der TR-Phosphoramidit-Baustein **7** wurde anschließend in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt. Dabei wurde das für natürliche DNA-Basen verwendete Standardprotokoll durch verlängerte Kopplungszeiten und erhöhte Substanzmenge modifiziert (siehe Kapitel 11.5).

Synthese des TO Bausteins

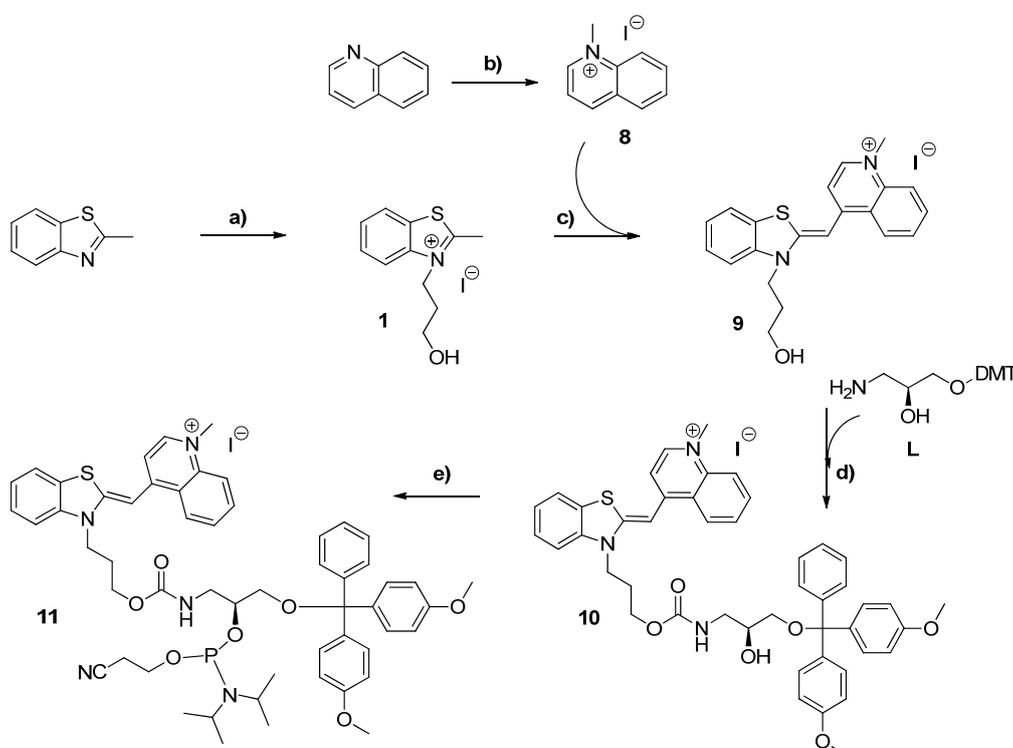


Abb. 4.3: Synthese des TO-Phosphoramidit-Bausteins **11**: **a)** Iodpropanol in MeCN, 90 h, 110 °C, 79%; **b)** Methyljodid, Dioxan, 1 h, 120 °C, 95%; **c)** DCM/MeOH (1:1), Et₃N; 1) 5 h, 55 °C; 2) 16 h, RT, 34%; **d)** 1) CDI in abs. DCM, 2 d, RT; 2) **L**, 5 d, RT, 92%; **e)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit / DIPEA in abs. DCM, 16 h, RT, 100%.

Die Synthese von Thiazolorange (**9**) erfolgte in drei Schritten nach Literaturvorschrift.^[100] Dabei wird 2-Methylbenzothiazol zuerst mit Iodpropanol alkyliert (**1**), und anschließend mit N-Methylchinolin (**8**) unter basischen Bedingungen zum Cyanin gekoppelt (**9**). Im nächsten Schritt wurde **9** unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol über eine Carbamat-Brücke an den DMT-geschützten,

acyclischen (S)-3-Amino-1,2-porpanndiol Linker **L** gebunden (**10**). Die Synthese von **L** erfolgte nach Literaturvorschriften.^[152-154] Die Umsetzung zum Phosphoramidit-Baustein **11** wurde unter Verwendung von 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit erreicht.^[100] Der TO-Phosphoramidit-Baustein **11** wurde anschließend in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt. Dabei wurde das für natürliche DNA-Basen verwendete Standardprotokoll durch verlängerte Kopplungszeiten und erhöhten Substanzmenge modifiziert (siehe Kapitel 11.5).

4.2 Einfluss der Chromophor-Chromophor Orientierung

Da das Konzept der *DNA Traffic Lights* auf einem Energietransferprozess (ET) basiert, ist die ET-Effizienz stark von der Lage der jeweiligen Übergangsdipolmomente abhängig (vgl. Kapitel 3.1). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Art und Weise wie TO und TR mit dem DNA-Rückgrat verknüpft sind (entweder über den Benzothiazolstickstoff oder den Chinolinstickstoff) von entscheidender Bedeutung ist.^[100] Dabei wurden bei einer Konjugation über den Chinolinstickstoff deutlich schlechtere Kontrastverhältnisse I_{670}/I_{530} von 0.8:1 bzw. 0.9:1, im Vergleich zu 6:1 für eine Verknüpfung über den Benzothiazolstickstoff, beobachtet. Zudem können durch die Anbindung über den Benzothiazolstickstoff bis zu fünf Mal höhere Extinktionswerte für TR erhalten werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die folgenden Untersuchungen mit einer Linker-Verknüpfung über den Benzothiazolstickstoff der Farbstoffe durchgeführt (Abb. 4.4). Durch die Wahl einer kurzen Alkylkette zwischen Farbstoff und Linker wird die strukturelle Grundvoraussetzung geschaffen, um den Einfluss der DNA-Doppelhelix auf die relative Lage der Übergangsdipolmomente der Chromophore zu untersuchen (vgl. Kapitel 3.1).

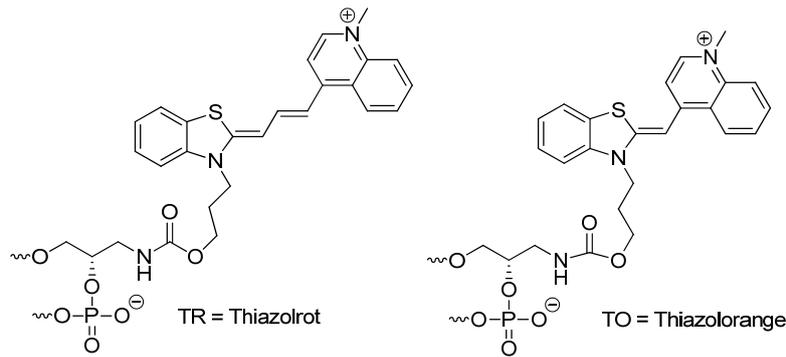


Abb. 4.4: Struktur der eingesetzten DNA-Basensurrogate. Die Ribose-Einheit wurde durch einen acyclischen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker ersetzt. Links: Thiazolrot (TR), rechts: Thiazolorange (TO); beide Farbstoffe wurden über den Benzothiazolstickstoff ins DNA-Rückgrat integriert.

Um die Auswirkungen der Chromophor-Chromophor-Orientierung auf die Energie-Transfer Effizienz zu untersuchen, wurde die Farbstoffanordnung in **DNA 1 – DNA 8** systematisch variiert (Abb. 4.5) um so unterschiedliche ET-Richtungen innerhalb des DNA-Duplexes zu erhalten.^[158]

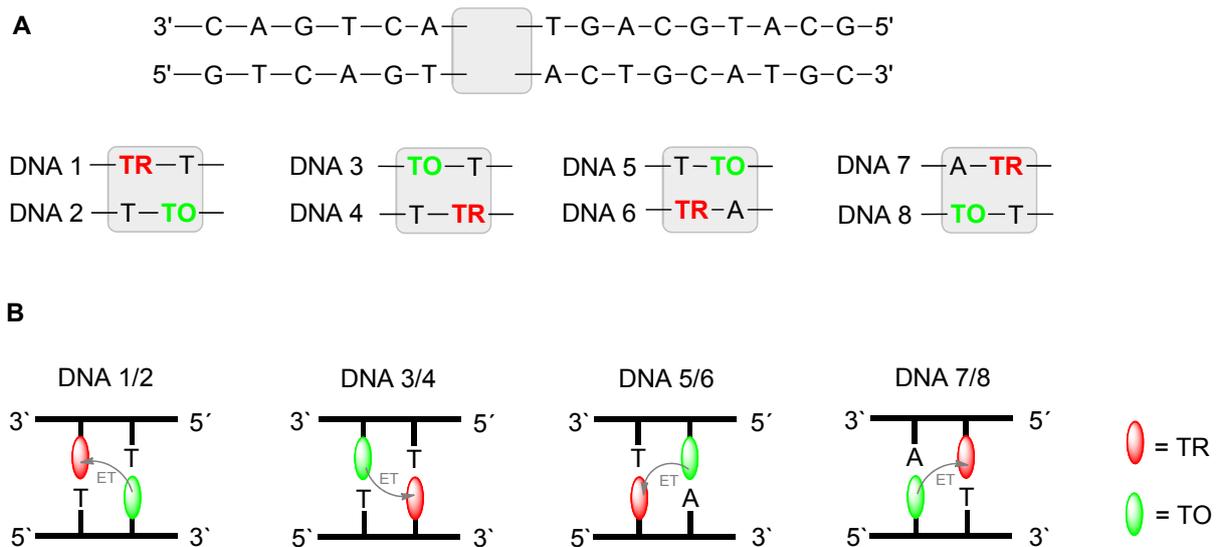


Abb. 4.5: **A:** Sequenzen der TO- und TR-modifizierten DNA-Oligonukleotide **DNA 1-DNA 8**. **B:** Schematische Darstellung der verschiedenen Chromophor-Chromophor Orientierungen in der DNA-Doppelhelix und die daraus resultierenden ET-Richtungen.

Die Absorptionsspektren der Duplexe **DNA 1/2**, **DNA 3/4**, **DNA 5/6** sowie **DNA 7/8** (Abb. 4.6, links) zeigen deutlich die beiden kovalent angeknüpften Chromophore durch gut voneinander getrennte Absorptionsmaxima (510 nm für TO und 640 nm für TR). Dabei sind die Absorptionsmaxima für TR in **DNA 5/6** und **DNA 7/8** ~8 nm blauverschoben gegenüber **DNA 1/2** bzw. **DNA 2/4**. Die Extinktionskoeffizienten der

beiden Farbstoffe variieren in den gewählten DNA-Sequenzen sowohl für TO als auch für TR, wobei im Fall von TR deutlich größere Differenzen zu beobachten sind. So werden in **DNA 1/2** bzw. **DNA 3/4** ϵ -Werte von ~ 33.200 bzw. $\sim 27.300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ beobachtet, wohingegen in **DNA 5/6** bzw. **DNA 7/8** ϵ -Werte von ~ 70.900 bzw. $49.200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ erreicht werden können (vgl. Tabelle 4.1). Diese Extinktionsunterschiede deuten wahrscheinlich auf excitonische Wechselwirkungen zwischen den beiden Farbstoffmolekülen hin, welche die ET-Effizienz maßgeblich beeinträchtigen können.

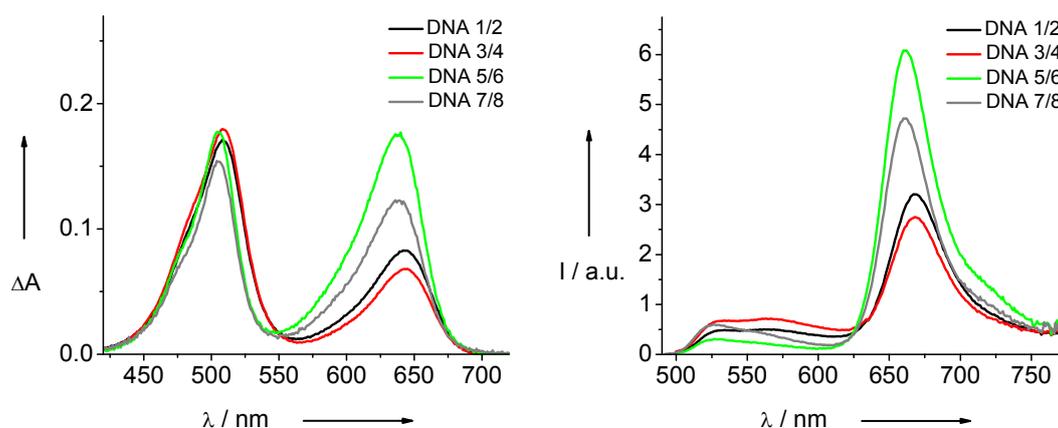


Abb. 4.6: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Oligonukleotid-Duplexe **DNA 1/2**, **DNA 3/4**, **DNA 5/6** und **DNA 7/8** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$).

Liegen die beiden Chromophore TO und TR im Grundzustand als Dimer vor, so kann der Energiedonor (TO) in Gegenwart des Energieakzeptors (TR) nicht selektiv angeregt werden, was zu einer sehr geringen ET-Effizienz führt. Dieser Interpretation zu Folge sollte die ET-Effizienz für **DNA 3/4** am geringsten und für **DNA 5/6** am höchsten sein. Betrachtet man die Emissionsspektren in Abb. 4.6 (rechts) wird diese Annahme bestätigt:

Beste ET-Effizienz wird in **DNA 5/6** erhalten, in dem sowohl TO als auch TR annähernd gleich hohe Werte des Extinktionskoeffizienten zeigen. Auch in **DNA 7/8** kann mit einem höheren ϵ -Werten für TR, verglichen mit **DNA 1/2** bzw. **DNA 3/4**, eine verbesserte ET-Effizienz festgestellt werden. Dabei konnte zum einen die Intensität der TR-Emission bei 670 nm gesteigert und gleichzeitig die verbleibende TO-Emission bei 530 nm verringert werden. Vergleicht man **DNA 5/6** und **DNA 7/8** mit **DNA 1/2** und **DNA 3/4** erkennt man, dass außerdem das Emissionssignal bei $\sim 570 \text{ nm}$ minimiert werden konnte. Typischer Weise emittieren TO-Dimere bei etwa dieser Wellenlänge^[54] weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich in diesem Fall

um Grundzustands-Dimere aus TO und TR handelt, die angeregt werden und dadurch nicht mehr zum ET zur Verfügung stehen. Die Aufhebung der Grundzustandswechselwirkungen trägt daher zu einem erhöhten Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} bei (Abb. 4.7, links). So konnte beispielsweise für **DNA 5/6** ein Kontrastverhältnis (I_{670}/I_{530}) von 20:1 verglichen mit 6:1 für **DNA 1/2** bzw. 4:1 für **DNA 3/4** erhalten werden.

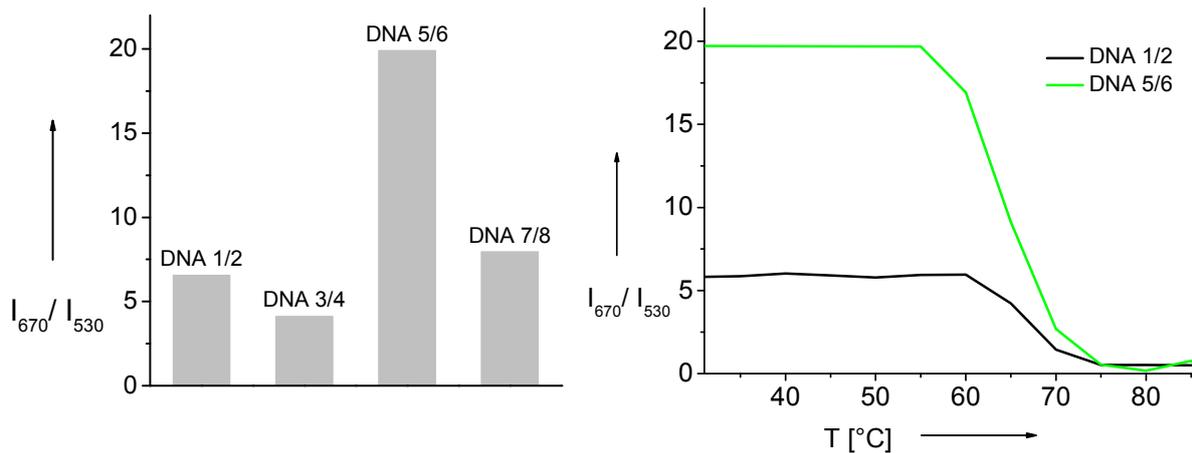


Abb. 4.7: Links: Kontrastverhältnisse I_{670}/I_{530} für **DNA 1/2**, **DNA 3/4**, **DNA 5/6** und **DNA 7/8**; Rechts: temperaturabhängige Messung des Fluoreszenzkontrastes; dargestellt ist der Abfall des Kontrastverhältnisses mit steigender Temperatur (ET-Messungen mit $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$) für **DNA 1/2** und **DNA 5/6**.

Um zu zeigen, dass es sich tatsächlich um einen Energietransferprozess zwischen TO und TR handelt, der von einer Hybridisierung der jeweiligen markierten Einzelstränge abhängig ist, wurden temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen an **DNA 1/2** und **DNA 5/6** durchgeführt (Abb. 4.7, rechts). In beiden Fällen ist mit der Aufhebung der Hybridisierung des DNA-Duplexes ein Abfallen des Kontrastverhältnisses I_{670}/I_{530} zu beobachten. Die daraus resultierenden Schmelztemperaturen von $\sim 65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für **DNA 1/2** und **DNA 5/6** stimmen mit den, durch eine Absorptionsänderung bei 260 nm erhaltenen Werten von $67 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für **DNA 1/2** bzw. $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für **DNA 5/6** annähernd überein (vgl. Tabelle 4.1).

Auch das Anregungsspektrum für eine Emission bei 670 nm von **DNA 1/2** sowie von **DNA 5/6** zeigt deutlich, dass durch direkte Anregung des TO-Monomers ein ET auf TR stattfindet (Abb. 4.8). Im CD-Spektrum wurden nur sehr schwache Effekte beobachtet, weshalb nicht näher darauf eingegangen wird.

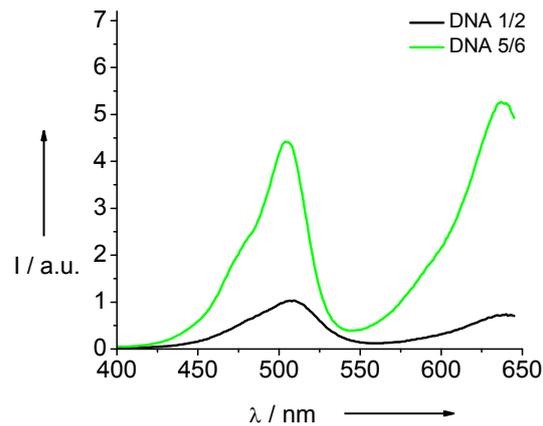


Abb. 4.8: Anregungsspektrum für **DNA 1/2** und **DNA 5/6** bei einem Emissionsmaximum von 660 nm.

4.3 Einfluss des Chromophor-Chromophor-Abstands

Eine weitere Möglichkeit die relative Lage der Übergangsdipolmomente beider Chromophore zu beeinflussen besteht darin, den Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu verändern. Dadurch dass sowohl TO als auch TR kovalent in das Rückgrat der rechtsgängigen DNA-Helix eingebaut wurden, kann die Orientierung der Übergangsdipolmomente der einzelnen Farbstoffe durch die Wahl unterschiedlicher Abstände variiert werden (Abb. 4.9 B).^[158] Zu diesem Zweck wurden **DNA 9 – DNA 13** hergestellt und mit **DNA 1/2** verglichen. Dabei wurden die DNA-Sequenzen so gewählt, dass die Auswirkung auf die ET-Effizienz sowie die Chromophor-Chromophor-Interaktionen bis zu einer Distanz von fünf Basenpaaren (**DNA 10/13**) untersucht werden konnten (Abb. 4.9 A). Um die erhaltenen Ergebnisse mit **DNA 1/2** zu vergleichen und bezüglich dieser optimieren zu können, wurde für **DNA 9 – DNA 13** die gleiche TO-TR Orientierung wie in **DNA 1/2** gewählt (vgl. Abb. 4.5).

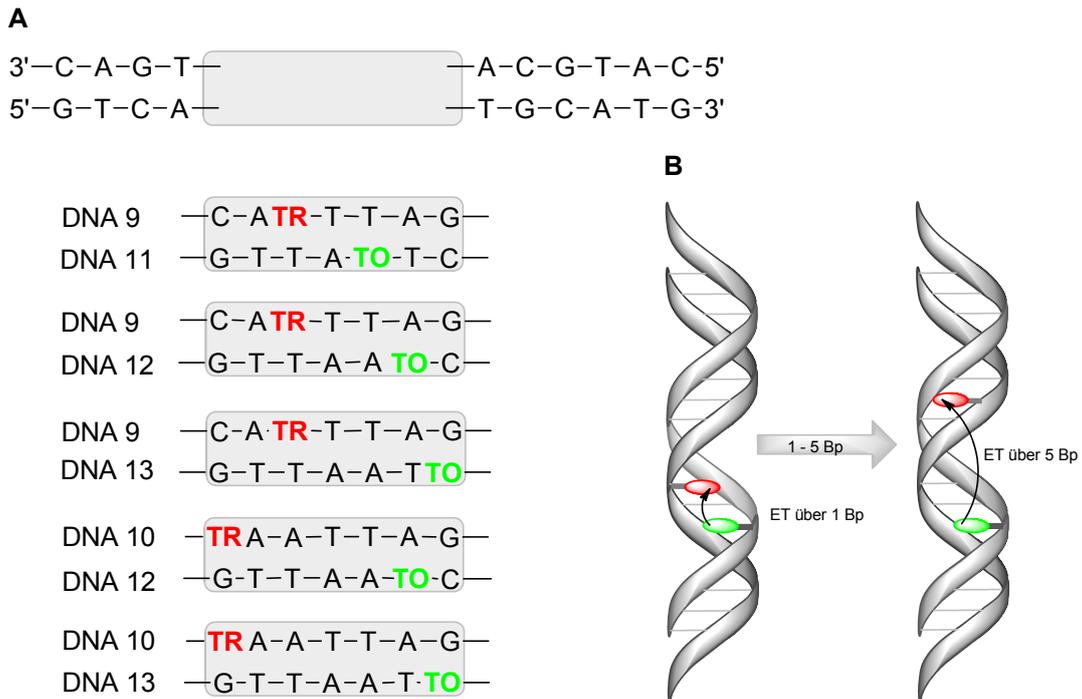


Abb. 4.9: **A:** Sequenzen der TO und TR modifizierten DNA-Stränge **DNA 9-DNA 12**. **B:** Schematische Darstellung für einen Energie Transfer über ein Basenpaar in **DNA 9/11** sowie fünf Basenpaare in **DNA 10/13**.

Bei Betrachtung der Emissionsspektren (Abb. 4.10, rechts) lässt sich eine deutliche Verbesserung des Kontrastverhältnisses I_{670}/I_{530} von 16:1 für **DNA 9/11** verglichen mit 6:1 für **DNA 1/2** feststellen. Durch den Abstand von einem Basenpaar (Bp) zwischen TO und TR in **DNA 9/11** konnte sowohl die verbleibende TO-Emission bei 530 nm, als auch das Signal bei ~570 nm vermindert werden. Die Signalintensität der TR-Emission bei 670 nm bleibt weitgehend unverändert, wobei die TO-Emission mit steigendem Abstand konstant an Intensität gewinnt (**DNA 9/12** bis **DNA 10/13**).

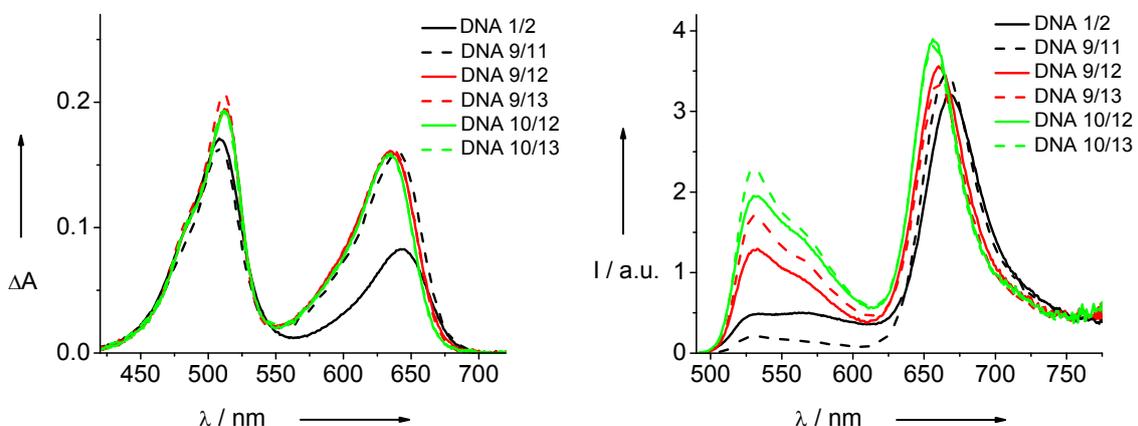


Abb. 4.10: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der Oligonukleotid-Duplexe **DNA 1/2**, **DNA 9/11**, **DNA 9/12**, **DNA 9/13**, **DNA 10/12** und **DNA 10/13** ($\lambda_{exc} = 490$ nm).

Auf Grund dieser Beobachtungen lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Zum einen trägt die DNA-Architektur dazu bei, dass TO und TR in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dadurch wird verhindert, dass ein Energietransfer nur durch zufälliges Aufeinandertreffen unter Kollision der beiden Farbstoffmoleküle stattfinden kann. Durch die räumliche Nähe von Donor und Akzeptor kann daher die ET-Effizienz erhöht werden. Zum anderen jedoch können TO und TR wegen des sehr kurzen Abstandes in der DNA-Doppelhelix aggregieren und Grundzustands-Wechselwirkungen ausbilden. Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, zeigen Grundzustands-Dimere eine verminderte ET-Effizienz. Wählt man allerdings größere Abstände von 2 – 5 Basenpaaren zwischen TO und TR (**DNA 9/11**, **DNA 9/12**, **DNA 9/13**, **DNA 10/12** und **DNA 10/13**), kann die Bildung der TO-TR-Dimere im Grundzustand deutlich unterdrückt werden. Folglich ist ein größerer Anteil des TO-Monomers für einen ET vorhanden, wodurch die Effizienz gesteigert wird. Diese Interpretation der Emissionsspektren wird durch zwei weitere Argumente gestützt:

- i. Betrachtet man die in Abb. 4.10 links dargestellten Absorptionsspektren, lässt sich ein deutlich kleinerer ϵ -Wert für TR von **DNA 1/2** verglichen mit **DNA 9/11**, **DNA 9/12**, **DNA 9/13**, **DNA 10/12** und **DNA 10/13** beobachten. Wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, ist das ein zusätzlicher Hinweis auf Grundzustandswechselwirkungen. Dieser Effekt kann durch den Einsatz von Basenpaaren als Abstandshalter zwischen TO und TR unterdrückt werden, was durch annähernd doppelt so hohe Werte des Extinktionskoeffizienten für TR in **DNA 9/11**, **DNA 9/12**, **DNA 9/13**, **DNA 10/12** und **DNA 10/13** deutlich wird.
- ii. Die Schmelztemperaturen (T_m) der untersuchten DNA-Duplexe liegen in einem Bereich von 67 °C für **DNA 1/2**, 57 °C für **DNA 9/11** bis 47 °C für **DNA 10/13**. Mit steigendem Abstand zwischen TO und TR lässt sich somit eine zunehmende Destabilisierung des DNA-Duplexes beobachten. Diese Duplexstabilisierung tritt typischer Weise dann auf, wenn das natürlich vorkommende 2'-Deoxyfuranosid im Rückgrat der DNA durch einen acyclischen Linker (an welche die Chromophore gebunden sind) ersetzt wird.^[102] Können jedoch Grundzustands-Dimere zwischen TO und TR gebildet werden, kann die Destabilisierung ausgeglichen werden. Dadurch lässt sich auch die relativ hohe Schmelztemperatur von 67 °C für in **DNA 1/2** erklären. Wird der Abstand zwischen TO und TR erhöht, werden die Wechselwirkungen

zwischen den Farbstoffen unterbrochen und es kann eine höhere ET-Effizienz erzielt werden (**DNA 9/11**).

Tabelle 4.1: Schmelztemperaturen, TO-TR-Abstandsangabe und ϵ -Werte von TO und TR für **DNA 1/2-DNA 7/8** und **DNA 9/11-DNA 10/13**.

| DNA-Duplex | T_m [°C] | TO-TR Abstand [Basenpaare] | ϵ_{TR} [L* mol^{-1} * cm^{-1}] | ϵ_{TO} [L* mol^{-1} * cm^{-1}] |
|------------------|------------|-------------------------------|---|---|
| DNA 1/2 | 67 | 0 | 33.200 | 68.400 |
| DNA 3/4 | 67 | 0 | 27.300 | 71.500 |
| DNA 5/6 | 65 | 0 | 70.900 | 71.000 |
| DNA 7/8 | 66 | 0 | 49.200 | 61.700 |
| DNA 9/11 | 57 | 1 | 63.800 | 64.900 |
| DNA 9/12 | 53 | 2 | 64.400 | 77.900 |
| DNA 9/13 | 47 | 3 | 65.700 | 82.400 |
| DNA 10/12 | 45 | 4 | 63.300 | 77.200 |
| DNA 10/13 | 47 | 5 | 63.700 | 78.200 |

4.4 Einfluss der Chromophor-DNA Konjugation

Im nun folgenden Teil der Arbeit wird eine Möglichkeit zur postsynthetischen DNA-Modifikation mit Thiazolorange (**kU**) vorgestellt. Anschließend wurden Experimente zum Energietransfer zwischen **kU** und TR durchgeführt und mit den bisherigen Ergebnissen verglichen.

4.4.1 Klick-Reaktion von Thiazolorange an DNA

Neben dem Einbau über einen acyclischen Linker während der Festphasensynthese, kann die DNA auch postsynthetisch mit einem Chromophor markiert werden. Häufig wird zu diesem Zweck die kupferkatalysierte Huisgen [3+2] Cycloaddition (Klick-Reaktion) eingesetzt (vgl. Kapitel 3.4.2). Hierzu wurde in einer zweistufigen Synthese die Alkoholgruppe eines TO-Vorläufermoleküls **9** in eine Azid-Funktion umgewandelt.

Zuerst wurde der Alkohol durch eine Mesylierung in eine bessere Abgangsgruppe überführt. Anschließend konnte, durch eine Austauschreaktion mit Natriumazid das gewünschte azidmodifizierte TO-Derivat (**12**) erhalten werden.

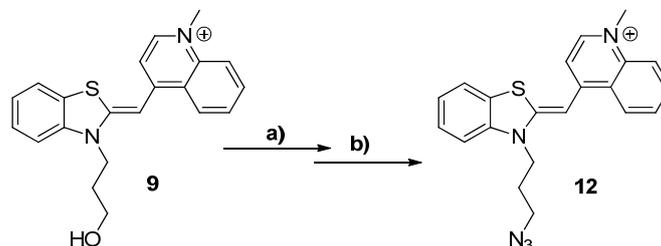


Abb. 4.11: Reaktionsschema zur Darstellung des Azid-modifizierten TO Derivats **12**: a) MsCl, Et₃N, DMSO, RT, 2 h; b) NaN₃, DMSO, 120 °C, 24 h, 5% nach Reinigung über HPLC.

Als Alkin-Baustein wurde ein gekauftes 2'-alkinfunctionalisiertes Uridin während der automatisierten DNA-Festphasensynthese ins DNA-Rückgrat integriert. Der Einbau kann dabei an beliebiger Stelle des DNA-Strangs stattfinden. Nach erfolgter Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase konnte **12** durch Zusatz von Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, TBTA als Ligand sowie Natriumascorbat an die DNA gebunden werden (Abb. 4.12).

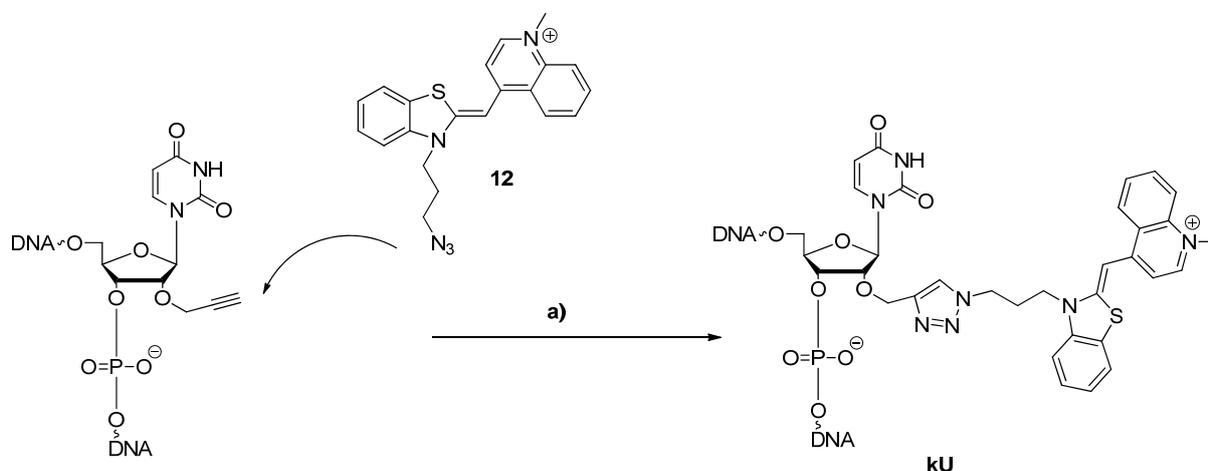


Abb. 4.12: Reaktionsschema zur postsynthetischen DNA-Modifikation mittels kupferkatalysierter Klick-Reaktion von **12** mit alkinmodifizierter DNA; a) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, TBTA, Natriumascorbat, 14 h, RT.

Da die Farbstoffmodifikation an der 2'-Position des Uridins erfolgt, wird die Basenpaarung im DNA-Doppelstrang nicht gestört, Adenin wird als Gegenbase erkannt. Außerdem zeigen 2'-modifizierte Uridine, verglichen mit einem acyclischen Linker, keine Duplexdestabilisierung.^[148] Durch die Wahl der kurzen Alkylketten auf beiden Seiten des Triazolrings wird dem Farbstoff die nötige Flexibilität gegeben in

den Basenstapel zu interkalieren oder sich in einer der Furchen anzulagern. Zusätzlich wird TO dadurch in räumliche Nähe zu TR gebracht, was für einen effizienten Energietransfer wichtig ist.

Den Arbeitsgruppen um *Carell* und *Armitage* ist es 2011 ebenfalls gelungen, ein Thiazolorange-Derivat an ein modifiziertes Thymin zu klicken.^[146] Im Unterschied zu der in dieser Arbeit vorgestellten Methode wurde die Alkin-Gruppe über eine C₆-Alkylkette mit der 5-Position des Thymins verbunden. Zusätzlich ist ein PEG-2 Linker zwischen TO und die Azid-Funktionalität eingesetzt worden.

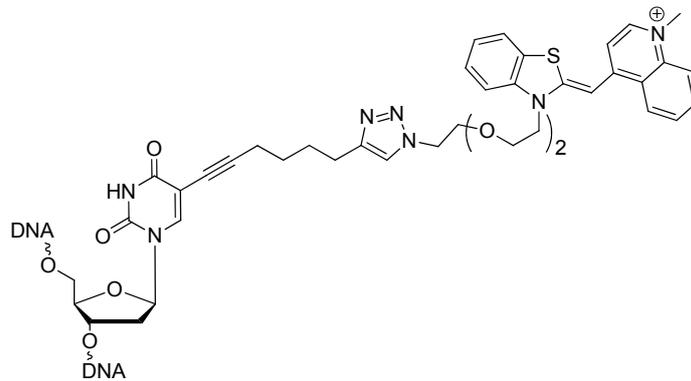


Abb. 4.13: Strukturformel des von *Carell* und *Armitage* verwendeten TO-Bausteins.

4.4.2 Vergleich Linker- und Klick-Konjugation auf die ET-Effizienz in DNA

Es wurden die Oligonukleotide **DNA 14 – DNA 17** hergestellt, wobei **DNA 15** sowie **DNA 16** postsynthetisch mit **12** modifiziert wurden. Die Sequenzen für **DNA 14/15** sind mit **DNA 1/2** bis auf den jeweiligen Modifikationsbereich, identisch. Gleiches gilt für **DNA 16/17** und **DNA 3/4** (Abb. 4.14 A). In Abb. 4.14 B ist die Richtung des Energietransfers für die einzelnen Duplexe schematisch dargestellt. Dabei bleibt die Richtung des ET sowohl in **DNA 14/15** als auch in **DNA 16/17**, verglichen mit **DNA 1/2** und **DNA 3/4** (siehe Abb. 4.5) erhalten.

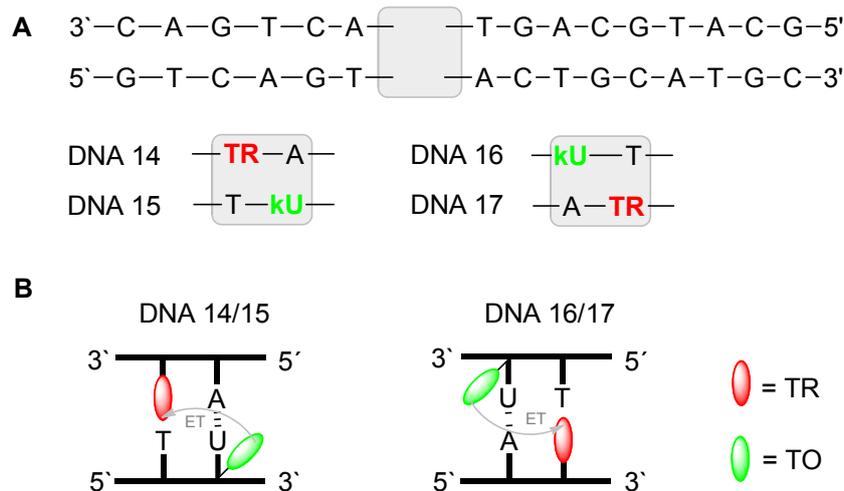


Abb. 4.14: **A:** Sequenzen der **kU** und **TR** modifizierten DNA-Stränge **DNA 14-DNA 17**. **B:** Schematische Darstellung der verschiedenen Chromophor-Chromophor-Orientierungen in der DNA-Doppelhelix und die daraus resultierenden ET-Richtungen.

Die Absorptionsspektren (Abb. 4.15 links) zeigen die für TO typische Bande in einem Bereich von ~530 nm. Auch in dem für TR typischen Bereich von ~640 nm ist die dazugehörige Absorptionsbande deutlich zu erkennen. Im Fall von **DNA 14/15** bzw. **DNA 16/17** ist dabei eine hypsochrome Verschiebung um 10 nm im Vergleich zu **DNA 1/2** bzw. **DNA 3/4** zu sehen. Ein Unterschied der **kU**-modifizierten Duplexe lässt sich auch bei Betrachtung der Emissionsspektren feststellen (Abb. 4.15 rechts): auch hier ist eine hypsochrome Verschiebung der TR-Emission um 10 nm zu beobachten. Des Weiteren kann man erkennen, dass das für TO-TR-Dimere typische Signal bei ~570 nm in **DNA 14/15** bzw. **DNA 16/17** nicht mehr vorhanden ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch die Klick-Konjugation von Thiazolorange an die DNA die excitonische TO-TR-Dimerbildung unterbunden werden kann.

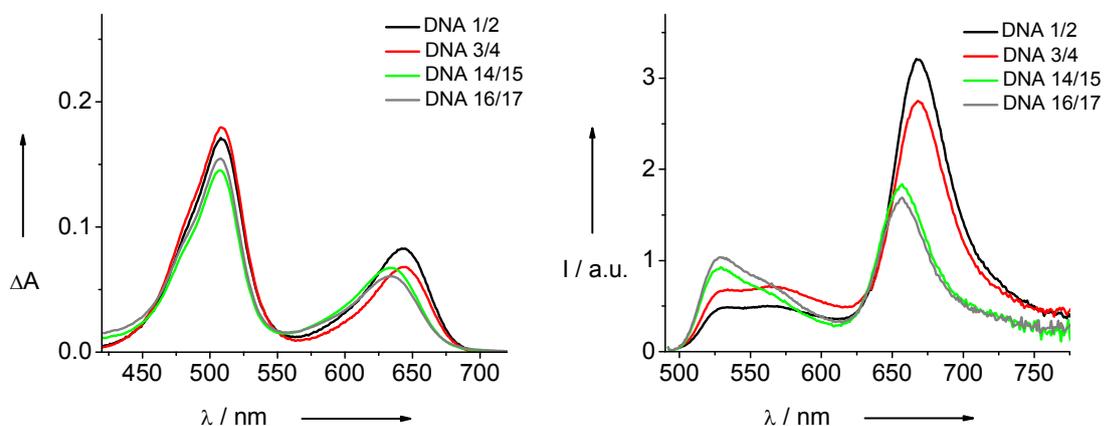


Abb. 4.15: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von **DNA 1/2**, **DNA 3/4**, **DNA 14/15**, **DNA 16/17** ($\lambda_{exc} = 490$ nm).

Durch eine Verknüpfung von Thiazolorange an der 2'-Position des Uridin wird dem Farbstoff die Lage in der DNA-Furche vorgegeben. Bei der Konjugation über einen acyclischen Linker ins DNA-Rückgrat hat TO jedoch eine gewisse konformative Freiheit: eine Integration in den Basenstapel an Stelle der natürlichen DNA-Base ist ebenso möglich, wie eine Anlagerung in der Furche der DNA-Doppelhelix.

Weil sich die Bildung von TO-TR-Dimeren stabilisierend auf den DNA-Duplex auswirkt (vgl. Kapitel 4.3), sollten durch die Aufhebung dieser Grundzustandswechselwirkungen auch die Schmelztemperaturen für **DNA 14/15** bzw. **DNA 16/17** niedriger sein. Dieser Effekt wird durch eine Destabilisierung von 4 °C gemessen mit **DNA 14/15** bzw. **DNA 16/17** verglichen mit **DNA 1/2** bzw. **DNA 3/4** bestätigt (Tabelle 4.2). Die ET-Effizienz konnte dadurch leider nicht verbessert werden.

Tabelle 4.2: Schmelztemperaturangaben von **DNA 14/15** und **DNA 16/17** sowie spektroskopische Charakterisierung von **DNA 1/2**, **DNA 3/4**, **DNA 14/15** und **DNA 16/17**.

| DNA-Duplex | T _m [°C] | λ _{abs max} [nm] ^(a) | λ _{em max} [nm] ^(a) |
|------------------|---------------------|--|---|
| DNA 1/2 | 67 | 644 | 668 |
| DNA 3/4 | 67 | 644 | 668 |
| DNA 14/15 | 63 | 634 | 657 |
| DNA 16/17 | 63 | 634 | 656 |

(a) es werden nur die jeweiligen Werte für TR angegeben.

Zusammenfassung

Zum Abschluss dieses Kapitels kann zusammenfassend gesagt werden, dass es gelungen ist die ET-Effizienz, sowie das Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} im Vergleich zu **DNA 1/2** zu verbessern. Durch systematische Variation der Chromophor-Chromophor-Orientierung als auch des Chromophor-Chromophor-Abstands konnte das Konzept der *DNA Traffic Lights* optimiert werden. Durch die Wahl unterschiedlicher Konjugationsmethoden der Farbstoffe an DNA konnten Grundzustandswechselwirkungen zwischen den beiden Chromophore zwar unterbunden, nicht jedoch die ET-Effizienz bezüglich **DNA 1/2** erhöht werden.

5 *DNA Traffic Lights*: Anwendung in der Bioanalytik

Wie bereits einleitend erwähnt, bringt die Verwendung von wellenlängenverschiebenden, fluoreszenten DNA-Sonden in der Bioanalytik eine Menge Vorteile mit sich. Da die Auslesung dieser Sonden auf zwei unterschiedlichen Wellenlängen beruht, sollte das Risiko eines falsch-positiv oder falsch-negativen Ergebnisses bei *in vivo* durchgeführten Hybridisierungsexperimenten verhindert werden. Das nun folgende Kapitel behandelt die praktische Anwendung des Konzepts der *DNA Traffic Lights* in der Bioanalytik. Zum einen wurden *Molecular Beacons* (MBs) mit unterschiedlichen Stammlängen im Stamminneren markiert, charakterisiert und mit einem kommerziell erhältlichen, endständig markierten MB verglichen.^[159] Des Weiteren wurde ein DNA-Aptamer (Aptasensor) zum Nachweis eines spezifischen Analyten hergestellt.^[158]

5.1 *Molecular Beacons*

Eine ausführliche Beschreibung über den prinzipiellen Aufbau eines MB sowie dessen Funktionsweise wird in Kapitel 3.2 gegeben. Dabei werden zudem unterschiedliche Anwendungsbeispiele bzw. verschiedenen Detektionsmöglichkeiten beschrieben.

5.1.1 Charakterisierung der im Stamminneren markierten MBs

Mithilfe der bereits in Kapitel 4 vorgestellten DNA-Bausteine TO und TR wurden vier MBs hergestellt (**MB 1 – MB 4**, Abb. 5.1, Tabelle 5.1) die sich in ihrer Stammlänge von 5 bis 11 Basenpaaren unterscheiden (einschließlich der als künstliche Basen eingebauten Farbstoffe). Zusätzlich wurde **MB 5** synthetisiert, um die Auswirkung der Farbstofforientierung des diagonalen TO-TR-Chromophorenpaars zu untersuchen (5`-3` oder 3`-5`). In allen MBs wurde darauf geachtet, dass die Farbstoffe TO und TR im Stamm in identische DNA-Basenumgebungen eingebettet werden, um so die strukturelle und optische Vergleichbarkeit für die Chromophor-Wechselwirkung zu gewährleisten. Dies beinhaltet zum einen ein A-T-Basenpaar an jeder Seite des

Farbstoffpaares und zum anderen ein Thymin als „Gegenbase“ zu jedem Chromophor. Die Basenumgebung des Farbstoffpaares wurde so ausgewählt, dass sowohl für TO als auch für TR möglichst hohe Quantenausbeuten erhalten werden (vgl. Φ_F (TO) = 16.8 und Φ_F (TR) = 26.2 für einfachmodifizierte DNA-Duplexe mit einer A-T-Basenpaarumgebung).^[100] Des Weiteren ist bekannt, dass zu TO benachbarte G-C-Basenpaare die Fluoreszenz erheblich löschen.^[105] Außer diesem festgelegten, zentralen Strukturmotiv ist die übrige Stammsequenz der MBs frei wählbar.

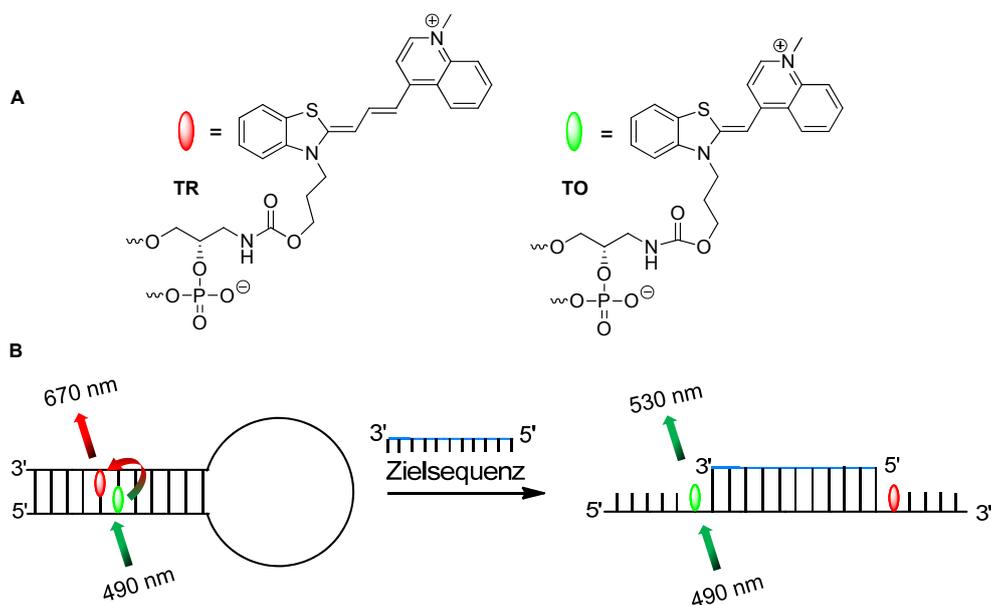


Abb. 5.1: **A:** Struktur von Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR) als Basensurrogate. **B:** Der hybridisierungsbedingte Fluoreszenzfarbwechsel eines MB, der mit TO und TR modifiziert ist, von Rot nach Grün.

Tabelle 5.1: Sequenzen der MBs (**MB 1-MB 6**)^(a) und entsprechender Analyten (**MB 1a-MB 6a**).

| | 3' → 5' für MBs, 5' → 3' für Gegenstränge |
|--------------|---|
| MB 1 | <u>GTCATRTTGACCGTACGTCAGTTGACTGGTCATTOTTGAC</u> |
| MB 1a | ACTGGCATGCAGTCAACTGACCAG |
| MB 1b | AACTGGCATGCAGTCAACTGACCAGT |
| MB 2 | <u>GTCATRTTGACTGTACGTCAGTTGACTGGTCATTOTTGAC</u> |
| MB 2a | ACTGACATGCAGTCAACTGACCAG |
| MB 2b | AACTGACATGCAGTCAACTGACCAGT |
| MB 2c | ACATGCAGTCAACTGAC |
| MB 3 | <u>TCATTRTTGACTGTACGTCAGTTGACTGATCATTOTTGA</u> |
| MB 3a | ACTGACATGCAGTCAACTGACTAG |
| MB 3b | AACTGACATGCAGTCAACTGACTAGT |
| MB 3c | GACATGCAGTCAACTGAC |

| | |
|---------------------------|--|
| MB 4 | <u>CAT</u> <u>TR</u> TTCGCTGTACGTCAGTTGACTGATCAT <u>TO</u> <u>TTG</u> |
| MB 4a | GCGACATGCAGTCAACTGACTAG |
| MB 4b | AAGCGACATGCAGTCAACTGACTAGT |
| MB 5 | <u>GTCAT</u> <u>TO</u> <u>TGAC</u> <u>CGTACGTCAGTTGACTGGTCAAT</u> <u>TR</u> <u>TGA</u> |
| MB 5a | CTGGCATGCAGTCAACTGACCAGT |
| MB 6^(b) | <u>X-GTCAATTGACCGTACGTCAGTTGACTGGTCAATTGAC-Y</u> |
| MB 6a | ACTGGCATGCAGTCAACTGACCAG |

(a) Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Stammsequenz der MBs. (b) MB 6: am Ende markiert mit **X** = Rhodamin (TAMRA, 3') und **Y** = Fluorescein (6-FAM, 5'); siehe Kapitel 5.1.3.

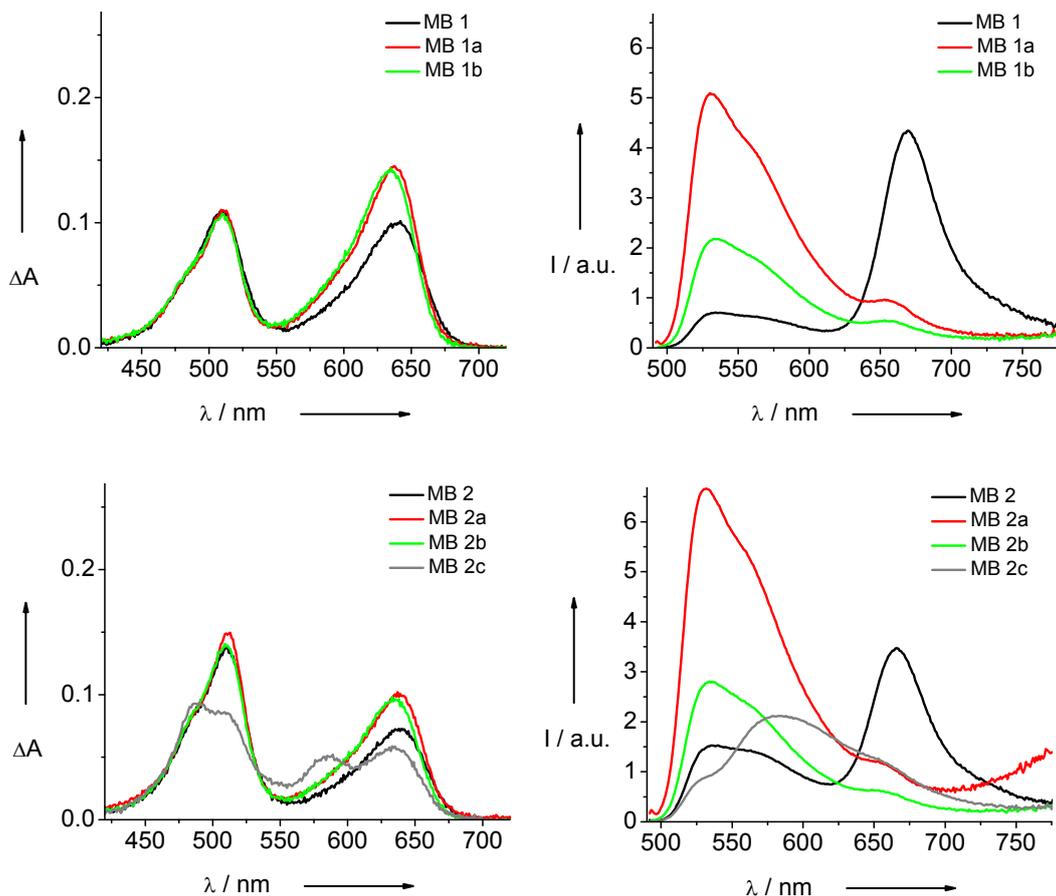
Die Absorptionsspektren aller MBs (Abb. 5.2, links) zeigen deutlich die beiden kovalent angeknüpften Chromophore durch gut voneinander getrennte Absorptionsmaxima (510 nm für TO und 640 nm für TR). Die Charakterisierung der TO-TR-modifizierten MBs erfolgte hauptsächlich mittels stationärer Fluoreszenzspektroskopie, wobei die TO-selektive Anregung bei 490 nm verwendet wurde. Zusätzlich wurden die Schmelztemperaturen (T_m) der Haarnadeln mit denen der Duplexe verglichen, die sich in Gegenwart von 1.2 eq Gegenstrang bilden. Hierbei zeigte sich, dass die Länge der eingesetzten Gegenstränge dann optimal ist, wenn diese nicht nur zum Schleifenbereich des MB, sondern auch zu den ersten Basenpaaren des Stamminnenen komplementär sind (**MB 1a-4a**). Dies wird bei Betrachtung von **MB 2c** sowie **MB 3c** deutlich: mit Gegensträngen, die nur mit der Schleife des MB hybridisieren, werden beide Chromophore nur unvollständig voneinander getrennt. Außerdem führt eine teilweise Selbstkomplementarität der Stämme von **MB 2** und **MB 3** zu unspezifischer Farbstoffaggregation von TO und TR. Diese sind sowohl im Absorptions- als auch im Emissionsspektrum klar zu erkennen. Wird der Gegenstrang jedoch zu lang gewählt, lassen sich deutliche Verluste der Fluoreszenzintensität des TO in der Duplexform aller MBs feststellen (**MB 1b-4b**).

Um die erhaltenen Ergebnisse der TO-TR modifizierten MBs sowohl untereinander als auch mit kommerziell erhältlichen MBs vergleichen zu können, wurde der sog. *Enhancement Factor* (Kontrastfaktor) f berechnet.^[38-39] f steht für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I_{530}/I_{670} für Duplex- und Haarnadelform (Tabelle 5.2), wobei I_{530} und I_{670} die jeweils farbstofftypischen Emissionsintensitäten bei einer Wellenlänge von 530 nm für TO und 670 nm für TR steht.

Tabelle 5.2: Enhancement Factor f und Schmelztemperaturen T_m für **MB 1-6** sowie **MB 1a-6a**.

| | $f^{(a)}$ | T_m (Duplex) ^(b) [°C] | T_m (Haarnadel) ^(c) [°C] | ΔT_m ^(d) [°C] |
|---|-----------|---------------------------------------|--|-------------------------------------|
| MB 1a^(b)/MB 1^(c) | 34.2±0.5 | 79.9 | 69.3 | 10.6 |
| MB 2a^(b)/MB 2^(c) | 13.0±0.5 | 77.3 | 66.4 | 11.0 |
| MB 3a^(b)/MB 3^(c) | 39.7±2.4 | 76.8 | 63.9 | 12.9 |
| MB 4a^(b)/MB 4^(c) | 22.3±0.9 | 78.6 | 58.5 | 20.1 |
| MB 5a^(b)/MB 5^(c) | 13.4±2.0 | 79.1 | 68.4 | 10.7 |
| MB 6a^(b)/MB 6^(c) | 3.9±0.4 | 78.4 | 72.8 | 5.6 |

(a) Enhancement Factor $f = (I_{530}/I_{670})_{\text{Duplex}} / (I_{530}/I_{670})_{\text{Haarnadel}}$. (b) Schmelztemperatur T_m von **MB 1a-6a** (Duplex) gemessen bei 260 nm hybridisiert mit 1.2 eq Gegenstrang. (c) Schmelztemperatur T_m von **MB 1-6** (Haarnadelform) gemessen bei 260 nm. (d) $\Delta T_m = T_m(\text{Duplex}) - T_m(\text{Haarnadel})$.



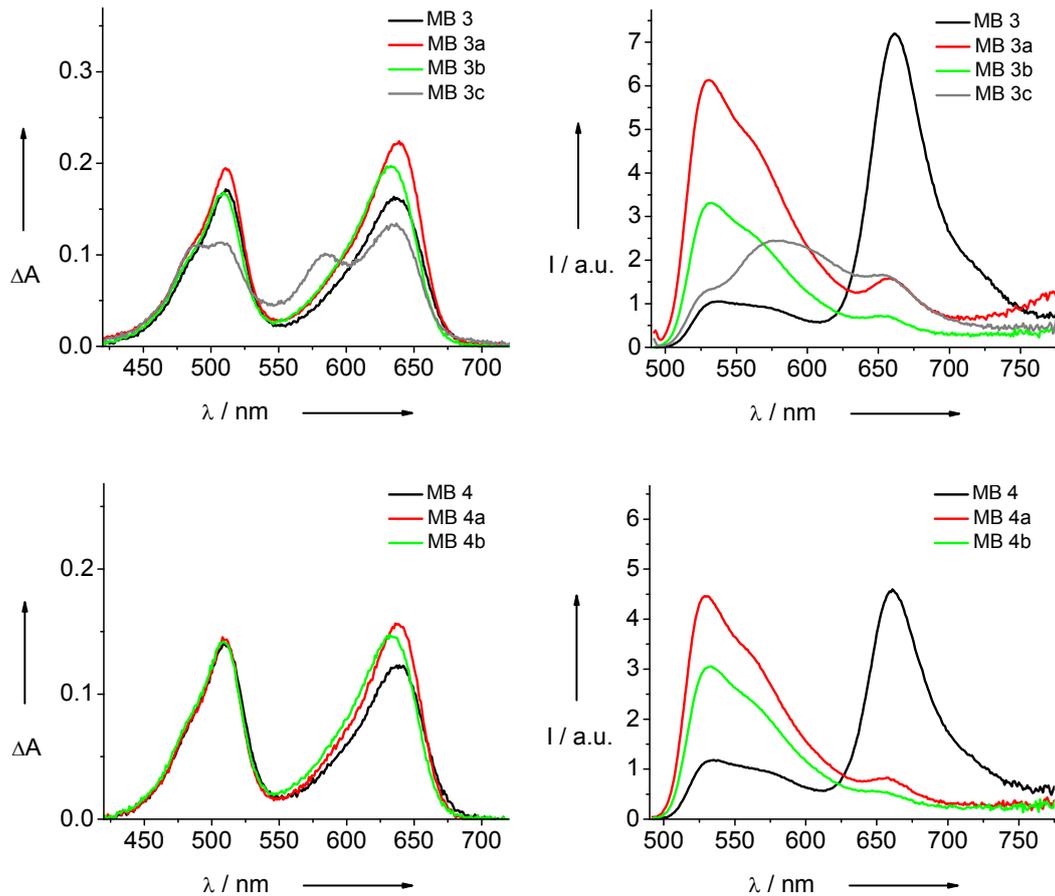


Abb. 5.2: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) für **MB 1 – MB 4** mit unterschiedlichen Gegensträngen ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$).

5.1.2 Verschiedene TO-TR markierte MBs im Vergleich

Im nun folgenden Teil werden die im Stamminneren TO-TR markierten MBs (**MB 1-5**) hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften verglichen, sowie ihr kinetisches Verhalten in Anwesenheit von Gegensträngen untersucht. Da **MB 1a-4a** (Duplexform) die besten Kontrastverhältnisse zu **MB 1-4** aufweisen, wurden die Vergleichsstudien ausschließlich mit Gegensträngen **a** durchgeführt.

Zuerst wurde die Auswirkung der Farbstofforientierung von TO und TR zueinander anhand von **MB 1** und **MB 5** genauer untersucht (Abb. 5.3, links). Während die T_m -Unterschiede zwischen Duplex und Haarnadel annähernd gleich groß sind (10.6 bzw. 10.7 °C), zeigt sich bei Betrachtung der Fluoreszenzspektren ein deutlicher Unterschied: Die intensivere rote Fluoreszenz von **MB 5** lässt auf eine höhere ET-

Effizienz im Vergleich zu **MB 1** schließen. Durch die Öffnung der Haarnadel ist jedoch der Anstieg der TO-Fluoreszenz im Fall von **MB 1a** deutlich ausgeprägter.

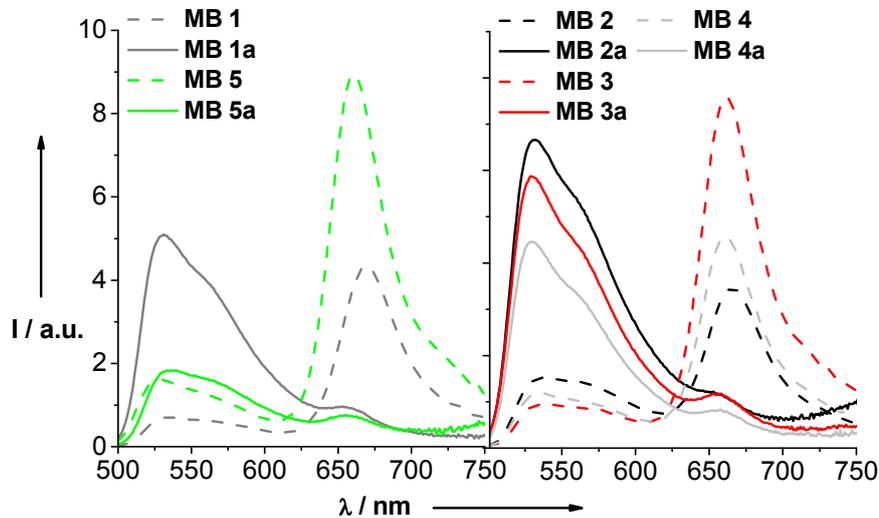


Abb. 5.3: Fluoreszenzspektren der Haarnadelformen **MB 1-MB 5** sowie der Duplexe **MB 1a-MB 5a** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$).

Aus diesem Grund weist **MB 1** einen weitaus besseren *Enhancement Factor* f (34.2) zwischen den beiden Farben Rot und Grün auf als **MB 5** (13.4). Dieses Ergebnis kann im Moment nur unzureichend erklärt werden. Vermutlich würde die Wahl eines kürzeren Gegenstranges zu einem besseren Anstieg der TO-Emission in **MB 5a** führen. Ein ähnliches Verhalten zeigten **MB 1b-4b**: Hier konnte durch die Verkürzung des jeweiligen Gegenstranges um ein Basenpaar deutliche Intensitätssteigerungen der TO-Emission beobachtet werden.

In einer zweiten Experimentreihe wurde die optimale Stammlänge der MBs ermittelt (Abb. 5.3, rechts). Auf Grund der Stammverkürzung sinken die T_m -Werte von 69.3 C für **MB 1** auf 58.5 C für **MB 4**, wohin gegen die T_m -Unterschiede zwischen Haarnadel und Duplex von 10.6 °C auf 20.1 °C ansteigen. Vergleicht man alle erhaltenen f -Werte miteinander, so lassen sich zwei bemerkenswert hohe Werte herausstellen: 34.2 für **MB 1** und 39.7 für **MB 3**. Abschließend wurde noch das kinetische Verhalten der Haarnadelöffnung für **MB 1-MB 5** nach Zugabe von 0.5 eq des entsprechenden Gegenstranges untersucht. Zeitabhängige Messungen der f -Werte zeigen – dass bei niedrigen DNA-Konzentrationen – ein plateauartiges Maximum innerhalb von 12 min für **MB 2-5** und 30 min für **MB 1** erreicht wird.

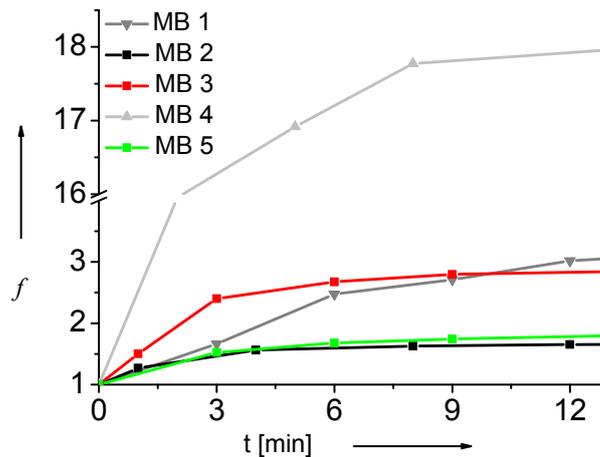
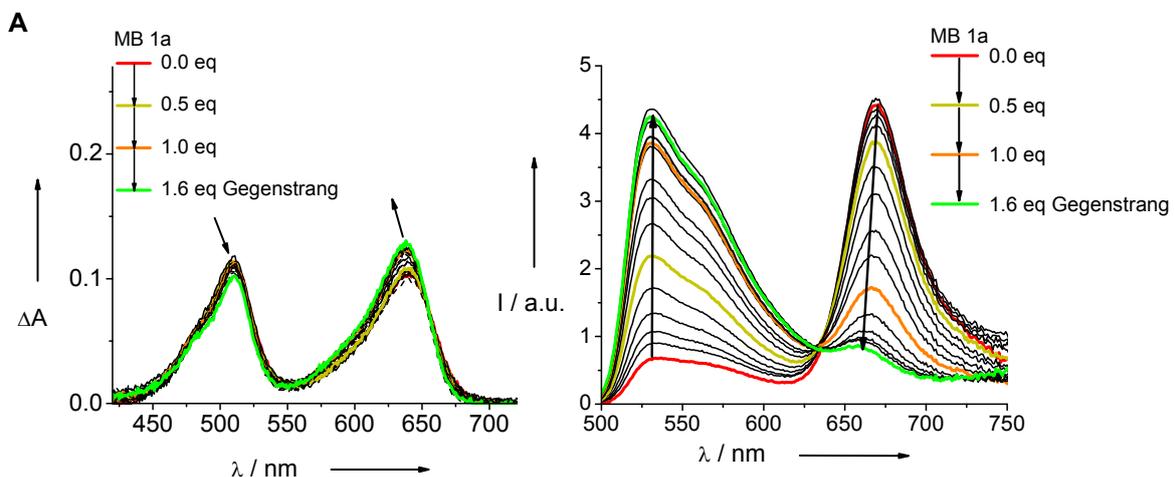


Abb. 5.4: Zeitabhängige Beobachtung des *Enhancement Factor* f für **MB 1-5** nach der Zugabe von 0.5 Äquivalenten des jeweiligen Gegenstranges.

Abb. 5.5 A zeigt eine vollständige Titration von **MB 1** durch schrittweise Zugabe von 0.1 eq Gegenstrang. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurde eine Wartezeit von 60 min eingehalten um eine vollständige Öffnung des MB zu gewährleisten, obwohl die oben besprochenen kinetischen Experimente eine deutlich kürzere Zeit ergeben hatten. Bemerkenswerterweise ändert sich die Emissionsfarbe des MB schrittweise von Rot (TR) nach Grün (TO), was daran liegt, dass beide Wellenlängen durch die große Differenz von 140 nm deutlich getrennt sind. Die vollständige Öffnung des MB erfordert die Zugabe von 1.6 eq Gegenstrang, was in dem vergleichsweise kleinen ΔT_m -Wert begründet liegt.

Da der Rückgang der roten TR-Emission gleichzeitig mit dem Anstieg der grünen TO-Emission stattfindet, kann diese Farbänderung gut mit bloßem Auge verfolgt werden, wenn die Küvette unter der UV-Lampe beleuchtet wird (Abb. 5.5 B).



B

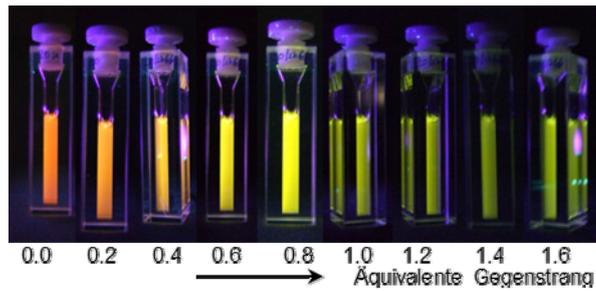


Abb. 5.5: **A:** Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) der Titration von **MB 1** in der Haarnadelform mit bis zu 1.6 eq Gegenstrang zu **MB 1a** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$). **B:** Dazugehörige Leuchtreihe von **MB 1** bei schrittweiser Zugabe an Gegenstrang. Belichtung für das Foto erfolgte mit einer laborüblichen UV-Lampe.

Die beschriebene Wellenlängenverschiebung war ebenfalls bei einer Titration von **MB 2**, **MB 3** und **MB 4** mit den jeweiligen Gegensträngen zu beobachten (siehe Kapitel 11.9: „Im Hauptteil nicht dargestellte DNA/RNA-Spektren“, Abb. 11.1). Deshalb wird davon ausgegangen, dass das Konzept der *DNA Traffic Lights* in einer Vielzahl von MBs, die sich in Stammlänge und Schleifengröße unterscheiden, einsetzbar ist.

5.1.3 Proof of Concept: DNA Traffic Lights im Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen MB

Um die Anwendungsvorteile der entwickelten MBs heraus zustellen, wurde **MB 1** mit dem kommerziell erhältlichen **MB 6** verglichen, der ebenfalls eine sog. Wellenlängenverschiebung aufweist. **MB 6** wurde endständig mit Fluorescein als ET-Donor (6-FAM, 5'-Ende) und Rhodamin als ET-Akzeptor (TAMRA, 3'-Ende) markiert (Abb. 5.6).^[36]

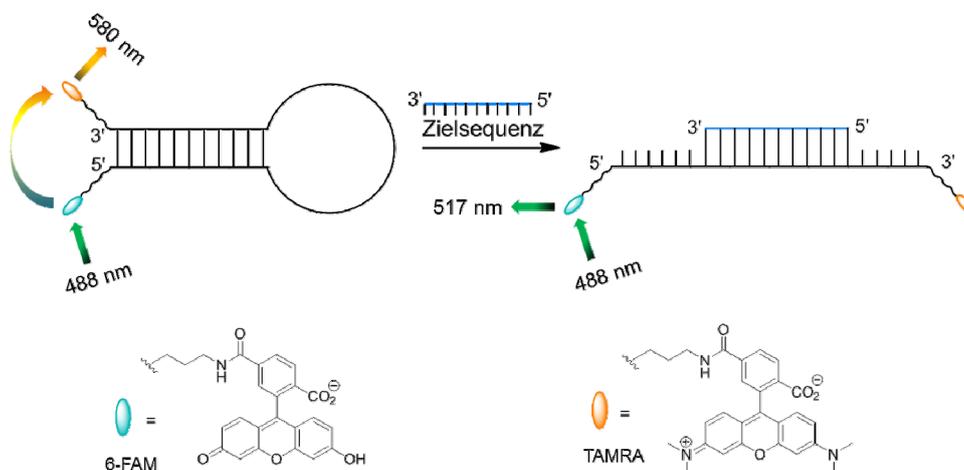


Abb. 5.6: Schematische Darstellung eines endständig markierten *Molecular Beacon* (**MB 6**) mit 6-FAM als Energie Donor und TAMRA als Energie Akzeptor ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$).

Das Titrationsexperiment mit **MB 6** (Abb. 5.7 A) zeigt prinzipiell ähnliche Spektren wie aus der Literatur bekannt und wird durch einen f -Wert von nur 3.9 charakterisiert (Abb. 5.8). Dieser Wert steht wie oben beschrieben, für den Kontrast zwischen Haarnadel und Duplex, der für **MB 6** annähernd eine Größenordnung kleiner ist als für **MB 1**. Dieses Ergebnis überrascht nicht, denn bei genauerer Betrachtung des Fluoreszenzspektrums wird ersichtlich, dass die beiden Emissionswellenlängen in **MB 6** nur mäßig voneinander getrennt sind. Der Grund weshalb **MB 6** den maximalen f -Wert mit bereits 0.2 eq Gegenstrang erreicht, findet sich in der Tatsache, dass die TAMRA-Fluoreszenz eine deutlich geringere Intensität aufweist und zudem mit der Seitenbande der FAM-Emission überlappt. Außerdem findet in der Haarnadelform ein nur unvollständiger ET statt. Bei Betrachtung der Küvetten unter der UV-Lampe lässt sich eine Farbänderung zwischen den einzelnen Gelbtönen nur erahnen (Abb. 5.7 B).

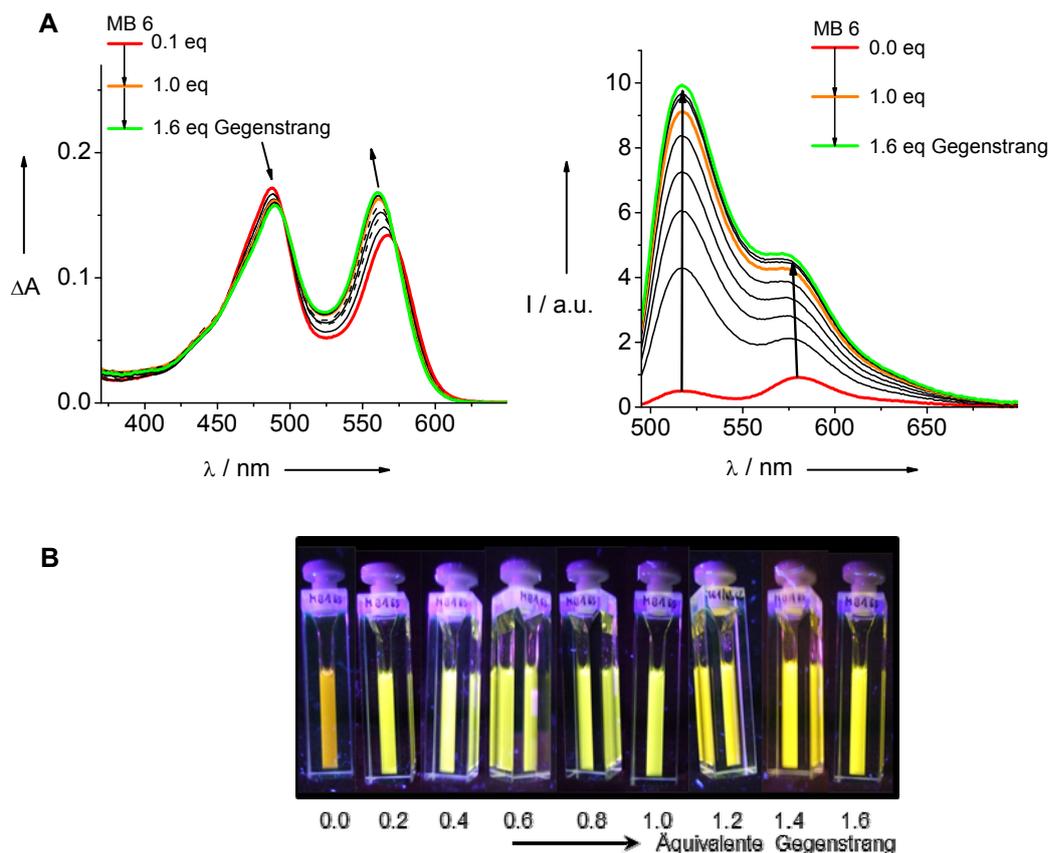


Abb. 5.7: **A:** Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) der Titration von **MB 6** in der Haarnadelform mit bis zu 1.6 eq Gegenstrang zu **MB 6a** ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$). **B:** Dazugehörige Leuchtreihe von **MB 6** bei schrittweiser Zugabe an Gegenstrang. Belichtung für das Foto erfolgte mit einer laborüblichen UV-Lampe.

Obwohl sich der f -Wert als sehr nützlich erwiesen hat um die Fluoreszenzänderung unterschiedlicher MBs miteinander zu vergleichen, wird in der Literatur nur spärlich darüber berichtet. Als eines der wenigen Beispiele sei hier ein mit Alexa und RedX markierter MB genannt, der einen f -Wert von 10.5 erreicht.^[38]

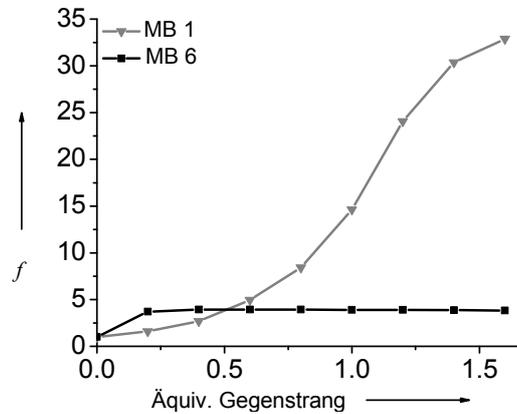


Abb. 5.8: Enhancement Factor f von **MB 1** und **MB 6**, aufgetragen gegen die Menge des entsprechenden Gegenstrangs.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Art und Weise, wie die Chromophore mit dem DNA-Rückgrat verknüpft werden, entscheidend zum Unterschied zwischen **MB 1** und **MB 6** beiträgt.^[160] Im Fall von **MB 6** sind beide Farbstoffe über lange, flexible Alkylketten mit dem jeweiligen Ende des MB verknüpft, wodurch ein ET nur sehr ineffizient durch zufälliges Aufeinanderprallen der Farbstoffmoleküle stattfinden kann. Dagegen zwingt in **MB 1** die DNA-Architektur die beiden Farbstoffe TO und TR in räumliche Nähe zueinander, wodurch die ET-Effizienz durch statische Löschung erheblich gesteigert wird.

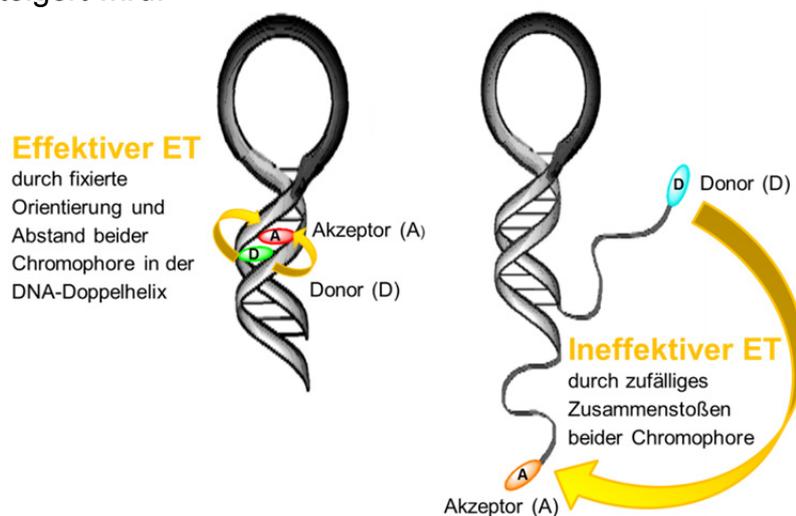


Abb. 5.9: Schematische Darstellung eines im Stamminneren markierten MB und eines Endständig, über flexible Alkyllinker, markierten MB. Links: Ein effektiver ET kommt durch statische

Fluoreszenzlöschung zustande. Rechts: Ein ineffektiver ET kommt durch dynamische Fluoreszenzlöschung zustande.

Während der Titration wird der entsprechende Gegenstrang schrittweise zugegeben, was nach und nach zu einer Öffnung der Haarnadel führt, wodurch die architektonischen Kräfte der DNA-Doppelhelix um die Chromophore herum gelockert werden. Dies führt dazu, dass TO und TR voneinander getrennt werden, was sich durch eine kontinuierliche Farbänderung von Rot nach Grün verfolgen lässt.

Verglichen mit **MB 6** und anderen kommerziell erhältlichen MBs weist das Konzept der *DNA Traffic Lights* hauptsächlich drei große Vorteile auf:

- i) Die Fluoreszenzauswertung wird durch die klar voneinander getrennten Wellenlängen sehr einfach (140 nm Verschiebung)
- ii) Bedingt durch die gut voneinander getrennten Emissionsbanden sowohl des Duplexes als auch der Haarnadel, steigern die hohen f -Werte das Signal/Rausch-Verhältnis signifikant.
- iii) Sensitivität bis in den nanomolaren Bereich (~10 nM)

Diese Eigenschaften machen die in dieser Arbeit entwickelten MBs zu sehr leistungsfähigen Werkzeugen der Bioanalytik mit einem breiten Anwendungsspektrum. Im nun folgenden Unterkapitel wird dies am Beispiel einer SNP-Detektion (*Single Nucleotide Polymorphism*) mit **MB 1** exemplarisch dargestellt.

5.1.4 SNP-Detektion

Das Genom eines Menschen besteht aus einer Gesamtzahl von 3.2 Milliarden Basenpaaren, von denen 99.9% bei allen Menschen identisch sind. Anders gesagt bestimmt ein Sequenzunterschied von nur 0.1% des menschlichen Genoms unsere Individualität und Einzigartigkeit. Handelt es sich dabei um den simplen Austausch eines Basenpaares, spricht man von einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP).^[161-162] Befinden sich SNPs in den codierenden Bereichen des Genoms, können Fehler in der Translation entstehen, was zu einer veränderten Proteinexpression führen kann. Dies kann zur Ausprägung bestimmter Krankheiten wie beispielsweise Krebs^[7] oder Morbus Alzheimer führen.^[8] Auch die Wirkung von

Medikamenten kann dadurch beeinflusst werden.^[9-11] Die Wichtigkeit einer verlässlichen SNP-Detektion liegt daher auf der Hand. Die wichtigsten Grundlagen für einen erfolgreichen Einsatz von MBs in der SNP-Detektion werden im folgenden Absatz kurz erläutert.

Im Allgemeinen kann der Hybridisierungsvorgang von *Molecular Beacons* über thermodynamische Prozesse erklärt werden. Dabei wird die Ausbildung der Duplex-Form durch den Energieunterschied zur Haarnadel-Form angetrieben. Diese Differenz ist sowohl von der Stammlänge, der Stammsequenz als auch von der Temperatur abhängig und drückt sich in den bereits in Tabelle 5.2 gezeigten ΔT_m -Werten aus. Dieser Unterschied ist verantwortlich für die Stabilität, Spezifität und die Kinetik der Stammöffnung. Auf Grund der Hybridisierungsrate, die bei Match- bzw. Mismatch-Gegenstrang verschieden ist, wird es möglich SNPs mit Hilfe von MBs zu erfassen.^[163] Ausschlaggebend für eine effektive Diskriminierung von Basenfehlpaarungen ist auch die Lage des SNPs. Experimente belegen, dass die höchst mögliche Selektivität für Mutationen in der Mitte des Bindungsbereiches liegt. Je weiter die Fehlpaarung in Richtung des Stammes wandert, umso schlechter wird die Unterscheidungsfähigkeit zwischen Wildtyp und Mutante.^[164]

Im nun folgenden Abschnitt wird am Beispiel von **MB 1** gezeigt, dass eine SNP-Detektion mit dem in dieser Arbeit entwickelten Auslesungs-Konzept (*DNA Traffic Lights*) möglich ist. Zu diesem Zweck wurde **MB 1** mit einem vollständig komplementären Gegenstrang (**MB 1b**), sowie einem Gegenstrang mit einer Basenfehlpaarung titriert (**MB 1c**). Die jeweiligen Sequenzen sind in Tabelle 5.3 dargestellt. Dabei ist in der Duplexform **MB 1c** beispielhaft ein Thymin (*Match*) gegen ein Adenosin (*Mismatch*) in der Mitte des Zielstrangs ausgetauscht worden.

Tabelle 5.3: Sequenz von **MB 1**^(a) (Haarnadelform) und Gegenstränge (**MB 1b**,**MB 1c**)^(b).

| | 3'→5' für MBs, 5'→3' für Gegenstränge |
|--------------|---|
| MB 1 | <u>GTCA</u> TR TTGACCGTACGTCAGTTGACTGGTCAT OT TTGAC |
| MB 1b | AACTGGCATGCAGTCAACTGACCAGT |
| MB 1c | AACTGGCATGCAG A CAACTGACCAGT |

(a) Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Stammsequenz des MB. (b) **MB 1b**: vollständig komplementärer Gegenstrang im Duplex; **MB 1c**: enthält eine Basenfehlpaarung (*Mismatch*).

Abb. 5.10 zeigt die dazugehörigen Absorptions- sowie Emissionsspektren für eine schrittweise Titration von **MB 1** mit den jeweiligen Gegensträngen. Um eine vollständige Öffnung der Haarnadel zu garantieren, wurde zwischen jedem Titrationsschritt eine Stunde gewartet. Außerdem wurden insgesamt 3.6 eq Gegenstrang zugegeben.

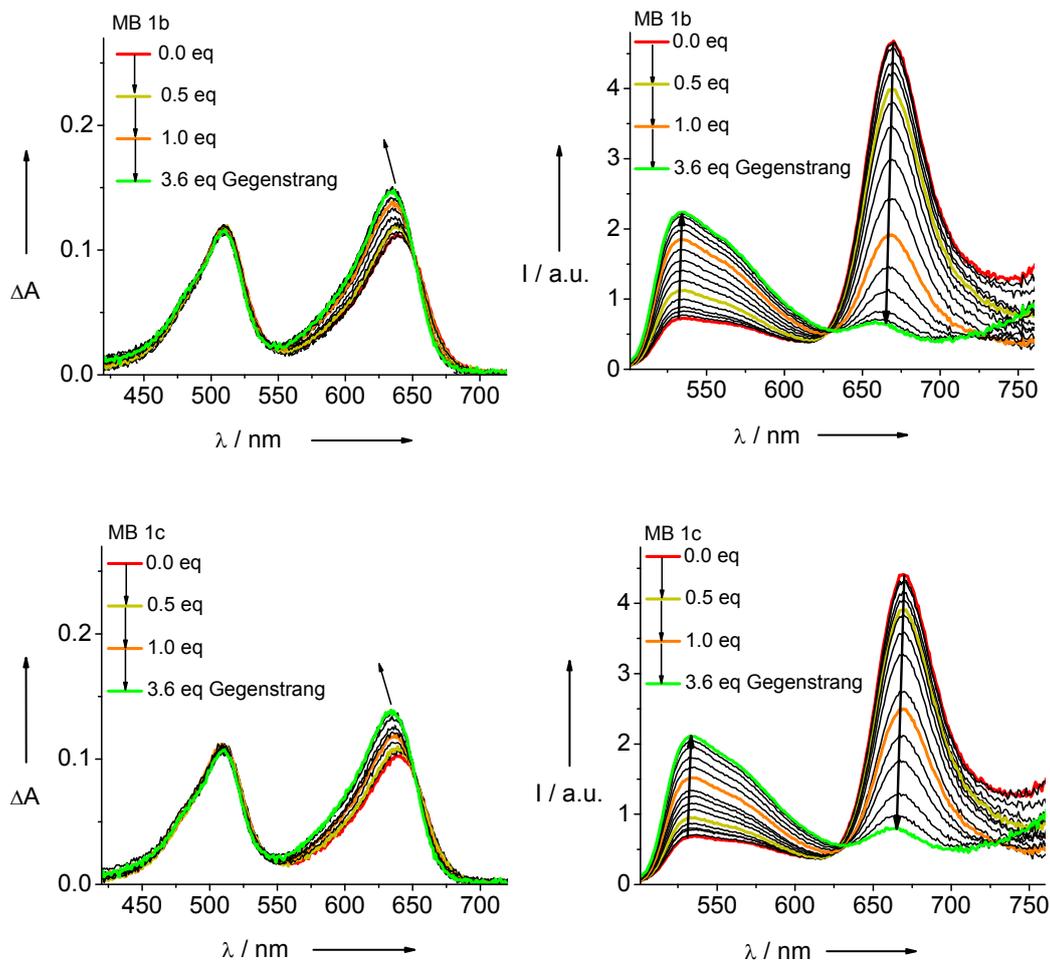


Abb. 5.10: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der schrittweisen Titration von **MB 1b** sowie **MB 1c** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$).

In beiden Fällen (**MB 1b** und **MB 1c**) ist eine schrittweise Öffnung der Haarnadelstruktur zu beobachten, die jedoch im *Mismatch*-Fall langsamer abläuft. Dies wird bei Betrachtung der dazugehörigen Kinetik deutlich (Abb. 5.11). Auf Grund der Basenfehlpaarung in **MB 1c** sinkt die Hybridisierungsrate, wodurch die Haarnadel-Form langsamer geöffnet wird als in Gegenwart des vollständig komplementären Gegenstrangs (**MB 1b**).

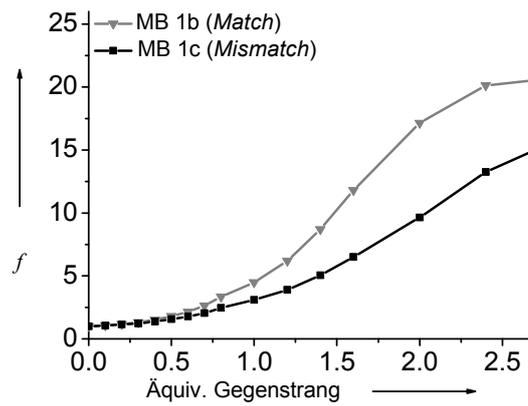


Abb. 5.11: *Enhancement Factor* f von **MB 1b (Match)** und **MB 1c (Mismatch)**, aufgetragen gegen die Menge des entsprechenden Gegenstrangs.

Dieses Ergebnis zeigt, dass bei der richtigen Wahl von Stammlänge, Stammstabilität und Schleifenlänge die Detektion von SNPs mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Konzepts der *DNA Traffic Lights* möglich ist.

5.2 Aptasensoren

Als Aptamer bezeichnet man einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide mit einer Bindungsstelle für kleine Moleküle; Aptamere werden meist aus DNA/RNA-Bibliotheken mit Hilfe der SELEX Technologie identifiziert und optimiert.^[165-166] Sie haben die Eigenschaft spezielle Sekundär- und Tertiärstrukturen anzunehmen, wodurch eine Bindungsstelle für kleine Moleküle entsteht. Dabei werden sowohl kanonische- als auch nicht-kanonische Basenpaare ausgebildet, die verantwortlich für die Strukturgebung sind.^[165-166] Die Bindungsstelle an sich ist sehr selektiv gegenüber dem Analyten und kann diesen mit einer hohen Affinität binden. In den vergangenen Jahren wurde über eine Vielzahl von Sensoren berichtet, die auf dem Prinzip eines Aptamers beruhen. In der Literatur werden diese als „Aptasensor“ bezeichnet und finden Anwendung in den verschiedensten Bereichen der Bioanalytik.^[167-171] Elektrochemische-,^[172] chemilumineszente-^[173] oder colorimetrische^[174] Auslesemethoden des Sensorsignals sind indessen ebenso etabliert wie die Fluoreszenzdetektion.^[175-176] Da die Fluoreszenzspektroskopie mit zu den empfindlichsten Methoden zählt um zwischenmolekulare Interaktionen zu beobachten, liegt es nahe einen Aptasensor auf der Basis der *DNA Traffic Lights* zu entwickeln.

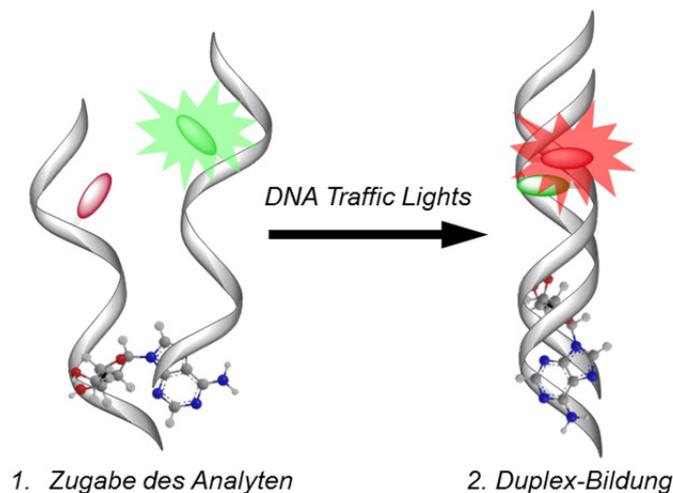


Abb. 5.12: Schematische Darstellung eines Adenosin-spezifischen Aptasensors basierend auf dem Konzept der *DNA Traffic Lights*.

Im folgenden Kapitel wird die Entwicklung eines Adenosin-spezifischen DNA-Aptasensors vorgestellt. Des Weiteren wird die Selektivität gegenüber strukturell ähnlichen Analyten gezeigt.^[158]

5.2.1 Design und Strukturoptimierung

Der in dieser Arbeit entwickelte Aptasensor für die Bindung von Adenosin basiert auf einer 27 Nukleotid langen Aptamer-Sequenz, die von *Patel et al.* 1997 publiziert worden ist.^[177] Wie in Abb. 5.13 (oben) gezeigt, besteht dieses Aptamer ursprünglich aus einem einzigen DNA-Strang, der mit Adenosin eine adaptive Bindung eingehen kann. Dabei werden sowohl kanonische-, als auch nicht-kanonische Basenpaare ausgebildet, die für die dreidimensionale Strukturgebung verantwortlich sind und so die Adenosin-Bindungsstelle generieren.

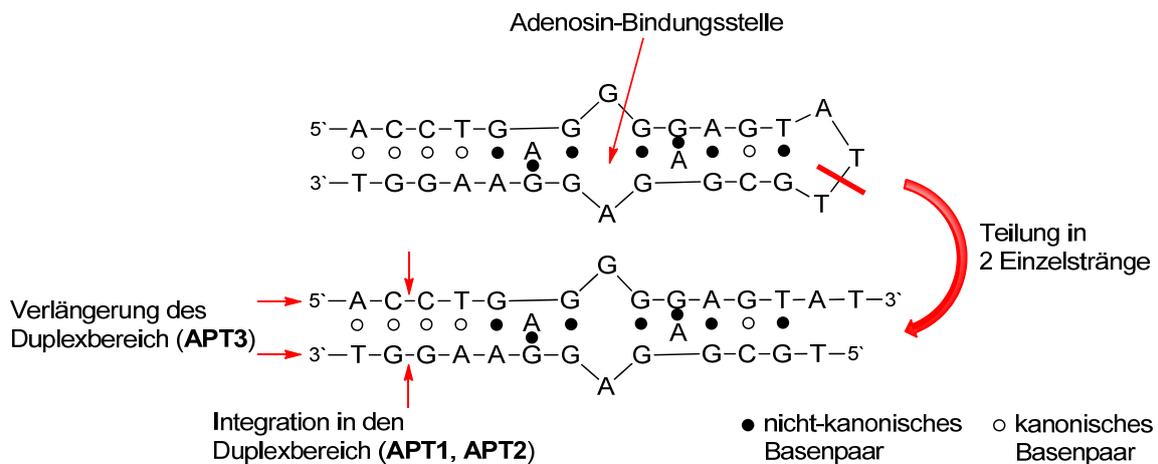


Abb. 5.13: Schematische Darstellung der 27 Nukleotid langen Aptamerstruktur mit Adenosin-Bindungsstelle (oben); Überlegungen zum Design eines wellenlängenverschiebenden DNA-Aptasensors (unten).

Um einen wellenlängenverschiebenden DNA-Aptasensor herzustellen wurden folgende Modifikationen an der ursprünglichen Sequenz vorgenommen:

- Der DNA-Strang einer Länge von 27 Nukleotiden wurde zwischen den Nukleotiden 14 und 15 in zwei Einzelstränge unterteilt, mit einer Länge von 14 bzw. 13 Nukleotiden (**APT1-APT3**).
- Die Integration von TO und TR als künstlicher Basenersatz wurde in **APT1** und **APT2** im Duplexbereich zwischen Nukleotid 2 und 3 vorgenommen.
- Die Verlängerung des Duplexbereichs um 4 Basenpaare, inklusive TO und TR als Basenersatz, sowohl am 3'- als auch am 5'-Terminus der ursprünglichen Aptamer-Sequenz wurde in **APT3** vorgenommen.

Um eine gute Target-Spezifität und -Selektivität zu gewährleisten wurde der Bereich um die Adenosin-Bindungsstelle nicht modifiziert. Eine vollständige Übersicht der

hergestellten DNA-Aptamere **APT1-APT3** gibt Tabelle 5.4; dabei besteht jedes Aptamer aus den jeweiligen farbstoffmodifizierten Einzelsträngen **APT1a-APT3a** und **APT1b-APT3b**.

Tabelle 5.4: Sequenzen der Adenosin-spezifischen Aptamere **APT1-APT3**^(a,b,c)

| | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| APT1a ^(a) | 5'-ACT TO CTGGGGGAGTAT-3' |
| APT1b ^(a) | 3'-TG TR TGAAGGAGGCGT-5' |
| APT2a ^(b) | 5'-ACT TR ACTGGGGGAGTAT-3' |
| APT2b ^(b) | 3'-TGT TO GAAGGAGGCGT-5' |
| APT3a ^(c) | 5'-GTT TO ACCTGGGGGAGTAT-3' |
| APT3b ^(c) | 3'-CA TR TTGGAAGGAGGCGT-5' |

(a) **APT1** besteht aus dem Duplex von **APT1a** und **APT1b**. (b) **APT2** besteht aus dem Duplex von **APT2a** und **APT2b**. (c) **APT3** besteht aus dem Duplex von **APT3a** und **APT3b**.

Funktionsprinzip

In Abwesenheit von Adenosin liegen die jeweiligen Einzelstränge **APT1a-APT3a** sowie **APT1b-APT3b** vor. Eine Duplexbildung findet auf Grund unzureichender Komplementarität zwischen den jeweiligen Einzelsträngen nicht statt, wodurch TO und TR räumlich voneinander getrennt vorliegen. Da in diesem Fall kein ET auf TR stattfinden kann, sollte sich ausschließlich die für TO typische Grüne Fluoreszenz (530 nm) beobachten lassen ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$). Durch die Zugabe von Adenosin kommt es zur Duplexbildung und damit auch zum ET von TO auf TR. Ein Farbumschlag nach Rot (670 nm) sollte erkennbar sein. In Abb. 5.14 ist dieses Prinzip an Hand von **APT3** schematisch dargestellt.

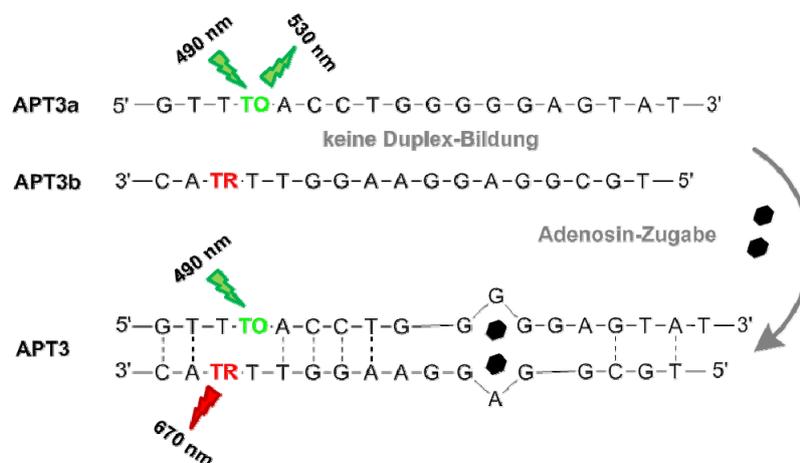


Abb. 5.14: Adenosin-Aptasensor: Sequenzen der modifizierten Aptamer-Einzelstränge **APT3a** und **APT3b**; durch die Bindung von Adenosin bildet sich der Aptamer-Duplex **APT3** aus, was durch einen Fluoreszenzfarbwechsel von Grün nach Rot zu beobachten ist.

Im nun folgenden Teil wurden **APT1-APT3** auf ihre Fähigkeit untersucht, Adenosin (A) in unterschiedlichen Konzentrationen adaptiv zu binden. Dabei wurde nach erfolgter Adenosin-Zugabe zwei Stunden gewartet um eine vollständige Strukturumbildung zum Aptamer zu ermöglichen.

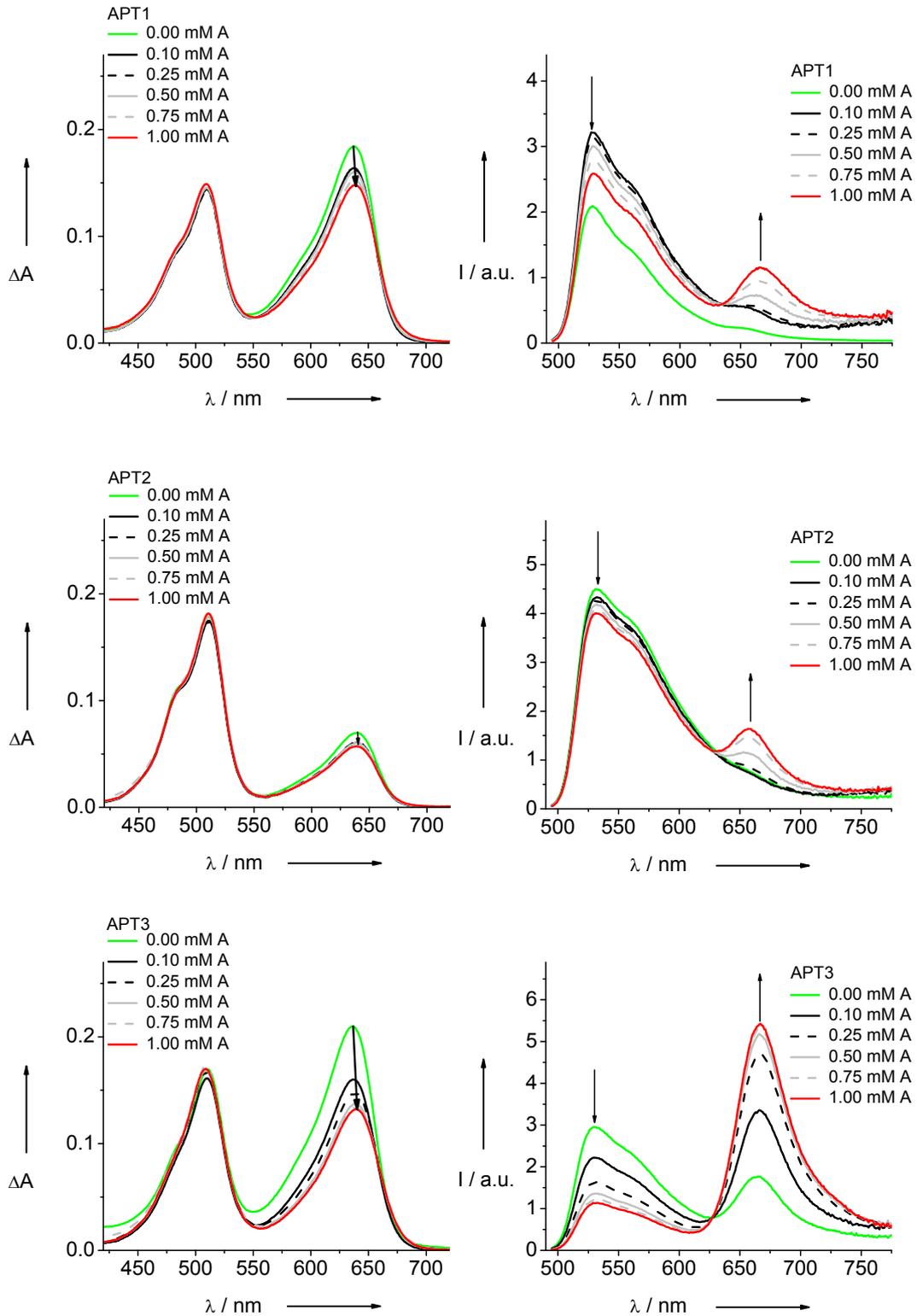


Abb. 5.15: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von **APT1 – APT3** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$); A (Adenosin).

In Abb. 5.15 sind die dazugehörigen Absorptions- und Emissionsspektren dargestellt. Dabei ist in allen Absorptionsspektren die Anwesenheit beider Farbstoffe durch klar voneinander getrennte Absorptionsmaxima von TO (~510 nm) und TR (~630 nm) zu erkennen. Die Extinktionswerte von TO unterscheiden sich kaum voneinander, wohingegen die Werte für TR zwischen **APT1-APT3** variieren. Dabei lassen sich mit steigender Adenosin-Konzentration deutlich kleinere ϵ -Werte für TR beobachten. Wie bereits ausführlich in Kapitel 4 erläutert, kann dieses Verhalten ein erster Hinweis auf Grundzustandswechselwirkungen zwischen TO und TR sein. Diese können sich dem zufolge nach der adaptiven Bindung von Adenosin ausbilden, sobald die jeweiligen Einzelstränge sich zu einem Duplex zusammenlagern. Außerdem lässt sich mit zunehmender Adenosin-Konzentration ein ET von TO auf TR beobachten, der im Fall von **APT3** die größte Effizienz zeigt. In **APT1** und **APT2** wurden die Farbstoffmodifikationen im Duplexbereich des ursprünglichen Aptamers vorgenommen. Eine Destabilisierung des Aptamers ist die Folge, wodurch TO und TR nur in unzureichendem Maße in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dies könnte ein Grund für die geringere Duplexbildung und die damit verbundene geringe ET-Effizienz sein. Zusätzlich liegt der Modifikationsbereich von **APT1** und **APT2** relativ nahe an der Adenosin-Bindungsstelle, was möglicherweise zu einer schlechteren adaptiven Bindung führt. Durch eine Modifikation von **APT3** am 3'- bzw. 5'-Terminus der ursprünglichen Aptamersequenz können diese Probleme umgangen werden. Außerdem wurde in **APT3** die Chromophor-Chromophor-Orientierung mit der größten Duplexstabilisierung gewählt (vgl. Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3), um die adaptive Bindung von Adenosin zu unterstützen.

5.2.2 Sensitivität und Selektivität

Um neben einer Adenosin-Sensitivität auch die Selektivität des in dieser Arbeit entwickelten Aptasensors bezüglich Adenosin (A) herauszustellen, wurde die Bindung von **APT3** zu strukturell ähnlichen Analytmolekülen untersucht. Dazu wurde das Verhalten der einzelsträngigen Aptamerbestandteile **APT3a** und **APT3b** in Gegenwart von Deoxyadenosin (dA), Deoxyguanosin (dG) sowie 2-Aminopurin (2-AP) mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht (Abb. 5.16). Dabei kann klar zwischen A, dG und 2-AP differenziert werden. Verdeutlicht wird dies bei

Betrachtung der Kontrastverhältnisse I_{670}/I_{530} , die in Abb. 5.16 (rechts) dargestellt sind.

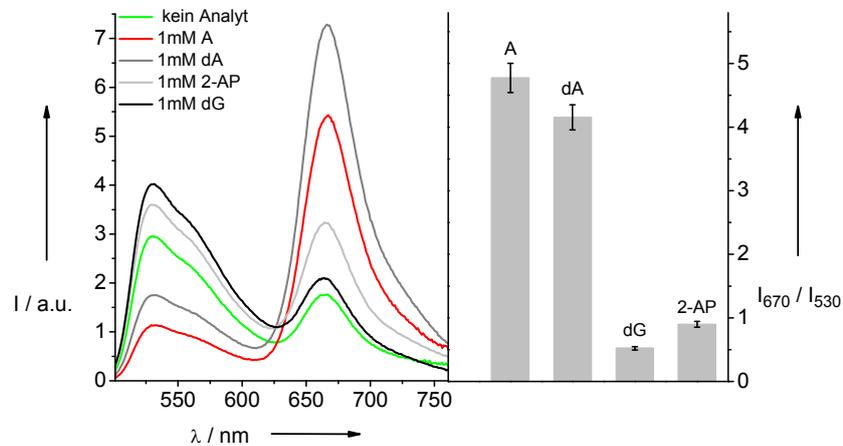


Abb. 5.16: Untersuchung der Selektivität des wellenlängenverschiebenden Aptasensors **APT3**. Links: Fluoreszenzspektren von **APT3** in Gegenwart unterschiedlicher Analyten: A (Adenosin), dA (Deoxyadenosin), dG (Deoxyguanodin), 2-AP (2-Aminopurin). Rechts: Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} für **APT3** in Gegenwart unterschiedlicher Analyten.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass das Konzept der *DNA Traffic Lights* Anwendung in der Bioanalytik findet. Es ist gelungen *Molecular Beacons* zu entwickeln, die im Stamminnen markiert sind und eine große Wellenlängenverschiebung aufweisen. Eine *Mismatch*-Detektion konnte erfolgreich durchgeführt werden. Des Weiteren wurde ein adenosinspezifischer und –selektiver Aptasensor auf der Basis der *DNA Traffic Lights* hergestellt. Beide Anwendungsbeispiele zeigen, welches große Potential in dem in dieser Arbeit entwickelt und vorgestellten Konzept liegt.

6 CylQ als ET-Donor für TR

Um zu zeigen, dass sich der Cyanin-Farbstoff Thiazolrot (TR) auch in Kombination mit anderen Chromophoren als Energie-Akzeptor eignet, wurde der von *Moritz Rubner* entwickelte Azidfarbstoff CylQ (Cyanine Indol Quinoline) als Energiedonor verwendet. Abb. 6.1 zeigt, dass die CylQ-Emission mit der TR-Absorption überlappt, was die Grundvoraussetzung für einen effizienten Energietransfer darstellt.

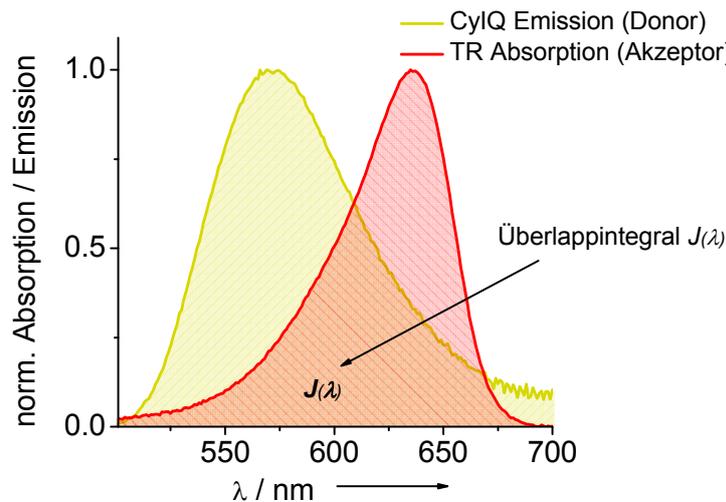


Abb. 6.1: Normierte CylQ-Emission sowie TR-Absorption mit Überlappintegral $J(\lambda)$.

Der Azid-Farbstoff CylQ (Abb. 6.2 C) kann postsynthetisch sehr einfach an die 2'-Position eines alkinmodifizierten Uridins gekoppelt werden. CylQ besteht zu einem Teil aus einem Chinolin, das über eine styrylartige Brücke mit einem Indol verknüpft ist. Auf Grund ihrer enormen Helligkeit wird diese Klasse von Farbstoffen bereits als nichtkovalentes Färbereagens für RNA verwendet.^[178-179] Verglichen mit kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen weist CylQ eine sehr viel höhere Photostabilität auf.^[149]

Im nun folgenden Kapitel wird gezeigt, dass CylQ als ET-Donor für TR eingesetzt werden kann. Dabei werden sowohl Interstrang-Dimere als auch Intrastrang-Dimere untersucht und auf ihre Eignung als Fluoreszenzsonde überprüft.

6.1 CylQ-TR Interstrang-Dimere

Wie bereits ausführlich für **12** in Kapitel 4.4 beschrieben, wurden die Oligonukleotide analog mit CylQ postsynthetisch modifiziert. Der Farbstoff CylQ absorbiert und emittiert in einem ähnlichen Bereich wie TO, weist jedoch eine höhere Photostabilität auf. Durch die Kombination mit TR wurde erwartet, das Konzept *DNA Traffic Lights* photostabiler und daher unempfindlicher gegenüber langen Bestrahlungszeiten machen zu können. Aus diesem Grund wurden die Interstrang-Dimere **DNA 18/19**, **DNA 20/21**, **DNA 22/6** und **DNA 7/23** hergestellt (Abb. 6.2 A). Die gewählten DNA-Sequenzen orientieren sich an **DNA1-DNA8**.

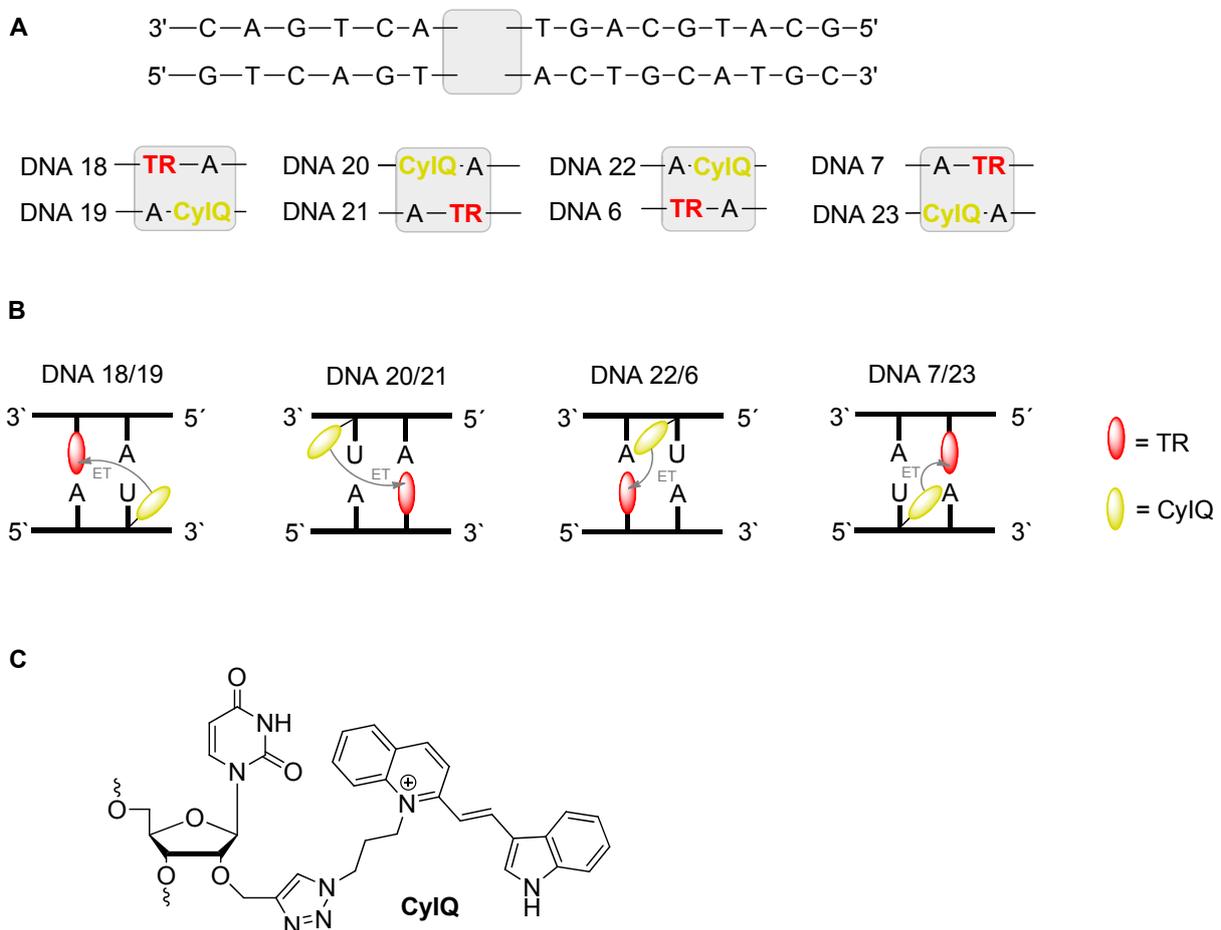


Abb. 6.2: **A:** Sequenzen der CylQ- und TR-modifizierten DNA-Stränge **DNA 18-DNA 23**. **B:** Schematische Darstellung der verschiedenen Chromophor-Chromophor-Orientierungen in der DNA-Doppelhelix und die daraus resultierenden ET-Richtungen. **C:** Durch postsynthetische Modifikation wurde der Azid-Farbstoff CylQ an ein 2'-alkinmodifiziertes Uridin geknüpft.

Auch hier wurde die Orientierung der ET-Paare variiert, um einen möglichst effizienten ET von CylQ auf TR zu erhalten (Abb. 6.2 B). Bei Betrachtung der Absorptionsspektren für **DNA 18/19**, **DNA 20/21**, **DNA 22/6** und **DNA 7/23** sind beide Chromophore durch deutlich voneinander separierte Absorptionsmaxima von CylQ (~500 nm) und TR (~640 nm) zu erkennen. Dabei ändern sich die Extinktionswerte für TR kaum, wohingegen ein deutlicher Unterschied der ϵ -Werte für CylQ zu beobachten ist (Abb. 6.3). Vermutlich handelt es sich um Grundzustandswechselwirkungen zwischen CylQ und TR, die bevorzugt dann auftreten, wenn die beiden Chromophore in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden. In Abb. 6.2 B wird dies an Hand eines Schemas verdeutlicht: Durch die Wahl der Farbstoff-Orientierung in **DNA 22/6** und **DNA 7/23** kommen diese direkt neben einander zu liegen. In **DNA 18/19** bzw. **DNA 20/21** ist das jedoch nicht der Fall. Hier werden TR und CylQ durch ein A-U Basenpaar getrennt, wodurch die Chromophore nicht mehr in direktem Kontakt miteinander stehen. Der Wegfall der Grundzustandswechselwirkungen zwischen den beiden Farbstoffen wirkt sich auf die Duplexstabilität aus. Für **DNA 22/6** und **DNA 7/23** wird eine Schmelztemperatur (T_m) von 68 °C erhalten, die mit veränderter Farbstoffanordnung in **DNA 18/19** und **DNA 20/21** auf 64 bzw. 61 °C sinkt (Tabelle 6.1).

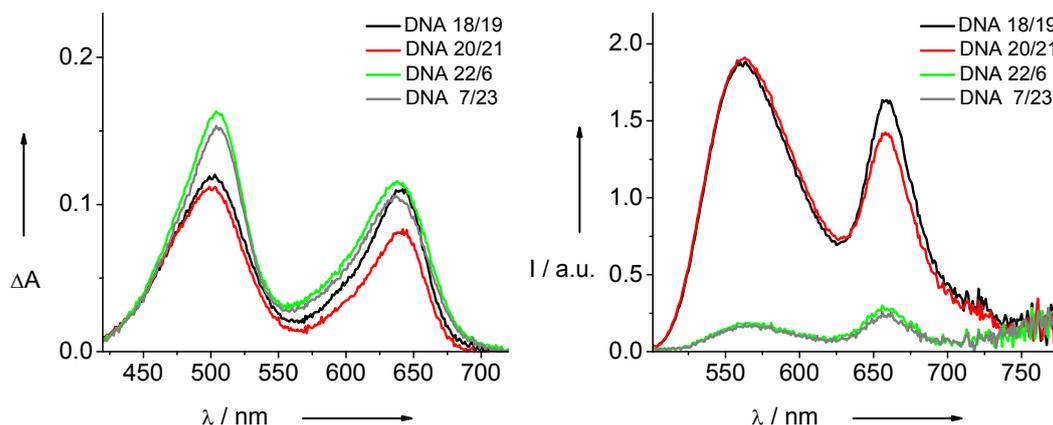


Abb. 6.3: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der CylQ- und TR- modifizierten Duplexe **DNA 18/19**, **DNA 20/21**, **DNA 22/6** und **DNA 7/23** ($\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm).

Bestätigt wird diese Hypothese bei Betrachtung der Fluoreszenzspektren in Abb. 6.3. Zu erkennen sind sowohl die für CylQ typische Emissionsbande in einem Bereich von ~565 nm, als auch die für TR in einem Bereich von ~660 nm. Durch die selektive Anregung von CylQ bei einer Wellenlänge von 495 nm findet in Gegenwart von TR

ein ET statt, der allerdings nur sehr ineffizient auftritt. Dies wird bei der Betrachtung der Kontrastverhältnisse I_{660}/I_{565} von beispielsweise 0.8 für **DNA 18/19** bzw. 1.6 für **DNA 22/6** besonders deutlich.

Tabelle 6.1: Schmelztemperaturen für **DNA 18/19**, **DNA 20/21**, **DNA 22/6** und **DNA 7/23**, sowie das dazugehörige Kontrastverhältnis I_{660}/I_{565} der jeweiligen DNA-Duplexe.

| DNA-Duplex | T_m [°C] | I_{660}/I_{565} |
|------------------|------------|-------------------|
| DNA 18/19 | 64 | 0.8 |
| DNA 20/21 | 61 | 0.7 |
| DNA 22/6 | 68 | 1.6 |
| DNA 7/23 | 68 | 1.4 |

Des Weiteren zeigen **DNA 22/6** und **DNA 7/23**, verglichen mit **DNA 18/19** bzw. **DNA 20/21**, eine nur sehr geringe Fluoreszenzintensität. Geht man davon aus, dass CylQ und TR in **DNA 22/6** und **DNA 7/23** miteinander wechselwirken, so lassen sich die niedrigen Fluoreszenzintensitäten durch eine statische Fluoreszenzlöschung erklären.^[160] Diese kann durch die Separation beider Farbstoffe in **DNA 18/19** bzw. **DNA 20/21** teilweise aufgehoben werden. Durch eine direkte Anregung von TR im Duplex bzw. im Einzelstrang kann diese Tatsache experimentell bestätigt werden: Eine Fluoreszenzlöschung tritt hauptsächlich in Gegenwart von CylQ auf.

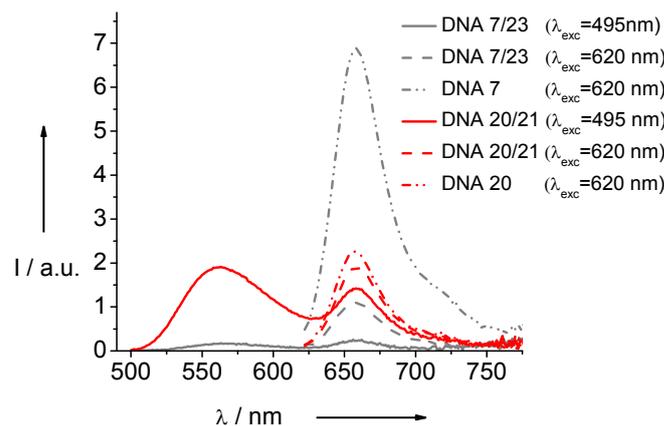


Abb. 6.4: Vergleich der Fluoreszenzintensität von TR in **DNA 7/23** und **DNA 20/21** bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und 620 nm; Anregung von TR im Einzelstrang **DNA 7** und **DNA 20** bei $\lambda = 620$ nm.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass ein ET von CylQ auf TR stattfindet, dieser jedoch sehr ineffizient verläuft. Zudem wird die

Fluoreszenzintensität stark gelöscht. CylQ ist als Ersatz von TO im Konzept der *DNA Traffic Lights* deshalb nicht geeignet.

6.2 CylQ-TR Intrastrang-Dimere als lineare DNA-Sonden

Im Fall von Intrastrang-Dimeren sind TR und CylQ im selben Strang ins DNA-Rückgrat eingebunden. Dabei wird TR während der DNA-Festphasensynthese als künstliches Phosphoramidit eingebaut, wohingegen die CylQ-Modifikation postsynthetisch via Klick-Reaktion vorgenommen wird. In diesem Zusammenhang spricht man auch von sog. „*On-Off*“-DNA-Sonden, die erst nach Bindung an ihre Zielstruktur ein auswertbares Signal liefern.^[180] Beispielsweise könnte so in der Fluoreszenzmikroskopie eine selektive DNA-Sequenz lokalisiert und durch Fluoreszenzänderung visualisiert werden.^[68] Auch eine Anwendung in der DNA-Microarray-Technologie wäre denkbar.^[181-182] Im Vergleich zu Molecular Beacons haben Intrastrang-Dimere den Vorteil, dass die Modifikationen sehr einfach in kurze, lineare DNA-Stränge eingebaut werden können. Zudem kann die Ziel-DNA ohne weitere Modifikation detektiert werden.^[183-184]

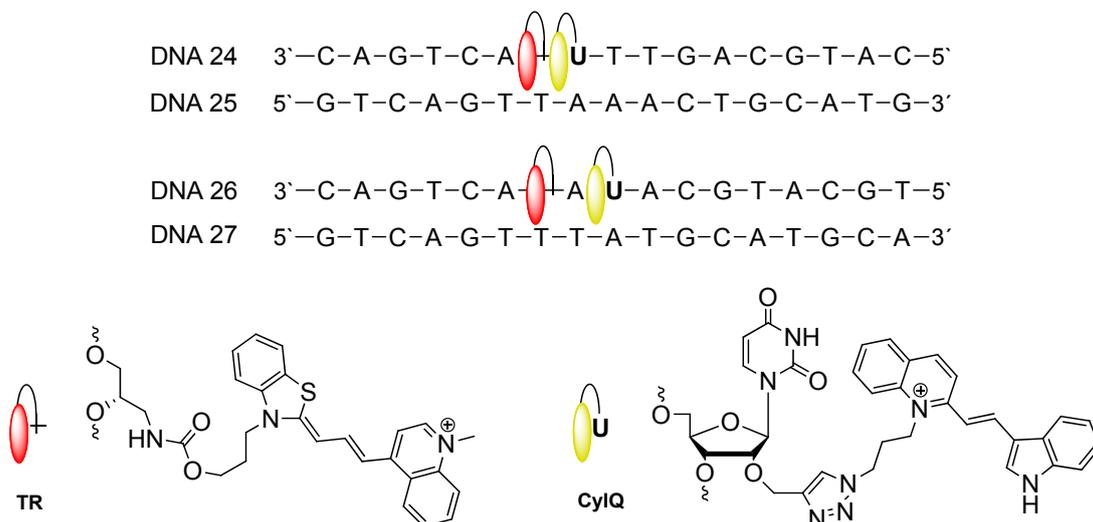


Abb. 6.5: Sequenzen der TR- und CylQ- modifizierten Intrastrang-Dimere **DNA 24** und **DNA 26** mit den dazugehörigen Gegensträngen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Farbstoffe CylQ und TR so angeordnet, dass sie sich entweder direkt nebeneinander im DNA-Strang befinden (**DNA 24**), oder durch ein A-T Basenpaar separiert werden (**DNA 26**, Abb. 6.5).

Die Absorptionsspektren (Abb. 6.6, links) zeigen sowohl für die Einzelstränge **DNA 24** und **DNA 26** als auch für die dazugehörigen Doppelstränge die CylQ-Monomerbande bei ~ 500 nm, sowie die des TR bei ~ 660 nm. Auffällig ist dabei, dass die TR-Bande in **DNA 24** eine Schulter bei ~ 590 nm zeigt. Diese ist typisch für Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen. Ein ähnliches Verhalten von TR konnte bereits für TR-TR-Intrastrang-Dimere gezeigt werden.^[100] Beim Vergleich der CylQ-Absorbanzen fällt auf, dass sich diese im Duplex **DNA 26/27** erhöht. Passenderweise findet in diesem Duplex auch der ET mit der größten Effizienz statt (vgl. Tabelle 6.2).

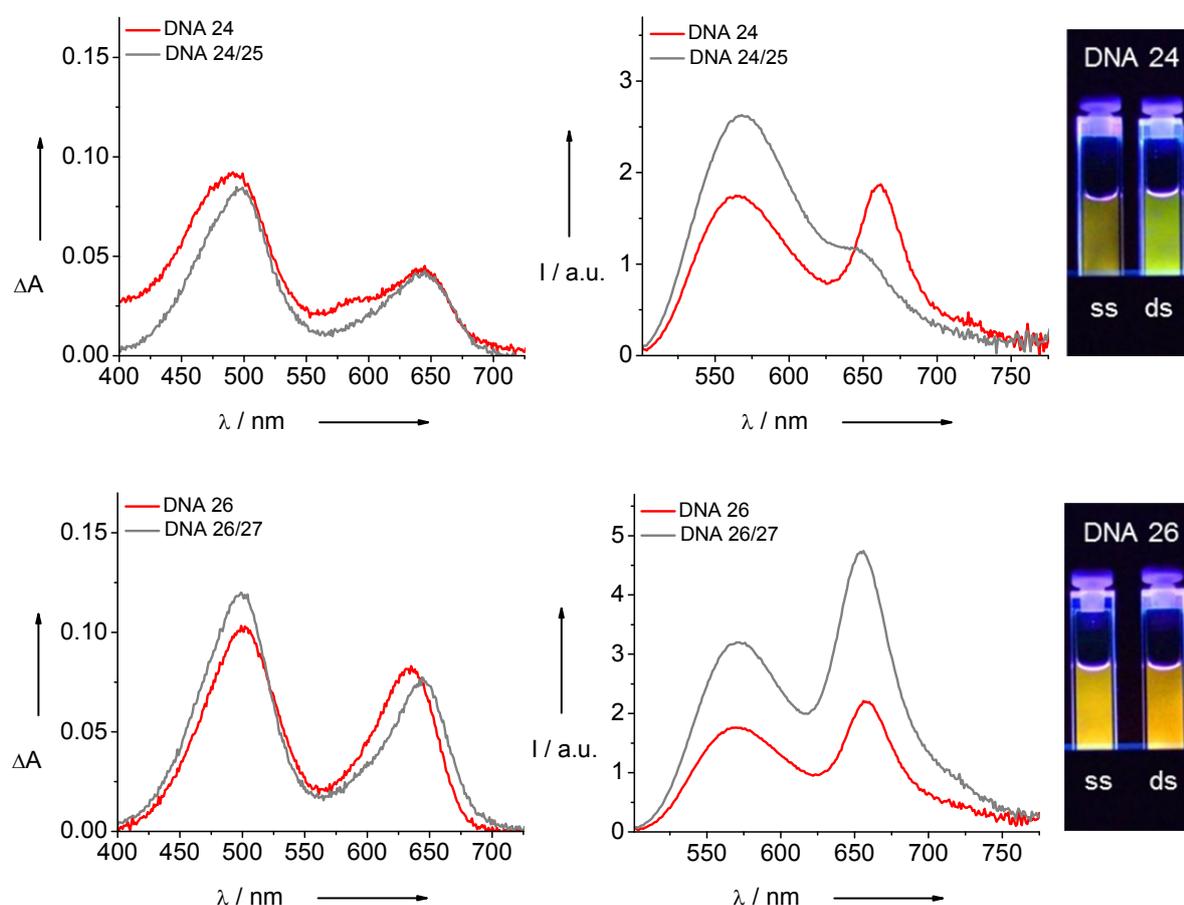


Abb. 6.6: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (mitte) von **DNA 24** und **DNA 26** als Einzel- bzw. Doppelstrang ($\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm), sowie unter der UV-Lampe beleuchtete Küvetten der jeweiligen Einzel- und Doppelstränge (rechts).

Dieser Trend konnte bereits in Kapitel 6.1 beobachtet werden. Dabei weisen die Duplexe mit den höchsten T_m -Werte auch die größte ET-Effizienz auf. Mit einem Kontrastverhältnis I_{660}/I_{565} von 1.6 für **DNA 26/27** kann die gleiche ET-Effizienz wie auch in einem Interstrang-Dimer (**DNA 22/6**) erreicht werden.

Tabelle 6.2: Schmelztemperaturen für **DNA 24/25** und **DNA 26/27**, sowie das dazugehörige Kontrastverhältnis I_{660}/I_{565} der jeweiligen DNA-Duplexe und DNA-Einzelstränge.

| DNA | T_m [°C] | I_{660}/I_{565} |
|------------------|------------|-------------------|
| DNA 24 | - | 1.2 |
| DNA 24/25 | 59 | 0.5 |
| DNA 26 | - | 1.3 |
| DNA 26/27 | 63 | 1.6 |

Betrachtet man die Fluoreszenzspektren von **DNA 24** bzw. **DNA 24/25** (Abb. 6.6, mitte), so lassen sich im Einzelstrang (**DNA 24**) deutlich die CylQ-Emission als auch die TR-Emission in einem Bereich von ~660 nm erkennen. Interessanterweise wird dieser Energietransferprozess annähernd vollständig unterbrochen, sobald **DNA 24** einen Duplex mit dem dazugehörigen Gegenstrang (**DNA 25**) ausbildet. Der Rückgang der roten Emissionsanteile kann durch einen Farbwechsel von Orange nach Grün beobachtet werden (Abb. 6.6, rechts). Eine Begründung dafür könnte sein, dass durch die Duplexbildung die beiden Chromophore eine Orientierung einnehmen, die für einen ET ungünstig ist. Durch die Architektur der DNA-Helix im Doppelstrang sind die beiden Farbstoffe außerdem stark fixiert und haben einen sehr kleinen Abstand zueinander. Aus diesem Grund tritt vermutlich anstelle eines Energietransfers statische Fluoreszenzlöschung durch Farbstoffaggregation auf.^[185] Werden die beiden Farbstoffe durch ein A-T Basenpaar räumlich voneinander getrennt (**DNA 26**), kann zwar die ET-Effizienz gesteigert werden, eine Unterscheidung zwischen Einzel- und Doppelstrang ist jedoch anhand des Fluoreszenzsignals nicht mehr möglich.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich TR auch als ET-Akzeptor für den Styrylfarbstoff CylQ eignet. Da in Fall von Interstrang-Dimeren die ET-Effizienz sehr gering ausfällt, ist CylQ jedoch als Ersatz für TO im Konzept *DNA Traffic Lights* wenig geeignet. Durch die Kombination beider Farbstoffe zum Intrastrang-Dimer konnte eine lineare DNA-Sonde entwickelt werden, welche die Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Strang durch einen Farbwechsel von Orange nach Grün anzeigt.

7 Wellenlängenverschiebende RNA-Sonden

Um fluoreszente RNA-Sonden herzustellen, die in lebenden Zellen Hybridisierungssensitivität und –spezifität gegenüber der gesuchten Ziel-mRNA zeigen, gibt es verschiedene Ansatzpunkte.^[186] Beispielsweise kann RNA mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (RNA-FISH)^[187-188] oder *Molecular Beacons*^[189] detektiert werden. Weiterhin sind fluoreszierende Basenpaare bekannt, die eine Sensitivität gegenüber Hybridisierung und Basenfehlpaarungen zeigen.^[190-192] Auch durch templatgesteuerte Reaktionen ist es gelungen, RNA in lebenden Zellen sichtbar zu machen.^[193] Das Ausleseprinzip aller erwähneter Methoden basiert auf einer einfach Änderung der Fluoreszenzintensität in Gegenwart der Ziel-RNA; dabei werden jedoch unspezifische Wechselwirkungen der Sonde mit anderen Zellbestandteilen, die z. B. zu Fluoreszenzlöschung führen können, nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund ist es wichtig alternative Methoden zu entwickeln, deren Auslesungswellenlänge nach Interaktion mit zellulärer RNA verschoben wird.^[194] Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln 4 und 5 ausführlich beschrieben, erfüllt das Konzept der *DNA Traffic Lights* diese Anforderungen: Durch einen effizienten Energietransfer von TO auf TR kann die Auslesungswellenlänge durch eine Anregung bei 490 nm von 530 auf 680 nm verschoben werden. Im folgenden Kapitel wird gezeigt, dass sich dieses Konzept auch auf RNA übertragen lässt (Kapitel 7.1). Des Weiteren werden Zelltests sowie Versuche zur gezielten Stilllegung eines Genes durchgeführt (Kapitel 7.2 und 7.4).

7.1 Konzeptübertragung: *RNA Traffic Lights*

Die Integration der Sonderbausteine TO und TR ins RNA-Rückgrat erfolgte während der automatisierten Festphasensynthese unter Verwendung einer 0.13 M Lösung der Phosphoramidit-Bausteine **7** und **11** in Acetonitril und einer verlängerten Kopplungszeit (vgl. Kapitel 4.1, sowie Kapitel 11.6). Des Weiteren wurden RNA-Monomerbausteine verwendet, deren 2`OH-Funktion TBDMS-geschützt vorlag.

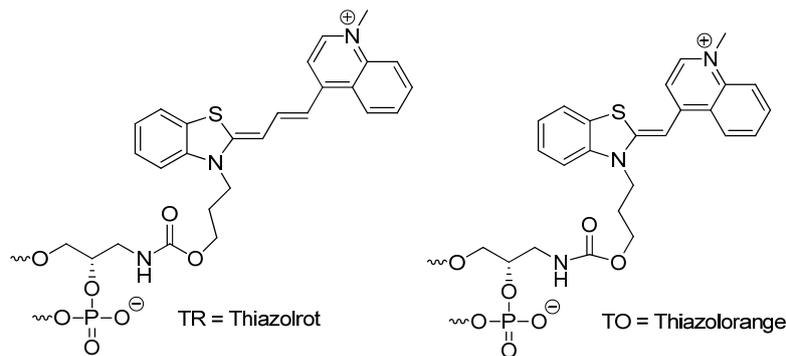


Abb. 7.1: Struktur der eingesetzten RNA-Basensurrogate. Die Ribose-Einheit wurde durch einen acyclischen (S)-3-Amino-1,2-propandiol-Linker ersetzt. Links: Thiazolrot (TR), rechts: Thiazolorange (TO); beide Farbstoffe wurden über den Benzothiazolstickstoff ins RNA-Rückgrat integriert.

7.1.1 Einfluss der Chromophor-Chromophor-Orientierung

Zunächst wird untersucht, ob ein Energietransfer von TO auf TR auch in RNA effizient stattfindet. Außerdem sollte, in Anlehnung an die in Kapitel 4 erhaltenen Ergebnisse für DNA, der Einfluss der Chromophor-Chromophor-Orientierung auf die ET-Effizienz untersucht werden. Die hierzu synthetisierten Oligonukleotidsequenzen sind in Abb. 7.2 dargestellt.

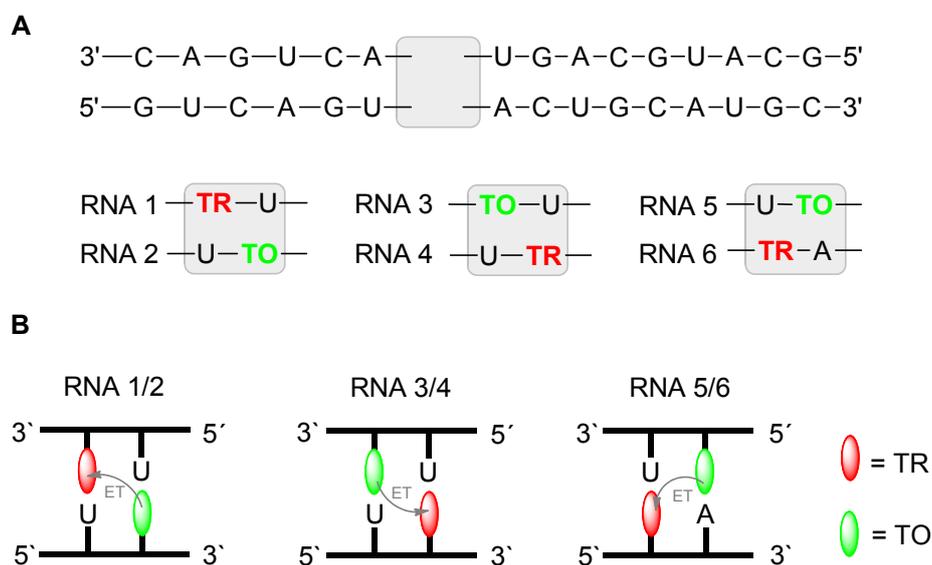


Abb. 7.2: **A:** Sequenzen der TO- und TR-modifizierten RNA-Oligonukleotide **RNA 1-RNA 6**. **B:** Schematische Darstellung der verschiedenen Chromophor-Chromophor Orientierungen in der RNA-Doppelhelix und die daraus resultierenden ET-Richtungen.

Die Absorptionsspektren (Abb. 7.3) lassen die Anwesenheit beider Chromophore durch deutlich voneinander separierte Absorptionsbanden erkennen. Die

beobachteten Wellenlängenbereiche sind sowohl für TO (425 – 500 nm), als auch für TR (575- 700 nm) mit den, in DNA erhaltenen Absorptionsbanden identisch. Die dabei erhaltenen Extinktionswerte für TR liegen in einem Bereich von $9.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für **RNA 1/2** und $14.100 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für **RNA 3/4** und sind um ein Vielfaches niedriger, jeweils verglichen mit den entsprechenden DNA-Duplexen. Betrachtet man ausschließlich **RNA 1/2**, lässt sich außerdem die für TO-Dimere typische Absorptionsbande mit einem Maximum bei $\sim 480 \text{ nm}$ erkennen.^[194] Beide Beobachtungen lassen sich durch Grundzustandswechselwirkungen zwischen TO und TR erklären. Diese Annahme wird bei Betrachtung der Emissionsspektren bestätigt. Durch eine TO-Anregung (bei $\lambda = 490 \text{ nm}$) ist zwar ein ET auf TR zu beobachten, mit Kontrastwerten I_{670}/I_{530} von 0.5:1 bis 0.8:1 erweist sich dieser jedoch als extrem ineffizient.

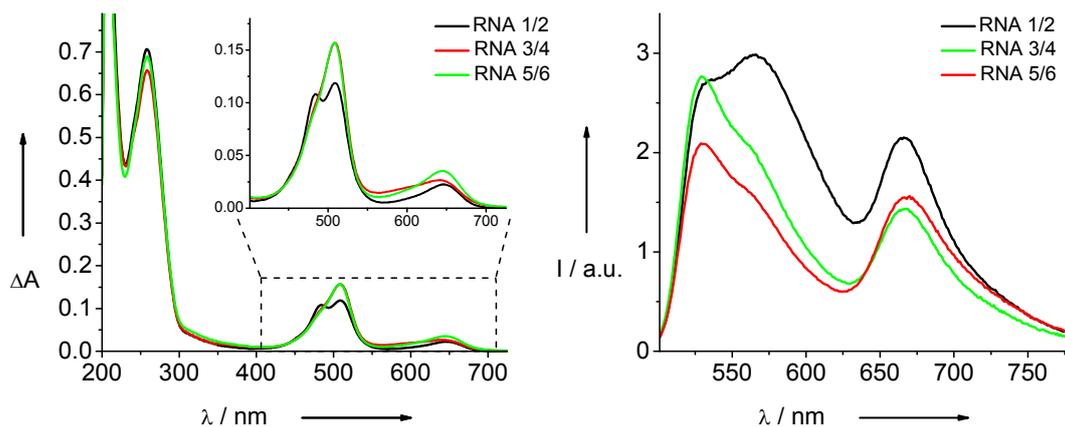


Abb. 7.3: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der TO- und TR- modifizierten Duplexe **RNA 1/2**, **RNA 3/4** und **RNA 5/6** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$).

In einem weiteren Experiment soll anhand von **RNA 1/2** gezeigt werden, dass ein ET zwischen TO und TR nur durch eine Anregung des TO-Monomers stattfindet. Wie bereits oben erwähnt, zeigt **RNA 1/2** im Bereich von 425 – 550 nm eine Absorptionsbande mit zwei Maxima bei $\sim 480 \text{ nm}$ und $\sim 510 \text{ nm}$. Durch eine Anregung bei 480 nm sollte es daher möglich sein, dass hauptsächlich das TO-Dimer emittiert. Die verbleibende TO-Emission sollte sich daraufhin typischerweise von 530 auf 580 nm verschieben. Bei Betrachtung des Emissionsspektrums in Abb. 7.4 ist dieses Verhalten deutlich zu erkennen. Gleichzeitig wird die ET-Effizienz verringert, was durch einen Intensitätsabfall der TR-Emission deutlich wird. Im Gegensatz dazu kann, durch eine Anregung bei 510 nm, die ET-Effizienz gesteigert und die

verbleibende TO-Emission zu einem Emissionsmaximum bei ~ 530 nm verschoben werden. Da die Absorptionsbanden des TO-Monomers und TO-Dimers überlappen, ist es jedoch nicht möglich, das TO-Monomer selektiv anzuregen.

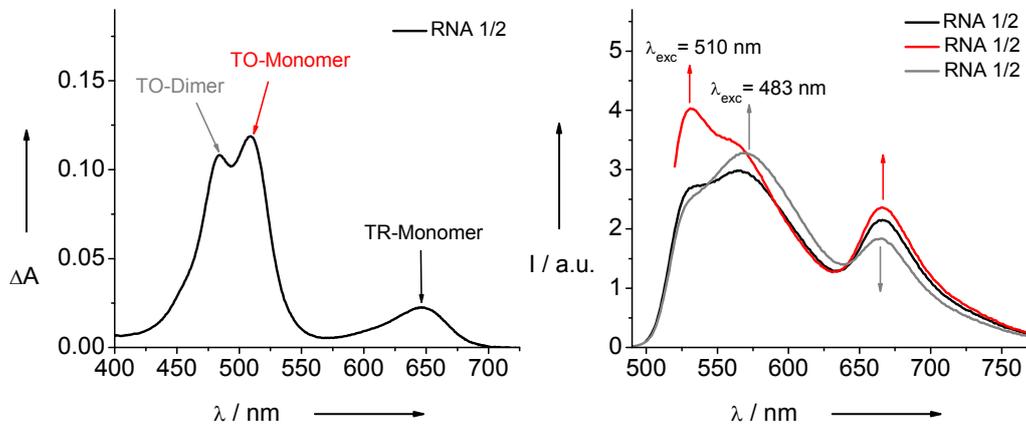


Abb. 7.4: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) des TO- und TR- modifizierten Duplex **RNA 1/2** mit einer Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm (schwarz), $\lambda_{\text{exc}} = 510$ nm (rot) und $\lambda_{\text{exc}} = 483$ nm (grau).

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit den für DNA erhaltenen Resultaten, so lässt sich feststellen, dass die ET-Effizienz um mehr als eine Größenordnung geringer ausfällt (etwa 1:1 in RNA verglichen mit 20:1 in DNA). Im Fall von doppelsträngiger RNA ist die Bildung einer A-Helix (im Vergleich zur B-Helix in DNA) bevorzugt. Dabei unterscheidet sich die A-Form hinsichtlich Zuckerkonformation (C3'-endo), Basenpaare pro helikale Windung (11-12 Bp), Abstand der Phosphatgruppen (7.0 Å), Ganghöhe (2.6 Å) sowie Helixdurchmesser (26 Å). Die Basenpaarebene ist zudem nicht mehr senkrecht zur Helixebene, sondern leicht abgeknickt. Diese Unterschiede tragen dazu bei, dass die RNA-Helix dichter gepackt ist, wodurch sehr schmale, tiefe Furchen entstehen. Eine Unterscheidung zwischen großer und kleiner Furche ist nur noch bedingt möglich. Eine gerichtete Farbstoffanlagerung ist dadurch vermutlich erschwert. Die strukturellen Unterschiede zwischen A-Form (in RNA) und B-Form (in DNA) können somit eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Resultate sein.

Besonders auffallend ist außerdem, dass durch eine einzelne TR-Modifikation eine Duplexdestabilisierung von 14 °C, verglichen mit einem unmodifizierten Referenzduplex, zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu destabilisiert eine TO-Modifikation den RNA-Duplex nur um 3 °C. Temperaturabhängige Absorptionsänderungen der jeweiligen Duplexe sind beispielhaft für **RNA 5/6** in Abb.

7.5 dargestellt. Wird TO und TR als Interstrangdimer eingesetzt, so ist eine Duplexdestabilisierung von 12 °C zu beobachten. Vermutlich wird die helikale Struktur der RNA im Bereich um die Farbstoffe gestört, was die beobachtete Duplexdestabilisierung erklären würde. Eine Vororientierung der Farbstoffe durch die Struktur der RNA ist nur noch schwach gegeben, wodurch der Energietransfer zwischen TO und TR nur sehr ineffizient verläuft.

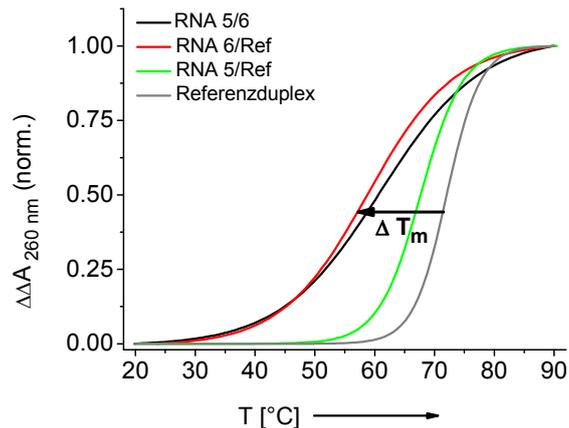


Abb. 7.5: Temperaturabhängige Absorptionsänderung für **RNA 5/6** (schwarz), für den unmodifizierten **Referenzduplex** (grau) sowie für **RNA 5** und **RNA 6** im Duplex mit dem jeweiligen unmodifizierten Gegensträngen (grün bzw. rot).

Eine Übersicht aller gemessenen Schmelztemperaturen sind in Tabelle 7.1 dargestellt. Die angegebenen ΔT_m –Werte beziehen sich dabei auf den jeweiligen, unmodifizierten Referenzduplex.

Tabelle 7.1: Schmelztemperaturen, ϵ -Werte für TR und TO im Duplex, sowie Angabe des Kontrastverhältnisses I_{670}/I_{530} für **RNA 1/2 – RNA 5/6**.

| RNA-Duplex | T_m [°C] | ΔT_m [°C] ^(a) | ϵ_{TR} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] | ϵ_{TO} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] | I_{670}/I_{530} |
|------------------|------------|----------------------------------|---|---|-------------------|
| RNA 1/2 | 59 | 13 | 9.100 | 43.300 ^(b) 47.500 ^(c) | 0.8:1 |
| RNA 3/4 | 63 | 9 | 10.500 | 62.700 | 0.5:1 |
| RNA 5/6 | 59 | 12 | 14.100 | 62.800 | 0.7:1 |
| RNA 5/Ref | 69 | 3 | _(d) | 61.800 | - |
| RNA6/Ref | 58 | 14 | 24.900 | _(e) | - |

(a) Alle ΔT_m -Werte beziehen sich auf die jeweiligen, unmodifizierten RNA-Duplexe. (b) Wert bei $\lambda = 483$ nm. (c) Wert bei $\lambda = 510$ nm. (d) TR wurde im Referenzduplex durch ein Adenin ersetzt. (e) TO wurde im Referenzduplex durch ein Uridin ersetzt.

7.1.2 Einfluss der RNA-Sequenz

Das vorgestellte Konzept (*RNA Traffic Lights*) sollte in der siRNA-Technologie angewendet werden. Zu diesem Zweck wurden drei weitere, TR und TO modifizierte RNA-Duplexe hergestellt und spektroskopisch charakterisiert (Abb. 7.6). Im nun folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse vorgestellt und mit den Resultaten aus Kapitel 7.1.1 verglichen. Die theoretischen Grundlagen zur siRNA-Technologie werden im nächsten Teil dieser Arbeit besprochen. Dort wird außerdem gezeigt, worauf beim Design der hergestellten, farbstoffmodifizierten siRNAs geachtet werden muss. In dem nun folgenden Abschnitt wird aus diesem Grund darauf nicht näher eingegangen.

Es wurde die in Abb. 7.6 dargestellte RNA synthetisiert. Die jeweiligen „einzelsträngigen Enden“ werden hervorgehoben. G-C Basenpaare, die den RNA-Duplex im Bereich der Farbstoffmodifikation stabilisieren, sind grau hinterlegt.

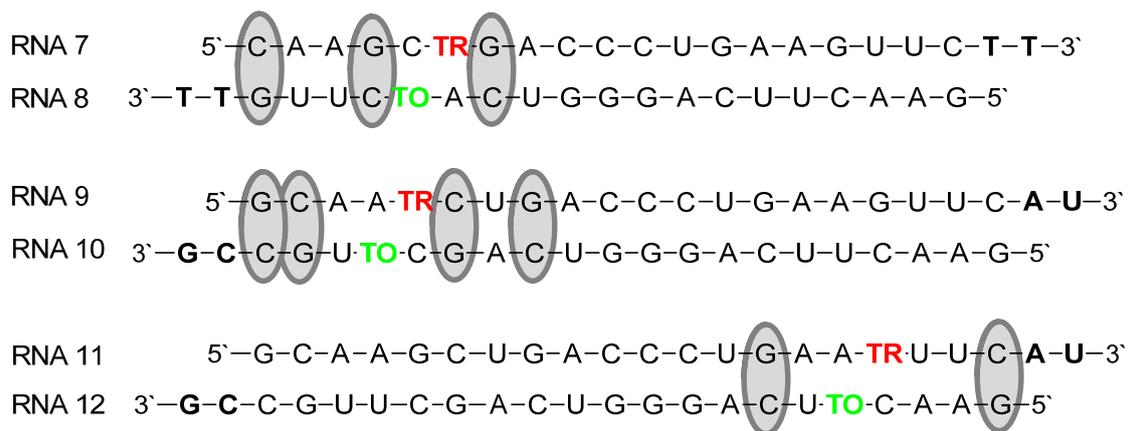


Abb. 7.6: Sequenzen der hergestellten farbstoffmodifizierten Oligonukleotide **RNA 7-RNA 12**. Duplexstabilisierende G-C-Basenpaare im Modifikationsbereich sind grau hinterlegt. Die jeweiligen Überhänge am 3'-Ende werden hervorgehoben.

Die Absorptionsspektren zeigen die für TO und TR typischen Banden in einem Bereich von 425 – 550 nm für TO und 550 – 700 nm für TR. Verglichen mit **RNA 1-6** werden für TR mit bis zu $38.400 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ deutlich höhere Extinktionswerte erhalten. Die ϵ -Werte für TO variieren kaum. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es gelungen ist, die Grundzustandswechselwirkungen zwischen TO und TR teilweise zu unterbinden. Bei genauer Betrachtung ist zudem zu erkennen, dass das Absorptionsmaximum für **RNA 7/8** im Bereich von TO leicht blauverschoben und gleichzeitig im Bereich von TR leicht rotverschoben ist (jeweils um $\sim 5 \text{ nm}$).

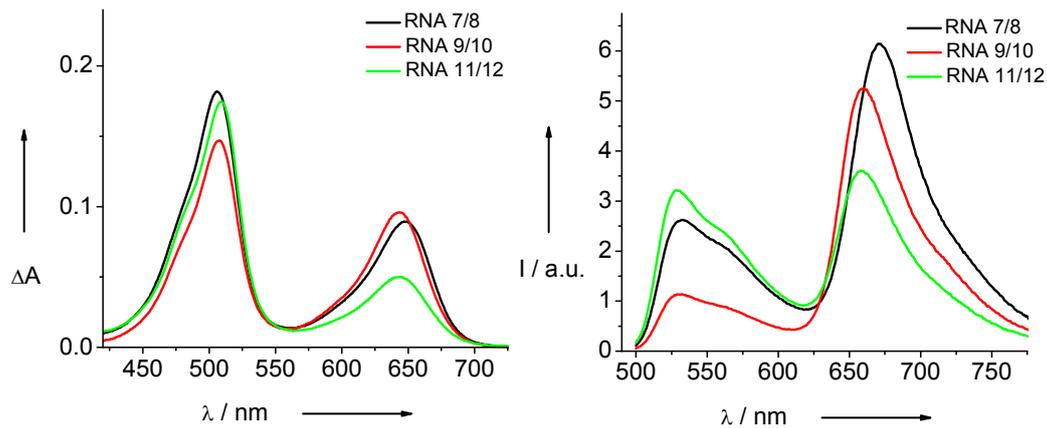


Abb. 7.7: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der TO- und TR- modifizierten Duplexe **RNA 7/8**, **RNA 9/10** und **RNA 11/12** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$).

Durch den Einsatz von zwei G-C Basenpaaren in unmittelbarer Nähe zur Farbstoffmodifikation in **RNA 11/12** ist es gelungen, das Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} von 0.8:1 (in **RNA 1/2**) auf 1.2:1 zu verbessern. Variiert man die Chromophor-Umgebung erneut, kann dieser Wert auf 4.3:1 in **RNA 7/8** bzw. 4.6:1 in **RNA 9/10** verbessert werden. Hier befinden sich drei bzw. vier G-C Basenpaare in unmittelbarer Nähe zur Modifikationsstelle, die sich stabilisierend auf den RNA-Duplex auswirken. Bei Betrachtung der Schmelztemperaturen ist eine Duplexstabilisierung von 4 °C für **RNA 9/10**, verglichen mit **RNA 7/8**, festzustellen. Vermutlich bleibt die Struktur der RNA-Helix im Bereich der Modifikationen weitgehend ungestört. Dadurch wird zum einen die ungewollte Farbstoffaggregation verhindert, und zum anderen werden die beiden Chromophore für einen effizienten ET vororientiert und in räumliche Nähe zueinander gebracht. Auffallend ist jedoch, dass das Emissionsmaximum für **RNA 7/8** um ~10 nm rotverschoben, verglichen mit **RNA 9-12**, ist.

Tabelle 7.2: Schmelztemperaturen, ϵ -Werte für TR und TO im Duplex, sowie Angabe des Kontrastverhältnisses I_{670}/I_{530} für **RNA 7/8** – **RNA 11/12**.

| RNA-Duplex | T_m [°C] | $\epsilon_{\text{TR}}^{\text{TR}}$ [L* mol^{-1} * cm^{-1}] | $\epsilon_{\text{TO}}^{\text{TO}}$ [L* mol^{-1} * cm^{-1}] | I_{670}/I_{530} |
|------------------|------------|--|--|-------------------|
| RNA 7/8 | 76 | 35.700 | 72.700 | 4.2:1 |
| RNA 9/10 | 80 | 38.400 | 58.800 | 4.6:1 |
| RNA 11/12 | n.b. | 20.000 | 69.900 | 1.2:1 |

Werden die Küvetten mit den RNA-Duplexen **RNA 7-12** unter der UV- Lampe beleuchtet, so lassen sich die oben erwähnten Kontrastunterschiede I_{670}/I_{530} mit

bloßem Auge erkennen. Auch hier ist die ET-bedingte, rötliche Emission von **RNA9/10** deutlich zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigt **RNA 11/12** auf Grund eines ineffektiven Energietransfers eine grünliche Emission.

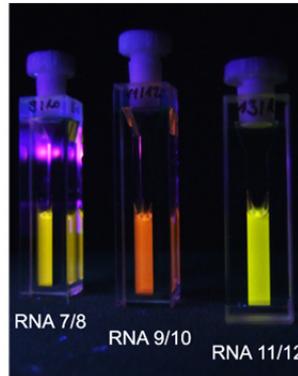


Abb. 7.8: Unter der UV-Lampe beleuchtete Küvetten der jeweiligen RNA-Duplexe: **RNA 7/8** (gelb, links), **RNA 9/10** (rot, mitte) und **RNA 11/12** (grün, rechts).

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann anhand der bisher erbrachten Ergebnisse festgehalten werden, dass sich das in dieser Arbeit vorgestellte Konzept auf RNA übertragen lässt. Um allerdings einen effizienten ET von TO auf TR zu erhalten, darf die Struktur der RNA-Doppelhelix im Bereich der Farbstoffmodifikation nicht gestört werden. Dies kann durch den Einsatz zusätzlicher G-C Basenpaare erreicht werden.

7.2 Hintergrund zur siRNA-Technologie

Bei Experimenten an *C. elegans* wurde erstmals 1998 entdeckt, dass die Expression bestimmter Gene durch kleine doppelsträngige RNA Moleküle gesteuert werden kann (*Gene-Silencing*). Dieses Phänomen wird seither als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet.^[195] Einige Jahre später konnte RNAi als Kontrollmechanismus der Genexpression auch in Säugetierzellen entdeckt werden.^[196] Dabei wird die sog. siRNA (*small interfering RNA*: 21 – 23 nt lange, dsRNA Moleküle mit einem 2 nt langem Überhang am 3'-Ende) in einen RNA-Protein-Komplex gebunden, der als RISC (*RNA-induced silencing complex*) bezeichnet wird. Die beiden RNA-Stränge werden unterschieden in Sense- und Antisense-Strang, wobei der Antisense-Strang zur Ziel-mRNA komplementär ist. Im Anschluss löst sich der Sense-Strang aus dem RISC, wodurch der sog. aktivierte RISC (siRISC) vorliegt. Dieser ist nun in der Lage, mit Hilfe der Antisense-RNA die Ziel-mRNA zu erkennen, zu binden und anschließend zu spalten (Abb. 7.9). Durch die Spaltung der mRNA in zwei Teile kann diese in der Zelle durch RNasen abgebaut werden, wodurch die Genexpression reguliert wird. Der RISC wird anschließend wiedergewonnen und kann weitere mRNA Moleküle spalten.^[197-202]

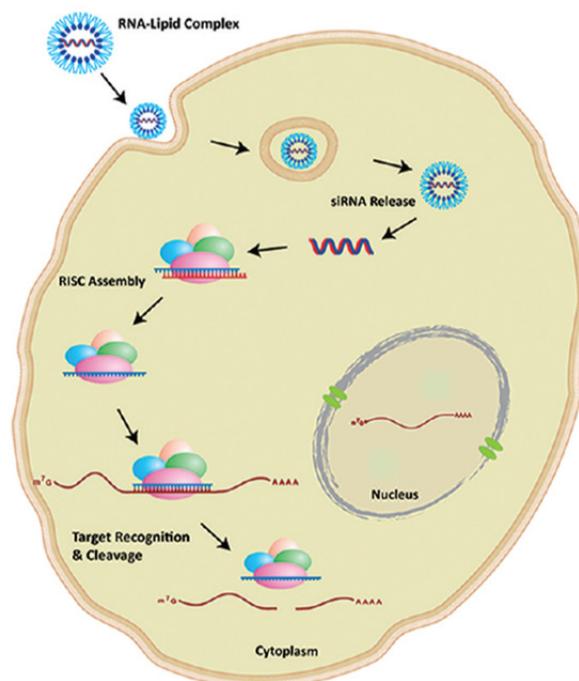


Abb. 7.9: Einzelne Schritte des siRNA-Prozesses in Säugetierzellen.^[199] Doppelsträngige siRNA (19-23nt lang, 2nt Überhang am 3'-Ende) bildet mit Lipidaminen einen RNA-Lipid-Komplex und kann endosomal aufgenommen werden; aktivierter RISC (*RNA-induced silencing complex*) bildet sich zusammen mit dem Antisense-Strang (siRISC); siRISC erkennt die Ziel-mRNA und spaltet sie; RISC wird wiedergewonnen und kann weitere Ziel-mRNA-Stränge spalten.^[197]

In den Zellen entsteht siRNA aus längeren, dsRNA-Vorläufermolekülen, die mit Hilfe eines weiteren Protein-Komplexes (den sog. Dicer) in die gewünschte Länge gespalten werden.^[203]

Da das komplette Genom vieler Spezies bereits vollständig sequenziert werden konnte, steckt großes therapeutisches Potential in der Antisense- und RNAi Technologie.^[204] Grundlage bildet die spezifische Ausschaltung bzw. Regulierung von Genen, deren Genprodukte bisher unheilbare Krankheiten verursachen, wie beispielsweise Krebs, neurodegenerative Krankheiten oder virale Infektionen.^[205-207] Um einen effektiven Einsatz RNAi basierender Therapeutika zu ermöglichen, ist es wichtig die siRNAs an spezielle Zellen adressieren zu können, die diese aufnehmen sollen. Dies konnte beispielsweise durch die Konjugation der siRNA mit einem zelloberflächenspezifischen Antikörper^[208-209] oder Aptamer^[210] in einzelnen Fällen bereits erreicht werden. Auch die Aufnahme der negativ geladenen siRNA in die Zelle selbst stellt eine Hürde dar, weil die Lipiddoppelschicht der Zellmembran überwunden werden muss. Um diese natürliche Schutzbarriere der Zelle zu überwinden kann die siRNA beispielsweise direkt in die Zelle via Mikroinjektion eingespritzt werden,^[211-213] mit einer lipophilen Gruppe wie z.B. Cholesterin chemisch konjugiert werden um die Zellgängigkeit zu erhöhen,^[214-216] oder als Lipoplex über endosomale Vesikel in die Zelle aufgenommen werden.^[217-218] Weitere Möglichkeiten, wie eine effektive siRNA Aufnahme durch die Zellen erreicht werden kann, werden ausführlich in einem Übersichtsartikel von *M. D. Krebs* und *E. Alsberg* beschrieben.^[219]

Des Weiteren ist es wichtig, die Stabilität der siRNA im Cytosol gegen einen Abbau durch RNasen zu erhöhen. Hierzu werden häufig an der Ribose oder am RNA-Rückgrat modifizierte Oligonukleotid-Konjugate eingesetzt um die Lebenszeit der siRNA zu erhöhen.^[220-222] Außerdem wird versucht, durch den Einbau von Basensurrogaten ins Rückgrat der siRNA die Bindungsaffinität zur Ziel-mRNA, sowie die RNAi-Aktivität zu verbessern.^[223-224]

In der vorliegenden Arbeit wurden 21 nt lange siRNAs hergestellt, die jeweils eine TO-Modifikation im Antisense-Strang und eine TR-Modifikation im Sense-Strang tragen (Abb. 7.10). Um die Stabilität gegenüber RNasen im Cytosol zu erhöhen wurden die siRNAs mit einem Überhang am 3'-Ende bestehend aus zwei Thyminen synthetisiert.^[196] Die Region zwischen den Nukleotiden 2 – 8 des Antisense-Strangs

(vom 5'-Terminus aus) wird als sog. *Seed Region* (Erkennungsbereich für mRNA) bezeichnet; sie ist verantwortlich für eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem RISC und der mRNA. Da außerdem bekannt ist, dass die Spaltung der mRNA zwischen den Nukleotiden 10 und 11 stattfindet,^[225-226] musste bei der Wahl der Lage der beiden Chromophore darauf geachtet werden, dass diese Region des Antisense-Strangs unmodifiziert bleibt.

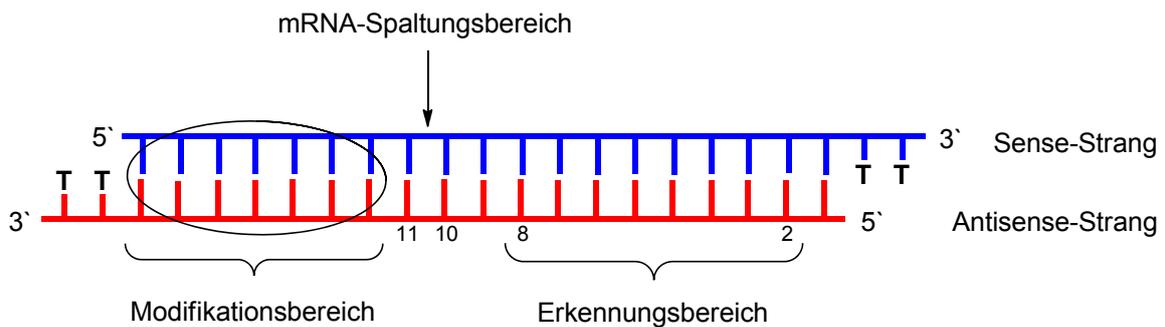


Abb. 7.10: Schematische Darstellung einer 21 Nukleotid langen siRNA mit einem TT-Überhang am 3' Ende; Antisense-Strang (rot) mit i) Erkennungsbereich für die mRNA sowie ii) Modifikationsbereich für TO; Sense-Strang (blau) mit Kennzeichnung des Spaltungsbereiches sowie des Modifikationsbereiches für TR.

7.3 Duplexstabilität modifizierter siRNA in HeLa-Zellen

Mithilfe etablierter Standardmethoden ist es möglich, fluorophormarkierte siRNA-Sonden in lebenden Zellen zu beobachten. Eine Unterscheidung zwischen intakten siRNA-Duplex, Einzelsträngen oder dem bloßen Chromophor nach vollständigem Abbau der siRNA ist jedoch schwer möglich. Durch die Verwendung FRET-basierenden Techniken können diese Probleme umgangen werden. Da es sich bei einem Energietransfer um ein abstandsabhängiges Phänomen zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff handelt, kann beispielsweise die Dissoziation des siRNA-Duplexes durch eine sinkende ET-Effizienz beobachtet werden.^[227-228] Die Forschungsgruppe um *M. Helm* nutzte dieses Prinzip um die Umverteilung modifizierter siRNA in der Zelle nach erfolgter Transfektion zu beobachten.^[229] Dabei wurden FAM/TAMRA endmodifizierte siRNA-Duplexe verwendet (Strukturformeln siehe Kapitel 5.1.3). Intakte siRNA-Duplexe konnten anhand des Verhältnisses von roter zu grüner

Emission (I_{590}/I_{520}) in einzelnen Proben identifiziert werden. Eine verlässliche Aussage war allerdings nur in einem Bereich >90 % für intakte siRNA-Duplexe möglich.

Im nun folgenden Teil dieser Arbeit werden einzelne Aspekte des beschriebenen Konzepts aufgegriffen. Es soll gezeigt werden, dass durch den Einsatz von TO und TR als fluoreszentes ET-Paar in RNA, die Dissoziation des modifizierten siRNA-Duplexes beobachtet und der Sensitivitätsbereich erweitert werden kann. Für die folgenden Experimente wurde **RNA 9/10** hergestellt (Abb. 7.11). Dabei befindet sich die TO-modifikation im Antisense-, die TR-modifikation im Sense-Strang.

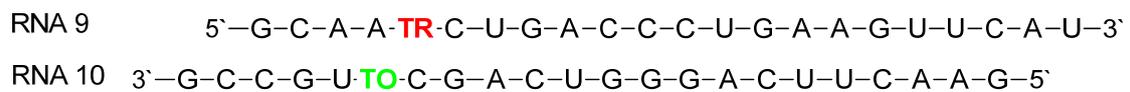


Abb. 7.11: Sequenz der verwendeten, TO und TR modifizierten siRNA **RNA9/10**.

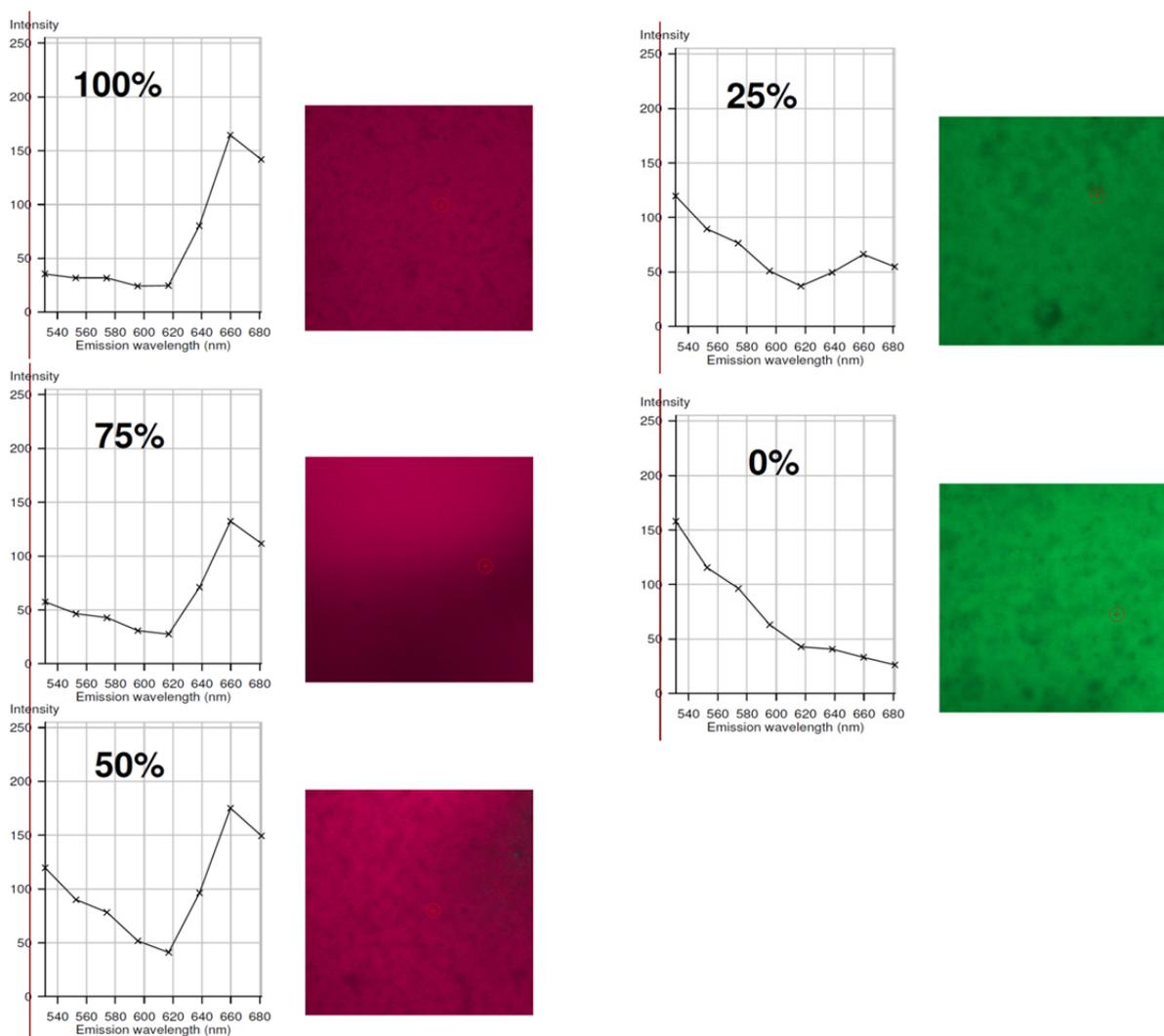


Abb. 7.12: Erstellung der Kalibriergerade im Konfokalmikroskop mit unterschiedlichen Anteilen intakten **RNA 9/10-Duplex** (Angabe in %). Die Messungen wurden in Zelllysate durchgeführt.

Wie bereits einleitend erwähnt, kann mithilfe des Kontrastverhältnisses I_{660}/I_{531} eine Aussage über die Intaktheit des verwendeten siRNA-Duplexes gemacht werden. Dieser Wert sinkt mit zunehmendem Anteil an dissoziiertem Duplex **RNA 9/10**, wie die Kalibriergerade (Abb. 7.13) zeigt. Um die Kalibriergerade zu erhalten, wurden **RNA 9** und **RNA 10** mit den jeweiligen unmodifizierten Gegensträngen hybridisiert (dies entspricht dissoziierter **RNA 9/10**) und in genau definierten Verhältnissen mit **RNA 9/10** vermisch. Die Messungen wurden in Zelllysate aus HeLa-Zellen durchgeführt. Die erhaltene Kurve in Abb. 7.13 wurde für eine 100 % intakte **RNA 9/10** auf 1 normiert. Ein linearer Zusammenhang ist für den Bereich von 100 – 50% intakter **RNA 9/10** gegeben. Anhand dieser Resultate kann die Dissoziation von **RNA 9/10** in HeLa-Zellen beobachtet werden, bis etwa die Hälfte der induzierten siRNA (**RNA 9/10**) gebunden im RISC vorliegt. Dieser Sensitivitätsbereich ist, verglichen mit etablierten Systemen,^[229] um das Fünffache größer.

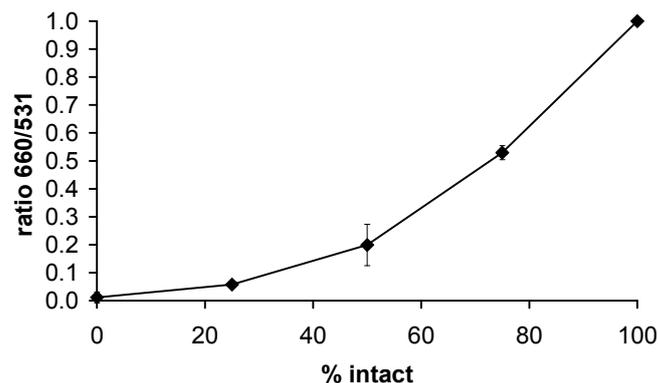


Abb. 7.13: Kalibriergerade für **RNA 9/10** (Angabe des intakten siRNA-Duplex in %) um Rückschlüsse auf den Dissoziationsgrad von RNA 9/10 in der Zelle. Der Wert von I_{660}/I_{531} für einen 100 % intakten Duplex wurde auf 1 normiert. Sensitivitätsbereich: 100 – 50 %.

Um die Dissoziation von **RNA 9/10** in HeLa-Zellen beobachten zu können, wurden die verwendeten Zellen mit Nanopartikeln aus biologisch abbaubaren Polyethylenimin^[230] und **RNA 9/10** inkubiert. Nach erfolgter Transfektion konnten die Aufnahmen am Konfokalmikroskop nach 30 min bzw. 6 h erhalten werden (Abb. 7.14). Die rot fluoreszierenden Lipoplexe sind nach einer Wartezeit von 30 min noch deutlich zu erkennen, wohin gegen nach einer Zeitspanne von 6 h die grüne Emission des TO deutlich überwiegt. Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits nach 6 h der Großteil der transfizierten siRNA als Einzelstrang gebunden im RISC vorliegt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Experimente mit einfach modifizierter **RNA 10** im Duplex mit einem unmodifizierten Gegenstrang (EGFP-SS) durchgeführt.

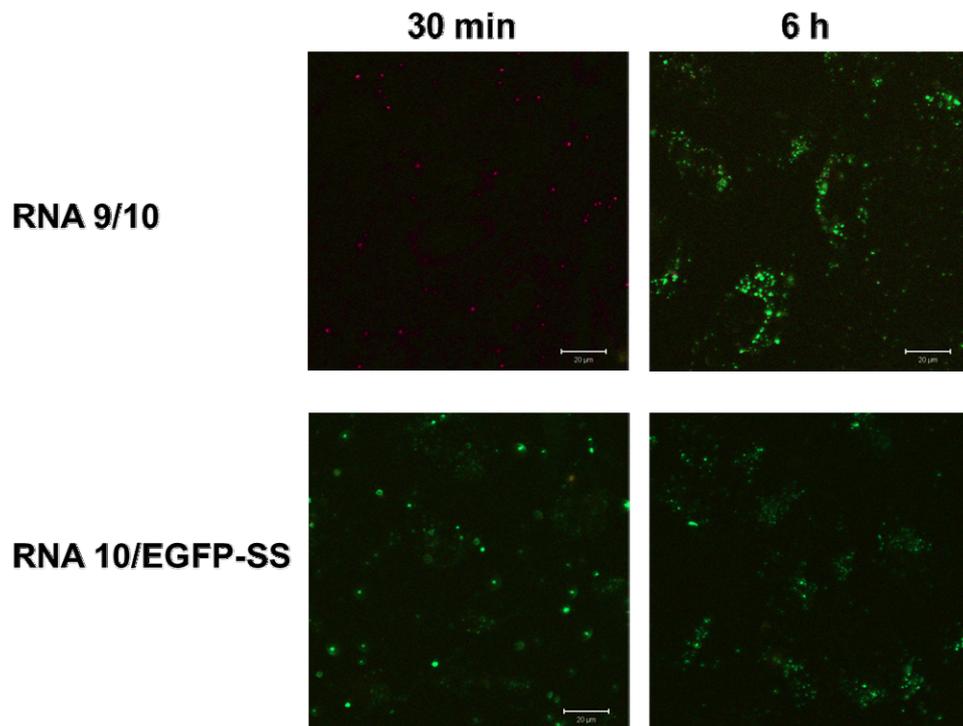


Abb. 7.14: Konfokalmikroskopbilder. **Oben:** RNA 9/10 nach 30 min bzw. 6 h. **Unten:** Kontrollexperiment mit RNA 10 und einem unmodifizierten Gegenstrang (EGFP-Sense-Strang).

Betrachtet man die zeitabhängige Veränderung des Kontrastverhältnisses I_{660}/I_{531} (Abb. 7.15) kann man erkennen, dass bereits nach ~ 50 min die transfizierte siRNA nicht mehr als Duplex vorliegt. Liegt der Antisense-Strang gebunden im RISC vor, so würde dies bedeuten, dass ein Antisense-Reagenz bereits nach 50 min seine maximale Wirkung entfalten kann.

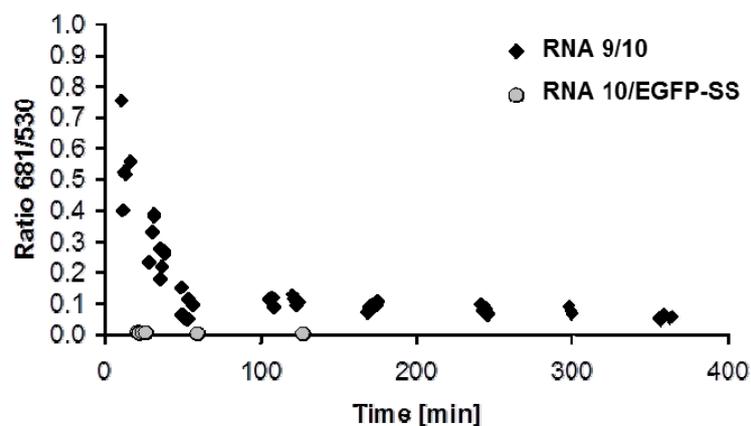


Abb. 7.15: Abbau von RNA 9/10 in HeLa Zellen nach der Aufnahme als Polyplex; normalisiert auf „100 % intact“ der Kalibrierungsmessung.

7.4 Gene-silencing: Regulierung der GFP Expression in HeLa-Zellen

Um die Auswirkungen der oben beschriebenen Modifikationen auf die Silencing-Aktivität von siRNAs zu überprüfen, wurden die in Abb. 7.6 gezeigten siRNAs gegen das grünfluoreszierende Protein (GFP) synthetisiert. Zur Durchführung der *Gene-silencing* Experimente wurden die siRNAs **RNA 7/8** und **RNA 9/10** in einer Konzentration von 40 nM in humane Cervix Karzinomzellen (HeLa-Zellen) transfiziert. 24 bzw. 48 h nach erfolgter Transfektion wurde die Aufnahme in die Zelle, die Spaltung in die Einzelstränge und die Regulierung der GFP-Expression mithilfe von Laser Scanning Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie (LSM) visualisiert (Abb. 7.16 und Abb. 7.17).

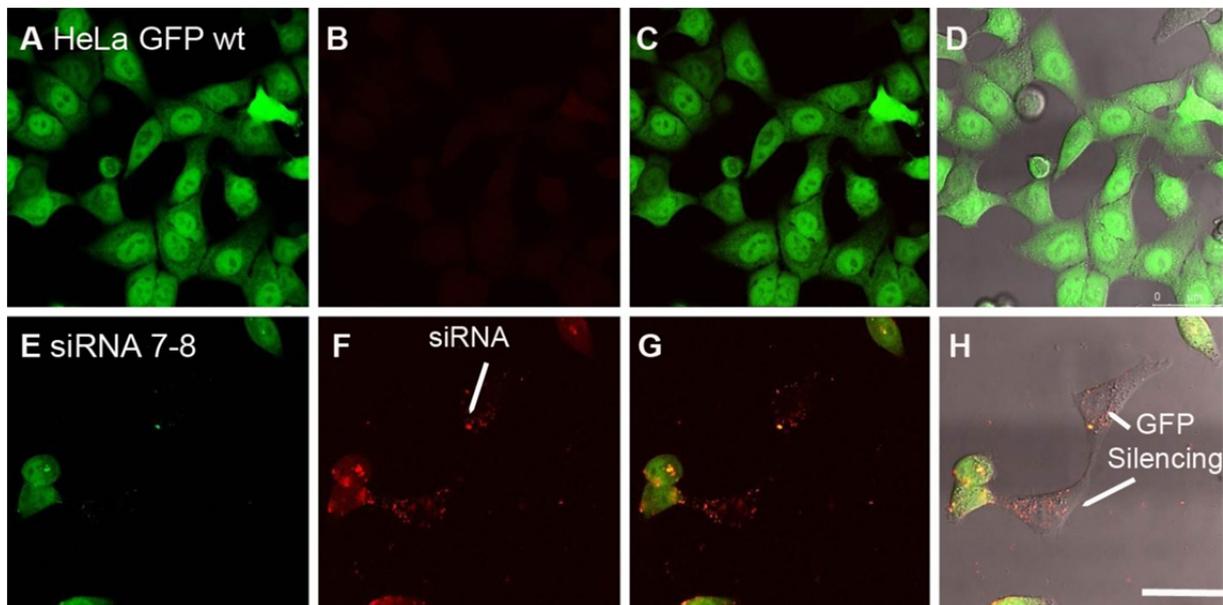


Abb. 7.16: *Silencing*-Effekt der modifizierten **siRNA 7/8** in HeLa-GFP-Zellen. Die HeLa Zellen wurden mit 40 nM **siRNA 7/8** transfiziert und 48 h inkubiert. Die einzelnen Abbildungen zeigen konfokale Laser-Scan-Fluoreszenzmikroskopien (LSM) unter Verwendung eines HCX PL APO CS 63.0x1.2 Water UV Objektivs: **(A-D)** HeLa-GFP Wildtyp-Zellen. **(E-H)** HeLa-GFP-Zellen transfiziert mit **siRNA 7/8**. **A, E:** Visualisierung des GFPs (grüne Fluoreszenz, Anregung 488 nm, Emission 535 – 567 nm); **B, F:** Visualisierung der siRNA z.T. noch in endosomalen Vesikeln (rote Fluoreszenz, Anregung 488 nm, Emission 625 – 772 nm); **C, G:** Überlagerung der Bilder **A** und **B** sowie **E** und **F**; **D, H:** Überlagerung der Bilder **A** und **B** sowie **E** und **F** mit der Hellfeldaufnahme. Zellen, welche die siRNA aufgenommen haben und eine Regulation der GFP-Expression zeigen, sind mit Pfeilen markiert. Scale bar = 10 μm .

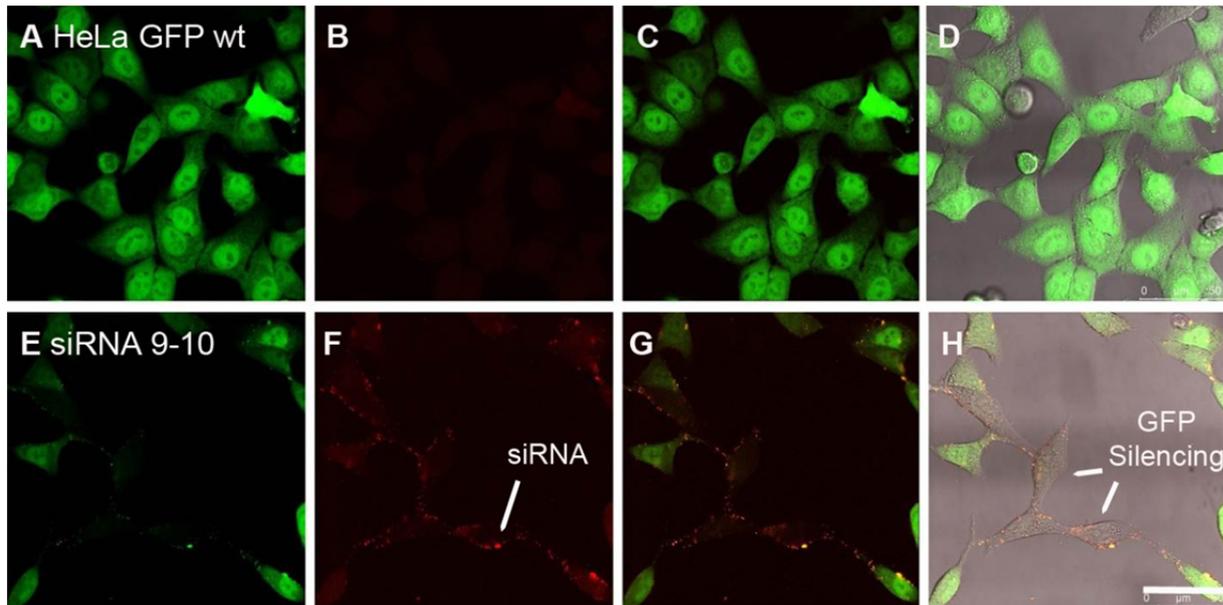


Abb. 7.17: *Silencing*-Effekt der modifizierten **siRNA 9/10** in HeLa-GFP-Zellen. Die HeLa Zellen wurden mit 40 nM **siRNA 9/10** transfiziert und 48 h inkubiert. Die einzelnen Abbildungen zeigen konfokale Laser-Scan-Fluoreszenzmikroskopien (LSM) unter Verwendung eines HCX PL APO CS 63.0x1.2 Water UV Objektivs: **(A-D)** HeLa-GFP Wildtyp-Zellen. **(E-H)** HeLa-GFP-Zellen transfiziert mit **siRNA 9/10**. **A, E:** Visualisierung des GFPs (grüne Fluoreszenz, Anregung 488 nm, Emission 535 – 567 nm); **B, F:** Visualisierung der siRNA z.T. noch in endosomalen Vesikeln (rote Fluoreszenz, Anregung 488 nm, Emission 625 – 772 nm); **C, G:** Überlagerung der Bilder **A** und **B** sowie **E** und **F**; **D, H:** Überlagerung der Bilder **A** und **B** sowie **E** und **F** mit der Hellfeldaufnahme. Zellen, welche die siRNA aufgenommen haben und eine Regulation der GFP-Expression zeigen, sind mit Pfeilen markiert. Scale bar = 10 μm .

Die Abbildungen zeigen deutlich die Aufnahme beider siRNAs (**RNA 7/8** und **RNA 9/10**) über Endozytose in endosomalen Vesikeln. Die Freisetzung der siRNA in der Zelle lässt sich bei den durchgeführten Experimenten schlecht visualisieren, da die Konzentration der aufgenommenen siRNAs zu gering ist. Somit ist die Chromophordichte im Zytosol nicht ausreichend, um eine deutliche Rotfärbung des gesamten Zytosols beobachten zu können. Der Nachweis über eine tatsächliche Freisetzung der siRNA ins Zytosol konnte anhand der *Gene-silencing*-Effekte erbracht werden. In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass erfolgreich transfizierte Zellen keine bzw. nur noch eine schwach grüne Fluoreszenz zeigen. Auf Grund der Silencing-Aktivität der siRNAs konnte die Expression des GFPs herunterreguliert werden. (Abb. 7.16 **H** und Abb. 7.17 **H**). Vereinzelt konnte zudem eine erhöhte, grüne Fluoreszenz in den Endosomen der Zellen festgestellt werden. Dies ist auf eine Denaturierung der doppelsträngigen siRNAs zurückzuführen, wodurch der ET zwischen TO und TR aufgehoben wird, und nur noch die grüne TO-Fluoreszenz zu beobachten ist.

8 Korrelative Elektronen- und Lichtmikroskopie

Fluoreszente DNA/RNA-Sonden, die eine sequenzspezifische Hybridisierung anzeigen, sind in dem weit gefächerten Feld der Zellbiologie unabdingbar. Häufig jedoch stellt man sich die Frage, wie genau die Prozesse innerhalb einer Zelle ablaufen, welche Zellorganellen beteiligt sind oder wie man Einfluss auf bestimmte Zellvorgänge nehmen kann. Fragen auf diese Antworten zu finden sind essentiell, um Bereich der Gentherapie oder der Antisense-Technologie Fortschritte zu erzielen.^[231-233] Wie beispielsweise in Kapitel 7 beschrieben, ist es durchaus möglich im klassischen Lichtmikroskop (LM) den Weg der siRNA in die Zelle zu beobachten; anhand des beobachteten Farbwechsels ließen sich sogar Aussagen über die Bildung des RISC-Komplexes machen. Eine genaue Angabe über die tatsächliche Größe und Form der endosomal aufgenommenen siRNA-Komplexe kann jedoch nicht gemacht werden. Auch ist es nicht möglich, die Bildung des RISC-Komplexes aus RNA und Proteinen zu beobachten. Für Aufnahmen mit der dafür erforderlichen Auflösung eignet sich die besonders die Elektronenmikroskopie (EM), bei welcher allerdings keine fluoreszenten Signale beobachtet werden können. Man braucht daher eine Kombination aus EM und LM, mit der es möglich ist die erhaltenen Strukturinformationen mit den fluoreszenten Signalen zusammen zu führen. Dies wird in der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie durch die fluorophor-induzierte Photooxidation von Diaminobenzidin (DAB) erreicht (Abb. 8.1).^[234-235]

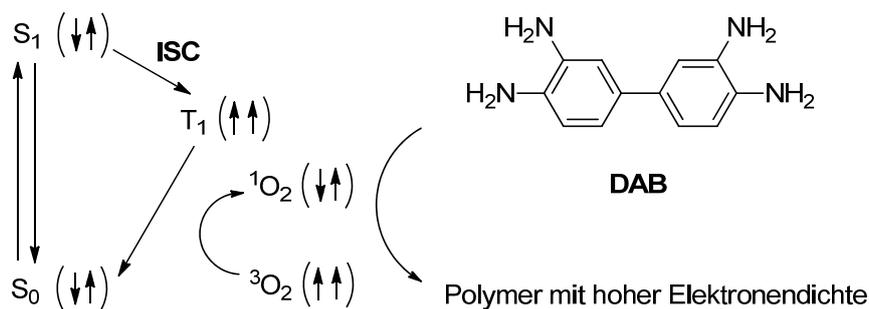


Abb. 8.1: Schematisches Diagramm zur oxidativen DAB-Photopolymerisation in der korrelierten Licht- und Elektronenmikroskopie; Singulett-Zustand (S), Triplett-Zustand (T); Intersystem-Crossing (ISC).

Etabliert ist diese Methode bereits seit einigen Jahren, um beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen.^[236-239] Dabei wird eines der beiden Proteine mit

einem Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise DAPI,^[235] Eosin,^[240] Lucifergelb,^[241] Fluorogold^[242] oder *Quantum Dots*^[237] markiert. Durch die Anregung des Farbstoffes in Gegenwart von Sauerstoff entsteht Triplett-Sauerstoff, der wiederum in der Lage ist DAB zu oxidieren. Das dabei entstehende Produkt ist ein schwer lösliches Polymer mit hoher Elektronendichte, das sich durch Osmiumtetroxid anfärben lässt und so im Elektronenmikroskop sichtbare Strukturen bildet (siehe Abb. 8.2). Da die Photooxidation von DAB nur dort stattfinden kann wo auch fluorophormarkierte Proteine zugegen sind, ist eine lokal-begrenzte DAB-Polymerisation möglich.

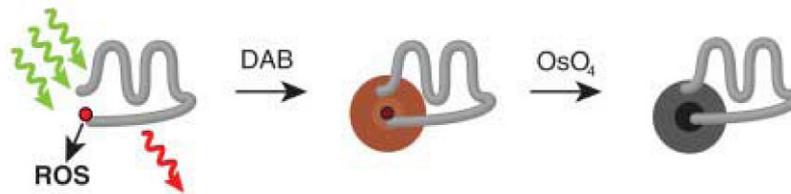


Abb. 8.2: Schematische Darstellung des Photooxidationsprozesses von DAB für EM-Aufnahmen. Durch die Anregung des Fluorophors (rot) wird eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS) regeneriert, wodurch DAB polymerisiert (braun), mit Osmiumtetroxid angefärbt werden kann (schwarz) und im EM sichtbar wird.^[243]

Die so erhaltenen Strukturinformationen können anschließend mit den im optischen Mikroskop erhaltenen Bildern zusammengeführt werden.^[234-235] Selbst nach aufwendiger Literaturrecherche sind bisher keine Anwendungen mit DNA/RNA-Fluorophorsonden bekannt. Zusammen mit den Forschergruppen um *Prof. Göpferich* und *Prof. Witzgall* von der Universität Regensburg wurde daher ein gemeinsames Projekt ins Leben gerufen; Ziel war es, fluorophormarkierte DNA/RNA-Sonden herzustellen um anschließend mittels korrelativer Elektronen- und Lichtmikroskopie zum einen die endosomale Aufnahme in die Zelle, zum anderen den Weg der DNA/RNA in der Zelle zu verfolgen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für erste elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde **DNA 28** hergestellt. Die TO-Modifikation ist dabei am 5'-Terminus angebracht worden. Für nachfolgende Zelltests wurde **DNA 28** mit einem unmodifizierten Gegenstrang hybridisiert.

DNA 28 3'-A-C-G-C-A-G-T-A-T-C-G-T-A-G-T-C-A-G-T-G-T-C-A-T-TO-5'
 5'-T-G-C-G-T-C-A-T-A-G-C-A-T-C-A-G-T-C-A-C-A-G-T-A-T-3'

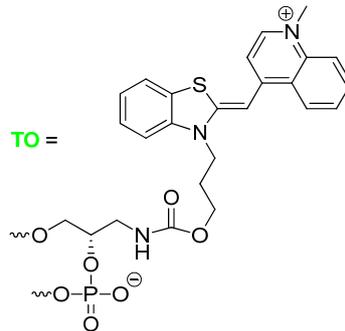


Abb. 8.3: Oben: Sequenz der verwendeten DNA-Sonde **DNA 28** zur Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Unten: Struktur von Thiazolorange (TO).

Aus **DNA 28** und Lipofectamin wurden partikuläre Lipoplexe hergestellt, die zusammen mit einer Kultur aus Epithelzellen der Schweineniere (LLC-PK1) für insgesamt 31 Stunden inkubiert wurden. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd wurde das DAB zu den Zellkulturen gegeben. Die Transfektion konnte im Lichtmikroskop verfolgt werden (hier aus Platzgründen nicht dargestellt). Anschließend wurden Zellschnitte angefertigt und im TEM betrachtet. Durch die fluorophorinduzierte Photooxidation von DAB und der anschließenden Färbung mit OsO_4 sollten die Stellen, an denen sich die DNA-Lipoplexe befinden, schwarz kontrastiert sein.

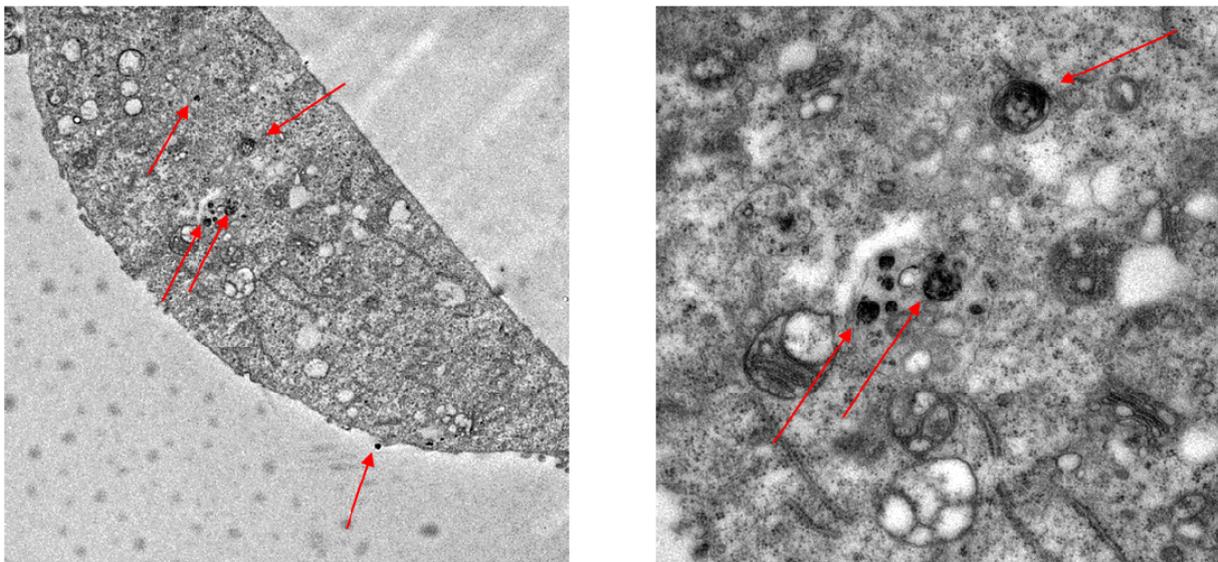


Abb. 8.4: TEM Aufnahmen von Zellschnitten untersuchter Schweinenierenzellen. **Links:** Übersichtsaufnahme in der deutlich die LLC-PK1 Zelle mit basaler und apikaler Seite zu erkennen ist. Bereits hier sind deutlich die dunkel gefärbten Lipoplexe zu erkennen. **Rechts:** Vergrößerung der Zelle, bei der deutlich die schwarz gefärbten Bereiche um die DNA-Sonden zu sehen sind.

Die TEM Aufnahmen (Abb. 8.4) zeigen deutlich eine LLC-PK1-Zelle mit basaler und apikaler Seite, wobei ein Ausschnitt der Zelle in Abb. 8.4, rechts vergrößert dargestellt ist. Zu erkennen sind mehrere, schwarz eingefärbte DNA-Lipoplexe (gekennzeichnet mit einem roten Pfeil). Diese befinden sich sowohl im Inneren der Zelle als auch extrazellulär an der Membran. Die Transfektionsrate der Zellen konnte mittels FACS-Analyse zu ~50% für **DNA 28** bestimmt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass sich der Anwendungsbereich der korrelativen Elektronen- und Lichtmikroskopie von Proteinen auf Oligonukleotide erweitern lässt. Es ist gelungen, mithilfe markierter DNA-Sonden die endocytische Aufnahme in die Zellen durch das Elektronenmikroskop zu verfolgen. Auf diese Weise können die aufgenommenen Vesikel sowohl im intrazellulären- als auch im extrazellulären Bereich genau lokalisiert und so wertvolle Umgebungsinformationen erhalten werden. Als problematisch bei der Durchführung der Experimente mit TO-modifizierten Oligonukleotiden, erwies sich die relativ kurze Stabilität des Farbstoffs unter direkter Belichtung. Durch den Einsatz des photostabileren Styrylfarbstoff CylQ konnten vielversprechende Ergebnisse erhalten werden.^[244]

9 Postsynthetische Modifikation von RNA

9.1 Klick-Reaktion an RNA

Wie bereits in Kapitel 6 erwähnt, handelt es sich bei dem Chromophor CyIQ um einen sehr photostabilen Styrylfarbstoff.^[149] Auf Grund der enormen Helligkeit wird diese Klasse von Farbstoffen bereits als nichtkovalentes Färbereagenz für RNA verwendet.^[178-179] Somit liegt es nahe, RNA-Sonden beispielsweise für den Einsatz in der korrelativen Elektronen- und Lichtmikroskopie zu entwickeln, die mit CyIQ kovalent markiert wurden. Verglichen mit einer TO-Modifikation sollen dadurch längere Beobachtungszeiten im konfokalen Lichtmikroskop ermöglicht werden. Erste Versuche die endosomale Aufnahme von CyIQ modifizierter DNA im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten, konnten mit großem Erfolg durchgeführt werden. Nach erfolgter Zelltransfektion ist es ebenfalls gelungen, durch eine fluorophorinduzierte Photooxidation von DAB die endosomal aufgenommenen DNA-Partikel im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen.^[244] Die dabei verwendeten DNA-Sonden wurden von *M. Rubner* durch eine postsynthetische Modifikation von DNA-Oligonukleotiden mit CyIQ hergestellt. Mittels einer kupferkatalysierten Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition (die sog. Klick-Reaktion) wurde CyIQ die 2'-Position eines alkinmodifizierten Uridins gekoppelt.^[149] Im folgenden Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich postsynthetisch modifizierte RNA ebenfalls mit Hilfe einer kupferkatalysierten Klick-Reaktion herstellen lassen.

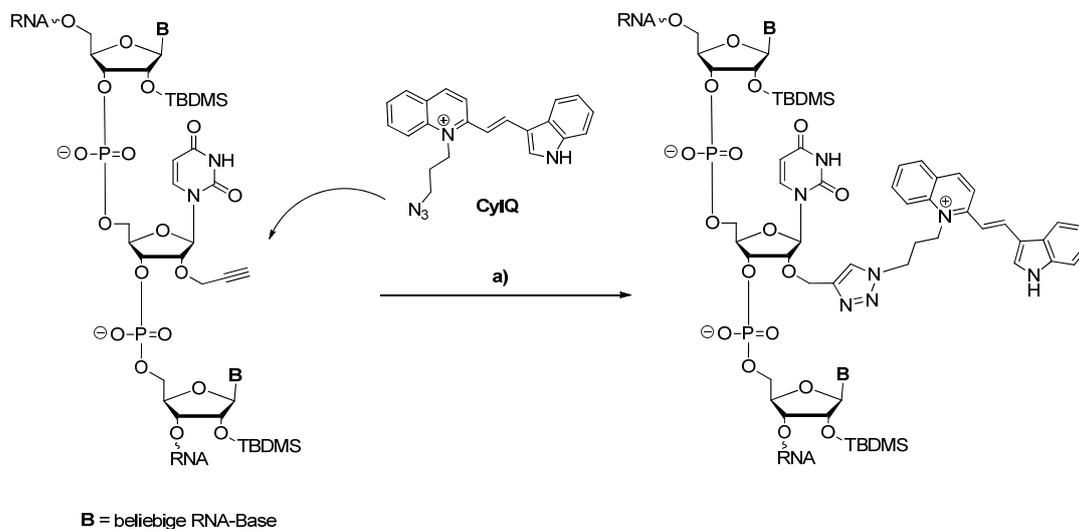


Abb. 9.1: Reaktionsschema zur postsynthetischen RNA-Modifikation mittels kupferkatalysierter Klick-Reaktion von CyIQ mit alkinmodifizierter RNA; **a)** Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat,

TBTA, Natriumascorbat, 14 h, RT unter RNase freien Bedingungen. TBTA, Natriumascorbat, 14 h, RT unter RNase freien Bedingungen.

Als Alkinbaustein wurde ein gekauftes 2'-alkin-funktionalisiertes Uridin während der automatisierten RNA-Festphasensynthese ins RNA-Rückgrat integriert. Der Einbau kann dabei an beliebiger Stelle in den RNA-Strang stattfinden. Nach erfolgter Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase konnte CylQ durch Zusatz von Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, TBTA als Ligand sowie Natriumascorbat an die RNA geknüpft werden. Wichtig dabei ist, dass die postsynthetische Modifikation noch vor der Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen am 2'-OH des Riboserückgrats durchgeführt wird. Dadurch kann ein Cu(I)-induzierter Strangbruch verhindert werden.^[245-247] Des Weiteren müssen die zur Klick-Reaktion benötigten Reagenzlösungen unter RNase freien Bedingungen hergestellt werden. Nach erfolgter Aufarbeitung und Entfernung von Cu(I), kann die TBDMS-Schutzgruppe nach Standardbedingungen abgespalten werden.^[248]

9.2 Spektroskopische Charakterisierung

Es wurden Oligonukleotide mit einer internen- und einer terminalen-CylQ-Modifikation (**RNA 13** bzw. **RNA 14**) hergestellt und anschließend spektroskopisch untersucht. Um die erhaltenen Ergebnisse mit den Eigenschaften von CylQ in DNA-Oligonukleotiden vergleichen zu können wurde für **RNA 13** eine Sequenz gewählt, die bereits von *M. Rubner* für eine Markierung von DNA verwendet wurde.^[244]

RNA 11 3'-A-G-U-C-A-C-U-U-CylQ-U-U-C-U-G-A-C-G-5'
5'-U-C-A-G-U-G-A-A-A-A-A-G-A-C-U-G-C-3'

RNA 12 3'-U-A-U-C-A-C-U-U-A-U-U-C-U-C-A-C-U-CylQ-5'
5'-A-U-A-G-U-G-A-A-U-A-A-G-A-G-U-G-A-A-3'

Abb. 9.2: Sequenzen der CylQ-modifizierten RNA-Oligonukleotide **RNA 11** und **RNA 12**, jeweils mit den dazugehörigen unmodifizierten Gegensträngen.

Die Absorptionsspektren zeigen die CylQ typische Bande bei $\lambda = 495$ nm im Einzel- und Doppelstrang für **RNA 13**, sowie eine um bis zu 5 nm blauverschobene Bande für **RNA 14**. Durch eine Anregung bei $\lambda = 495$ nm kann in allen modifizierten Oligonukleotiden eine Fluoreszenz im Bereich von $\lambda = 500 - 700$ nm, mit einem Maximum von $\lambda = (566 \pm 3)$ nm, beobachtet werden. Dabei findet für **RNA 13** ein 1.5-facher Intensitätsanstieg im RNA-Doppelstrang statt. Im Gegensatz dazu sinkt die Fluoreszenzintensität für **RNA 14** im Doppelstrang um das 3.8-fache. Möglicherweise ist die terminale Modifikation dafür verantwortlich: Im Einzelstrang lagert sich CylQ unspezifisch in die willkürlich geformten RNA-Gebilde ein, wodurch die Rotation um die Styrylbrücke eingeschränkt wird. Dadurch kann eine ähnliche Intensität wie in **dsRNA 13** erreicht werden. Durch den Übergang zum Doppelstrang in **dsRNA 12** wird CylQ an den Rand des Duplexbereiches gezwungen. π - π -Wechselwirkungen mit benachbarten Basen sind nur begrenzt möglich, wodurch mehr eingestrahlte Energie in strahlungslosen Relaxationsprozessen wieder abgegeben werden kann.

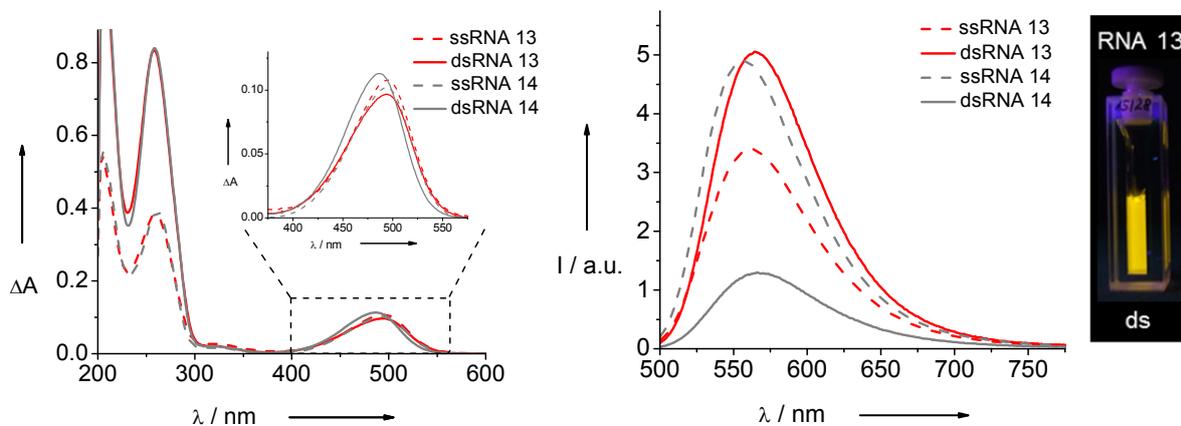


Abb. 9.3: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (mitte) von **RNA 13** und **RNA 14** als Einzel- bzw. Doppelstrang ($\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm), sowie die unter der UV-Lampe beleuchtete Küvette von **dsRNA 13** (rechts).

Diese Vermutung wird beim Vergleich der jeweiligen Schmelztemperaturen der Duplexe bestätigt: Durch eine terminale Farbstoffmodifikation (**RNA 14**) wird die Duplexstabilität, im Vergleich zu **RNA 13**, um 4 °C erhöht. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und RNA-Basen im Fall einer terminal vorgenommen Farbstoffmodifikation schwächer ausgeprägt sind, wodurch die Duplexstruktur weniger stark gestört wird.

Tabelle 9.1: Schmelztemperaturen sowie Angabe der Absorptions- und Emissionsmaxima für **RNA 13**, **RNA 14** und **DNA_{Vergleich}** im Einzel- und Doppelstrang.

| RNA | T _m [°C] | λ _{abs max} [nm] | λ _{em max} [nm] |
|--|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| RNA 13 | - | 495 | 563 |
| dsRNA 13 | 67 | 495 | 564 |
| RNA 14 | - | 492 | 558 |
| dsRNA 14 | 71 | 487 | 566 |
| DNA_{Vergleich}^(a) | - | 495 | 562 |
| dsDNA_{Vergleich}^(a) | 62 | 495 | 566 |

(a) Die verwendeten Werte wurden aus der von *M. Rubner* angefertigten Dissertation entnommen;^[244] Die Sequenz von **DNA_{Vergleich}** entspricht dabei der von **RNA 13**.

Vergleicht man die für **RNA 13** erhalten Ergebnisse mit einer CyIQ-Modifikation in DNA (**DNA_{Vergleich}**), so lassen sich keine nennenswerte Unterschiede im optischen Verhalten feststellen.

10 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Konzept *DNA Traffic Lights* entwickelt und anschließend optimiert. Dieses Konzept basiert auf einer Doppelmarkierung von Oligonukleotiden mit den Cyaninfarbstoffen Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR). Durch einen Energietransfer (ET) von TO auf TR kann eine Wellenlängenverschiebung der Fluoreszenz von 140 nm erreicht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Konzept *DNA Traffic Lights* vielversprechende Anwendungen in der Bioanalytik findet.

A. Entwicklung des Konzepts *DNA Traffic Lights*

1) Synthese des FRET-Paares als DNA/RNA-Basenersatz

Die Phosphoramiditbausteine der Cyaninfarbstoffe TO (**11**) und TR (**7**) konnten in einer vier- bzw. sechsstufigen Synthese hergestellt und über einen acyclischen Linker mittels DNA/RNA-Festphasensynthese ins Oligonukleotidrückgrat integriert werden (Abb. 10.1).

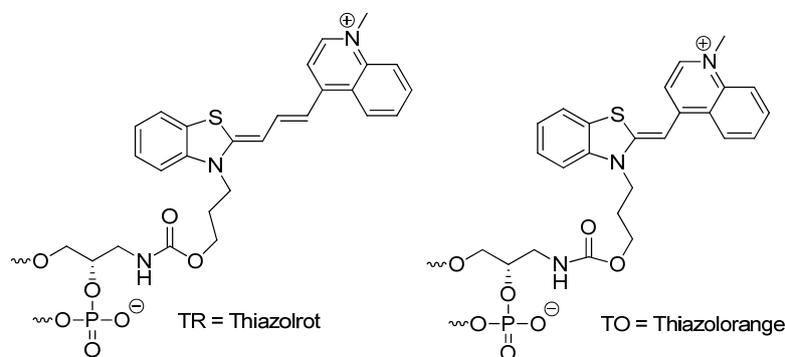


Abb. 10.1: Struktur der hergestellten DNA-Basenanaloga TO und TR in DNA/RNA.

2) Kontrastoptimierung

Durch eine systematische Variation der relativen Chromophor-Chromophor-Orientierung ist es gelungen, die Effizienz des Energietransfers von TO auf TR zu optimieren. Dabei konnte für das Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} ein Wert von 20:1 erhalten werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich Grundzustandswechselwirkungen zwischen den beiden Farbstoffen durch eine gezielte Abstandswahl unterbinden lassen. Die Aufhebung der genannten

Wechselwirkungen führt ebenfalls zu einer Effizienzsteigerung des ET-Prozesses zwischen TO und TR.

3) Alternative DNA-Konjugation

In einer zweistufigen Austauschreaktion konnte das azidmodifizierte TO-Derivat **12** erhalten werden. Mittels einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition wurde **12** anschließend an ein 2'-O-propargyl-modifiziertes Uridin gekoppelt (Abb. 10.2). Nachfolgend wurde der Einfluss der DNA-Chromophor-Konjugation auf die ET-Effizienz von TO auf TR untersucht. Dabei zeigte sich, dass oben genannte Grundzustandswechselwirkungen zwischen den beiden Farbstoffen ebenfalls aufgehoben werden können. Eine Kontrastoptimierung war jedoch nicht möglich.

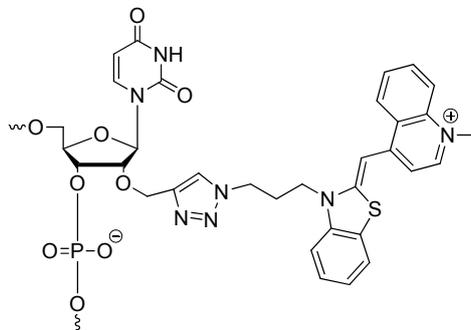


Abb. 10.2: TO-Derivat **12** in DNA nach postsynthetischer Kupplung an ein 2'-O-propargyl-modifiziertes Uridin.

4) Erhöhung der Photostabilität

Um die Beobachtbarkeit der *DNA Traffic Lights* in zellbiologischen Anwendungen zu verlängern, wurde TO durch den photostabilieren Styrylfarbstoff CyIQ ersetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich TR auch als ET-Akzeptor für CyIQ eignet. Da im Fall von Interstrang-Dimeren die ET-Effizienz sehr gering ausfällt, ist CyIQ jedoch als Ersatz für TO wenig geeignet. Durch die Kombination beider Farbstoffe zum Intrastrang-Dimer konnte eine lineare DNA-Sonde entwickelt werden, welche die Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Strang durch einen Farbwechsel von Orange nach Grün anzeigt.

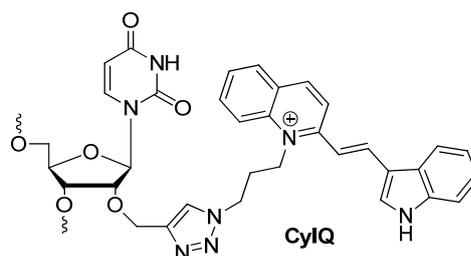


Abb. 10.3: CyIQ in DNA nach postsynthetischer Kupplung an ein 2'-O-propargyl-modifiziertes Uridin.

B. Anwendung des Konzepts *DNA Traffic Lights*

1) *Molecular Beacons* zur SNP-Detektion

Durch die Wahl unterschiedlicher Stammlängen und Schleifengrößen ist es gelungen, das Kontrastverhältnis I_{670}/I_{530} zwischen Haarnadel- und Duplexform zu optimieren. Dabei stellte sich heraus, dass optimale Kontrastverhältnisse dann erreicht werden können, wenn der detektierte Zielstrang nicht nur zur Schleife, sondern auch teilweise zum Stamm der MBs komplementär ist. Durch eine schrittweise Zugabe von Ziel-DNA kann ein kontinuierlicher Farbwechsel von Rot nach Grün beobachtet werden (Abb. 10.4).

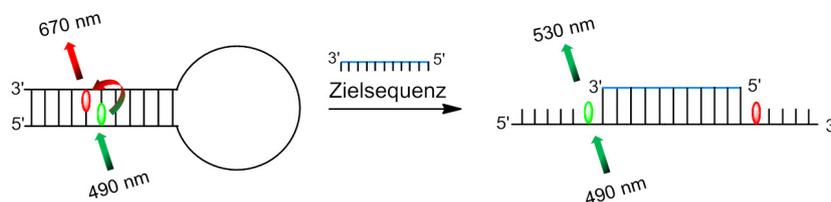


Abb. 10.4: Schematische Darstellung des entwickelten, wellenlängenverschiebenden Molecular Beacons.

Um verschiedenen MBs untereinander vergleichen zu können, wurde der sog. Enhancement Factor f eingeführt. Durch den Einsatz der *DNA-Traffic Lights* in MBs konnte ein maximaler f -Wert von 39.7 erreicht werden. Verglichen mit einem kommerziell erhältlichen, FAM/TAMRA modifizierten MB liegt dieser Werte eine Größenordnung höher. Erste Versuche zur SNP-Detektion konnten erfolgreich durchgeführt werden.

2) Aptasensoren

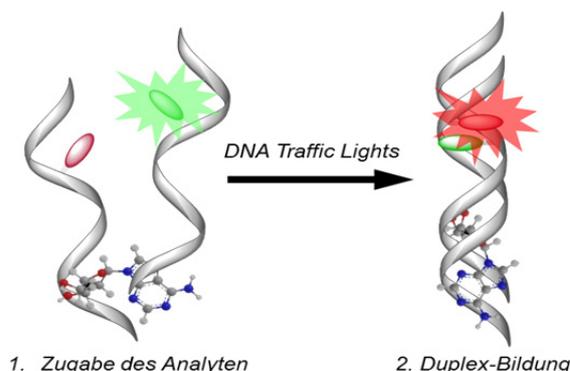


Abb. 10.5: Schematische Darstellung des entwickelten, adenosinsensitiven und -selektiven Aptasensors.

Um zu zeigen, dass sich das entwickelte Konzept zur Detektion einzelner Moleküle anwenden lässt, wurde ein adenosinsensitiver und -selektiver Aptasensor auf Basis der *DNA Traffic Lights* entwickelt (Abb. 10.5). Modifikationen im Duplexbereich stellten sich dabei störend für die Ausbildung der gewünschten Sekundär-

und Tertiärstruktur heraus. Der entwickelte Aptasensor zeigt eine adenosinsensitivität in einem Bereich bis zu 1 mM und ist selektiv gegenüber strukturell ähnlichen Analyten.

3) RNA-Interferenz (siRNA-Technologie)

Konzeptübertragung

Um die prinzipielle Übertragbarkeit des entwickelten Konzepts auf RNA zu testen, wurden verschiedene modifizierte Oligonukleotide hergestellt und die erhaltenen Resultate mit den bisher erbrachten Ergebnissen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass sich das Konzept *DNA Traffic Lights* auf RNA übertragen lässt. Um allerdings einen effizienten ET von TO auf TR zu erhalten, darf die Struktur der RNA-Doppelhelix im Bereich der Farbstoffmodifikation nicht gestört werden. Dies kann durch den Einsatz zusätzlicher G-C Basenpaare erreicht werden.

siRNA-Technologie

Durch die gezielte Wahl des Modifikationsbereichs der siRNA ist es gelungen die Aktivität zu erhalten und die GFP-Expression in HeLa Zellen zu regulieren. Des Weiteren war es möglich die intrazelluläre Prozessierung der siRNA anhand eines Farbwechsels zu verfolgen, sowie den Sensitivitätbereich (verglichen mit einem aktuellen Literaturbeispiel) zu erweitern.

4) Korrelative Elektronen- und Lichtmikroskopie

Mit Hilfe modifizierter DNA/RNA ist es gelungen, die für Proteine häufig gebrauchte Methode der korrelativen Elektronen- und Lichtmikroskopie auf Oligonukleotide anzuwenden. Dabei findet eine fluorophorinduzierte Photooxidation von DAB statt. Das entstandene Polymer lässt sich mit OsO₄ anfärben, wodurch eine Kontrastierung in Zellschnitten ermöglicht wird. Auf diese Weise ist es gelungen, die Aufnahme markierter DNA/RNA in Podocyten Zellen über endocytische Vesikel sowohl im Elektronenmikroskop zu verfolgen.

11 Materialien, Methoden und Synthesen

11.1 Materialien, Geräte und allgemeine Methoden

Reagenzien

Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR*, *Alpha Aeser*, *Fluka*, *Merck* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die dabei verwendete Qualitätsstufe war mindestens „zur Synthese“.

Lösungsmittel

Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel wurden von *Acros*, *Alfa Aeser*, *Fluka* und *Sigma Aldrich* bezogen und unter Argon- oder Stickstoff-Atmosphäre aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochreine (HPLC Grade) organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*, *Fluka*) sowie entionisiertes und ultrafiltriertes Wasser aus einer *Millipore*-Anlage verwendet.

Reaktionsführung

Wenn nötig, wurden Reaktionen zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Stickstoff- (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) oder Argon-Atmosphäre (Schweißargon 4.6, 99.996% rein) durchgeführt. Glasapparaturen wurden vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Verwendet wurden fertige Aluminium DC-Platten der Firma *Merck* mit einer Beschichtung aus Kieselgel 60 F₂₅₄ und einer Schichtdicke von 0.25 mm. Die Auswertung erfolgte über die sichtbare Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenz, angeregt bei $\lambda = 366$ nm. Als Anfärbereagenzien wurde eine schwefelsaure Methanol Lösung (3 Vol.-% H₂SO₄) verwendet.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* verwendet (Korngröße 40 – 63 μm). Es wurde ausschließlich nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[249] bei ca. 0.4 bar Überdruck chromatographiert. Die zu reinigende Substanz wurde im Laufmittel gelöst. Es wurden ausschließlich Glassäulen mit einer Fritte (Porengröße 2 oder 3) verwendet.

Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff getrocknet.

DNA-Festphasensynthese

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems*. Als feste Phase diente CPG (Controlled Pore Glass) mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å). Phosphoramidite, Synthesizer Chemikalien und CPG-Säulen stammten von *ABI*, *Glen Research* und *Proligo*. Das 2'-O-Propargyl-Uridin wurde als Phosphoramidit von *ChemGenes* bezogen.

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte DNA- und RNA-Stränge, sowie der 5'-Cy3- und 3'-Cy5-markierte DNA-Strang wurden von *Metabion international* in HPLC gereinigtem Zustand bezogen. Der 5'-FAM- und 3'-TAMRA markierte DNA-Strang wurde von *biomers.net GmbH* in HPLC gereinigtem Zustand bezogen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Für die Entsalzung nach Klickreaktionen wurden fertige *illustra NAP™-5*-Säulen (*Sephadex™ G-25 DNA Grade*) von *GE-Healthcare* verwendet. Für die Aufreinigung von DNA-Strängen wurde mit 5 mM Ammoniumacetat-Puffer äquilibriert und

chromatographiert. Für die Aufreinigung von RNA-Strängen wurde mit 10 mM Ammoniumcarbonat-Puffer äquilibriert und chromatographiert. Bei DNA liegt das Größenausschlusslimit von G-25 Gelen bei 10 Basen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von DNA/RNA wurde an einem modularen HPLC-System von *Shimadzu* durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Detektion, Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Software *Class VP*. Für die analytische Chromatographie wurde eine Reversed Phase *Supelcosil*TM LC-318-Säule (250 x 4.6 mm, 3 µm) verwendet. Semipräparative Trennungen erfolgten über eine Reversed Phase *Supelcosil*TM LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 µm). Die Flussrate bei analytischen Methoden betrug 1 mL/min und 2,5 mL/min bei semipräparativen Methoden. Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer für DNA (pH = 6.5, Laufmittel A) und 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer für RNA (Laufmittel A) äquilibriert und anschließend mit verschiedenen Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) eluiert. Die Detektion erfolgte über die DNA typische UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ und 290 nm. Bei DNA-/RNA-Strängen mit eingebauten Farbstoffen wurde zusätzlich deren charakteristische UV/Vis-Absorption detektiert.

NMR

Kernresonanzspektren wurden an einem *Bruker Avance 300*, *Avance 400* oder *Avance 600-Kryo* durch die Abteilung für NMR-Spektroskopie der Zentralen Analytik an der Universität Regensburg bzw. der Analytik-Abteilung des Instituts für Organische Chemie des KIT gemessen. Die jeweiligen Analysen wurden in üblichen NMR-Probenröhrchen ($\varnothing = 5$ mm) gemessen. Es wurden typischerweise 10 mg Substanz in 0.7 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Chemische Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und beziehen sich auf Trimethylsilan (TMS) als Nullpunkt. Für unvollständig deuterierte Lösungsmittel dient folgender Referenzwert^[250] bezüglich ihrer chemischen Verschiebung:

- DMSO- d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2,50$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39,52$ ppm

- CD_3CN : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1,94 \text{ ppm}$ $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 118,26 \text{ ppm}$

Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die Multiplizität der ^1H -Signale wird wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett von Dublett) und m (Multipllett).

Massenspektroskopie (MS)

ESI-, CI- und EI- Massenspektren wurden in der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Abteilung Massenspektroskopie der Universität Regensburg gemessen. Die relevanten Spektrometer werden nachfolgend zusammengefasst.

- ESI-MS: ThermoQuest Finnigan TSQ 7000
- CI-MS: Finnigan MAT SSQ 710 A
- EI-MS: Finnigan MAT SSQ 710 A, Finnigan MAT 95
- HR-FAB-MS: *Finnigan MAT 95*

MALDI-TOF-Massenspektren wurden am Karlsruher Institut für Technologie an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linearen negativen Modus gemessen. Als Matrix wurde eine Mischung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP, 0.3 M in Ethanol) und Diammoniumcitrat (0.1 M in Wasser) im Volumenverhältnis 2:1 verwendet. Die Angabe der Peaks erfolgt bei allen MS-Analysen in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

Circulardichroismus

Die CD-Spektroskopie erfolgte an einem *Jasco J-715* Spektropolarimeter mit *PTC-150J* Thermostat am Lehrstuhl für Analytik an der Universität Regensburg. Die Spektren wurden gegen das Lösungsmittel basislinienkorrigiert. Es wurden folgende Geräteeinstellungen verwendet: Data pitch: 0.5 nm, Scanning Mode: continuous, Scanning Speed: 200 nm/min, Response: 0.5 s, Band Width: 1 nm, Accumulation: 5.

11.2 Optische Spektroskopie

Bei allen spektroskopischen Messungen wurden Quarzglas-Küvetten der Firma *Starna* ($d = 1 \text{ cm}$) mit einem Füllvolumen von 1 mL verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Messungen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und verschlossenen Küvetten durchgeführt. Bei Temperaturabhängigen Messungen wurden die Probenkammern mit einem kontinuierlichen Stickstoffstrom gespült um ein Beschlagen der Küvetten zu verhindern. Alle DNA/RNA Spektren wurden gegen das jeweilige Lösungsmittel (i.d.R. NaP_i -Puffer) basislinienkorrigiert. Soweit nicht anders angegeben setzten sich die Probelösungen wie folgt zusammen:

$c_{(\text{DNA/RNA})} = 2.5 \text{ } \mu\text{M}$ für markierte DNA/RNA-Stränge

$c_{(\text{DNA/RNA})} = 3.0 \text{ } \mu\text{M}$ für unmarkierte DNA/RNA-Stränge

$c_{(\text{NaPi})} = 10 \text{ mM}$

$c_{(\text{NaCl})} = 250 \text{ mM}$

UV/Vis Absorptionsspektroskopie

Die UV/Vis- Absorptionsspektren wurden mit einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit Temperatureinheit (*Cary 100 Temperature Controller*) gemessen. Folgende Grundeinstellungen blieben unverändert: SBW: 2.0 nm, Average time: 0.1 s, Data intervall: 1.0, Light source change over: 350 nm.

Schmelztemperaturmessungen wurden in selbigem Gerät mit dem Programm „Thermal“ durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionsänderung der DNA bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verfolgt. Die Messungen erfolgten aufwärts von $10 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$ und abwärts von $90 - 10 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug $0.7 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Die Messdaten wurden in $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ Schritten erfasst.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Jobin-Yvon* gemessen. Die Proben wurden mit einem Peltier-Element *LFI-3751* thermostatisiert. Falls nicht anders angegeben wurde bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen und die Spektren gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter blieben unverändert: Increment: 1 nm, Integration Time: 0.2 s.

Temperaturabhängige Fluoreszenzspektren wurden über einen Temperaturbereich von 20-90 °C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur mit einer Toleranz von 1 °C für 5 min konstant gehalten.

11.3 Fluoreszenzmikroskopie

11.3.1 Stabilität modifizierter siRNA in HeLa-Zellen

Alle Messungen wurden an einem *Zeiss Axiovert 200 M* Mikroskop, das an eine *Zeiss LSM 510 Scanneinheit* (Carl Zeiss) gekoppelt war, durchgeführt. Fluoreszenzbilder wurden durch die Anregung mit Hilfe eines Argonlasers ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) und eines *META Detektor* (Detektionsbereich 531 – 703 nm) erhalten. Zur Auswertung wurde das Intensitätsverhältniss I_{681}/I_{531} bestimmt.

Probenherstellung

- Kontrollmessungen ohne HeLa-Zellen

Die siRNA wurde mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/L}$ entweder in Puffer (10 mM HEPES mit pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*) oder Zelllysate gelöst und vermessen.

- Herstellung des Zelllysats

Die HeLa-Zellen wurden trypsinisiert und anschließend bei 400xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend zwei Mal mit kaltem PBS (je 1 mL) gewaschen und in hypertonischem Puffer (Herstellung siehe oben) suspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (400xg, 5 min, 4 °C) und in Lysepuffer suspendiert (es wurde das gleiche Volumen wie das des Pelletts verwendet). Die erhaltene Zellsuspension wird langsam durch die Nadel in eine Spritze gezogen (27 Gauge Nadel) und anschließend schnell wieder heraus gedrückt. Dieser Vorgang wurde zehn Mal wiederholt. Dabei wird die Zellmembran zerstört und der Zellkern bleibt erhalten.

- Messungen mit HeLa-Zellen

Die HeLa Zellen wurden in *Ibidi μ -Slide 8 Well Dishes* ausgesät mit einer Anfangsdichte von 20.000 Zellen pro Kammer. Nach 20 h wurden Nanopartikel

bestehend aus siRNA und bioabbaubaren Poly(ethylenimin),^[230] mit einer Konzentration von 100 nmol/L, zu den Zellen zugeben und vermessen.

Probenvorbereitung und Messung wurde von *M. Breunig* und *R. Liebl* des Arbeitskreis *Göpferich* an der Universität Regensburg (Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie) durchgeführt.

11.3.2 Gene-silencing: Regulierung der GFP Expression in HeLa-Zellen

Zellkultur

Humane Cervix-Karzinom- Zellen (HeLa- Zellen) wurden mit dem Vektor pEGFP-C1 (Clontech) transfiziert und mit Neomycin zu einer stabilen Zelllinie selektioniert und kloniert. Die so erhaltenen HeLa-GFP-Zellen exprimieren das grünfluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert (Zellkulturschalen, Greiner). Um die Zellen zu passagieren wurden diese zweimal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (10 mL 0.25 %ige Trypsinlösung, 10 mL EDTA 5 mM und 30 mL PBS) benetzt und im Brutschrank für 5 bis 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde nach vollständigem Ablösen der Zellen mit mindestens einem Volumen eines Trypsininhibitors (10 % FKS in DMEM) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 x g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet im entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und wieder ausplattiert.

Mikroskopie

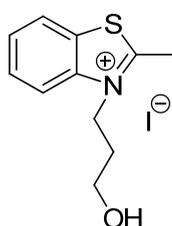
Es wuden 1x 10⁴ Zellen pro well in einem 8 well IBITreat µ-Slide ausplattiert und 24 h bei 37 °C mit 40 nM der entsprechenden siRNAs transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Screenfect (Incella, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach 24 und 48 h wurden die Zellen mit konfokaler Laser Scan Fluoreszenzmikroskopie (Leica SP5-TCS) visualisiert. Objektiv: HCX PL APO CS 63.0x1.2 Water UV, Laser: Argon Excitation 488 nm, Auflösung 1024 x1024.

Probenvorbereitung und Messungen wurden von *U. Schepers*, *C. Bednarek* und *C. Grün* des Arbeitskreis *Schepers* am KIT Campus Nord (Institut für Toxikologie und Genetik) durchgeführt.

11.4 Synthesen

11.4.1 Synthese von Thiazolrot

2-Methyl-3-propanoyl-benzothiazoliumiodid (1)



$C_{11}H_{14}INOS$

334.98 g/mol

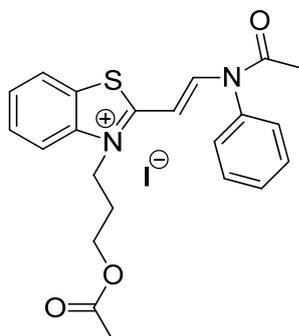
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 8 mL 2-Methylbenzothiazol (63 mmol; 3.0 eq) und 2 mL Iodpropanol (21 mmol; 1.0 eq) in 30 mL Acetonitril gelöst und 5 Tage unter Rückfluss gerührt. Während die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, fiel das kristalline Produkt aus. Zur vollständigen Fällung wurde die Reaktionsmischung über Nacht ins Gefrierfach gestellt. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck abgesaugt. Nach Trocknen des Produkts am Hochvakuum wurden 5.59 g (16.7 mmol) einer rotbraunen, kristallinen Substanz erhalten (79%).

1H -NMR (300 MHz; $[d_6]$ -DMSO): δ = 2.03 (qi, 2H, $-CH_2-$), 3.23 (s, 3H, 2-Me), 3.52 (t, 2H, $-CH_2-OH$), 4.23 (s, 1H, OH), 4.78 (t, 2H, N- CH_2-), 7.89 (t, 1H, arom), 7.80 (t, 1H, arom), 8.32 (d, 1H, arom), 8.47 (d, 1H, arom)

^{13}C -NMR (75 MHz; $[d_6]$ -DMSO): δ = 16.9 (2-Me), 30.4, 46.8, 57.3 (propyl), 116.7, 124.6, 127.9, 128.9, 129.2, 140.7, 177.1 (Benzothiazol arom.)

ESI-MS m/z (%): 208.0 (100) $[M^+]$

HR-MS(FAB): gefunden: m/z = 208.0801 $[M^+]$, berechnet: m/z = 208.0796

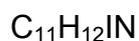
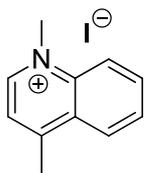
3-Acetoxypropyl-2-(2-Acetanilidovinyl)benzothiazoliumiodid (2) $C_{22}H_{23}IN_2O_3S$

522.05 g/mol

Es wurden 4.0 g **1** (12 mmol, 1.0 eq) in 60 mL frischem Essigsäureanhydrid gelöst und erwärmt. Sobald **1** vollständig gelöst war, wurden 2.32 g N,N'-Diphenylformamidin (12 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Die dunkelrote Reaktionslösung wurde 1 h unter Rückfluss gerührt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Produkt wurde durch langsame Zugabe von ca. 60 mL Diethylether gefällt. Das überstehende Lösungsmittel wurde abdekantiert, das Produkt anschließend mit 120 mL Methanol gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 4.0 g (7.7 mmol) des Hemicyanins erhalten (64%). Leider konnte diese Stufe nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden um alle analytischen Daten bereit zu stellen.

¹H-NMR (300 MHz; [d₆]-DMSO): δ = 1.79 (m, 3H, O-acetyl-CH₃), 1.92-1.98 (m, 2H, -CH₂), 2.06 (s, 3H, N-acetyl-CH₃), 3.93 (t, 2H, O-CH₂-), 4.49 (t, 2H, N-CH₂-), 5.67 (d, 1H, Methin-H), 7.52-7.57 (m, 2H, Benzothiazol arom.), 7.63-7.81 (m, 5H, arom), 8.17 (d, 1H, Benzothiazol arom.), 8.33 (dd, 1H, Benzothiazol arom.), 8.84 (d, 1H, Methin-H)

ESI-MS m/z (%): 394.9 (84) [M⁺]

4,N-Dimethylchinoliniumiodid (3)

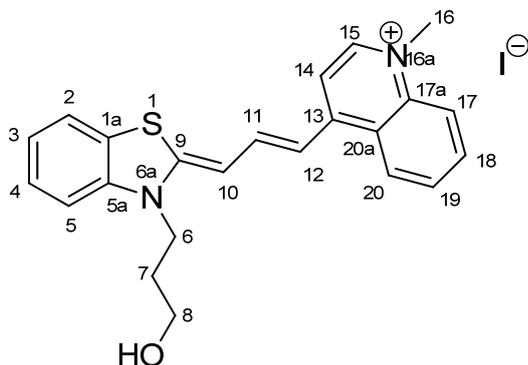
285.12 g/mol

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.5 mL 4-Methylchinolin (19 mmol, 1.0 eq) und 3.9 mL Methyljodid (62 mmol, 3.3 eq) in 40 mL Dioxan gelöst und 1 h unter Rückfluss gerührt. Es fiel ein senfgelber Niederschlag aus. Dieser wurde abgesaugt und mit Diethylether (2 mal je 20 mL), sowie Petrolether (2 mal je 20 mL) gewaschen und anschließend am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 5.42 g (19 mmol) eines senfgelben Pulvers erhalten (100%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; $[\text{d}_6]$ -DMSO): $\delta = 3.00$ (s, 3H, 4-Me), 4.68 (s, 3H, -N-Me), 8.03-8.08 (m, 2H, arom), 8.24-8.29 (m, 1H, arom), 8.47-8.54 (m, 2H, arom), 9.38 (m, 1H, arom)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; $[\text{d}_6]$ -DMSO): $\delta = 19.6$ (4-Me), 45.0 (N-Me), 119.4, 122.3, 126.7, 128.3, 129.5, 134.8, 137.5, 148.8, 158.0 (Chinolin arom.)

ESI-MS m/z (%): 158.1 (100) $[\text{M}^+]$

4-[[[(3-Hydroxypropyl)-benzothiazol-2-yliden)-prop-1-enyl]-methylchinolinium-iodid (5)C₂₃H₂₃N₂OSI

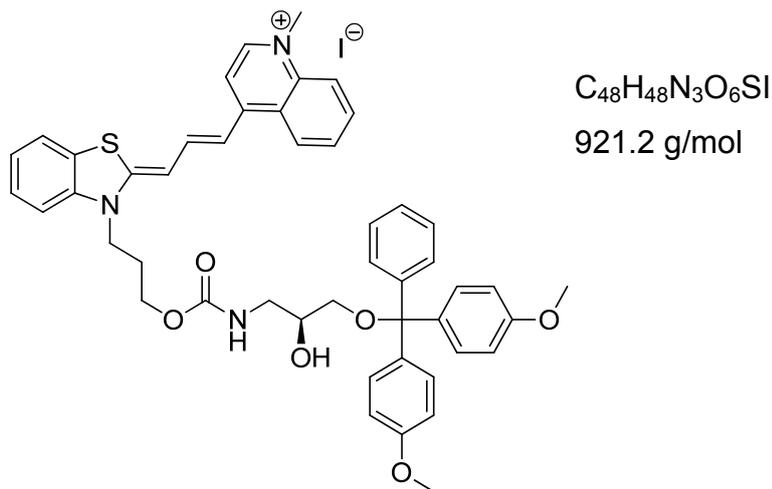
502.06 g/mol

In 20 mL trockenem Dichlormethan wurden unter Stickstoffatmosphäre 1.0 g **2** (2 mmol, 1.0 eq) sowie 0.57 g **3** (2 mmol, 1.0 eq) gelöst und 1.66 mL trockenes Triethylamin (12 mmol, 6.0 eq) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung färbte sich sofort blau. Nach dreitägigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der entstandene violettblaue Niederschlag (**4**, 0.62 g, 58%) abgesaugt und ohne weitere Aufreinigung zum gewünschten Produkt umgesetzt. Hierzu wurde der erhaltene Niederschlag in 10 mL MeOH gelöst, danach 20 mL NH₃ (32%) zugegeben und anschließend 4 h bei einer Ölbadtemperatur von 70 °C, sowie 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene grünschwarze Niederschlag wurde unter vermindertem Druck abgesaugt und am Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0.3 g (0.6 mmol) reines Produkt erhalten (51%).

¹H-NMR (600 MHz; [d₆]-DMSO): δ = 1.88 (qi, 2H, 7), 3.54 (qa, 2H, 8), 4.13 (s, 3H, 16), 4.25 (t, 2H, 6), 4.83 (t, 1H, OH), 6.49 (d, 1H, 10), 7.09 (d, 1H, 12), 7.27 (t, 1H, 3), 7.45 (t, 1H, 4), 7.52 (d, 1H, 5), 7.70 (m, 1H, 19), 7.82 (m, 1H, 14), 7.83 (d, 1H, 2), 7.96 (m, 1H, 18), 7.97 (m, 1H, 17), 8.11 (t, 1H, 11), 8.38 (d, 1H, 15), 8.45 (d, 1H, 20)

¹³C-NMR (600 MHz; [d₆]-DMSO): δ = 30.0 (7), 42.2 (16), 42.9 (6), 57.6 (8), 98.2 (10), 109.5 (14), 109.3 (12), 112.2 (5), 117.9 (17), 122.4 (2), 123.9 (20a), 124.0 (3), 124.6 (1a), 124.8 (20), 126.7 (19), 127.5 (4), 133.2 (18), 138.8 (17a), 141.5 (5a), 143.2 (15), 143.6 (11), 150.4 (13), 160.7 (9)

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC**

ESI-MS m/z (%): 375.0 (100) [M⁺]**HR-MS(FAB)**: gefunden: m/z = 375.1524[M⁺], berechnet: m/z = 375.1526**3-(((Bis(4-methoxyphenyl)phenyl-methoxy-2-hydroxypropylcarbamoyloxy-propyl)benzothiazol-2-yliden)prop-1-enyl)-1-N-methylchinoliniumiodid (6)**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.5 g **5** (1 mmol, 1.0 eq) in 40 mL trockenem DMF gelöst, 0.33 g Carbodiimidazol (2 mmol, 2.0 eq) zugegeben und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 0.78 g 3-(Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propylamin (2 mmol, 2.0 eq) zugegeben und weitere 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden ist, wurde der blauviolette Rückstand durch *Flash*chromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/Methanol 10:1 + 0.1% Pyridin, Fritte 2). Es wurden 0.83 g (0.9 mmol) eines blauen Pulvers erhalten (90%).

DC (DCM/MeOH 10:1) R_f = 0.38

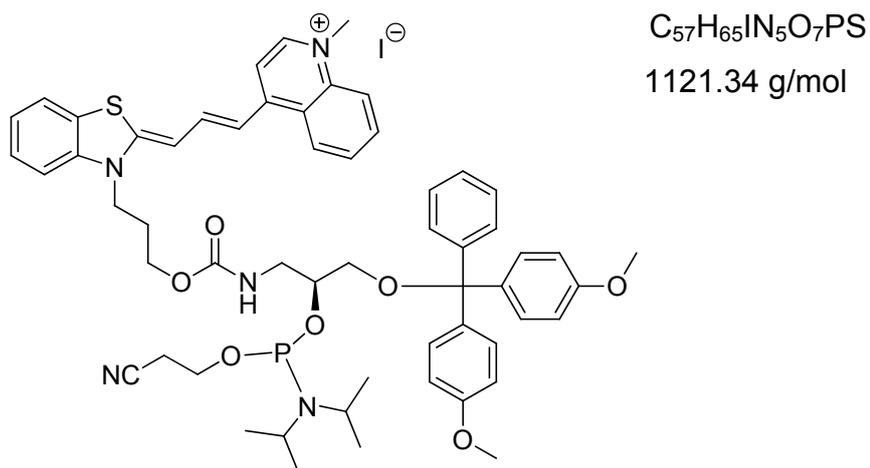
¹H-NMR (300 MHz; [d₆]-DMSO): δ = 1.99-2.03 (m, 2H, -CH₂-), 2.88-2.99 (m, 2H, CH₂-ODMT), 3.18-3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 3.33 (s, 1H, NH), 3.70 (s, 6H, 2*OMe), 3.73 (s, 1H, -CH-OH), 5.02 (d, 1H, OH), 6.47 (d, 1H, methin-H), 6.84 (m, 4H, arom.DMT), 7.08-7.13 (m 1H, TO-3), 7.20-7.24 (m, 7H, arom.DMT), 7.26-7.32 (m 2H, TO-3 arom.), 7.43-7.56 (m, 2H, arom.), 7.64-7.69 (m, 1H, arom.), 7.85-7.90 (m, 2H, arom.), 7.93-8.02 (m, 3H, arom.), 8.10-8.18 (m 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz; $[\text{d}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 26.5, 30.7, 35.7, 42.2, 44.3, 54.9, 65.6, 68.7, 85.1, 98.0, 109.5, 109.8, 112.1, 113.0, 118.1, 122.5, 123.8, 124.0, 124.6, 126.4, 127.6, 129.6, 133.3, 135.7, 138.1, 141.3, 143.4, 145.0, 157.9, 162.2$

ESI-MS m/z (%): 794.2 (100) $[\text{M}^+]$

HR-MS(FAB): gefunden: $m/z = 794.3242[\text{M}^+]$, berechnet: $m/z = 794.3258$

4-[(3-Bis(4-methoxyphenyl)phenyl-methoxy-methyl-1-cyano-4-(diisopropyl-amino)-9-oxo-3,5,10-trioxa-8-aza-4-phosphatridecanyl]-[(benzothiazol-2-yliden)prop-1-enyl]-1-methylchinoliniumiodid (7)



Unter Argonatmosphäre und Wasserausschluss wurden 0.3 g **6** (0.33 mmol, 1.0 eq) in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Nachdem die Reaktionslösung mit 166 μl trockenem DIPEA (0.97 mmol, 3.0 eq) versetzt worden ist, wurden 125 μl 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (0.56 mmol, 1.7 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Vom vollständigen Verlauf der Reaktion wurde sich mit Hilfe einer MALDI-Messung vergewissert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und das entstandene Produkt mit trockenem Dichlormethan zwei Mal co-destilliert. Das erhaltene Phosphoramidit wurde am Hochvakuum 2-3 h getrocknet.

Es wurde ein Umsatz von 100% angenommen.

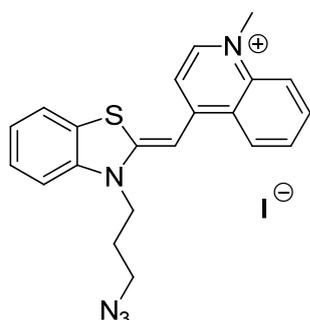
DC (DCM/Aceton 2:1) $R_f = 0.30$

MALDI-TOF-MS: gefunden: $m/z = 994.3 [M^+]$ (berechnet: $m/z = 994.4$)

$^{31}\text{P-NMR}$ (121 MHz, $[\text{d}_3]$ -Acetonitril) $\delta = 150.06, 149.70$

11.4.2 Synthese des Thiazolorange Azids

4-((3-(Azidopropyl)benzothiazol-2-ylidene)methyl)-1-methylchinolin-1-iumiodid (12)



$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{IN}_5\text{S}$

501.05 g/mol

Die Synthese von Thiazolorange **9** erfolgte analog der von S. Berndl entwickelten und publizierten Synthesestrategie.^[100] Zur Umsetzung zum TO-Azid (**12**) wurden 200 mg **9** (0.42 mmol, 1.0 eq) unter Argonatmosphäre in 5 mL DMSO gelöst und 0.13 mL Triethylamin (0.92 mmol, 2.2 eq) zugegeben. Unter Kühlung im Wasserbad wurden unter ständigem Rühren langsam 0.1 g Mesylchlorid (0.84 mmol, 2.0 eq) zugegeben und bei Raumtemperatur 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde unter Argonatmosphäre erneut in 5 mL trockenem DMSO gelöst, 0.27 g NaN_3 (4.2 mmol, 10 eq) zugegeben und 24 h bei einer Temperatur von 120 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol gelöst. Nicht lösliche Bestandteile der Mischung wurden abfiltriert. Das Rohprodukt konnte nach Entfernen des Lösungsmittels unter

vermindertem Druck erhalten werden. Die Reinigung erfolgte mittels RP-HPLC (verwendete Säule: Phenomenex Luna C-18(2), 100 Å, 10 µm; Laufmittel: Wasser/Acetonitril 5 – 98 % + 0.0059 % TFA). Es wurden 11 mg des TO-Azids (**12**) erhalten (0.022 mmol, 5 %).

DC (DCM/MeOH 10:1) $R_f = 0.23$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; $[\text{d}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 2.09$ (qi, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.61 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Br}$), 4.20 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 4.68 (t, 2H, S-CH_2-), 6.97 (s, 1H, Methin-H), 7.43 (m, 2H), 7.63 (t, 1H), 7.80 (m, 2H), 8.05 (m, 2H), 8.10 (d, 1H), 8.66 (d, 1H), 8.78 (d, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz; $[\text{d}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 26.1, 42.4, 43.1, 48.0, 87.5, 108.1, 112.7, 118.4, 122.9, 123.9, 124.1, 124.5, 125.3, 127.0, 128.2, 133.3, 138.1, 139.9, 145.2, 148.8, 159.3$.

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

HR-MS(FAB): gefunden: $m/z = 374.1449$ [M^+], berechnet: $m/z = 374.1439$

11.5 DNA-Synthese

11.5.1 Synthese modifizierter DNA

Allgemein

Die automatisierte Synthese von DNA-Oligonukleotiden erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems (ABI)*. Die Reagenzien zum Betrieb des Syntheseautomaten wurden von den Firmen *ABI* und *Proligo* bezogen, das Gerät selbst wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Die kommerziell erhältlichen natürlichen DNA-Basen wurden in Acetonitril (*amidite diluent*) gelöst und als 0.067 M Lösungen eingesetzt. Synthetisch hergestellte Basenanaloga wurden ebenfalls in Acetonitril gelöst und als 0.085 M Lösung verwendet. Der 2'-O-Propargyl-Uridin Baustein wurde von der Firma *ChemGenes* als Phosphoramidit bezogen und als 0.1 M Lösung in Acetonitril eingesetzt (*amidite diluent*). Als Trägermaterial dienten CPG-Säulen der Firma *Proligo* mit einer Porengröße von 500 Å und einer Belegung von 100 µmol.

Kupplungsprotokolle

Im Kupplungsprotokoll werden die Einzelschritte des Synthesesyklus bei der automatisierten DNA-Festphasensynthese programmiert. Jeder Zyklus besteht aus einer veränderlichen Anzahl an Pulsen, wobei je Puls 16 µL des jeweiligen Reagenzes aus den Vorratsflaschen gefördert werden. Zusätzlich lässt sich die Zeit für jeden Schritt programmieren. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet einen schnellstmöglichen Durchlauf des Einzelschrittes ohne zusätzliche Reaktionszeit. Tabelle 11.1 zeigt das Kupplungsprotokoll, welches für den Einbau des 2'-O-Propargyl-Uridins verwendet wurde; es entspricht dem Kupplungsprotokoll für den Standardeinbau von T.

Tabelle 11.1: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von A, G, C, T. Erläuterungen: **Dbk:** 3 % Dichloressigsäure in CH₂Cl₂; **Wsh:** MeCN; **Act:** 0,45 M Tetrazol in MeCN; **Caps:** Ac₂O in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Iod in Wasser/THF/Pyridin.

| Codierung | Funktion | Modus | Menge /Arg1 | Zeit (s) /Arg2 |
|---------------|--------------------|-------|-------------|----------------|
| \$ Deblocking | | | | |
| 144 | Index Fract. Coll. | NA | 1 | 0 |
| 0 | Default | WAIT | 0 | 1.5 |
| 141 | Trytl Mon. On/Off | NA | 1 | 1 |
| 16 | Dbk | PULSE | 10 | 0 |
| 16 | Dbk | PULSE | 50 | 49 |
| 38 | Diverted Wsh A | PULSE | 40 | 0 |
| 141 | Trytl Mon. On/Off | NA | 0 | 1 |
| 38 | Diverted Wsh A | PULSE | 40 | 0 |
| 144 | Index Fract. Coll. | NA | 2 | 0 |
| \$ Coupling | | | | |
| 1 | Wsh | PULSE | 5 | 0 |
| 2 | Act | PULSE | 5 | 0 |
| 21 | T + Act | PULSE | 5 | 0 |
| 21 | T + Act | PULSE | 2 | 16 |
| 2 | Act | PULSE | 3 | 24 |
| 1 | Wsh | PULSE | 7 | 56 |
| 1 | Wsh | PULSE | 8 | 0 |
| \$ Capping | | | | |
| 12 | Wsh A | PULSE | 20 | 0 |
| 13 | Caps | PULSE | 8 | 0 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 6 | 15 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 14 | 0 |
| \$ Oxidizing | | | | |
| 15 | Ox | PULSE | 15 | 0 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 15 | 0 |
| \$ Capping | | | | |
| 13 | Caps | PULSE | 7 | 0 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 30 | 0 |

Tabelle 11.2 zeigt das im Bereich „\$ Coupling“ veränderte Kopplungsprotokoll, welches für den Einbau des TR und des TO verwendet wurde. Die Kopplungszeit wurde mit 30 Pulsen auf 90 min verlängert. Alle Sonderbausteine wurden als 0.085 M Lösungen in abs. MeCN in den Syntheseautomaten eingebracht.

Tabelle 11.2: Kupplungsprotokoll für die Einführung der Sonderbausteine TO und TR in DNA-Oligonukleotide.

| Codierung | Funktion | Modus | Menge /Arg1 | Zeit (s) /Arg2 |
|-------------|----------------|-------|-------------|----------------|
| \$ Coupling | | | | |
| 1 | Wsh | PULSE | 5 | 0 |
| 2 | Act | PULSE | 5 | 0 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 6 | 0 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 2 | 900 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 2 | 600 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 5 | 200 |
| 2 | Act | PULSE | 1 | 500 |
| 2 | Act | PULSE | 3 | 300 |
| 1 | Wsh | PULSE | 7 | 200 |
| 1 | Wsh | PULSE | 15 | 0 |
| 1 | Wsh | PULSE | 15 | 0 |
| 2 | Act | PULSE | 5 | 0 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 6 | 0 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 2 | 900 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 2 | 600 |
| 24 | 7 + Act | PULSE | 5 | 200 |
| 2 | Act | PULSE | 1 | 500 |
| 2 | Act | PULSE | 3 | 200 |
| 1 | Wsh | PULSE | 7 | 200 |
| 1 | Wsh | PULSE | 10 | 0 |

11.5.2 Aufarbeitung und Reinigung

Nach Abschluss der DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet, anschließend geöffnet und das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Oligonukleotidstränge vom Trägermaterial abzuspalten sowie zur Entfernung der Schutzgruppen wurden 700 µL konzentrierte Ammoniaklösung (>25%, *trace select*, Fluka) zugegeben und über 12 h bei 45 °C erhitzt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde das CPG mittels Zentrifugenfilter abgetrennt und zweimal mit je 300 µL HPLC reinem Wasser gewaschen. Die gesammelten Filtratlösungen wurden vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (35 min, Heizung 30 min, 100 mbar) vom Ammoniak und einem großen Teil des Wassers (gefriergetrocknen, 10 h, 0.1 mbar) befreit. Zur Reinigung mittels *reversed-phase* HPLC wurden die gefriergetrockneten Proben in 300 µL Wasser aufgenommen. Oligonukleotide, die postsynthetisch modifiziert wurden, mussten nach erfolgter postsynthetischer Modifikation zunächst entsalzt werden, ehe sie durch *reversed-phase* HPLC getrennt werden konnten. Zur Analytik und präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 11.3: Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten und –säulen, sowie die Detektionswellenlängen zur Oligonukleotidreinigung. Erläuterungen: A = 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6.5), B = MeCN

| DNA/Modifikation | Säule | Gradient | Detektion |
|---------------------|---|-------------------------|---|
| TR (Monomer) | <i>Supelcosil</i> LC-318 | 0 – 20 % B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 630 \text{ nm}$ |
| TO (Monomer) | <i>Supelcosil</i> LC-318 | 0 - 20 % B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 490 \text{ nm}$ |
| TO, TR (Dimer / MB) | 1. <i>Discovery</i> [®] <i>Bio</i> | 1. 0 – 15 % B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 512 \text{ nm}, 630 \text{ nm}$ |
| | 2. <i>Supelcosil</i> LC-318 | 2. 0 - 20 % B (45 min.) | |
| CyIQ, TR (Dimer) | <i>Supelcosil</i> LC-318 | 0 – 20% B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 495 \text{ nm}, 630 \text{ nm}$ |

11.5.3 Charakterisierung modifizierter DNA

Charakterisierung der Oligonukleotide durch ESI-MS / MALDI-TOF

ESI-Massenspektren von Oligonukleotiden wurden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg an einem *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000* im negativen Ionisierungsmodus aufgenommen. MALDI-TOF-Massenspektren wurden am Karlsruher Institut für Technologie an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linearen negativen Modus gemessen (siehe Kapitel 11.1).

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde aus dem *Lambert-Beerschen Gesetz* über die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt.^[251] Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten DNA-Strangs in Wasser kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot \epsilon_A + C \cdot \epsilon_C + G \cdot \epsilon_G + T \cdot \epsilon_T) \cdot 0.9$$

Dabei steht A, C, G und T für die Anzahl der entsprechenden Nukleobasen, ϵ beschreibt die Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität. Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide muss der entsprechende Extinktionskoeffizient der Modifikationen addiert werden.

Hybridisierung

Der modifizierte Einzelstrang wird zusammen mit 1.2 eq. des komplementären, unmodifizierten Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (Na-P_i) für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Im Falle einer Hybridisierung zweier modifizierter Oligonukleotide wird je 1.0 eq beider Stränge verwendet.

11.6 RNA-Synthese

11.6.1 Synthese modifizierter RNA

Allgemein

Die Synthese erfolgte an einem *PerSeptive Biosystems Expedite 8909* von *ABI* genauso wie unter 11.5.1 beschrieben. Das Profil wurde am Gerät von DNA auf RNA geändert. Es wurden RNA-Basen (*Fast Deprotection* DMT-2'O-TBDMS-rC(tac), -rG(tac), -rA(tac), -rU Amidite) und CPGs (*Fast Deprotection* CPG rC(tac), rG(tac), rU) der Firma *Proligo* verwendet. Alle RNA Basen wurden als 0.6 M Lösung in MeCN eingesetzt. Synthetisch hergestellte Basenanaloga wurden ebenfalls in Acetonitril gelöst und als 0.13 M Lösung verwendet.

Kopplungsprotokolle

Vergleicht man ein Standardkopplungsprotokoll für DNA Basen mit dem von RNA-Basen, so lassen sich folgende Unterschiede feststellen: zunächst dauert der Deblocking-Schritt einer RNA-Base länger als der einer DNA-Base. Es werden pro Kopplungszyklus 15 Pulse des Amidits statt 7 Pulse (vgl. Tabelle 11.1) gepumpt. Zudem dauert ein Kopplungsschritt für eine RNA Base 759 s, wohingegen die Kopplung einer DNA-Base nur 96 s dauert. Sowohl die Menge an Caps als auch die Menge an Oxidizer ist größer; zudem ist die *Capping*-Dauer um 15 s verlängert (siehe Tabelle 11.4).

Tabelle 11.4: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von rA, rG, rC, rU. Erläuterungen: **Dblk:** 3 % Dichloressigsäure in CH₂Cl₂; **Wsh:** MeCN; **Act:** 0,45 M Tetrazol in MeCN; **Caps:** Ac₂O in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox:** Iod in Wasser/THF/Pyridin.

| Codierung | Funktion | Modus | Menge / Arg1 | Zeit / Arg2 |
|---------------|--------------------|-------|--------------|------------------------|
| \$ Deblocking | | | | |
| 24 | Index Fract. Coll. | NA | 1 | 0 |
| 0 | Default | WAIT | 0 | 1.5 |
| 21 | Trytl Mon. On/Off | NA | 1 | 1 |
| 16 | Dblk | PULSE | 10 | 0 |
| 16 | Dblk | PULSE | 50 | 60 (49 bei DNA) |
| 38 | Diverted Wsh A | PULSE | 40 | 0 |

| | | | | |
|--------------|--------------------|-------|---------------------------------------|-----|
| 21 | trityl Mon. On/Off | NA | 0 | 1 |
| 38 | Diverted Wsh A | PULSE | 40 | 0 |
| 21 | Index Fract. Coll. | NA | 2 | 0 |
| \$ Coupling | | | | |
| 1 | Wsh | PULSE | 5 | 0 |
| 2 | Act | PULSE | 5 | 0 |
| 18 | A + Act | PULSE | 6 (5 im DNA Zyklus) | 0 |
| 18 | A + Act | PULSE | 9 (2 im DNA Zyklus) | 402 |
| 1 | Wsh | PULSE | 8 (zuvor zusätzl. Act bei DNA) | 357 |
| 1 | Wsh | PULSE | 7 | 0 |
| \$ Capping | | | | |
| 12 | Wsh A | PULSE | 20 | 0 |
| 13 | Caps | PULSE | 7 (8 im DNA Zyklus) | 0 |
| 13 | Caps | PULSE | 6 (fehlt im DNA Zyklus) | 15 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 6 | 15 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 2 | 0 |
| \$ Oxidizing | | | | |
| 15 | Ox | PULSE | 20 (15 im DNA Zyklus) | 0 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 15 | 0 |
| \$ Capping | | | | |
| 13 | Caps | PULSE | 7 | 0 |
| 12 | Wsh A | PULSE | 30 | 0 |

Um eine möglichst hohe Ausbeute an TO/TR-modifizierter RNA zu erreichen, wurde dementsprechend das Kopplungsprotokoll der Synthetischen Bausteine durch erhöhte Pulszahl und Kopplungsdauer modifiziert (Tabelle 11.5). *Capping*, *Oxidizing* sowie der *Washing* Schritt wurden dem Standardprotokoll für RNA-Basen angepasst.

Tabelle 11.5: Kupplungsprotokoll für die Einführung der Sonderbausteine TO und TR in RNA-Oligonukleotide.

| Codierung | Funktion | Modus | Menge / Arg1 | Zeit / Arg2 |
|-------------|----------------|-------|--------------|-------------|
| \$ Coupling | | | | |
| 1 | Wsh | PULSE | 5 | 0 |
| 2 | Act | PULSE | 6 | 0 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 6 | 0 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 2 | 1000 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 2 | 1000 |

| | | | | |
|----|----------------|-------|----------|-------------|
| 26 | 9 + Act | PULSE | 5 | 50 |
| 2 | Act | PULSE | 1 | 1000 |
| 2 | Act | PULSE | 3 | 300 |
| 1 | Wsh | PULSE | 7 | 200 |
| 1 | Wsh | PULSE | 15 | 0 |
| 2 | Act | PULSE | 6 | 0 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 6 | 0 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 2 | 1000 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 2 | 1000 |
| 26 | 9 + Act | PULSE | 5 | 50 |
| 2 | Act | PULSE | 1 | 1000 |
| 2 | Act | PULSE | 3 | 300 |
| 1 | Wsh | PULSE | 7 | 200 |
| 1 | Wsh | PULSE | 15 | 0 |

11.6.2 Aufarbeitung und Reinigung

Nach Abschluss der RNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet, anschließend geöffnet und das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Oligonukleotidstränge vom Trägermaterial abzuspalten sowie zur Entfernung der tac-Schutzgruppen, wurde 1 mL einer 1:1 (v/v) Lösung aus konzentrierter Ammoniaklösung (>25%, *trace select*, Fluka)/Methylamin (in EtOH) zugegeben und für 20 min bei 65 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das CPG mittels Zentrifugenfilter abgetrennt und zweimal mit je 300 µL einer 1:1 (v/v) Mischung aus Wasser/EtOH gewaschen. Die gesammelten Filtratlösungen wurden vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (12 h, 0.1 mbar) lyophilisiert. Die erhaltenen Pellets wurden in 300 µL EtOH resuspendiert und anschließend evaporiert (2 h, 80 mbar). Die trockenen Pellets wurden in 300 µL DMSO vollständig gelöst und nach der Zugabe von 300 µL ET₃N*3HF für 2.5 h bei 65 °C erhitzt. Nach dem die RNA auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 600 µL Trimethyl(propoxy)silan zugegeben und unter ständigem Belüften 10 min geschüttelt, woraufhin die RNA ausfiel. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene RNA Pellet zweimal mit 1 mL kaltem Diethylether gewaschen und lyophilisiert (20 min, 500 mbar). Zur Reinigung mittels *reversed-phase* HPLC wurden die gefriergetrockneten Proben in 300 µL Wasser

aufgenommen. Oligonukleotide, die postsynthetisch modifiziert wurden, mussten nach erfolgter postsynthetischer Modifikation zunächst entsalzt werden, ehe sie durch *reversed-phase* HPLC getrennt werden konnten. Zur Analytik und präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 11.6: Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten und –säulen, sowie die Detektionswellenlängen zur Oligonukleotidreinigung. Erläuterungen: A = 100 mM NH₄HCO₃-Puffer, B = MeCN

| RNA/Modifikation | Säule | Gradient | Detektion |
|------------------|-------------------|----------------------|---|
| TR (Monomer) | Supelcosil LC-318 | 0 – 20 % B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 630 \text{ nm}$ |
| TO (Monomer) | Supelcosil LC-318 | 0 – 20% B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 490 \text{ nm}$ |
| CylQ (Monomer) | Supelcosil LC-318 | 0 – 20 % B (45 min.) | $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 495 \text{ nm}$ |

11.6.3 Charakterisierung modifizierter RNA

Die Charakterisierung der modifizierten RNA-Oligonukleotide erfolgte analog dem in Kapitel 11.5.3 beschriebenen Verfahren für DNA-Oligonukleotide.

11.7 Klickreaktion

Zur postsynthetischen Modifikation **kU** markierter DNA-/RNA-Oligonukleotide wird eine Klick-Reaktion nach den unten aufgeführten Bedingungen mit anschließender Entsalzung und Reinigung mittels HPLC durchgeführt.

11.7.1 Klickreaktion an modifizierte DNA

Synthesevorschrift

Nach erfolgter Abspaltung von den CPG-Säulen werden die gefriergetrockneten DNA-Stränge mit je 25 μL (10 μmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser), 34 μL (3.4 μmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1), 17 μL (0.17 μmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) und 114 μL (1.14 μmol) einer Lösung des Azids **12** (10 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) versetzt und 15 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand in 100 μL (0.15 mmol) Natriumacetat-Lösung (0.3 M in Wasser) und 1 mL EtOH aufgenommen und über Nacht bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Nach Abzentrifugieren (15 min. bei 13000 rpm) wird der Überstand vorsichtig vom DNA-Pellet entfernt. Der Rückstand wird mit 1 mL EtOH (70 Vol-%) gewaschen, erneut abzentrifugiert (15 min. bei 13000 rpm) und der Überstand nochmals vorsichtig abpipettiert. Das DNA-Pellet wird anschließend im flüssigen Stickstoff ausgefroren, lyophilisiert und wieder in 500 μL Wasser aufgenommen.

Entsalzen

Um die DNA-Stränge über RP-HPLC zu reinigen ist es notwendig, die Oligonukleotidstränge zunächst von überschüssigen Kupfersalzen zu befreien. Dazu werden *illustra NAP-5*-Säulen der Firma *GE-Healthcare* verwendet. Zuerst müssen die Säulen mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers equilibriert werden. Anschließend wird der entsprechende DNA-Strang in 500 μL Wasser aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Das Oligonukleotid wird mit 1 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers eluiert und zur Verringerung des Probenvolumens in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

11.7.2 Klickreaktion an modifizierte RNA

Synthesevorschrift

Nach erfolgter Abspaltung von den CPG-Säulen werden die gefriergetrockneten RNA-Stränge vor der TBDMS-Entschützung am 2'OH mit je 25 μL (10 μmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in RNase freiem Wasser), 34 μL (3.4 μmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1), 17 μL (0.17 μmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) und 114 μL (1.14 μmol) einer Lösung des Azids (**CylQ**, 10 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) versetzt und 15 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand in 100 μL (0.15 mmol) frisch hergestellter Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (0.3 M in RNase freiem Wasser) aufgenommen. Nach 1 h wird 1 mL EtOH hinzugegeben und über Nacht bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Nach Abzentrifugieren (15 min. bei 13000 rpm) wird der Überstand vorsichtig vom RNA-Pellet entfernt und lyophilisiert, da die RNA nicht vollständig ausgefallen ist. Auf weitere Reinigungsschritte des Pellets mit EtOH wird auf Grund der partiellen Löslichkeit der RNA in EtOH verzichtet. Sowohl das RNA Pellet, als auch der erhaltene Rückstand des Überstands werden in flüssigem Stickstoff ausgefroren, lyophilisiert und in je 500 μL eines 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers gelöst.

Entsalzen

Um die RNA-Stränge über RP-HPLC zu reinigen ist es notwendig, die Oligonukleotidstränge zunächst von überschüssigen Kupfersalzen zu befreien. Dazu werden *illustra NAP-5*-Säulen der Firma *GE-Healthcare* verwendet. Zuerst müssen die Säulen mit 10 mL eines 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers equilibriert werden. Anschließend wird der entsprechende RNA-Strang (aufgenommen in 500 μL 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer) auf die Säule aufgetragen. Das Oligonukleotid wird mit 1 mL eines 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffers eluiert. Diese Reinigungsschritte werden jeweils wiederholt, da sich das RNA-Pellet nur unvollständig im verwendeten Puffer löst. RNA-Farbstoffkonjugate werden in den entsprechenden Fraktionen durch Absorption bei 260 nm (RNA-Basen) und 510 nm (charakteristische CylQ-Absorbanz) identifiziert. Zur Verringerung des Probenvolumens werden die vereinigten Fraktionen in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

11.8 Liste verwendeter DNA- und RNA-Sequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen der verwendeten modifizierten Oligonukleotide, sowie deren MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten angegeben.

11.8.1 DNA-Sequenzen

Chromophor-Chromophor-Orientierung (Kapitel 4.2)

| | |
|--------------|---|
| DNA 1 | 5` GCA – TGC – AGT – T TR A – CTG – AC 3` |
| DNA 2 | 5` GTC – AGT – T TO A – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 3 | 5` GCA – TGC – AGT – T TO A – CTG – AC 3` |
| DNA 4 | 5` GTC – AGT – T TR A – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 5 | 5` GCA – TGC – AGT – T TO A – CTG – AC 3` |
| DNA 6 | 5` GTC – AGT – T TR AA – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 7 | 5` GCA – TGC – AGT – T TR AA – CTG – AC 3` |
| DNA 8 | 5` GTC – AGT – T TO A – CTG – CAT – GC 3` |

Tabelle 11.7: ESI-Massen und ϵ -Werte der TO- und TR-modifizierten Oligonukleotide **DNA1-DNA8**.

| DNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L* mol^{-1} * cm^{-1}] |
|--------------|-----------------------------|---|--|
| DNA 1 | 5433 | 1357.9 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 155500 |
| | | 1810.9 [M ⁺ -4H] ³⁺ | |
| DNA 2 | 5398 | 1798.8 [M-3H ⁺] ³⁻ | 149600 |
| | | 1349.2 [M-4H ⁺] ⁴⁺ | |
| DNA 3 | 5407 | 1802.2 [M ⁺ -4H ⁺] ³⁺ | 155500 |
| | | 1351.3 [M ⁺ -5H ⁺] ⁴⁺ | |
| DNA 4 | 5425 | 1355.4 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 149600 |
| | | 1807.4 [M ⁺ -4H] ³⁺ | |
| DNA 5 | 5407 | 1351.2 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 155500 |
| | | 1802.2 [M ⁺ -4H] ³⁺ | |
| DNA 6 | 5434 | 1357.7 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 155500 |
| | | 1810.8 [M ⁺ -4H] ³⁺ | |
| DNA 7 | 5443 | 1360.0 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 161500 |
| | | 1813.7 [M ⁺ -4H] ³⁺ | |
| DNA 8 | 5398 | 1349.0 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 149600 |
| | | 1799.0 [M ⁺ -4H] ³⁺ | |

Chromophor-Chromophor-Abstand (Kapitel 4.3)

| | |
|---------------|---|
| DNA 9 | 5` CAT – GCA – GAT – T TRA – CTG – AC 3` |
| DNA 10 | 5` CAT – GCA – GAT – TAA – TRTG – AC 3` |
| DNA 11 | 5` GTC – AGT – T TO – TCT – GCA – TG 3` |
| DNA 12 | 5` GTC – AGT – TAA – TOCT – GCA – TG 3` |
| DNA 13 | 5` GTC – AGT – TAA – TTOT – GCA – TG 3` |

Tabelle 11.8: ESI-Massen und ϵ -Werte der TO- und TR-modifizierten Oligonukleotide **DNA9-DNA13**.

| DNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] |
|---------------|-----------------------------|---|--|
| DNA 9 | 5418 | 1353.8 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 158900 |
| | | 1805.4 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |
| DNA 10 | 5442 | 1361.8 [M ⁺ +3H] ⁴⁺ | 166100 |
| | | 1815.8 [M ⁺ +2H] ³⁺ | |
| DNA 11 | 5413 | 1352.6 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 150900 |
| | | 1804.3 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |
| DNA 12 | 5422 | 1355.1 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 156900 |
| | | 1807.2 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |
| DNA 13 | 5437 | 1358.7 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 158200 |
| | | 1811.9 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |

Chromophor-Anbindung (Kapitel 4.4)

| | |
|---------------|---|
| DNA 14 | 5` GCA – TGC – AGT – A TRA – CTG – AC 3` |
| DNA 15 | 5` GTC – AGT – T kUA – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 16 | 5` GCA – TGC – AGT – T kUA – CTG – AC 3` |
| DNA 17 | 5` GTC – AGT – A TRA – CTG – CAT – GC 3` |

Tabelle 11.9: ESI-Massen^(a) bzw. MALDI-Massen^(b) und ϵ -Werte der TO- und TR-modifizierten Oligonukleotide **DNA14-DNA17**.

| DNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] |
|-----------------------------|-----------------------------|---|--|
| DNA 14^(a) | 5442 | 1359.9 [M ⁺ -5H] ⁴⁺ | 161500 |
| | | 1813.8 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |
| DNA 15^(b) | 5589 | 5587.5 | 158600 |
| DNA 16^(b) | 5598 | 5597.6 | 164600 |

| | | | |
|-----------------------------|------|--|--------|
| DNA 17^(a) | 5433 | 1357.6 [M ⁺ -5H] ⁴⁻ 1810.8 [M ⁺ -4H] ³⁻ | 155500 |
|-----------------------------|------|--|--------|

CylQ als ET-Donor für TR (Kapitel 6)

| | |
|---------------|--|
| DNA 18 | 5` GCA – TGC – AGT – A TRA – CTG – AC 3` |
| DNA 19 | 5` GTC – AGT – A CylQA – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 20 | 5` GCA – TGC – AGT – A CylQA – CTG – AC 3` |
| DNA 21 | 5` GTC – AGT – A TRA – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 22 | 5` GCA – TGC – AGT – CylQAA – CTG – AC 3` |
| DNA 23 | 5` GTC – AGT – CylQAA – CTG – CAT – GC 3` |
| DNA 24 | 5` CAT – GCA – GTT – CylQTRA – CTG – AC 3` |
| DNA 26 | 5` TGC – ATG – CA CylQ – A TRA – CTG – AC 3` |

Die CylQ-modifizierten Oligonukleotide **DNA 19**, **DNA 20**, **DNA 22** sowie **DNA 23** wurden von *Moritz Rubner* synthetisiert und bereitgestellt.

Tabelle 11.10: ESI-Massen und ϵ -Werte der TO- und TR-modifizierten Oligonukleotide **DNA18**, **DNA21**, **DNA 24** und **DNA 26**.

| DNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] |
|---------------|-----------------------------|---|--|
| DNA 18 | 5442 | 1359.9 [M ⁺ -5H] ⁴⁻ | 161500 |
| | | 1813.8 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |
| DNA 21 | 5433 | 1357.6 [M ⁺ -5H] ⁴⁻ | 155500 |
| | | 1810.8 [M ⁺ -4H] ³⁻ | |
| DNA 24 | 5803 | 1449.9 [M-6H] ⁴⁻ | 154000 |
| | | 1934.0 [M-5H] ³⁻ | |
| DNA 26 | 5812 | 1452.1 [M-6H] ⁴⁻ | 160000 |
| | | 1936.4 [M-5H] ³⁻ | |

Molecular Beacons (Kapitel 5.1)

| | |
|-------------|---|
| MB 1 | 5` CAGTT TO ACTGGTCAGTTGACTGCATGCCAGTT TR ACTG 3` |
| MB 2 | 5` CAGTT TO ACTGGTCAGTTGACTGCATGTCAGTT TR ACTG 3` |
| MB 3 | 5` AGTT TO ACTAGTCAGGTTACTGCATGTCAGTT TR ACT 3` |

MB 4 5` GTT**TO**ACTAGTCAGTTGACTGCATGTCGCTT**TR**AC 3`
MB 5 5` CAGT**TR**A**ACT**GGTCAGTTGACTGCATGCCAGT**TO**TACTG 3`

 Tabelle 11.11: ESI-Massen und ϵ -Werte der TO- und TR-modifizierten Oligonukleotide **MB 1-MB 5**.

| DNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] |
|-------------|-----------------------------|--|--|
| MB 1 | 11831 | 1971.3 [M ²⁺ -8H] ⁶⁻ | 331500 |
| | | 2366.4 [M ²⁺ -7H] ⁵⁻ | |
| MB 2 | 11846 | 1973.8 [M ²⁺ -8H] ⁶⁻ | 332800 |
| | | 2369.3 [M ²⁺ -7H] ⁵⁻ | |
| MB 3 | 11212 | 1686.0 [M ²⁺ -8H] ⁶⁻ | 319100 |
| | | 2242.2 [M ²⁺ -7H] ⁵⁻ | |
| MB 4 | 10571 | 1761.7 [M ²⁺ -8H] ⁶⁻ | 290000 |
| | | 2114.1 [M ²⁺ -7H] ⁵⁻ | |
| MB 5 | 11840 | 1973.4 [M ²⁺ -8H] ⁶⁻ | 337400 |
| | | 2368.7 [M ²⁺ -7H] ⁵⁻ | |

Aptasensoren (Kapitel 5.2)

APT1a 5` TGC – GGA – GGA – AGT – **TR**GT 3`
APT1b 5` ACT – **TO**CT – GGG – GGA – GTA – T 3`
APT2a 5` TGC – GGA – GGA – AG**TO** – TGT 3`
APT2b 5` ACT**TR** – ACT – GGG – GGA – GTA – T 3`
APT3a 5` TGC – GGA – GGA – AGG – TT**TR** – AC 3`
APT3b 5` GTT – **TO**AC – CTG – GGG – GAC – TAT 3`

 Tabelle 11.12: MALDI-Massen und ϵ -Werte der TO- und TR-modifizierten Oligonukleotide **APT1-APT3**.

| DNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹] |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| APT1a | 5174 | 5175.5 | 149600 |
| APT1b | 4936 | 4936.6 | 145600 |
| APT2a | 5209 | 5211.0 | 155500 |
| APT2b | 4910 | 4910.0 | 145600 |
| APT3a | 5807 | 5808.4 | 168000 |
| APT3b | 5539 | 5540.2 | 166100 |

11.8.2 RNA-Sequenzen

| | |
|--------|--|
| RNA 1 | 5` GCA – UGC – AGU – U TRA – CUG – AC 3` |
| RNA 2 | 5` GUC – AGU – U TOA – CUG – CAU – GC 3` |
| RNA 3 | 5` GCA – UGC – AGU – U TOA – CUG – AC 3` |
| RNA 4 | 5` GUC – AGU – U TRA – CUG – CAU – GC 3` |
| RNA 5 | 5` GCA – UGC – AGU – TOUA – CUG – AC 3` |
| RNA 6 | 5` GUC – AGU – TRAA – CUG – CAU – GC 3` |
| RNA 7 | 5` CAA – G CTR – GAC – CCU – GAA – GUU – CTT 3` |
| RNA 8 | 5` GAA – CUU – CAG – GGU – C ATO – CUU – GTT 3` |
| RNA 9 | 5` GCA – A TRC – UGA – CCC – UGA – AGU – UCA – U 3` |
| RNA 10 | 5` GAA – CUU – CAG – GGU – CAG – C TOU – GCC – G 3` |
| RNA 11 | 5` GCA – AGC – UGA – CCC – UGA – A TRU – UCA – U 3` |
| RNA 12 | 5` GAA – C TOU – CAG – GGU – CAG – CUU – GCC – G 3` |
| RNA 13 | 5` GCA – GUC – UU CyIQ – UUC – ACU – GA 3` |
| RNA 14 | 5` CyIQUC – ACU – CUU – AUU – CAC – UAU 3` |

Tabelle 11.13: MALDI-Massen und ϵ -Werte der TO-,TR- und CyIQ modifizierten Oligonukleotide RNA 1-RNA 14.

| RNA-Strang | errechnete Masse [g/mol] | gefundene Masse [g/mol] | ϵ_{260} [L* mol^{-1} * cm^{-1}] |
|------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| RNA 1 | 5633 | 5633.2 | 155500 |
| RNA 2 | 5584 | 5581.5 | 149600 |
| RNA 3 | 5607 | 5606.1 | 155500 |
| RNA 4 | 5610 | 5637.5 | 149600 |
| RNA 5 | 5607 | 5603.4 | 155500 |
| RNA 6 | 5633 | 5633.8 | 155500 |
| RNA 7 | 6875 | 6870.4 | 190400 |
| RNA 8 | 6866 | 6864.4 | 189800 |
| RNA 9 | 7208 | 7207.0 | 204300 |
| RNA 10 | 7253 | 7249.8 | 200200 |
| RNA 11 | 7208 | 7207.1 | 204300 |
| RNA 12 | 7253 | 7252.9 | 200200 |
| RNA 13 | 5715 | 5716.7 | 157100 |
| RNA 14 | 5926 | 5924.3 | 161800 |

11.9 Im Hauptteil nicht dargestellte DNA/RNA-Spektren

Aus Platzgründen konnten im Hauptteil nicht alle relevanten Spektren dargestellt werden. Dies wird im folgenden Teil nachgeholt.

11.9.1 Titrationsversuche mit MB 2 – MB 4 und den jeweiligen Gegensträngen

Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurden Wartezeiten (erhalten durch kinetische Messungen siehe Kapitel 5.1.2) eingehalten, um eine vollständige Öffnung durch den dazugehörigen Gegenstrang des jeweiligen MB zu garantieren.

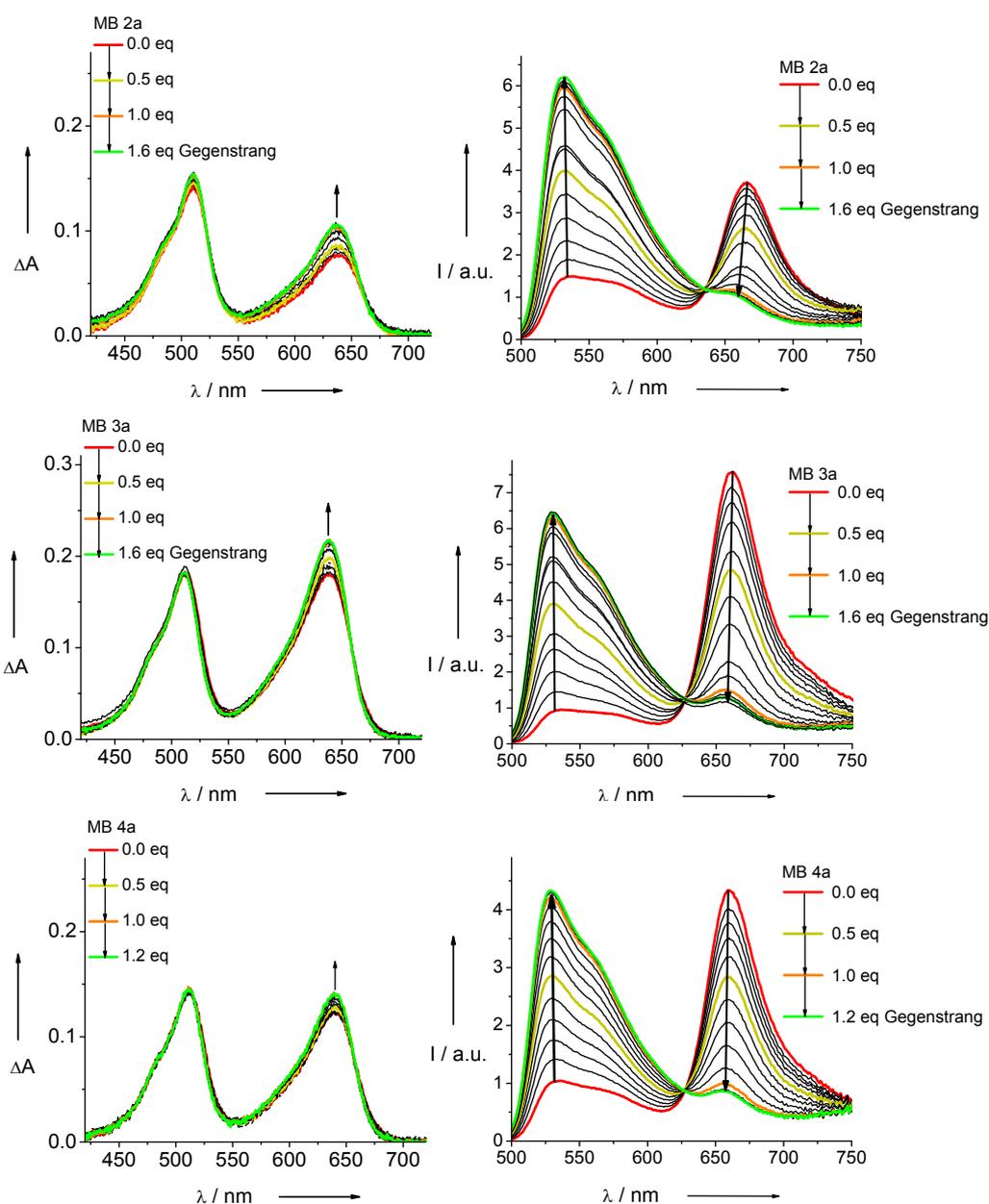


Abb. 11.1: Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) der Titration von **MB 2 – MB 4** in der Haarnadelform mit den jeweiligen Gegensträngen zu **MB 2a – MB 4a** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$).

11.9.2 Titration von MB 1 zu MB 1c mit einer verkürzten Wartezeit zwischen den einzelnen Titrationsschritten

Durch die Verkürzung der Wartezeit zwischen den einzelnen Titrationsschritten von einer Stunde auf ~4 Minuten, konnte eine vollständige Öffnung des MBs erst mit 8.0 eq des entsprechenden Gegenstrangs beobachtet werden.

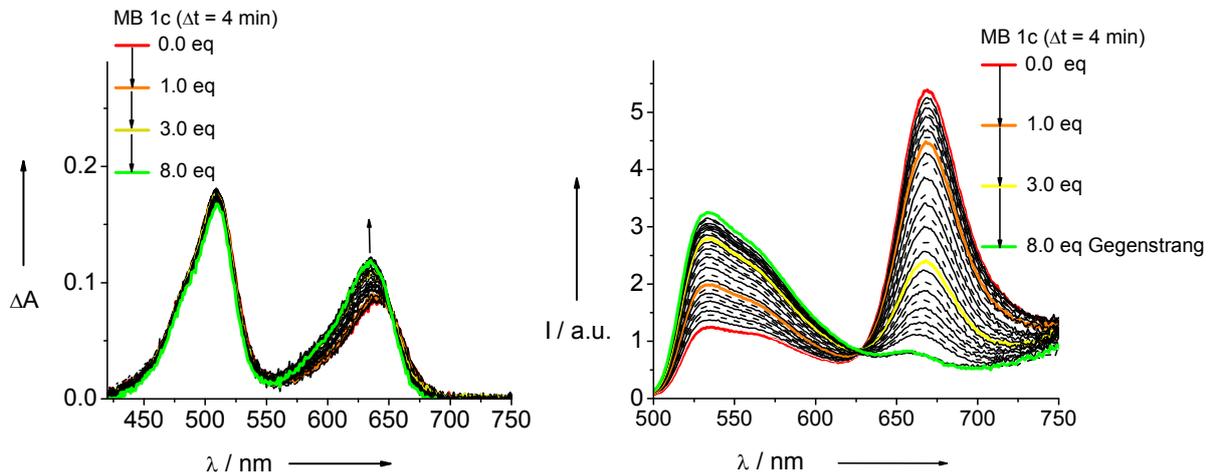


Abb. 11.2: Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) der Titration von **MB 1** in der Haarnadelform mit dem dazugehörigen Gegenstrang zu **MB 1c** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$) mit einer Wartezeit von ~4 min zwischen den einzelnen Titrationsschritten.

12 Literaturverzeichnis

- [1] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237-247.
- [2] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297-302.
- [3] J. Bath, A. J. Turberfield, *Nature Nanotech.* **2007**, *2*, 275-284.
- [4] G. W. Collie, G. N. Parkinson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5867-5892.
- [5] A. Patwa, A. Gissot, I. Bestel, P. Barthélémy, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5844-5854.
- [6] L. Kruglyak, D. A. Nickerson, *Nat. Genetics* **2001**, *27*, 234-236.
- [7] C. M. Ulrich, E. L. Goode, J. D. Potter, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2002**, *11*, 1513-1530.
- [8] T. Emahazion, L. Feuk, M. Jobs, S. L. Sawyer, D. Fredman, D. St Clair, J. A. Prince, A. J. Brookes, *Trends Gen.* **2001**, *17*, 407-413.
- [9] M. V. Relling, T. Dervieux, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 99.
- [10] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177-186.
- [11] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 505-508.
- [12] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463.
- [13] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, WILEY-VCH, **2002**.
- [14] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition ed., Kluwer Academic / Plenum Publishers, **1999**.
- [15] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641-2684.
- [16] T. Förster, *Annalen der Physik* **1948**, *6*, 55-75.
- [17] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 187-191.
- [18] J. H. M. Sauer, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, WILEY-VCH, **2011**.
- [19] D. M. J. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 507-517.
- [20] R. M. Clegg, A. I. H. Murchie, A. Zechel, D. M. J. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2994-2998.
- [21] C. Gohlke, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, R. M. Clegg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11660-11664.
- [22] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.

- [23] G. S. Bassi, N. E. Mollegaard, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3345-3354.
- [24] N. G. Walter, J. M. Burke, D. P. Millar, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 544-549.
- [25] H. Fang, D. J. Clark, J. J. Hayes, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1475-1484.
- [26] A. Kienzler, R. Flehr, R. A. Kramer, S. Gehne, M. U. Kumke, W. Bannwarth, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1852-1863.
- [27] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [28] M. A. Campbell, J. Wengel, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680-5689.
- [29] C. Dohno, K. Nakatani, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5718-5729.
- [30] P. Murat, Y. Singh, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293-5307.
- [31] M. E. Ostergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771-5788.
- [32] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 856-870.
- [33] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547-553.
- [34] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [35] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.
- [36] S. Tyagi, S. A. E. Marras, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.
- [37] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526-528.
- [38] S. Jockusch, A. A. Marti, N. J. Turro, Z. Li, X. Li, J. Ju, N. Stevens, D. L. Akins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 493-498.
- [39] P. Zhang, T. Beck, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 402-405.
- [40] A. A. Marti, S. Jockusch, Z. Li, J. Ju, N. J. Turro, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e50.
- [41] X. X. Li, Z. M. Li, A. A. Marti, S. Jockusch, N. Stevens, D. L. Akins, N. J. Turro, J. Y. Ju, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 896-902.
- [42] N. Venkatesan, Y. J. Seo, B. H. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 648-663.
- [43] G. T. Hwang, Y. J. Seo, B. H. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6528-6529.
- [44] R. Häner, S. M. Biner, S. M. Langenegger, T. Meng, V. L. Malinovskii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1227-1230.
- [45] Y. J. Seo, G. T. Hwang, B. H. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4037-4039.
- [46] S. M. Biner, R. Haner, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2733-2736.

- [47] P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336-342.
- [48] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.
- [49] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865-868.
- [50] F. Menacher, H. A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1275-1278.
- [51] H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044-7047.
- [52] H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2006**, 2768-2770.
- [53] H. Kashida, M. Komiyama, H. Asanuma, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 934-935.
- [54] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2418-2421.
- [55] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746-2748.
- [56] E. Socher, L. Bethge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9555-9559.
- [57] D. V. Jarikote, N. Krebs, S. Tannert, B. Röder, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 300-310.
- [58] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1931-1934.
- [59] Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5502-5506.
- [60] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3923-3933.
- [61] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2371-2380.
- [62] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11551-11558.
- [63] J. N. Wilson, Y. N. Teo, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15426-15427.
- [64] F. Samain, S. Ghosh, Y. N. Teo, E. T. Kool, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7025-7029.
- [65] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [66] S. Ikeda, H. Yanagisawa, A. Nakamura, D. O. Wang, M. Yuki, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4199-4204.

- [67] S. Ikeda, T. Kubota, D. O. Wang, H. Yanagisawa, T. Umemoto, A. Okamoto, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2871-2880.
- [68] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, A. Okamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6480-6484.
- [69] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307-9310.
- [70] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Queseda, R. P. Haugland, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2803-2812.
- [71] A. Mishra, R. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973-2011.
- [72] J. W. Park, Y. Kim, K. J. Lee, D. J. Kim, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 350-362.
- [73] J. R. Carreon, K. M. Stewart, J. Kerry P. Mahon, S. Shin, S. O. Kelley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5182-5185.
- [74] T. B. Morrison, J. J. Weis, C. T. Wittwer, *Biotechniques* **1998**, *24*, 954-958, 960, 962.
- [75] J. L. Yin, N. A. Shackel, A. Zekry, P. H. McGuinness, C. Richards, K. V. Putten, G. W. McCaughan, J. M. Eris, G. A. Bishop, *Immun. Cell Biol.* **2001**, *79*, 213-221.
- [76] R. H. L. Deprez, A. C. Fijnvandraat, J. M. Ruijter, A. F. M. Moorman, *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 63-69.
- [77] M. Levitus, S. Ranjit, *Quart. Rev. Biophys.* **2011**, *44*, 123-151.
- [78] S. Olsen, R. H. McKenzie, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 234306-234301-234314.
- [79] E. Akesson, V. Sundstrom, T. Gillbro, *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *121*, 513-522.
- [80] J. E. I. Korppitommola, A. Hakkarainen, T. Hukka, J. Subbi, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 8482-8491.
- [81] W. Sibbett, J. R. Taylor, D. Welford, *Ieee J. Quantum Electr.* **1981**, *17*, 500-509.
- [82] G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [83] X. Peng, T. Wu, J. Fan, J. Wang, S. Zhang, F. Song, S. Sun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4180-4183.

- [84] H. Ozhalici-Unal, C. L. Pow, S. A. Marks, L. D. Jesper, G. L. Silva, N. I. Shank, E. W. Jones, J. M. Burnette, P. B. Berget, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12620-12621.
- [85] B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *253*, 55-76.
- [86] A. N. Glazer, H. S. Rye, *Nature* **1992**, *359*, 859-861.
- [87] M. M. Becker, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3664-3666.
- [88] L. P. G. Wakelin, *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 275-340.
- [89] L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2027-2033.
- [90] H. Zhu, S. M. Clark, S. C. Benson, H. S. Rye, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1941-1948.
- [91] H. S. Rye, J. M. Dabora, M. A. Quesada, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 144-150.
- [92] H. S. Rye, B. L. Drees, H. C. M. Nelson, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25229-25238.
- [93] G. T. Hirons, J. J. Fawcett, H. A. Crissman, *Cytometry* **1994**, *15*, 129-140.
- [94] Z. X. Zeng, S. C. Benson, A. N. Glazer, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 256-260.
- [95] S. C. Benson, Z. X. Zeng, A. N. Glazer, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 247-255.
- [96] P. B. Dervan, *Science* **1986**, *232*, 464-471.
- [97] E. J. Fechter, B. Olenyuk, P. B. Dervan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3591-3594.
- [98] E. J. Fechter, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8476-8485.
- [99] E. J. Fechter, B. Olenyuk, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16685-16691.
- [100] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Gopferich, H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239-1248.
- [101] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1685-1690.
- [102] J. Barbaric, C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 364-370.
- [103] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174-4175.
- [104] M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana, L. Zhang, E. Meggers, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 927-932.
- [105] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.
- [106] L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2439-2448.
- [107] M. Boyce, C. R. Bertozzi, *Nat. Meth.* **2011**, *8*, 638-642.

- [108] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [109] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [110] D. C. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7816-7817.
- [111] S. Otto, F. Bertocin, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7702-7707.
- [112] D. Graham, A. Enright, *Curr. Org. Synth.* **2006**, *3*, 9-17.
- [113] B. Seelig, A. Jaschke, *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 167-176.
- [114] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54-57.
- [115] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352-5358.
- [116] G. M. Husar, D. J. Anziano, M. Leuck, D. P. Sebesta, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 559-566.
- [117] H. A. Latham-Timmons, A. Wolter, J. S. Roach, R. Giare, M. Leuck, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1495-1497.
- [118] D. Graham, A. Grondin, C. McHugh, L. Fruk, W. E. Smith, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 4785-4788.
- [119] J. Sauer, A. Mielert, D. Lang, D. Peter, *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 1435-1445.
- [120] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8846-8847.
- [121] D. S. Jones, P. A. Barstad, M. J. Feild, J. P. Hachmann, M. S. Hayag, K. W. Hill, G. M. Iverson, D. A. Livingston, M. S. Palanki, A. R. Tibbetts, L. Yu, S. M. Coutts, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2138-2144.
- [122] D. S. Jones, J. P. Hachmann, S. A. Osgood, M. S. Hayag, P. A. Barstad, G. M. Iverson, S. M. Coutts, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 390-399.
- [123] S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. Mccue, H. L. Chappelle, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 71-76.
- [124] S. B. Rajur, C. M. Roth, J. R. Morgan, M. L. Yarmush, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 935-940.
- [125] B. Bornemann, S. P. Liu, A. Erbe, E. Scheer, A. Marx, *Chemphyschem* **2008**, *9*, 1241-1244.
- [126] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *2*, 565-598.

- [127] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [128] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [129] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [130] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber. Recl.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [131] H. Meier, H. Petersen, H. Kolshorn, *Chem. Ber. Recl.* **1980**, *113*, 2398-2409.
- [132] R. B. Turner, P. Goebel, B. J. Mallon, A. D. Jarrett, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 790-792.
- [133] K. J. Shea, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4846-4855.
- [134] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493.
- [135] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664-667.
- [136] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821-1826.
- [137] M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6257-6259.
- [138] I. S. Marks, J. S. Kang, B. T. Jones, K. J. Landmark, A. J. Cleland, T. A. Taton, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1259-1263.
- [139] T. S. Seo, Z. M. Li, H. Ruparel, J. Y. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 609-612.
- [140] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [141] M. G. Finn, H. C. Kolb, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Prog. Chem.* **2008**, *20*, 1-4.
- [142] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
- [143] E. Lallana, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8794-8804.
- [144] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [145] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chemistry & Biodiversity* **2006**, *3*, 509-514.
- [146] A. L. Stadler, J. O. D. Santos, E. S. Stensrud, A. Dembska, G. L. Silva, S. Liu, N. I. Shank, E. Kunttas-Tatli, C. J. Sobers, P. M. E. Gramlich, T. Carell, L. A.

- Peteanu, B. M. McCartney, B. A. Armitage, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1491-1502.
- [147] T. Ehrenschwender, B. R. Varga, P. Kele, H. A. Wagenknecht, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1761-1764.
- [148] S. Berndl, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 558-564.
- [149] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [150] C. Beyer, H. A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2230-2231.
- [151] H. Finkelstein, *Berichte* **1910**, *43*, 1528-1532.
- [152] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977-4986.
- [153] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.
- [154] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1845-1847.
- [155] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48-50.
- [156] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [157] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051-1054.
- [158] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.
- [159] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.
- [160] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466-3471.
- [161] C. Bond, K. S. LaForge, M. Tian, D. Melia, S. Zhang, L. Borg, J. Gong, J. Schluger, J. A. Strong, S. M. Leal, J. A. Tischfield, M. J. Kreek, L. Yu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9608-9613.
- [162] A.-C. Syvänen, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 930-942.
- [163] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1319-1330.
- [164] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4208-4215.
- [165] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- [166] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.
- [167] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715-3743.
- [168] A. B. Iliuk, L. Hu, W. A. Tao, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4440-4452.
- [169] M. Famulok, G. Mayer, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1349-1358.

- [170] E. J. Cho, J. W. Lee, A. D. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 241-264.
- [171] X. Fang, W. Tan, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 48-57.
- [172] Y. Liu, N. Tuleouva, E. Ramanculov, A. Revzin, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8131-8136.
- [173] X. Ouyang, R. Yu, J. Jin, J. Li, R. Yang, W. Tan, J. Yuan, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 782-789.
- [174] F. Li, J. Zhang, X. N. Cao, L. H. Wang, D. Li, S. P. Song, B. C. Ye, C. H. Fan, *Analyst* **2009**, *134*, 1355-1360.
- [175] Z. Tang, P. Mallikaratchy, R. Yang, Y. Kim, Z. Zhu, H. Wang, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11268-11269.
- [176] R. Nutiu, Y. F. Li, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1868-1876.
- [177] C. H. Lin, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 817-832.
- [178] Q. Li, Y. Kim, J. Namm, A. Kulkarni, G. R. Rosania, Y.-H. Ahn, Y.-T. Chang, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 615-623.
- [179] Q. Li, Y. T. Chang, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2922-2932.
- [180] A. Okamoto, S. Ikeda, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 958-968.
- [181] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 109-139.
- [182] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865-2869.
- [183] M. Olivier, *Mutation Res.* **2005**, *573*, 103-110.
- [184] F. M. D. L. Vega, K. D. Lazaruk, M. D. Rhodes, M. H. Wenz, *Mutation Res.* **2005**, *573*, 111-135.
- [185] M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950-6956.
- [186] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Methods* **2003**, *29*, 51-57.
- [187] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
- [188] H. J. Tanke, R. W. Dirks, T. Raap, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 49-54.
- [189] D. P. Bratu, B.-J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *13308-13313*.
- [190] K.-Y. Lin, R. J. Jones, M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874.
- [191] S. G. Srivatsan, H. Weizman, Y. Tor, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1334-1338.

- [192] R. Kawai, M. Kimoto, S. Ikeda, T. Mitsui, M. Endo, S. Yokoyama, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17286-17295.
- [193] Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Wissinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492-6497.
- [194] S. Berndl, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, DOI: 10.1039/b921227b.
- [195] A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [196] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [197] T. M. Rana, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *8*, 23-36.
- [198] D. R. Corey, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 8-11.
- [199] Z. Li, T. M. Rana, *Acc. Chem. Res.* **2012**.
- [200] A. Nykanen, B. Haley, P. D. Zamore, *Cell* **2001**, *107*, 309-321.
- [201] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, *115*, 209-216.
- [202] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature* **2000**, *404*, 293-296.
- [203] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363-366.
- [204] D. M. Dykxhoorn, J. Lieberman, *Cell* **2006**, *126*, 231-235.
- [205] C. V. Pecot, G. A. Calin, R. L. Coleman, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 59-67.
- [206] Y. Chen, L. Huang, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 1301-1311.
- [207] R. Natarajan, F. N. Salloum, B. J. Fisher, R. C. Kukreja, A. A. Fowler, 3rd, *Circ. Res.* **2006**, *98*, 133-140.
- [208] E. W. Song, P. C. Zhu, S. K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco, J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 709-717.
- [209] P. Kumar, H. S. Ban, S. S. Kim, H. Q. Wu, T. Pearson, D. L. Greiner, A. Laouar, J. H. Yao, V. Haridas, K. Habiro, Y. G. Yang, J. H. Jeong, K. Y. Lee, Y. H. Kim, S. W. Kim, M. Peipp, G. H. Fey, N. Manjunath, L. D. Shultz, S. K. Lee, P. Shankar, *Cell* **2008**, *134*, 577-586.
- [210] J. H. Jeong, H. Mok, Y.-K. Oh, T. G. Park, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *2009*, 5-14.

- [211] S. Reich, J. Fosnot, A. Kuroki, W. X. Tang, X. Y. Yang, A. Maguire, J. Bennett, M. Tolentino, *Mol. Vis.* **2003**, *9*, 210-216.
- [212] J. Shen, R. Samul, R. L. Silva, H. Akiyama, H. Liu, Y. Saishin, S. F. Hackett, S. Zinnen, K. Kossen, K. Fosnaugh, C. Vargeese, A. Gomez, K. Bouhana, R. Aitchison, P. Pavco, P. A. Campochiaro, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 225-234.
- [213] M. DiFiglia, M. Sena-Esteves, K. Chase, E. Sapp, E. Pfister, M. Sass, J. Yoder, P. Reeves, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, M. Manoharan, D. W. Y. Sah, P. D. Zamore, N. Aronin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17204-17209.
- [214] G. F. Deleavey, J. K. Watts, M. J. Damha, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2009**, *Chapter 16*.
- [215] J. K. Watts, G. F. Deleavey, M. J. Damha, *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 842-855.
- [216] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliensky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173-178.
- [217] D. Palliser, D. Chowdhury, Q. Y. Wang, S. J. Lee, R. T. Bronson, D. M. Knipe, J. Lieberman, *Nature* **2006**, *439*, 89-94.
- [218] Y. J. Zhang, P. Cristofaro, R. Silbermann, O. Pusch, D. Boden, T. Konkin, V. Hovanesian, P. R. Monfils, M. Resnick, S. F. Moss, B. Ramratnam, *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 336-342.
- [219] M. D. Krebs, E. Alsberg, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3054-3062.
- [220] R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, *Acc. Chem. Res.* **2012**.
- [221] M. L. Jain, P. Y. Bruice, I. E. Szabo, T. C. Bruice, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1284-1309.
- [222] J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.
- [223] H. Ito, M. Urushihara, X. G. Liang, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 311-315.
- [224] H. Peacock, A. Kannan, P. A. Beal, C. J. Burrows, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7295-7300.
- [225] Y. Wang, G. Sheng, S. Juranek, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2008**, *456*, 209-213.

- [226] Y. Wang, S. Juranek, H. Li, G. Sheng, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2008**, 456, 921-926.
- [227] S. A. Uhler, D. W. Cai, Y. F. Man, C. Figge, N. G. Walter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14230-14231.
- [228] K. Raemdonck, K. Remaut, B. Lucas, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Biochemistry* **2006**, 45, 10614-10623.
- [229] A. Jarve, J. Muller, I. H. Kim, K. Rohr, C. MacLean, G. Fricker, U. Massing, F. Eberle, A. Dalpke, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35.
- [230] M. Breunig, U. Lungwitz, R. Liebl, A. Goepferich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 14454-14459.
- [231] A. P. Lam, D. A. Dean, *Gene Therapy* **2010**, 17, 439-447.
- [232] L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Alvarez, *Gene Therapy* **2005**, 12, 1734-1751.
- [233] S. Akhtar, R. L. Juliano, *Trends Cell Biol.* **1992**, 2, 139-144.
- [234] A. R. Maranto, *Science* **1982**, 217, 953-955.
- [235] J. H. Sandell, R. H. Masland, *J. Histochem. Cytochem.* **1988**, 36, 555-559.
- [236] G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, *Science* **2002**, 296, 503-507.
- [237] B. N. G. Giepmans, T. J. Deerinck, B. L. Smarr, Y. Z. Jones, M. H. Ellisman, *Nat. Meth.* **2005**, 2, 743-749.
- [238] C. Meisslitzer-Ruppitsch, M. Vetterlein, H. Stangl, S. Maier, J. Neumuller, M. Freissmuth, M. Pavelka, A. Ellinger, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, 130, 407-419.
- [239] X. Shu, V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *PLoS Biol.* **2011**, 9, e1001041.
- [240] T. J. Deerinck, M. E. Martone, V. Levram, D. P. L. Green, R. Y. Tsien, D. L. Spector, S. Huang, M. H. Ellisman, *J. Cell Biol.* **1994**, 126, 901-910.
- [241] J. Lubke, *Microsc. Res. Techniq.* **1993**, 24, 2-14.
- [242] G. Balercia, S. Chen, M. Bentivoglio, *J. Neurosci. Meth.* **1992**, 45, 87-98.
- [243] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, 312, 217-224.
- [244] M. M. Rubner, *Dissertation Universität Regensburg* **2011**.
- [245] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7003-7008.

- [246] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- [247] G. Park, J. T. Tomlinson, M. S. Melvin, M. W. Wright, C. S. Day, R. A. Manderville, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 113-116.
- [248] B. S. Sproat, (Eds.: R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
- [249] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [250] H. E. Goolieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [251] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.

Curriculum Vitae

Geburtsdatum 22. März 1984
Geburtsort Regensburg
Nationalität Deutsch

Ausbildung

Nov 2009 – heute Doktorarbeit von Nov 2009 bis Okt 2010 an der Universität Regensburg, weiterhin von Nov 2010 bis heute am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter der Anleitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Thema: **Wellenlängenverschiebende DNA- und RNA-Sonden zur bioanalytischen Anwendung**

Sept 2009 Hochschulabschluss: Diplom Chemikerin (1.5)

Jan – Sept 2009 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht an der Universität Regensburg (1.0)

Thema: **Synthese von Cyaninfarbstoffen als fluoreszente DNA-Basen**

Okt 2004- Sept 2009 Studium der Chemie an der Universität Regensburg

Jun 2003 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (1.8)

Sept 1994-Jun 2003 Goethe-Gymnasium Regensburg

Sept 1990-Jul 1994 Grundschule St. Wolfgang Regensburg

Publikationsliste

C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht: "DNA traffic lights": Concept of wavelength-shifting DNA probes and application in an aptasensor, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.

M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht: A "clickable" sytyl dye for fluorescent DNA labeling by excitonic and energy transfer interactions, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1299-1302.

C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht: In-stem-labeled molecular beacons for distinct fluorescent color readout, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.

C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht: Synthesis and optical properties of cyanine dyes as fluorescent DNA base substitutions for live cell imaging, *Eur. J. Org. Chem* **2010**, 1239-1248.

