

Modulation der Wechselwirkungen und Untersuchungen zur Stabilität der DNA-SWCNT-Hybride mittels chromophor- und hydroxychinolinmodifizierter Oligonukleotide

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 Chemiker

Wolfgang Josef Schmucker

aus Kaimling

Karlsruhe 2012

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Manfred Kappes

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2012

Meiner Familie

*„Ich bin immer noch verwirrt,
aber auf einem höheren Niveau“*

Enrico Fermi

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Oktober 2010 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg, weiterhin von November 2010 bis Oktober 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:

- Herrn Prof. Dr. Manfred Kappes (Institut für Physikalische Chemie II, KIT) für die Messungen der Photolumineszenz-Karten. Besonders möchte ich mich bei Dr. Frank Hennrich und Stefanie Klumpp bedanken, die zum einen die Messungen durchführten, zum anderen mir mit ihrer Expertise zur Seite standen.
- Herrn Dr. Thomas Hirsch am Arbeitskreis Wolfbeis (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg) für die Möglichkeit der SPR-Messungen, sowie die vielen interessanten und lehrreichen Diskussionen. Ganz besonders möchte ich mich bei Alexander Zöpfl, Sven Kochmann und Rosemarie Walter bedanken, die mir die beschichteten SPR-Goldchips zur Verfügung stellten, sowie einige Messungen durchführten.
- Herrn Prof. Dr. Frank Breher (Institut für Anorganische Chemie, KIT) für die EPR-Messungen an den HQ-Komplexen. Hierbei möchte ich besonders Timo Augenstein danken, der die Messungen durchführte.

- Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall (Institut für Anatomie, Universität Regensburg) für die Möglichkeit das perylenmodifizierte Oligonukleotid in der korrelativen Elektronen- und Lichtmikroskopie bioanalytisch einzusetzen. In diesem Zusammenhang besonders Sabrina Kracher, die sämtliche Zellexperimente durchführte und mir die dort entstandenen Aufnahmen zur Verfügung stellte.
- Herrn Prof. Dr. Christian Schüller (Institut für Experimentelle und Angewandte Physik, Universität Regensburg) für die Möglichkeit die SWCNTs mittels Ramanspektroskopie zu vermessen, sowie die fachliche Beratung. Ganz besonders möchte ich mich hierbei bei Stefanie Heydrich bedanken, die zum einen die Messungen durchführte zum anderen sowohl für unterhaltsame wie auch wissenschaftliche Diskussionen bereitstand.
- Frau Weck und Frau Sommer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen.
- Dr. Thomas Burgemeister und die Mitarbeiter der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die zuverlässige Messung meiner Proben.
- Pia Lang und Tanja Ohmer für die Messung der NMR-Proben am KIT.
- Josef Kiermeier und Wolfgang Söllner aus der Zentralen Analytik der Universität Regensburg für die Anfertigung der Massenspektren.
- Ingrid Roßnagel, Angelika Kernert und Karolin Niessner für die Anfertigung der Massenspektren am KIT.
- Meinen Kollegen Christian Wellner, Sabrina Sezi, Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Peggy Bohländer, Dr. Sina Berndl, Dr. Christoph Beyer, Dr. Janez Barbaric, Dr. Claudia Wanninger-Weiss, Andreas Dittmer, Dr. Thomas Ehrenschwender, Nadine Herzig, Phillipp Ensslen, Annette Hochgesand, Fabio Krohm, Daniel Lachmann, Nico Seeleib, Dr. Florian Menacher, Marcus Merkel, Alexander Penner, Dr. Christa Prunkl,

Dr. Moritz Rubner, Dr. Carolin Holzhauser, Claudia Stubinitzky, Dr. Reji Varghese, Michael Weinberger, Ulrike Wenge und Martin Weiser für die gute Zusammenarbeit, die gute Arbeitsatmosphäre und die schönen Jahre im AK Wagenknecht.

- Michael Weinberger für die fachlichen wie auch fachfremden Gespräche während des Schreibens.
- Der Karlsruher Crew: Rubner, Effi, Barry, Tom, Caro, Claudi, Kreisel und Aylin für die lustige Laborzeit, die spaßigen Abende und das gute Essen.
- Der erweiterten Regensburger Mittagsgruppe mit Alice, Sabine und Moritz für die lustigen Gespräche während des Essens.
- Allen meinen Freunden möchte ich danken für ihre Unterstützung, ganz besonders möchte ich Julian, Hias und Michl danken für die schöne Zeit während des Studiums, der Unterstützung in schwierigen Zeiten, die Freizeitgestaltung und natürlich der sauban gaudi. Ihr seits wahnsinns Freund. DANKE!
- Julian, Stefan, Kreisel und Micha für das fleißige Korrekturlesen.
- Meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre Unterstützung und den guten Zuspruch.

Als letztes möchte ich einer besonderen Frau danken: Vielen Dank Micha für die schöne Zeit.
Bleib so wie du bist!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Themenstellung	3
3. Theoretischer Hintergrund	6
3.1 Graphen	6
3.2 Kohlenstoffnanoröhren	7
3.2.1 Herstellung	8
3.2.2 Struktur.....	10
3.2.3 Spektroskopische Eigenschaften.....	12
3.2.4 DNA-SWCNT Hybride.....	19
3.2.5 Einsatzmöglichkeiten von DNA-SWCNT Hybriden	24
3.3 Oberflächenplasmonenresonanz	26
4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT	30
4.1 Modifizierte Oligonukleotide zur Änderung der Bindungseigenschaften am SWCNT..	30
4.1.1 Synthese und Charakterisierung des Perylen Bausteins 6	31
4.1.2 Anwendung der perylenmodifizierten Oligonukleotide in der Bioanalytik mittels korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie	36
4.1.3 Synthese des Pyren-Bausteins 12	40
4.1.4 CCVD oder HiPCO SWCNT	41
4.1.5 Synthese und Charakterisierung des „click“-Pyren Bausteines	47
4.1.6 Verbesserte Solvatation einzelner SWCNT durch pyrenmodifizierte Oligonukleotide.....	52
4.2 Untersuchungen zur Stabilität der Chromophor-DNA-SWCNT-Konjugate über mehrere Tage bei verschiedenen Temperaturen.....	57
4.2.1 Vergleich der Bindungsstärken von DNA und Nilrot am SWCNT.....	59
4.2.2 Verhalten der DNA um den SWCNT bei Raumtemperatur	62
4.2.3 Neuordnung der DNA um den SWCNT	67

Inhaltsverzeichnis

4.2.4	Verhalten der DNA um den SWCNT bei 90 °C und 55 °C	69
4.2.5	Berechnung der Stoffmengenverhältnisse gebundener DNA zu SWCNT	73
4.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	74
5.	Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT.....	75
5.1	Metallionenvermitteltes Basenpaar	77
5.1.1	Hydroxychinolinvermittelte DNA Basenpaare	79
5.1.2	Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) Messungen	82
5.2	Hybridisierungsexperiment mit HQ-Oligonukleotiden in Lösung	86
5.3	Messungen mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	91
5.3.1	Auftrocknen des Graphens.....	93
5.3.2	Optimierung der Graphenschicht	96
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	103
6.	Zusammenfassung	104
6.1	Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT	104
6.2	Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT	106
7.	Experimenteller Teil.....	108
7.1	Materialien und Methoden	108
7.2	Optische Spektroskopie	112
7.3	Synthesevorschriften.....	115
7.3.1	Darstellung des perylenmodifizierten Bausteins	115
7.3.2	Darstellung des 2PydU-Bausteins	118
7.3.3	Synthese des „click“-Pyren-Bausteins.....	119
7.3.4	Synthese des „click“-Nil-Rot-Bausteins (17).....	120
7.3.5	Synthese des HQ-Ligandosides	120
7.4	DNA-Synthese	121
7.4.1	Synthese modifizierter Oligonukleotide	121
7.4.2	Synthetisierte DNA-Sequenzen	124

7.4.3	Unmodifizierte Oligonukleotide für DNA-SWCNT- und DNA-Graphen-Experimente	128
7.4.4	1,3-dipolare Cycloaddition	128
7.4.5	Aufarbeitung der HQ-Oligonukleotide	129
7.5	Zellkulturen	130
7.6	Probenvorbereitung der DNA-SWCNT-Hybride	130
7.7	Charakterisierung der Oligonukleotide	131
8.	Literaturverzeichnis	132
9.	Anhang	139

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolut
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
CCVD	Katalytische chemische Aufdampfungs Methode (<i>catalytic chemical vapour deposition</i>)
CI	Chemische Ionisation
CNT	Kohlenstoffnanoröhre (<i>carbon nanotube</i>)
cm	Zentimeter
CoMoCat	Kobalt Molybdän Katalysator Verfahren
CPG	Controlled Pore Glass
CVD	Chemische Aufdampfungs Methode (<i>chemical vapour deposition</i>)
d	Dublett, Schichtdicke
Da	Dalton = g/mol
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dünnschichtchromatographie
d. h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOS	Zustandsdichte (<i>density of states</i>)
dsDNA	Doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
d. Th.	der Theorie
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

EI	Elektrische Ionisation
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
exc	Anregung (excitation)
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> (Ionisierungsmethode in der MS)
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FET	Feld-Effekt-Transistoren
G	Guanosin, 2'-Desoxyguanosin
IEX	Ionen Austausch Flüssigchromatographie (<i>ion-exchange liquid chromatography</i>)
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kNR	„click“-Nilrot (das Nilrotazid)
kPy	„click“-Pyren (das Pyrenazid)
h	Stunde
HiPCO	<i>High pressure carbon monooxide</i> (Herstellungsprozess für SWCNTs)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektroskopie (HR = high resolution)
Hz	Hertz
m	Multipllett
M	molar; mol/L
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
MD	Molekulare Dynamik (<i>molecular dynamics</i>)
MeOH	Methanol
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

mL	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MWCNT	Mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (<i>multi walled carbon nanotubes</i>)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NBS	N-Bromsuccinimid
n _D	Brechungsindex bei 20 °C und Deuteriumlampe
NIR	Nahes Infrarot ($\lambda = 780 \text{ nm} - 3 \text{ }\mu\text{m}$)
NHE	Normalwasserstoff-Elektrode
nm	Nanometer
NMR	Kernspinnagnetresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
ns	Nanosekunden
ppm	parts per million
RBM	radiale Atemschwingung (<i>radial breathing modes</i>)
REMD	<i>replica exchange molecular dynamics</i>
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde
SChol	Natriumcholat
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SDBS	Natriumdodecylbezolsulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
SWCNT	Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (<i>single walled carbon nanotube</i>)
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
T _m	Schmelzpunkt [°C]

TBTA	tris-(Benzyltriazolylmethyl)amine
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of Flight
UV/Vis	Ultraviolettes- und sichtbares Lichtspektrum (190 – 800 nm)
V	Volt
vgl.	vergleiche
vHS	<i>van Hove</i> Singularitäten
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel

Symbole

λ	Wellenlänge
Å	Ångström
δ	Chemische Verschiebung
°C	Grad Celcius
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
Θ	chiraler Winkel, Winkel in der SPR-Messung
$\overline{\vartheta_{xx}}$	Wellenzahl des x nach x Übergangs
\hbar	Planksches Wirkungsquantum
ϵ	Dielektrizitätskoeffizient
ω	Frequenz

Abkürzungsverzeichnis

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

^a Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

^b IUPAC Commission of Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Biochemistry* **1971**, *10*, 3983-4004, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *21*, 455-477.

1. Einleitung

„Wie Sie sehen, haben wir nicht einen, sondern zwei Fahrstühle gebaut. Zwei Seile spannen sich parallel in den Orbit. Doch noch vor wenigen Jahren schien es zweifelhaft, ob wir diesen Anblick je erleben würden [...] das Problem war, ein Material zu finden, aus dem sich ein 35786 Kilometer langes Seil weben ließ. [...] am Seil drohte das Konzept zu scheitern - bis Anfang des Jahrtausends ein revolutionäres, neues Material bekannt wurde: Kohlenstoffnanoröhren.“^[1] In diesem Auszug aus dem Science-Fiction Thriller *Limit* beschreibt der Autor *Frank Schätzing* einen Weltraumlift, mit dem es möglich ist, Personen und Materialien von der Erdoberfläche in den Weltraum zu befördern. Diese Idee ist nicht so Science-Fiction, wie sie sich vielleicht im ersten Moment anhören mag. Einige Einrichtungen, darunter NASA (National Aeronautics and Space Administration),^[2] NIAC (*NASA insitute for advances concepts*)^[3, 4] und WARR (Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft für Raketentechnik und Raumfahrt der TU München)^[5] verfolgen dieses Ziel und auch in der Literatur^[6-10] wird das Thema diskutiert. Ein entscheidender Faktor zur Realisierung dieser Idee ist das Seilmaterial, welches extremen Belastungen standhalten muss. Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes*, CNT) werden in diesem Zusammenhang als ein mögliches Material, das den Anforderungen entspricht, diskutiert.^[7, 8, 10]

CNTs wurden erstmals 1991 in der Literatur von Iijima^[11] beschrieben. Aufgrund ihrer Struktur besitzt dieses Nanomaterial einzigartige physikalische und chemische Eigenschaften. Dies führte zu einem großen Interesse in der Wissenschaft, wodurch zahlreiche Untersuchungen bezüglich ihrer Struktur, Eigenschaften und möglichen Anwendungen durchgeführt wurden (aktuelle Übersichtsartikel hierzu Lit.^[12-20]). In der heutigen Zeit beschäftigt sich ein Forschungsschwerpunkt der CNT mit der Anwendung im biologischen und medizinischen Bereich. Hierbei werden diese Nanostrukturen oftmals mit dem einzigartigen Biomaterial DNA kombiniert. Das Potential dieser Hybride aus DNA und CNTs ist enorm. Die bisherigen Anwendungen liegen beispielsweise in der Behandlung von Tumoren^[21, 22] sowie biochemischer Sensoren.^[23-25] Bei Betrachtung der Einsatzmöglichkeiten der DNA wird deutlich, dass das bisherige Anwendungsspektrum dieser Hybride sicherlich noch um einiges erweitert werden kann.

1. Einleitung

Die DNA ist nicht nur Träger der genetischen Information, sondern findet darüber hinaus Anwendungen im medizinischen und biologischen Bereich, in der Nanotechnologie und der Materialwissenschaft. Mittlerweile ist es möglich, über die spezifischen Basenpaarungseigenschaften große dreidimensionale Strukturen aufzubauen,^[26] Nanopartikel und Proteine mittels DNA-Templaten anzuordnen^[27] oder synthetische DNA-Maschinen zu erschaffen.^[28] In der Medizin wird die DNA beispielsweise zur Gentherapie, d.h. der Austausch eines defekten Gens durch ein intaktes, oder im Bereich der RNA-Interferenz, das gezielte Ausschalten eines Gens durch ein kurzes RNA-Segment, eingesetzt. Die Bedeutung all dieser Ergebnisse zeigt sich beispielsweise durch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin.^[29] *Fire* und *Mello* im Jahre 2006 für ihre Arbeiten zur RNA-Interferenz.^[30] Das breite Spektrum der Einsatzmöglichkeiten der DNA basiert auf Forschungsergebnissen aus allen Teilbereichen der Naturwissenschaften. Erst bei genaueren Verständnis der verschiedenen fundamentalen Prozesse, sei es DNA-Replikation, Genexpression, DNA-Schädigung, Elektronentransfer etc. ist es möglich, diese Prozesse gezielt zu beeinflussen und damit Anwendungen zu generieren.

Daher ist es auch im Falle der Hybride aus DNA und CNT wichtig, die Wechselwirkungen zwischen den beiden Materialien genauer zu verstehen. Dadurch können die Hybride evtl. gezielt beeinflusst werden, um damit das Anwendungsspektrum zu erweitern. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung und Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (*single walled carbon nanotubes*, SWCNT, ein Teilbereich der CNT) und synthetisch modifizierter DNA.

2. Themenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen synthetisch modifizierte Oligonukleotide verwendet werden, um das Verhalten von DNA auf dem SWCNT näher zu untersuchen. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teilbereiche auf: Der erste Teil beschäftigt sich mit der Untersuchung des Verhaltens der DNA am SWCNT mittels chromophormodifizierter Oligonukleotide. Im zweiten Teil wird der Hybridisierungsprozess am SWCNT genauer untersucht.

chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Im ersten Teil dieses Abschnittes soll mittels Oligonukleotide, welche mit den Polyaromaten perylen- bzw. pyrenmodifiziert sind, der Einfluss der Modifikationen auf die Bindungseigenschaften der DNA am SWCNT untersucht. Aufgrund einer ähnlichen Struktur von Perylen und Pyren (nur sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome) zu SWCNTs wird eine verstärkte π - π -Wechselwirkung erwartet. Für erste Experimente soll das Perylen und Pyren über die 5-Position von 2'-Desoxyuridin an DNA geknüpft werden. Anhand dieser Modifikationen wird zuerst geklärt, welche SWCNT-Charge sich für die Untersuchungen am besten eignet (HiPCO- oder CCVD-SWCNTs). Auf Grundlage der erhaltenen Resultate und neuerer Erkenntnisse^[31-37] über die Struktur der DNA auf SWCNTs im Verlauf dieser Arbeit soll die Anknüpfung des Pyrens an die DNA optimiert werden. Hierfür wird ein Pyrenazid synthetisiert, welches über eine 1,3-dipolare Cycloaddition an die DNA geknüpft wird. Anschließend soll durch Vergleich der Verhältnisse aus Photolumineszenz- zu Absorptionsdaten gegenüber unmodifizierter DNA ermittelt werden, ob die modifizierten Oligonukleotide die SWCNTs besser solvatisieren.

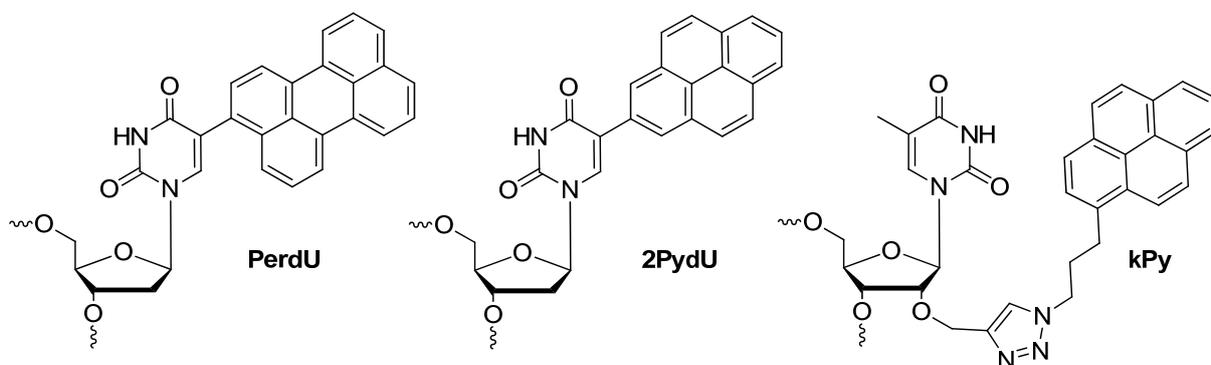


Abb. 1 Zielstrukturen der perylen- und pyrenmodifizierten Bausteine in der DNA

2. Themenstellung

Die Tatsache, dass die DNA-SWCNT-Hybride je nach Temperatur nur über einen gewissen Zeitraum stabil sind, ist zwar literaturbekannt.^[38], jedoch kaum untersucht. Daher soll im zweiten Teil dieses Abschnittes mittels eines Nilrot-Chromophors das Verhalten der DNA am SWCNT bei verschiedenen Temperaturen und Zeitintervallen genauer untersucht werden. Hierfür wird die Absorption um $\lambda = 600$ nm und die Fluoreszenz zwischen $\lambda = 615 - 750$ nm des Chromophors als zusätzliche Informationsquellen ausgenutzt. Die Ergebnisse sollen mit Literaturdaten verglichen und möglicherweise neu interpretiert werden.

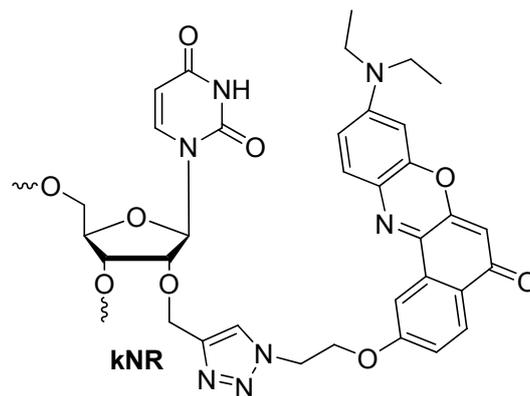


Abb. 2 Geplante Struktur der Nilrot-Modifikation in DNA

Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, ob der Doppelstrang nach Hybridisierung am SWCNT bzw. Graphen gebunden^[39-42] bleibt oder dissoziiert^[43-46]. Daher soll in diesem Teil der Arbeit zuerst der Einfluss der Duplexstabilität auf die Hybridisierung am SWCNT mittels eines metallionenvermittelten Basenpaares untersucht werden. Als metallionenvermitteltes Basenpaar wird ein Hydroxychinolin-Ligandosid, welches bereits am Arbeitskreis *Wagenknecht* entwickelt wurde, verwendet. Dieses wird über ESR-Spektroskopie noch genauer charakterisiert.

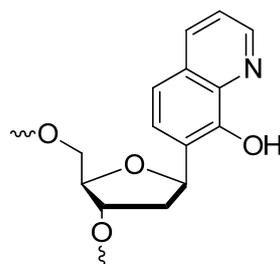


Abb. 3 Struktur des Hydroxychinolin-Ligandosids in DNA

Parallel dazu wird versucht, mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie das Verhalten des Duplexes nach Hybridisierung am Graphen genauer zu untersuchen, um unter anderem daraus Hinweise auf die Hybridisierung am SWCNT zu erhalten.

3. Theoretischer Hintergrund

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen der verwendeten Materialien Graphen und Kohlenstoffnanoröhren sowie die analytische Methode der Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) genauer erläutert.

3.1 Graphen

Graphen ist der Grundbaustein, aus dem Graphitmaterialien aufgebaut sind. Das Graphen besteht aus sp^2 -verbrückten Kohlenstoffatomen, welche eine Monoschicht mit einer zweidimensionalen honigwabenähnlichen Struktur bilden. Im Jahr 2004 gelang es *Novoselov et al.*^[47] erstmals, monolagiges Graphen herzustellen, wodurch neben den bereits seit Jahrzehnten existierenden theoretischen Berechnungen nun auch experimentelle Studien möglich waren. Diese Entdeckung weckte ein großes Interesse in der Physik und Chemie, so dass nur sechs Jahre später *Novoselov* und *Geim* dafür den Nobelpreis in Physik erhielten.^[48]

Über die Jahre hinweg haben sich mehrere Wege zur Herstellung von Graphen etabliert: *Novoselov* und *Geim* benutzten ein Klebeband^[47], mit dessen Hilfe mehrmals Schichten vom Graphit abgeblättert wurden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Stück Graphit gegen eine Oberfläche zu reiben,^[49] als würde man zeichnen. Beide Methoden liefern hauptsächlich Graphit-Flocken und nur wenige Graphen-Flocken, welche aufwändig unter dem Mikroskop selektiert werden müssen. Anstatt den Weg vom Graphit zu Graphen zu gehen wurden Verfahren entwickelt, um ausgehend vom Kohlenstoffatom zum Graphen zu gelangen: Eine Methode ist das chemische Aufdampfen von Kohlenwasserstoff-Gasen, z.B. Methan, auf einer Metalloberfläche,^[50, 51] eine andere das thermische Sublimieren von Si aus einem SiC Wafer.^[52]

Diese Methoden haben eine Gemeinsamkeit, in beiden Fällen wird Graphen auf einer Oberfläche erzeugt. Um nun Graphen auch in Lösung zu erhalten, bedient man sich des chemischen Abblätterns von Graphit. Hierbei hat sich die Methode nach *Hummers*^[53] bzw. *Staudenmeier*^[54] durchgesetzt, in der das Graphit zum Graphitoxid oxidiert wird. Mittels Ultraschallbehandlung in Wasser ergeben sich dabei einzelne, stabile Lagen an Graphenoxid.

Aufgrund der oxidativen Bedingungen befinden sich hauptsächlich Hydroxyl- und Epoxygruppen auf dem Material, sowie Carboxylgruppen am Rand.^[55] Diese können mittels Hydrazinhydrat,^[56] Natriumborhydrid,^[57] oder Ascorbat^[58] reduziert werden, wodurch Graphen entsteht (Abb. 4). Durch die geeignete Wahl des pH-Wertes und der Ionenstärke lassen sich so stabile Lösungen in Wasser herstellen.^[56] Die Reduktion entfernt ein Großteil der Hydroxyl-, Epoxy- und Carboxylgruppen, jedoch weisen diese Graphen-Flocken eine Vielzahl an Defekten auf. Dies hat einen nachteiligen Einfluss auf die Eigenschaften, z.B. Leitfähigkeit, im Gegensatz zu mechanisch abgeblättertem Graphen.

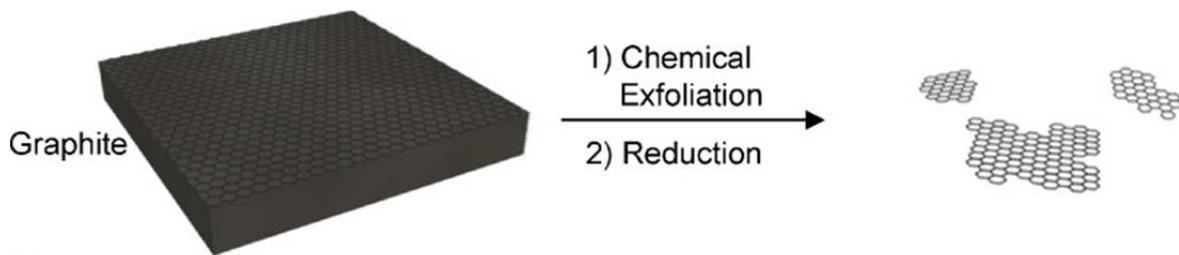


Abb. 4 Schematische Darstellung der Herstellung von chemischen Graphen ausgehend von Graphit. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. ^[50], Copyright John Wiley and Sons 2010)

3.2 Kohlenstoffnanoröhren

Als Kohlenstoffnanoröhren (*carbon nanotubes*, CNTs) wird ein neues Allotrop auf Kohlenstoffbasis aus der Familie der Fullerene bezeichnet. Man kann sich den CNT als einen aus Graphen aufgerollten Zylinder vorstellen, dessen Enden von einer Fulleren-Halbkugel abgeschlossen werden. Die CNTs werden von Van-der-Waals-Kräften zusammengehalten. Somit besteht die Struktur aus 12 Pentagonen und Millionen von Hexagonen, in denen die Kohlenstoffatome eine sp^2 -Hybridisierung aufweisen.^[59]

Die CNT lassen sich in zwei große Klassen einteilen:

- Mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (*multi walled carbon nanotubes*, MWCNTs)
- Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (*single walled carbon nanotubes*, SWCNTs)

MWCNTs bestehen aus zwei oder mehreren konzentrischen, zylindrischen Schalen aus Graphen, welche koaxial um einen leeren Raum gewickelt sind. Der Abstand zwischen den

3. Theoretischer Hintergrund

Schichten entspricht in etwa dem Abstand zwischen den einzelnen Schichten im Graphit (0,34 nm).^[60]

SWCNTs bestehen nur aus einer Schicht an Graphen, wodurch ihre Wandstärke nur aus einer Lage an Atomen besteht.^[61, 62] Aufgrund dessen haben sie nur eine sehr geringe Durchmesser-Verteilung (etwa 0,5-2 nm). Dies führt in Kombination mit ihrer im Vergleich dazu beachtlichen Länge (von 10 nm bis 1 cm) zu Effekten eines eindimensionalen Systems. Daraus resultieren exotische elektronische Eigenschaften, welche dieses Material so interessant machen.

Da sich das Thema dieser Arbeit ausschließlich mit SWCNTs beschäftigt, wird im Folgendem nur auf diese näher eingegangen.

3.2.1 Herstellung

Die meist verwendeten Methoden, um SWCNTs zu synthetisieren, sind:

Chemische Aufdampfungs Methode (*chemical vapour deposition*, CVD):^[63]

Hierbei wird gasförmiges Benzol mit Wasserstoff in einen Keramikzylinder eingeleitet. Mittig platziert ist das Substrat, welches aus einem Kohlenstoffblock besteht. Die Temperatur im Ofen beträgt etwa 1000 °C, der Benzolpartialdruck etwa $200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ mit Wasserstoff als Trägergas. Nach ca. einer Stunde Reaktionszeit wird der Ofen auf Raumtemperatur abgekühlt und der Wasserstoff gegen Argon ersetzt. Bei der katalytischen chemischen Aufdampfung^[64] (*catalytic chemical vapour depositions*, CCVD) wird ein Katalysator (Metallsalze: Co, Ni, Fe, etc. oder eine Mischung aus Metallsalzen, z.B. Co-Fe) in der Mitte platziert und ein Strom aus Methan und Wasserstoff darüber geleitet. Der Katalysator wird durch anschließende Behandlung mit HCl größtenteils entfernt.

Lichtbogen Entladung:^[65]

Diese Methode wird unter Inertgasatmosphäre (He, Ar usw.) bei ungefähr 500 Torr und einem Potential von ungefähr 18 V durchgeführt. Das Potential wird dabei zwischen zwei Graphitstäben unterschiedlicher Größe angelegt. Bringt man die Stäbe nah aneinander,

entsteht aufgrund der daraus folgenden Entladung ein Plasma. Auf den größeren der beiden Stäbe lagern sich kohlenstoffhaltige Strukturen ab, welche SWCNTs enthalten. Die dabei verwendete Stromstärke hängt, unter anderem, von der Größe der Stäbe, deren Abstand und dem Gasdruck ab, beträgt jedoch in der Regel etwa 100 A.

Laser Ablation:^[66]

Bei etwa 1200 °C wird in einem Ofen ein Metall-Graphit Gemisch von einem Laser abgetastet. Das Gemisch befindet sich dabei in einem Quarzrohr, welches von einem Argonstrom (Druck ungefähr 500 Torr) umspült wird. Der dabei entstehende Ruß, der die SWCNTs enthält, wird durch den Argonstrom aus dem Hochtemperaturbereich auf eine wassergekühlte Kupferhaube geleitet, auf der sich der Ruß abscheidet.

Disproportionierung von CO:

Hierbei wird die Eigenschaft der Boudouard-Reaktion ($\text{CO} + \text{CO} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{C(f)}$)^[67] genutzt, welche durch Metallpartikel in der Hitze katalysiert wird. Zwei Verfahren haben sich in der Anwendung durchgesetzt: Zum einen das HiPCO-(*High pressure carbon monoxide*) Verfahren^[67] in dem das CO mit $\text{Fe}(\text{CO})_5$ unter Druck in einem Ofen eingeleitet wird und zum anderen das CoMoCat-Verfahren^[68] bei dem das CO über eine Mischung aus Co und Mo geleitet wird.

Keine dieser genannten Methoden führt zu identischen Chargen an SWCNT, sondern immer zu einem Gemisch aus verschiedenen Spezies (genauere Erläuterungen dazu in Kapitel 3.2.2) Dies ist ein Grund, warum SWCNTs noch nicht den Weg zur wirtschaftliche Nutzung gefunden haben. In dieser Arbeit wurden SWCNTs verwendet, welche nach dem CCVD- und HiPCO-Verfahren hergestellt wurden.

3. Theoretischer Hintergrund

3.2.2 Struktur

Stellt man sich die Honigwabenstruktur des Graphens wie ein Blatt Papier vor und versucht dieses Blatt so aufzurollen, dass die losen Bindungen an beiden Enden noch zusammenpassen, ergeben sich daraus eine Vielzahl an Möglichkeiten. In Bezug auf die frei wählbare Raumachse führt jede Verschiebung an den Enden zu einer unterschiedlichen Anordnung des Gitters. Dadurch winden sind die Hexagone auf der gekrümmten Oberfläche in einer helixartigen Weise.

Um einen SWCNT genauer zu definieren, wird dieser mit seinem Durchmesser d und seinem chiralen Winkel Θ genauer beschrieben. Der chirale Vektor \mathbf{R} wird durch zwei ganze Zahlen (n,m) und den Basis Vektoren \mathbf{a}_1 und \mathbf{a}_2 auf dem Honigwabengitter dargestellt.

$$\mathbf{R} = m\mathbf{a}_1 + n\mathbf{a}_2 \quad \text{Gleichung (3-1)}$$

Die beiden ganzen Zahlen (n,m) definieren d und Θ , daher reichen sie aus, um einen CNT, abgesehen von der Länge, eindeutig einzuordnen (Abb. 5).

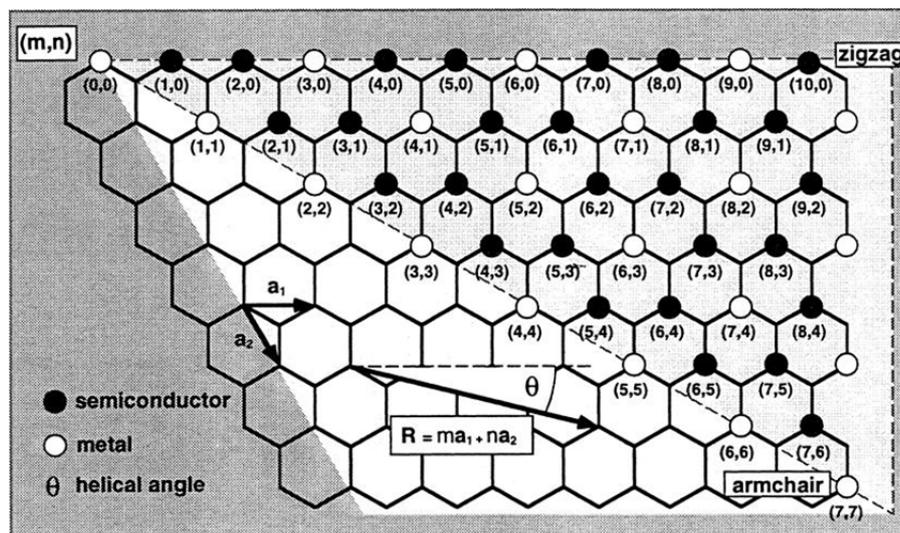


Abb. 5 Das zweidimensionale Graphenblatt mit den Vektoren \mathbf{a}_1 und \mathbf{a}_2 und den Winkel Θ (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit^[60] Copyright American Chemical Society 1999)

Diese (n,m) -Spezies werden in drei Gruppen aufgeteilt (Abb. 6):

- $m = n \rightarrow$ *armchair* SWCNT (a)
- $m = 0 \rightarrow$ *zig-zag* SWCNT (b)
- $m \neq n \rightarrow$ *chiral* SWCNT (c)

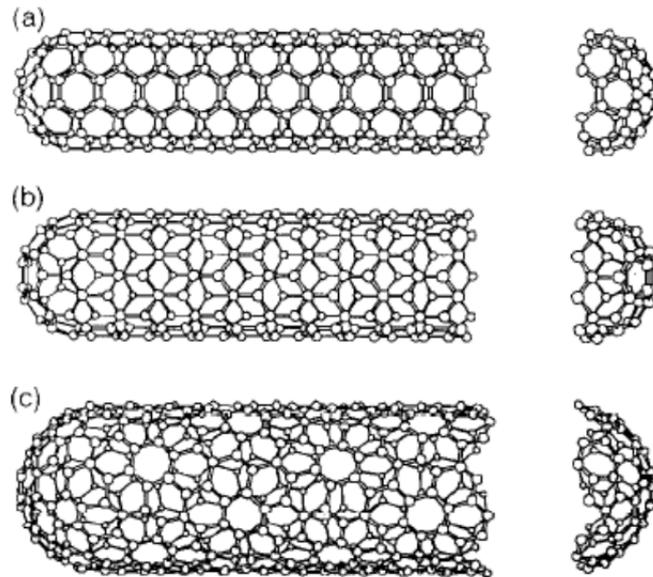


Abb. 6 Schematische Darstellung von drei theoretisch berechneten SWCNTs, mit der Fulleren-Halbkugel etwas nach rechts versetzt. a) (5,5) *armchair* SWCNT ($\theta = 30^\circ$), b) (9,0) *zig-zag* SWCNT ($\theta = 0^\circ$), c) (10,5) *chiral* SWCNT ($0^\circ < \theta < 30^\circ$) (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit ^[69], Copyright Elsevier Science Ltd 1995)

Anstatt nach der Struktur, kann der SWCNT auch nach der Leitfähigkeit eingeteilt werden:

- metallischer, halbmetallischer und
- halbleitender SWCNT

Wie aus Abb. 5 zu sehen ist, sind die halbleitenden SWCNTs als schwarzer Kreis und die metallischen als weißer Kreis dargestellt. Falls $|n - m| = 3q$, ist der SWCNT metallisch bzw. halbmetallisch, falls $|n - m| = 3q \pm 1$, ist der SWCNT halbleitend, wobei q eine ganze Zahl sei. Ein großes Interesse besteht an den halbleitenden SWCNTs, da diese sehr sensitiv auf Veränderungen in ihrer direkten Umgebung mit Änderungen in ihrer elektronischen Struktur reagieren.^[70] Metallische und halbmetallische SWCNTs zeigen für die hier besprochenen Eigenschaften gleiches Verhalten und werden daher in dieser Arbeit unter metallische SWCNTs zusammengefasst.

3. Theoretischer Hintergrund

3.2.3 Spektroskopische Eigenschaften

Um allgemein die elektronische Struktur der CNT zu beschreiben, bedient man sich am besten dem Bändermodell des Graphens. Hierbei schneidet das unbesetzte π^* -Leitungsband das besetzte π -Valenzband im \mathbf{K} Punkt der Brillouin Zone am Fermi-Niveau. Aufgrund ihrer eindimensionalen Struktur unterscheiden sich die SWCNTs aber stark von Graphen. Dies zeigt sich darin, dass nur etwa 1/3 der SWCNTs metallisch sind. Die restlichen 2/3 sind halbleitende SWCNTs. Die halbleitenden weisen eine Bandlücke zwischen dem π^* -Leitungsband und dem π -Valenzband auf. Entscheidend für die daraus resultierenden spektroskopischen Eigenschaften ist die elektronische Zustandsdichte (*electronic density of states*, DOS), d.h. die Anzahl freier Elektronen für ein bestimmtes Energieintervall. Theoretische Berechnungen belegen, dass aufgrund der eindimensionalen Struktur des SWCNT Sub-Bänder des Valenz- und Leitungsbandes entstehen. Diese unterscheiden sich in der elektronischen Zustandsdichte an den Enden, welche als *van Hove* Singularitäten (vHS) bezeichnet werden (Abb. 7). Optische Auswahlregeln erlauben nur Dipol-Absorption und -Emission zwischen passenden Sub-Bändern für Licht, welches entlang der SWCNT-Achse polarisiert ist. Auf diesen vHS beruhen interessante spektroskopische Eigenschaften der SWCNTs. Daher wird im Folgendem, falls nicht explizit erwähnt, nur noch auf halbleitende SWCNT eingegangen.

Die SWCNTs lassen sich über Absorptions-, Photolumineszenz- und Raman-Spektroskopie charakterisieren.

Absorptionsspektroskopie

Die Übergänge zwischen den entsprechenden vHS und deren Energie werden, wie in Abb. 7 dargestellt, als E_{11} , E_{22} , E_{33} , usw. bezeichnet. Da die Bandlücken in etwa indirekt proportional zu d sind, lässt sich dadurch auf einzelne (n,m) Spezies schließen (d und Θ sind durch (n,m) eindeutig definiert siehe Kapitel 3.2.2)

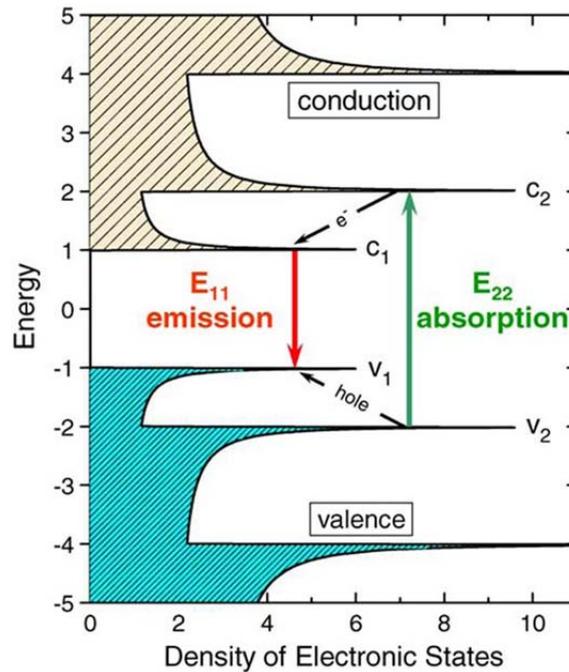


Abb. 7 Schematisches DOS-Diagramm eines halbleitenden SWCNT mit dessen vHS. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit^[71], Copyright Springer 2004)

In Abb. 8 ist ein Beispiel für ein Absorptionsspektrum einer Mischung aus mehreren (n,m) Spezies dargestellt. Im Bereich von:

- 830 nm – 1500 nm liegen die E_{11} -Übergänge^[72]
- 480 nm – 890 nm die E_{22} -Übergänge^[72]
- 320 nm – 450 nm die E_{33} -Übergänge^[73]
- 300 nm – 400 nm die E_{44} -Übergänge^[73]

Im Spektrum ist ein Versatz zum 0-Wert erkennbar. Der Grund dafür sind vor allem Überlagerungen der einzelnen (n,m)-Spezies, Absorptionsanteile der metallischen SWCNTs und Verunreinigungen durch amorphen Kohlenstoff.^[74] Aufgrund der Überlagerung der einzelnen (n,m) Spezies lassen sich diese nicht eindeutig aus dem Absorptionsspektrum einer Wellenlänge zuordnen. Um dies zu erreichen bedient man sich der Photolumineszenzspektroskopie an SWCNTs.

3. Theoretischer Hintergrund

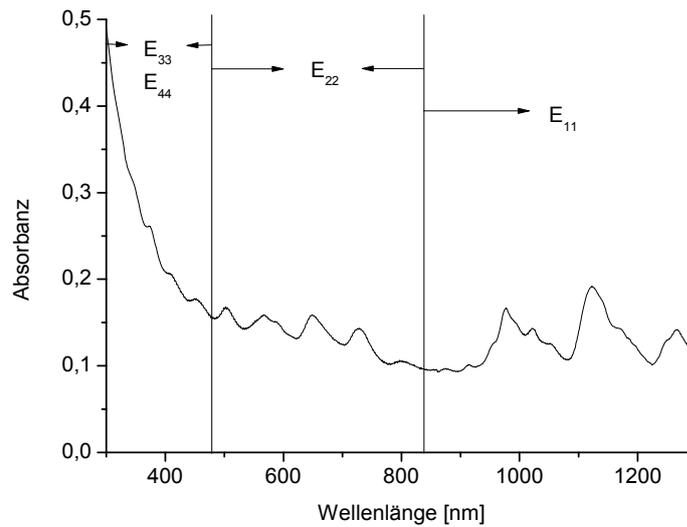


Abb. 8 In einer 1 gew.-% Lösung aus Natriumdodecylbenzylsulfonat (SDBS) gelöste HIPCO-SWCNTs

Photolumineszenzspektroskopie

Aus Abb. 7 ist erkennbar, dass die Energie der Emission in etwa dem E_{11} ($c_1 \rightarrow v_1$) Übergang entspricht, egal in welches Band angeregt wird ($v_1 \rightarrow c_1$, $v_2 \rightarrow c_2$, $v_3 \rightarrow c_3$ etc.). Der Grund liegt in den geringen Energieunterschieden zwischen den einzelnen Sub-Bändern, welche auch als „Pseudo“-Lücken bezeichnet werden. Dieses Verhalten stimmt mit der Regel nach *Kasha* überein^[75]. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass ein weites Spektrum an Anregungswellenlängen zur Verfügung steht. Experimentell bestätigt wurde dies von *O'Connell et al.*,^[76] die Photolumineszenzspektren in Natriumdodecylsulfonat (SDS) gelösten SWCNTs aufnahmen (Abb. 9).

Aus Abb. 9 wird deutlich, dass jede Absorptionsbande der ersten *van Hove* Bandlücke der einzelnen (n,m)-Spezies, auch im Emissionsspektrum mit einer leichten Rotverschiebung um etwa 45 cm^{-1} auftritt^[76].

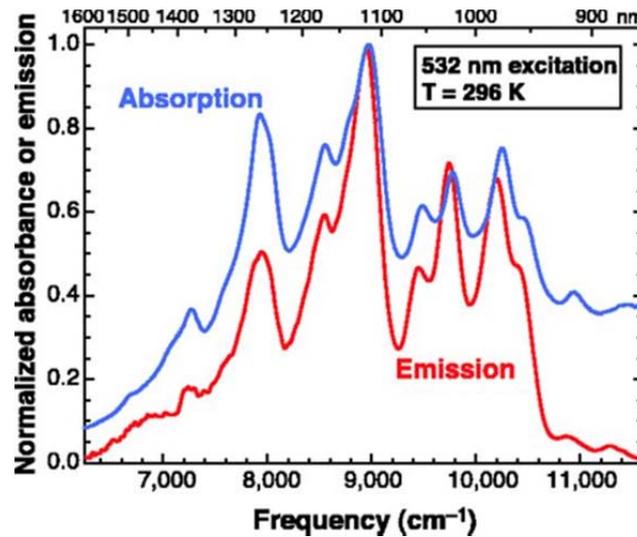


Abb. 9 Emissionsspektrum (rot) einzeln gelöster SWCNTs mit SDS in D_2O . 8 ns Anregung mittels 532 nm Laser Pulse. Absorptionsspektrum (blau) der Probe im Bereich des Übergangs der ersten *van Hove* Bandlücke. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[76], Copyright American Association for the Advancement of Science 2002)

Bachilo et al. konnten als erste 33 (n,m)-Spezies eindeutig zuordnen.^[72] Hierfür regten sie mit SDS in D_2O gelöste SWCNTs zwischen 300 bis 930 nm an und detektierten deren Emission in einem Bereich von 810 bis 1550 nm. Die daraus erhaltenen 52.000 Messwerte wurden in einem Kontur-Plot (Abb. 10) der Fluoreszenzintensität gegen die Anregungs- und Emissionswellenlänge zusammengefasst:

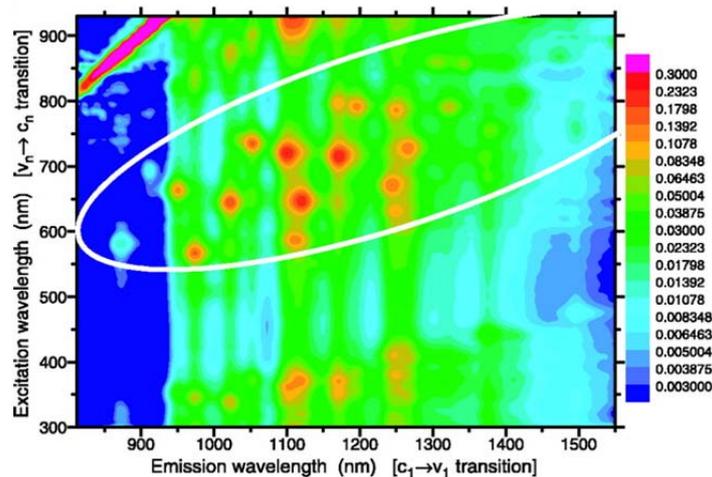


Abb. 10 Kontur-Plot der Fluoreszenzintensität gegen die Anregungs- und Emissionswellenlänge (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[72], Copyright American Association for the Advancement of Science 2002)

Der weiß eingekreiste Bereich in Abb. 10 zeigt die Signale, die durch den Übergang aus Abb. 7 hervorgehen. Bei niedrigerer Anregungswellenlänge (etwa 400 nm) befinden sich die

3. Theoretischer Hintergrund

E_{33} -Übergänge, die ebenfalls zur E_{11} -Emission führen. Zwischen den E_{22} - und E_{33} -Übergängen liegt ein Bereich, der eine starke Absorption, aber nur eine sehr schwache Emission aufweist. Diese Absorption wird den metallischen SWCNTs zugeschrieben (welche auch dort erwartet werden).^[77] In dem E_{22} -Übergangsbereich lassen sich 33 voneinander separierte Signale erkennen. Mit Hilfe von theoretischen Berechnungen, Raman-Messungen und den erhaltenen Lumineszenz-Daten konnten den einzelnen Signalen eindeutig (n,m)-Spezies zugeordnet werden.^[72] Darüber hinaus konnte *Bachilo et al.* zwei Gleichungen aufstellen, mit deren Hilfe die E_{11} - und E_{22} -Übergänge der einzelnen (n,m) Spezies berechnet werden können.

$$\overline{\vartheta}_{11} = \frac{1 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}}{157,5 + 1066,9 d} + \frac{A_1 \cos(3\theta)}{d^2} \quad (\text{Gleichung 3-2})$$

Mit $A_1 = -710 \text{ cm}^{-1}$ falls (n-m)/3 als Rest |1| ergibt oder $A_1 = 396 \text{ cm}^{-1}$ falls (n-m)/3 als Rest |2| ergibt

$$\overline{\vartheta}_{22} = \frac{1 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}}{145,6 + 575,7 d} + \frac{A_2 \cos(3\theta)}{d^2} \quad (\text{Gleichung 3-3})$$

Mit $A_2 = 1375 \text{ cm}^{-1}$ falls (n-m)/3 als Rest |1| ergibt oder $A_2 = -1475 \text{ cm}^{-1}$ falls (n-m)/3 als Rest |2| ergibt.^[72]

Die Gleichungen belegen, dass die Anregungsenergie nicht exakt proportional zu $1/d$ ist, sondern stärker davon abweicht, als erwartet wurde.

Ramanspektroskopie

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung bietet die Ramanspektroskopie. Hierbei wird ein Photon inelastisch am SWCNT gestreut (Ramanstreuung), wobei ein Phonon erzeugt oder aufgehoben wird. Das absorbierte Photon hebt dabei den SWCNT in einen angeregten Zustand an. Dieser kann durch Emittieren eines Photons in einen niedrigeren Zustand relaxieren. Ist die Energie des emittierten Photons kleiner als die der Anregung, so spricht man von einem Stokes-Prozess, ist sie höher, so spricht man von einem Anti-Stokes-Prozess. Der Anti-Stokes-Prozess entsteht dadurch, dass während der Streuung ein bereits angeregter Zustand aufgehoben wird. Entspricht die Energie des absorbierten oder gestreuten Photons einem E_{ij} Wert des SWCNT, so wird das Signal erheblich verstärkt, man spricht von einer

einfach resonanten Ramanstreuung. Findet nach der ersten Streuung direkt eine zweite an einem weiteren Phonon oder einem Defekt statt, so spricht man von einer doppelt resonanten Ramanstreuung. Durch den doppelten Streuprozess ist die Intensität niedriger, außer zwei reale elektronische Zustände werden dabei verbunden. In diesem Fall entspricht die Intensität etwa der der einfach resonanten Ramanstreuung^[78].

Aufgrund der hohen Symmetrie sind nur vier ausgeprägte Peaks im Spektrum erkennbar (Abb. 11): Die radiale Atemschwingung (*radial breathing mode*, RBM), der D-, G- und G'-Peak.

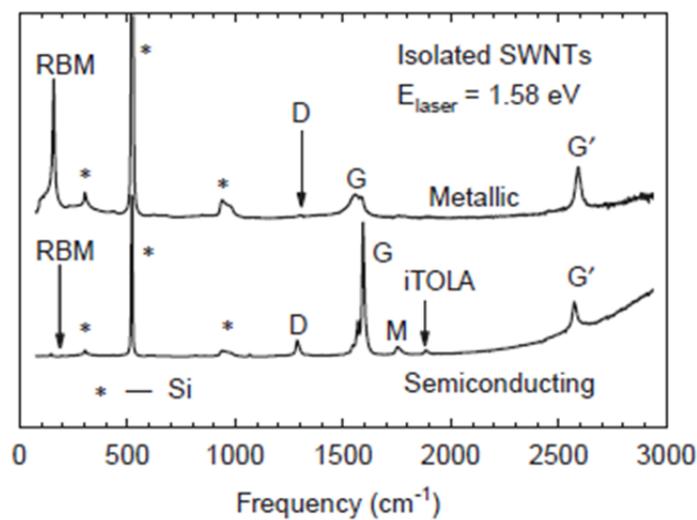


Abb. 11 Ramanspektrum eines metallischen- (oben) und eines halbleitenden- (unten) SWCNT, bei einer Anregung von 785 nm. Die vier relevanten Signale sind der RBM-, D-, G- und G'-Peak. Die mit einem * gekennzeichneten Signale stammen von Si/SiO₂-Substrat und dienen zur Kalibrierung. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit^[79], Copyright Elsevier B.V. 2004)

Bei der RBM (Abb. 12) schwingen alle C-Atome in radialer Richtung, als würde der SWCNT atmen. Die Lage des Peaks ist dabei indirekt proportional zum Durchmesser. Da es sich hierbei um einen einfach resonanten Ramanprozess handelt, kann auf den E_{ii} -Wert rückgeschlossen werden, wodurch eine eindeutige (n,m)-Zuordnung möglich ist. Jedoch sind nur einige (n,m)-Spezies bei einer bestimmten Wellenlänge resonant, wodurch verschiedene Anregungswellenlängen benötigt werden, um eine Mischung vollständig charakterisieren zu können.

3. Theoretischer Hintergrund

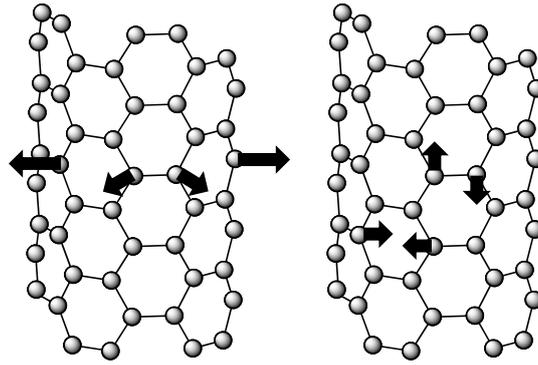


Abb. 12 Links: RBM Schwingungen, rechts: G-Peak Schwingungen

Schwingungen entlang der SWCNT-Achse oder entlang des Röhrenumfangs führen zum G-Peak (Abb. 12). Dieser teilt sich in einen G^- - und G^+ -Anteil auf, wobei der G^- -Anteil bei niedrigerer Energie liegt und abhängig vom Durchmesser ist.^[80] Darüber hinaus lassen sich am G-Peak halbleitende von metallischen SWCNTs unterscheiden: in metallischen SWCNTs sind die beiden G-Anteile etwa gleich hoch, in halbleitenden ist der G^+ -Peak viel stärker ausgeprägt.^[81]

Der D-Peak tritt durch doppelt resonante Streuung auf, wobei ein Streuprozess an einem Defekt stattfindet. Jedoch lässt sich nicht zwingend bei Abwesenheit des D-Peaks auf einen defektfreien SWCNTs schließen, da nur einige (n,m)-Spezies dazu beitragen.^[82]

Der G' -Peak entsteht ebenfalls durch doppelt resonante Ramanstreuung. Dieser spaltet in metallischen SWCNTs auf. Die Position und Form lässt Rückschlüsse auf den Energieunterschied in den vHS zu und ermöglicht dadurch eine (n,m) Zuordnung.^[78]

Alle Charakterisierungsmethoden (vor allem für Absorptions- und Photolumineszenz-Spektroskopie) sind nur dann effizient bzw. möglich, wenn der SWCNT individuell vorliegt, d.h. von den SWCNT-SWCNT Wechselwirkungen abgeschirmt ist. Ansonsten wird die elektronische Struktur durch die Aggregation der SWCNTs in parallele Bündel oder Stricke beeinflusst. Dadurch wird jede genauere Untersuchung, Aufreinigung und Zuordnung zunichte gemacht. Die Tendenz zur Aggregation in parallele Bündel oder Stricke, dies wird auch als Bündeln bezeichnet, liegt in der hohen *van der Waals*-Bindungsenergie von etwa 500 eV pro Mikrometer an SWCNT-SWCNT-Kontaktfläche.^[83, 84] Das Lösen und damit die Herstellung individueller SWCNTs wird durch verschiedene Tenside, z.B. SDS, SDBS, etc. oder Polymere, z.B. Proteine,^[85] Lipide^[21, 86] oder DNA,^[87] erreicht. Die genannten Tenside und

Polymere haben den Vorteil, dass die SWCNT-Hybride wasserlöslich werden und damit für den biologischen und medizinischen Bereich einsetzbar sind. Im Folgendem wird, wie im Titel dieser Arbeit angedeutet, auf die DNA-SWCNT-Hybride näher eingegangen.

3.2.4 DNA-SWCNT Hybride

Zheng et al.^[87] benutzten als erste einzelsträngige DNA (*single stranded*, ssDNA) um SWCNTs im wässrigem Medium zu lösen. Verantwortlich dafür ist das amphiphile Verhalten der DNA: die Basen verhalten sich hydrophob, wodurch sie $\pi-\pi$ -Wechselwirkungen mit basenabhängigen Bindungsstärke,^[88] zum SWCNT ausbilden. Das Zuckerrückgrat verhält sich hydrophil. Dadurch wickelt sich die DNA in einer helixartigen Struktur um den SWCNT. Diese Struktur wurde experimentell^[89-91] und durch Molekular Dynamik (MD)^[92, 93] Simulationen bewiesen. Das Umwickeln der SWCNTs mit DNA birgt einige Vorteile. Z.B. lassen sich die halbleitenden von metallischen SWCNTs trennen. Der Grund dafür liegt darin, dass durch die DNA auf dem SWCNT dieser Hybrid nach außen hin negativ geladen ist. Die Ladungsverteilung ist dabei eine Funktion aus DNA-Sequenz und den elektronischen Eigenschaften des SWCNT. Dies führt bei metallischen SWCNTs zu einer geringeren Oberflächenladung als bei halbleitenden, da im metallischen SWCNT eine Gegenladung erzeugt wird. Getrennt werden die beiden Spezies mittels Ionenaustauschchromatographie (*ion-exchange liquid chromatography*, IEX), wobei metallische SWCNTs in den ersten Fraktionen enthalten sind. Zheng et al.^[37] zeigten den wohl größten Vorteil, den die DNA besitzt: bestimmte Sequenzen der DNA binden bevorzugt einzelne (n,m)-Spezies stärker, wodurch diese mittels IEX abgetrennt werden können. Für dieses Experiment wurde ein systematischer Ansatz gewählt, der aus mehreren Runden bestand: In der ersten Runde wurden alle vier möglichen Mononukleotidwiederholungen, z.B. TTT..., AAA... untersucht. In der zweiten Runde alle 16 möglichen Dinukleotidwiederholungen, z.B. ATATAT..., GTGTGT... In der n-ten Runde alle möglichen n-Nukleotideinheitenwiederholungen. Jede Sequenz wurde mit HiPCO-SWCNTs dispergiert und anschließend über IEX aufgereinigt. Um die Anzahl an Testsequenzen zu reduzieren, wurden die Experimente nur bis zur vierten Runde durchgeführt. Desweiteren wurde die Anzahl durch bereits experimentelle wie theoretische

3. Theoretischer Hintergrund

Ergebnisse eingeschränkt. Nichtsdestotrotz wurden 320 Sequenzen getestet, von denen einige Selektivitäten aufwiesen (Tab. 1).

Tab. 1 DNA Sequenzen, die sich zur Aufreinigung bestimmter (n,m) Spezies eignen.^[37]

(n,m)-Spezies	Sequenzen
(9,1)	(TCC) ₁₀ , (TGA) ₁₀ , (CCA) ₁₀
(8,3)	(TTA) ₄ TT, (TTA) ₃ TTGTT, (TTA) ₅ TT
(6,5)	(TAT) ₄ , (CGT) ₃ C
(7,5)	(ATT) ₄ , (ATT) ₄ AT
(10,2)	(TATT) ₂ TAT
(8,4)	(ATTT) ₃
(9,4)	(GTC) ₂ GT, (CCG) ₄
(7,6)	(GTT) ₃ G, (TGT) ₄ T
(8,6)	(GT) ₆ , (TATT) ₃ T, (TCG) ₁₀ , (GTC) ₃ , (TCG) ₂ TC, (TCG) ₄ TC, (GTC) ₂
(9,5)	(TGTT) ₂ TGT
(10,5)	(TTTA) ₃ T
(8,7)	(CCG) ₂ CC

In Tab. 1 sind nur halbleitende SWCNTs aufgeführt, metallische können nur sehr schwer aufgereinigt werden. Vermutlich verhalten sich metallische SWCNTs mit unterschiedlichen (n,m)-Werten elektronisch sehr ähnlich. Die jeweiligen (n,m)-Werte zu den einzelnen Sequenzen wurden aufgrund der UV/Vis/NIR Spektren (Abb. 13) zugewiesen, deren E_{ij} Werte aus Lumineszenzmessungen erhalten wurden.^[72, 73] In den jeweiligen Spektren in Abb. 13 sind noch Verunreinigungen durch metallische oder andere halbleitende SWCNTs enthalten jedoch lassen sich die E_{11^-} , E_{22^-} , E_{33^-} und teilweise die E_{44^-} -Übergänge klar erkennen.

3. Theoretischer Hintergrund

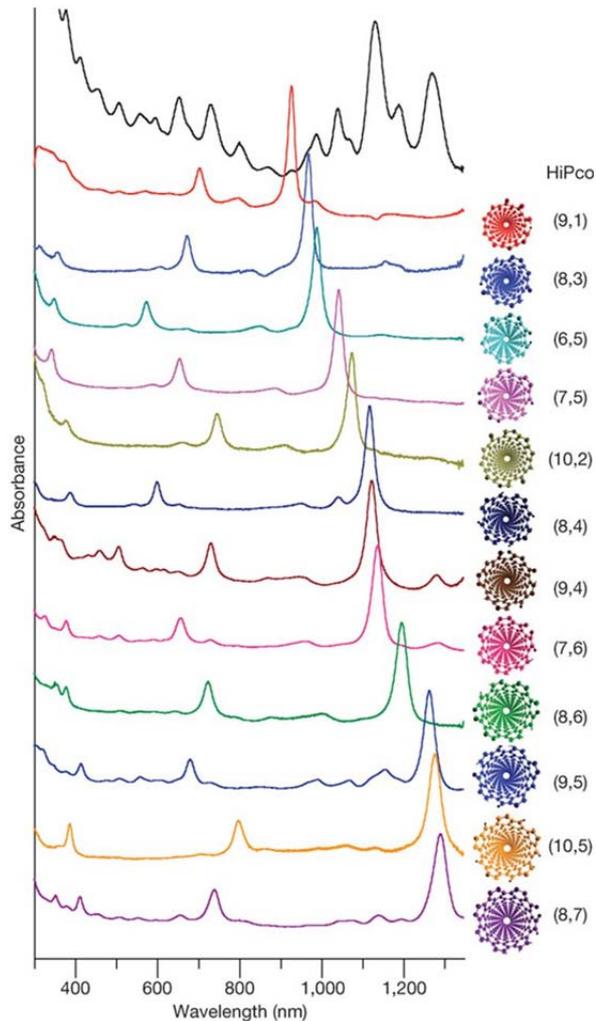


Abb. 13 UV/Vis/NIR Spektren von 12 gereinigten halbleitenden SWCNTs und der Rohmischung. Die Struktur des jeweiligen SWCNT (Blickrichtung entlang der Achse) ist am rechten Rand mit den jeweiligen (n,m) Wert dargestellt. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[37], Copyright Macmillian Publisher Limited 2009).

Wie kommt es zu dieser Selektivität einzelner DNA Stränge für bestimmte (n,m)-Spezies? Die neuesten Erkenntnisse und damit der aktuelle Stand der Forschung stammt von *Jagota et al.*^[31] und *Mittal et al.*^[32] welche die Struktur mit Hilfe von *all-atom replica exchange molecular dynamics (all-atom REMD)* Simulationen theoretisch berechneten. Grundlegend hierfür waren die experimentellen Befunde von *Zheng et al.*^[37] (bereits beschrieben) und *Jagota et al.*^[33, 34] welche aufzeigten, dass eine Änderung in der Erkennungssequenz die Bindungsstärke stark beeinflusst. Die theoretischen Berechnungen von *Johnson et al.*^[35] und *Jagota et al.*^[36] zeigten, dass eine auf der Oberfläche des SWCNT adsorbierte einzelsträngige DNA so vorliegt, dass deren Basen, im Bezug zum Rückgrat, alternierend links und rechts auf dem SWCNT liegen (Abb. 14).

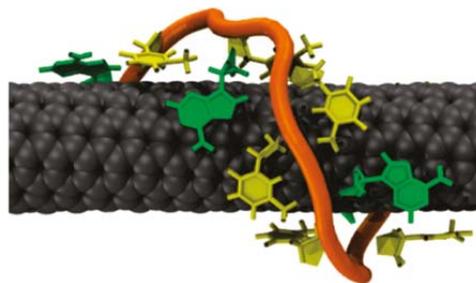


Abb. 14 Berechnetes Modell eines (TAT)₄-Strang (Adeninbasen grün, Thyminbasen gelb dargestellt) um einen (6,5) SWCNT. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[32], Copyright American Chemical Society 2011)

3. Theoretischer Hintergrund

Die Berechnungen von *Jagota et al.* und *Mittal et al.* führten zu folgenden Erkenntnissen:

- Im Gleichgewicht liegt die DNA rechts herum gewickelt um den SWCNT vor. Dieses Gleichgewicht stellt sich relativ schnell ein, innerhalb der ersten 6 – 30 ns, wobei die DNA eine länglich gezogenen Schleife bildet, statt sich auf dem SWCNT auszustrecken, um sich dann rechts herum zu wickeln.
- Im DNA Strang bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aus (Abb. 15). Die drei häufigsten Anordnungen sind die „8-Stitch“-Struktur, „8/9-Stitch“-Struktur und die „9-Stitch“-Struktur. Die „8-Stitch“-Struktur bezieht sich auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einer Base und einer anderen, welche 8 Basen davon entfernt ist. Entsprechendes gilt für die beiden anderen Strukturen. Liegt zwischen der Wasserstoffbrückenbindung eine gerade Anzahl an Basen, so muss eine davon auf die andere Seite des DNA Rückgrates wechseln, hier am Beispiel des „8-Stitch“ gezeigt. Diese Verdrehung, der Verlust an konformativer Entropie und die elektrostatische Abstoßung erhöhen die freie Energie, jedoch wird dies durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung bzw. -bindungen kompensiert. Dies hat zur Folge, dass sowohl die Sequenz als auch die Länge entscheidend sind, welche Struktur der DNA Strang auf den SWCNT annimmt.

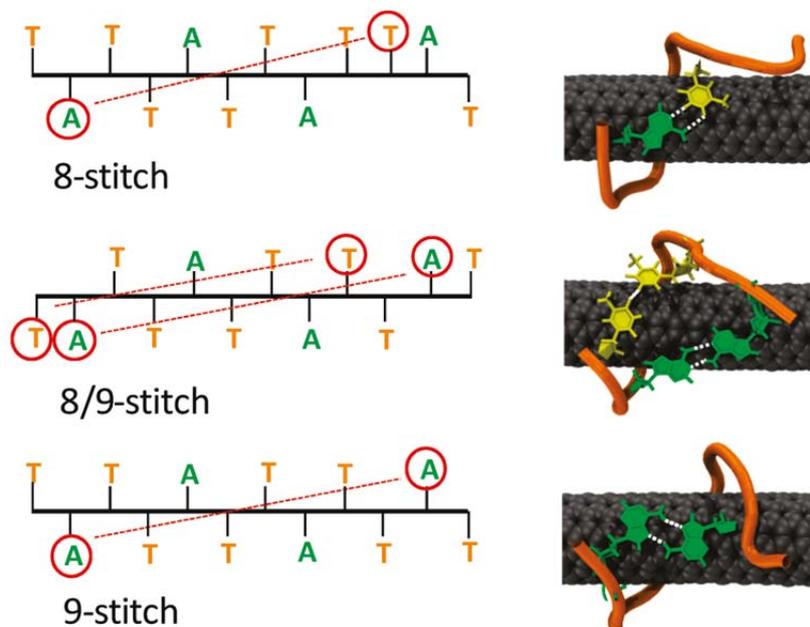


Abb. 15 Links: Drei mögliche Anordnungen für die Wasserstoffbrückenbindungen eines (TAT)₄-DNA Strangs um einen (6,5) SWCNT. Rechts: Die dazugehörigen Molekularen Modelle. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit ^[32], Copyright American Chemical Society 2011)

3. Theoretischer Hintergrund

- Aufgrund der intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der DNA bildet eine DNA-Sequenz auf dem SWCNT, nur zu einem bestimmten (n,m) -Wert, d.h. einen bestimmten Durchmesser, eine hoch geordnete Struktur aus. Wie man in Abb. 16 erkennen kann ist dies nur für den Strang $(TAT)_4$ auf $(6,5)$ SWCNT der Fall (passende Erkennungssequenz zu diesem Durchmesser). Die gleiche Sequenz auf einem SWCNT mit größerem Durchmesser $(8,7)$, sowie eine andere Sequenz $(T)_{12}$ auf den kleineren Durchmesser $(6,5)$ führen jeweils zu weniger geordneten Strukturen wegen fehlender Wasserstoffbrückenbindungen. Der letzte Fall zeigt die von Zheng *et al.*^[37] bereits postulierte doppelsträngige β -Fass Struktur auf, welche nur durch intermolekulare Wasserstoffbrücken entsteht (kaum oder nur schwache intramolekulare Wasserstoffbrücken vorhanden aufgrund fehlender Watson-Crick Basenpaarung). Aus den theoretischen Berechnungen sind Schnappschüsse dargestellt, darin markiert sind jeweils drei Basen. Vergleicht man die Abstände dieser Basen in einem zweidimensionalen Diagramm der gemittelten geringsten Abstände mit einer einzelsträngigen Helix,^[31] so erhält man nur für den ersten Fall, $(TAT)_4$ auf $(6,5)$, eine gute Übereinstimmung und damit eine Bestätigung für dessen Selektivität nur auf diesem Durchmesser geordnete Strukturen auszubilden.

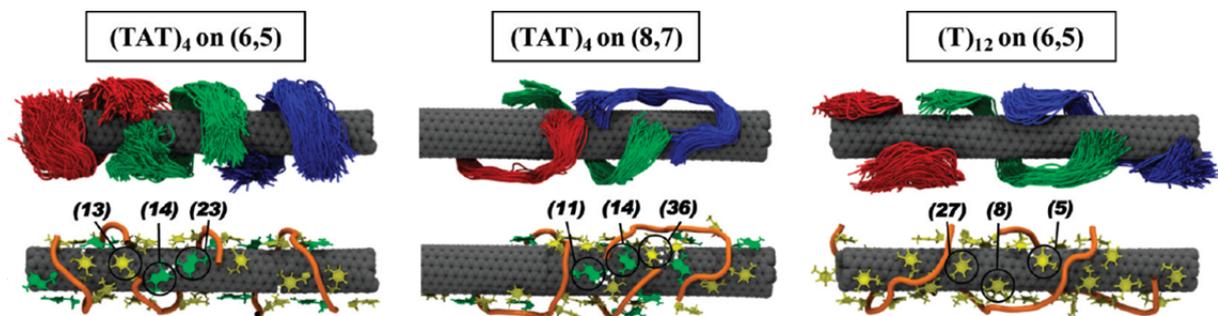


Abb. 16 Cluster Analyse im Gleichgewicht von drei $(TAT)_4$ -Strängen um einen $(6,5)$ -SWCNT, drei $(TAT)_4$ -Strängen um einen $(8,7)$ -SWCNT und drei $(T)_{12}$ -Strängen um einen $(6,5)$ -SWCNT. Darunter ein Schnappschuss des jeweils größten Clusters (Adenin in grün, Thymin in gelb dargestellt). (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit ^[31], Copyright American Chemical Society 2012)

3. Theoretischer Hintergrund

3.2.5 Einsatzmöglichkeiten von DNA-SWCNT Hybriden

Bisher wurden die Vorteile diskutiert, welche die DNA durch das Lösen der SWCNT mit sich bringen. Kombiniert man jedoch die Eigenschaften des SWCNT mit den einzigartigen Eigenschaften der DNA, so ergibt sich ein großes Anwendungsgebiet:

Einsatz als Hybridisierungsprobe (weitere Beispiele in Kapitel 5):

Die spezifische Hybridisierung der DNA wird oftmals verwendet, um einzelne DNA-Mutationen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) über einen Energietransfer zu detektieren. Hierbei besteht das System aus einer DNA, die mit einem Quencher und einem Farbstoff, bzw. zwei Farbstoffen, deren Emission und Absorption überlappen, modifiziert ist (Übersichtsartikel hierzu: Lit.^[94, 95]). Durch Zugabe des Gegenstranges kommt es zur Duplexbildung, wodurch ein Fluoreszenzanstieg bzw. Farbwechsel auftritt. Dieser ist nur schwach ausgeprägt, falls eine Fehlpaarung, wie im Falle eines SNP, vorliegt. Die DNA-SWCNT Hybride eignen sich für diese Untersuchungsmethode, wobei der SWCNT als Quencher (für Pyrene, Porphyrine, andere Chromophore und Quantenpunkte)^[96-100] dient. Die Fluoreszenz des Fluorophors wird dabei auf zwei verschiedene Wege gelöscht: Zum einen absorbiert eine SWCNT-Mischung über das gesamte UV/Vis-Spektrum (siehe Kapitel 3.2.3), wodurch eine Überlagerung mit der Emission des Chromophors und damit ein Energietransfer auftritt (SWCNT dient als Akzeptor,^[101, 102] Fluorophor als Donor). Zum anderen sind SWCNT sehr gute Elektronenakzeptoren.^[101] Hierbei wird der Chromophor oxidiert und das Elektron auf den SWCNT übertragen, der dabei reduziert wird.^[103, 104] *Tan et al.*^[105] nutzten diese Eigenschaften um ein Hybridisierungsexperiment durchzuführen. Hierzu wurde eine in DMF dispergierte SWCNT-Lösung zu einem fluoresceinmodifizierten DNA-Einzelstrang in Pufferlösung pipettiert. Hierdurch kommt es zur Bindung der DNA an den SWCNT, wodurch die Fluoreszenz des Fluoresceins um mehr als 98% gelöscht wurde. Bei Zugabe des Gegenstranges findet eine kompetitive Bindung an den SWCNT statt, wodurch sich der Doppelstrang ausbildet. Dies geht mit einem Fluoreszenzanstieg einher. Der Vorteil an diesem System liegt in dem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie dass nur ein Ende der DNA modifiziert werden muss. In einem anderen Experiment benutzten *Tan et al.*^[106] unmodifizierte DNA, SWCNTs und Ethidiumbromid (ein interkalierender Farbstoff), um erfolgreich SNP Detektion durchzuführen.

Feld-Effekt-Transistoren (FET):

Die DNA steigert die Leistung des SWCNT-FET-System welches bereits bisherige Si-FETs übertrifft.^[107] Durch das Wickeln der DNA um den SWCNT ändert sich dessen Leitfähigkeit kaum,^[108] bietet dabei aber Bindungsstellen für eine Vielfalt von Analyten.^[109] Bei Bindung eines Analyten verändert sich leicht die elektronische Struktur des SWCNT, die durch eine Änderung der Leitfähigkeit ausgelesen werden kann. Dabei verursachen unterschiedliche Analyten unterschiedliche Signaländerungen. *Johnson et al.*^[109] nutzten dies, unter anderem, um Methanol und Propionsäure zu detektieren.

SWCNT in der biologischen und medizinischen Anwendung

SWCNTs haben in den vergangenen Jahren einen immer größeren Stellenwert in der biologischen und medizinischen Anwendung gefunden. Sie eignen sich, aufgrund ihrer einzigartigen physikalischen Eigenschaften, als Sensoren und Wirkstoffe in biologischen Systemen, sowie als Transporter für verschiedenste Moleküle in Zellen (Übersichtsartikel hierzu Lit^[22, 110-113]). So wurde z.B. in einer Arbeit von *Curley et al.*^[114] der Effekt ausgenutzt, dass SWCNTs elektromagnetische Strahlung in Wärme umwandeln. Hierzu wurden mit Kentera (ein Polymer auf Polyphenylen-ethylen-Basis) umwickelte SWCNTs in Krebszellen eingebracht und einem 13,56 MHz Radiofrequenzfeld ausgesetzt. Dadurch kam es zum Absterben der Krebszellen. Um SWCNT für den biologischen und medizinischen Bereich einzusetzen, dürfen die SWCNT *per se* nicht schädlich sein. Daher spielt für die Verwendung von SWCNTs die Cytotoxizität eine große Rolle. Dabei müssen allerdings mehrere Faktoren betrachtet werden:

SWCNTs können durch verschiedene Prozesse (siehe Kapitel 3.2.1) mit unterschiedlichen Katalysatoren hergestellt werden. Verunreinigungen der SWCNT-Charge durch den Katalysator, vor allem Eisen, können bereits zur Cytotoxizität führen. Zelltest werden im wässrigen Medium durchgeführt, weshalb die Verwendung von reinen SWCNTs problematisch ist, da diese bündeln und sich damit nicht mehr wie individuelle SWCNTs verhalten bzw. durch Bindung essentieller Bestandteile der Zelle zu indirekten toxischen Effekten führen.^[115] Werden Tenside oder Polymere verwendet, um die SWCNTs im wässrigen Medium zu lösen, so muss deren Toxizität ebenfalls berücksichtigt werden.

3. Theoretischer Hintergrund

Darüber hinaus unterscheiden sich die Eigenschaften der SWCNTs von Hersteller zu Hersteller und manchmal auch bei unterschiedlichen Chargen eines Herstellers.^[116] All dies macht eine klare Aussage über die Cytotoxizität von SWCNTs schwierig. Daher werden meist nur einige Aspekte genauer betrachtet. *Dong et al.*^[117] untersuchten den Einfluss der gebräuchlichen Tenside und Polymere auf die Cytotoxizität. Hierfür testeten sie SDS-, SDBS-, Natriumcholatl- (SCol) und DNA-SWCNT-Hybride an menschlichen Astrocytoma 1321N1 Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass bereits SDS und SDBS ohne SWCNT cytotoxisch sind, dahingegen zeigten SCol, SCol-SWCNT Hybride, DNA und DNA-SWCNT Hybride keinen Einfluss. Diese Experiment und weitere Studien weisen darauf hin, dass hochfunktionalisierte SWCNT mit einer biokompatiblen Umgebung nicht cytotoxisch sind.^[116, 118-122]

3.3 Oberflächenplasmonenresonanz

Unter Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance* SPR) ist eine Ladungsdichtefluktuations zu verstehen, welche an der Grenzschicht zwischen zwei Medien mit Dielektrizitätskonstanten unterschiedlichen Vorzeichens auftreten kann, z.B. einem Metall und einem Dielektrikum.^[123] Die Oberflächenplasmonen (die kollektiven Plasmaschwingungen an der Grenzfläche) entstehen dabei aus den gemeinsamen Ladungsschwankungen des Elektronengases. Die Grundlagen lieferte die Entdeckung der anomalen Beugung am optischen Gitter aufgrund der Anregung von Oberflächenplasmawellen 1902 von *Wood*.^[124] In den späten 1960ern wurde von *Kretschmann*^[125] und *Otto*^[126] die Anregung von Oberflächenplasmonen mittels abgeschwächter Totalreflexion bewiesen. Seit diesem Zeitpunkt wurde das Phänomen der Oberflächenplasmonen intensiv studiert. Ende der 1970er wurde die SPR zur Charakterisierung von dünnen Filmen^[127] oder der Prozesse an Metalloberflächen^[128] genutzt. 1982 zeigten *Nylander et al.* und *Liedberg et al.* das Potential der SPR zur Gas-Detektion^[129, 130] und für die Biosensorik.^[130, 131] Seit diesem Zeitpunkt fand die SPR immer mehr Bedeutung. Vor allem in der Biosensorik findet diese Methode große Anwendung, da biospezifische Interaktionen ohne Markierung unter Echtzeitanalyse beobachtet werden können. Das physikalische Prinzip wird sehr vereinfacht im Folgenden erläutert:

Da bei diesen Plasmaschwingungen eine Bewegung von Ladung stattfindet, wird ein elektromagnetisches Feld, als evaneszentes Feld bezeichnet, erzeugt. Dieses fällt zu beiden Seiten der Grenzfläche exponentiell ab.

Zur Anregung von Oberflächenplasmonen mittels Licht müssen Energie- und Impulserhaltung erfüllt sein. Die Bedingungen dafür können durch das Lösen der Maxwell'schen Gleichung berechnet werden. Für eine ausführliche Berechnung sei auf die Literatur^[132] verwiesen. Der Impuls \mathbf{p} ist direkt proportional zum Wellenvektor \mathbf{k}

$$\mathbf{p} = \frac{\hbar}{2\pi} * \mathbf{k} \quad (\text{Gleichung 3-4})$$

mit \hbar = Planksches Wirkungsquantum

Somit ist die Impulserhaltung erfüllt, falls die Wellenvektorkomponente des Photons in Ausbreitungsrichtung x ($\mathbf{k}_{\text{Ph},x}$) gleich der Wellenvektorkomponente des Oberflächenplasmons \mathbf{k}_{op} ist. Der Einfallswinkel des Lichts hat dabei folgenden Einfluss auf den Wellenvektor

$$k_{\text{Ph},x} = |\mathbf{k}_{\text{Ph}}| * \sin\Theta \quad (\text{Gleichung 3-5})$$

wobei der Betrag des Wellenvektors definiert ist als:

$$|\mathbf{k}_{\text{Ph}}| = \frac{\omega}{c} * \sqrt{\epsilon} \quad (\text{Gleichung 3-6})$$

mit ϵ : Dielektrizitätskoeffizient und ω : Frequenz

Da der Impuls von Photonen, die aus der Luft auftreffen zu gering ist, können keine Oberflächenplasmonen angeregt werden. Daher muss der Impuls des Lichtes, bei konstanter Frequenz, erhöht werden. Dies ist durch eine Einkoppelvorrichtung, wie z.B. ein Prisma möglich. Durch die Prismenkopplung, auch als attenuated total reflection (ATR-Kopplung) bezeichnet, erfolgt die Impulserhöhung, indem aus einem höher brechenden Medium eingestrahlt wird und somit sich die Dielektrizitätszahl ϵ vergrößert.

$$\epsilon_{\text{Prisma}} > \epsilon_{\text{Luft}} \quad (\text{Gleichung 3-7})$$

Der Metallfilm, das Prisma und das dielektrische Medium haben Einfluss auf den Wellenvektor der Oberflächenplasmonen. Unter bestimmten Bedingungen, d.h. bei einer

3. Theoretischer Hintergrund

gewissen Wellenlänge unter einem bestimmten Winkel des auftreffenden Lichtstrahls, kommt es zu einer Resonanz zwischen den freien Elektronen und dem Licht, wodurch die Intensität der Reflexion stark abnimmt und dabei ein Minimum, den sogenannten SPR-Winkel, durchläuft. Änderungen der dielektrischen Eigenschaften, z.B. Brechungsindex oder Dicke des umgebenden Mediums, führen zu einer Änderung des Wellenvektors und dadurch zu einer Verschiebung des Resonanzminimums des reflektierten Lichtes (Abb. 17 A, Verschiebung von 1 → 2).

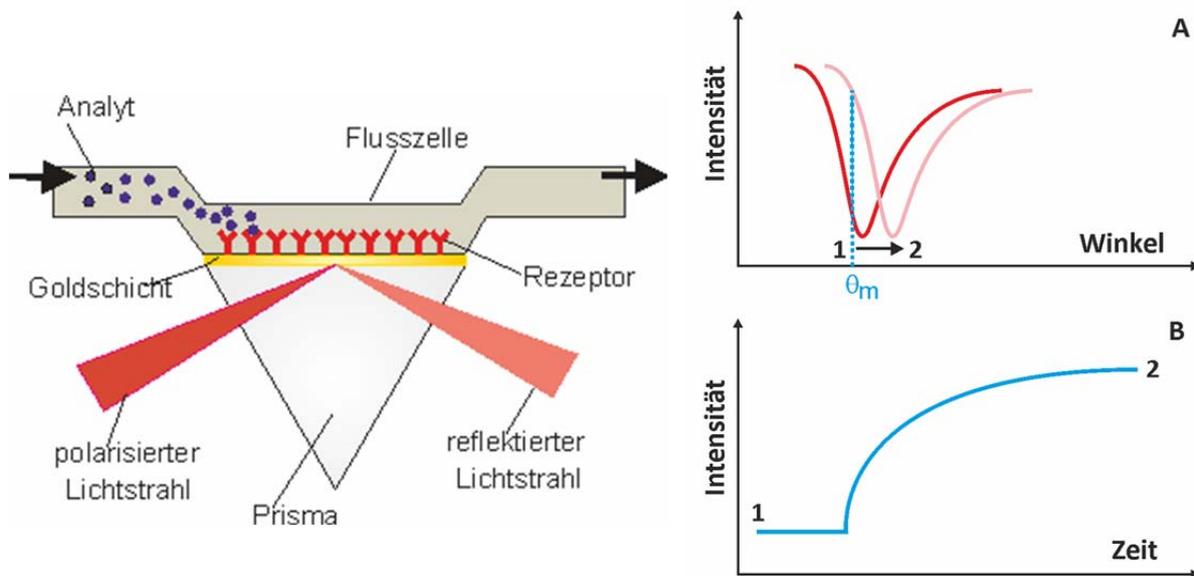


Abb. 17 Links: Schematischer Kretschmann Aufbau für eine SPR-Messung, rechts oben: Änderung des Resonanzminimums aufgrund einer Änderung der dielektrischen Eigenschaft. Rechts unten: Änderung des Brechungsindex gegen die Zeit aufgetragen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Hirsch.

Die SPR Spektroskopie gehört daher zu den sensitivsten Methoden, um Brechungsindexänderungen zu detektieren. Der Begriff Spektroskopie ist in diesem Fall nicht ganz richtig, da kein Energiespektrum des Analyten gemessen wird. Dennoch hat sich dieser Begriff dafür etabliert. Die Änderung des Brechungsindex wird hierbei als RIU (refractive index units) angegeben, welche sich auf die Änderung des Volumenindex bezieht.

Mehrere Varianten der SPR Spektroskopie haben sich mit der Zeit entwickelt. Diese lassen sich aufgrund zweier Faktoren unterteilen. Zum einen nach der Art der Einkoppelvorrichtung, zum anderen welche Komponente der Lichtwelle verändert wird.^[132] In einem *Kretschmann*-Aufbau, wie er links in Abb. 17 dargestellt ist, wird als

3. Theoretischer Hintergrund

Einkoppelvorrichtung ein Prisma verwendet. Als Lichtquelle wird häufig monochromatisches, p-polarisiertes Licht benutzt. Dies wird winkelabhängig eingestrahlt und die Intensität des reflektierten Lichtstrahls in Abhängigkeit des Winkels gemessen. (Abb. 17 rechts). Unter den Resonanzbedingungen kommt es zu einem Minimum in der Intensität. Für eine Messung wird ein Winkel Θ_m (Abb. 17 A) festgesetzt und dabei die Änderung der Intensität über die Zeit bei Zugabe des Analyten beobachtet (Abb. 17 B).

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Bei Betrachtung der in der Literatur beschriebenen Experimente mit DNA-SWCNT-Hybriden, lässt sich feststellen, dass nur selten modifizierte DNA Verwendung findet. Beispiele hierfür sind die Experimente von *Strano et al.*^[39] und *Tan et al.*^[133]. Beide verwendeten endständig chromophormodifizierte DNA, um mittels Energietransfer DNA-Hybridisierung am SWCNT nachzuweisen. Dabei bietet die DNA aus synthetischer Sicht eine „Spielwiese“ für verschiedenste Modifikationen. Der Grund dafür liegt im Aufbau der DNA aus Bausteinen. Dadurch lassen sich diverse Modifikationen in einen DNA-Strang einbetten, indem der entsprechend künstliche DNA-Baustein synthetisiert wird.^[134] Bisher wurden hauptsächlich Chromophor^[135-139] und Metall-Ligand-Komplexe^[140-143] in unterschiedlichster Art und Weise in DNA eingebaut. Auch am Arbeitskreis *Wagenknecht* haben sich unterschiedlichste Methoden zur Modifikation von DNA etabliert^[144].

Daher war es das Ziel in diesem Teil der Arbeit, durch eine geschickte Wahl des Chromophors und der Anknüpfungsstelle an die DNA, eine Änderung im Bindungs- bzw. Löslichkeitsverhalten und ein besseres Verständnis des Verhaltens der DNA am SWCNT hinsichtlich der Stabilität zu erlangen.

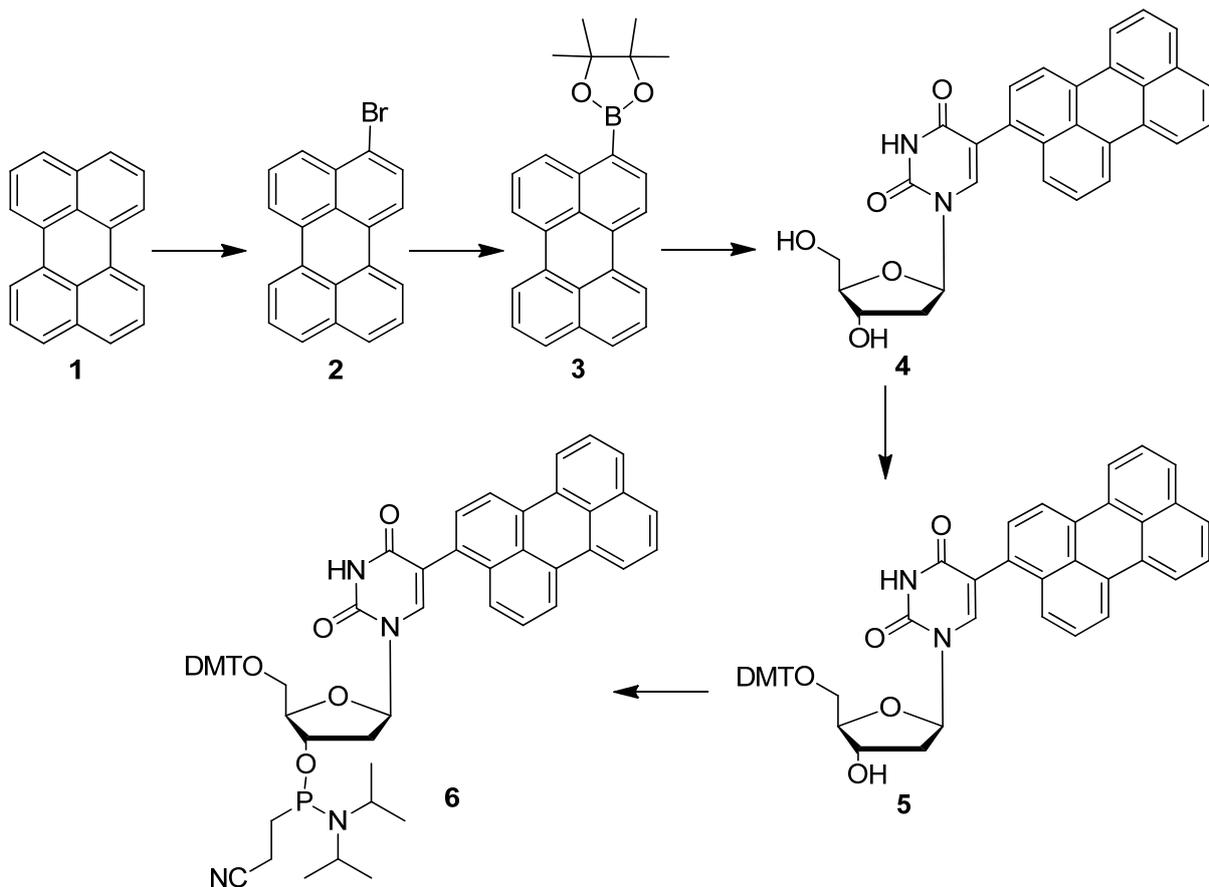
4.1 Modifizierte Oligonukleotide zur Änderung der Bindungseigenschaften am SWCNT

Wie in Kapitel 3.2.4 erläutert, kommt es aufgrund von π - π Wechselwirkungen zum Wickeln der DNA um SWCNTs. Nutzt man nun die breite Palette an möglichen Modifikationen für die DNA, so bietet sich daraus eine Vielzahl an Molekülen an, welche ein ausgedehntes π -System besitzen. Die Idee war, durch eine Verstärkung der π - π -Wechselwirkungen eine Änderung im Lösungs- und/oder Bindungsverhalten hervorzurufen. Dadurch kann es zu einer Änderung in der Selektivität für eine bestimmte (n,m)-Spezies und/oder erhöhten Ausbeute und/oder einer besseren Entbündelung der Hybride kommen. Dies ist insofern interessant, da die bisherigen Ausbeuten einzelner (n,m)-Spezies unter 1%^[37] liegen und daher nahezu keine praktische Anwendung möglich ist. Größere Mengen wären von Bedeutung, um die

theoretischen Berechnungen von einzelnen (n,m)-Spezies experimentell zu belegen. Die Mischungen aus mehreren Spezies machen dies jedoch kompliziert. Bisher besteht eine potentielle Anwendung darin, die geringen Mengen als Keime in der Synthese der SWCNT einzusetzen, um durch eine Art Klonierungsprozess bestimmte (n,m)-Spezies anzureichern.^[37, 145]

Als Modifikationen wurden die Polyaromaten Pyren **7** und Perylen **1** ausgewählt. Diese beiden Polyaromaten wurden verwendet, da sie wie der SWCNT nur aus sp^2 -verbrückten Kohlenstoffatomen aufgebaut sind. Aufgrund der ähnlichen Struktur sollten sich starke π - π -Wechselwirkungen ausbilden können.

4.1.1 Synthese und Charakterisierung des Perylen Bausteins **6**



Schema 1 Synthese des Bausteins **6**: a) NBS (1 eq.), DMF, 24 h, RT, 94%^[146]; b) Bispinakolatodiboron (1,1 eq.), KOAc (3 eq.), Pd(dppf)₂Cl₂ (4 mol%), THF, 80 °C, 54%; c) 5-Iod-2'-Desoxyuridin (1,0 eq.), Pd(dppf)₂Cl₂ (0,1 eq.), NaOH (14 eq.), THF:H₂O:MeOH 2:1:1, 65 °C, 37%; d) DMT-Cl (9 eq.), abs. Pyridin, abs. NEt₃ (5% v/v), 48 h, RT, 82%; e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2 eq.), DIPEA (3 eq.), abs. DCM, 1 h, RT, 98%.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Die Synthese des Perylen-Bausteins (PerdU) ist in Schema 1 dargestellt. Im ersten Schritt wurde nach Literaturvorschrift^[146, 147] das Perylen **1** mit NBS an der 3-Position bromiert. Nach Ausfällen aus DMF mit Wasser und anschließendem Umkristallisieren aus Hexan wurde **2** mit Bispinakolatodiboron unter Palladiumkatalyse zum entsprechenden Boronsäureester **3** umgesetzt.^[148] Anschließend wurde eine palladiumkatalysierte Suzuki-Miyaura-Reaktion mit 5-Iod-2'-Desoxyridin **9** zum Produkt **4** durchgeführt. Die niedrige Ausbeute bei dieser Reaktion ist auf eine Nebenreaktion von **3** zurückzuführen. Unter den stark basischen und wässrigen Bedingungen findet eine Ipso-Substitution statt, wodurch die Boronsäureestergruppe durch ein Proton ersetzt wird und **1** entsteht. Nach DMT-Schätzung von **4** und Reaktion mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit wurde der Baustein **6** mit einer Gesamtausbeute von 14% erhalten.

Zur Charakterisierung des neuen Bausteines wurden folgende Oligonukleotide synthetisiert, um den Effekt der Nachbarbasen zu untersuchen:

Per-DNA1	3'-AGT-CAC-TA PerdU -ATC-TGA-CG-5'
Per-DNA2	3'-AGT-CAC-TC PerdU -CTC-TGA-CG-5'
Per-DNA3	3'-AGT-CAC-TG PerdU -GTC-TGA-CG-5'
Per-DNA4	3'-AGT-CAC-TT PerdU -TTC-TGA-CG-5'

In Abb. 18 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren für die einzel- und doppelsträngigen (A als Gegenbase) Oligonukleotide (**Per-DNA1–4**) abgebildet. Bereits bei der Fluoreszenz der Einzelstränge findet bei G und C als Nachbarbase eine Fluoreszenzlöschung durch Guaninoxidation oder protonengekoppelten Elektronentransfer statt, welche im Doppelstrang noch stärker ausgeprägt ist. Generell ist die Fluoreszenz der Einzelstränge größer als die der Doppelstränge. Der Grund hierfür ist die ungeordnete Struktur des Einzelstranges: Der Anteil der Fluoreszenzlöschung durch Guaninoxidation bzw. protonengekoppelten Elektronentransfer ist aufgrund der flexiblen Struktur unwahrscheinlicher. Im Doppelstrang hingegen wird das Perylen durch die rigide Struktur der DNA in eine bestimmte Umgebung entlang der Furche der DNA gezwungen. Aufgrund der räumlichen Nähe kommt es zu einem photoinduzierten Ladungstransfer mit den benachbarten Basen, der zur Fluoreszenzlöschung führt.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

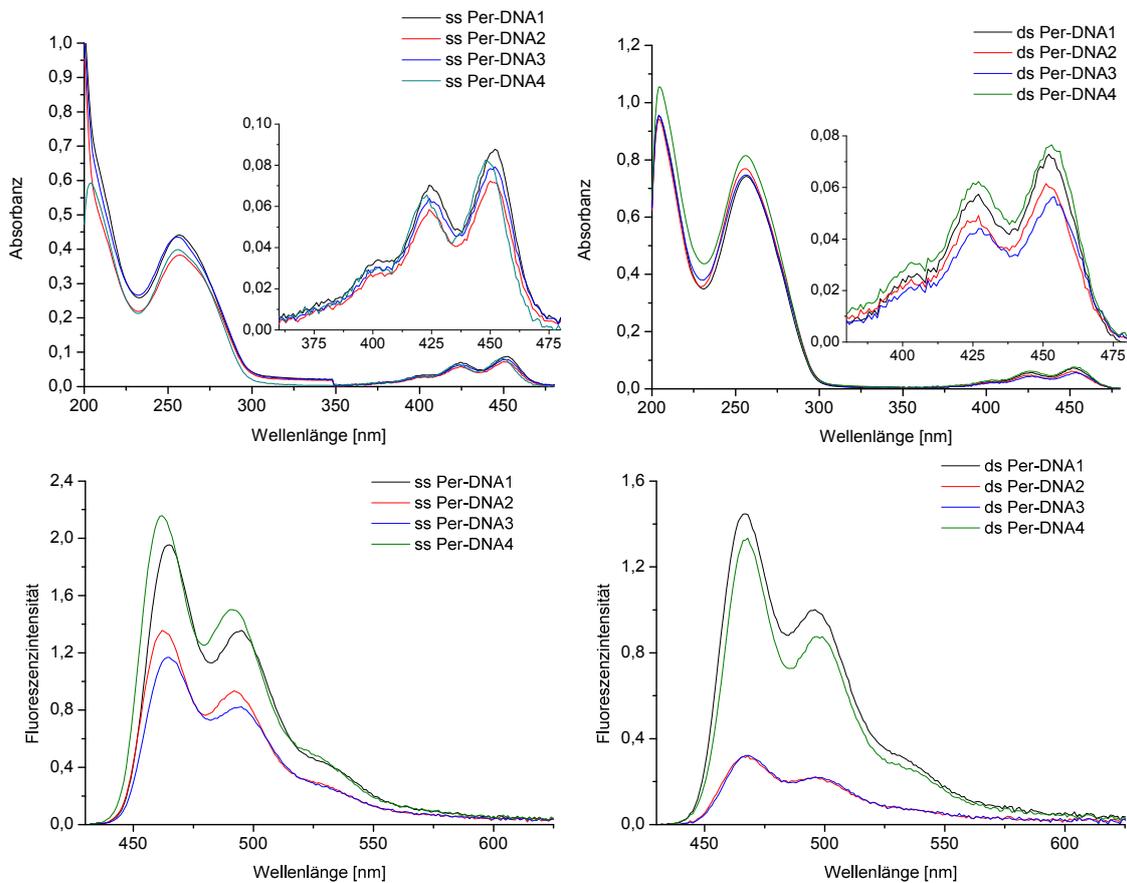


Abb. 18 Oben: Absorptionen der Einzel- und Doppelstränge von **Per-DNA1-4** (der Bereich der Absorption des Perylen ist vergrößert dargestellt). Unten: Fluoreszenzspektren der Einzel- und Doppelstränge von **Per-DNA1-4** (Anregung bei $\lambda = 426$ nm).

Damit eine Guaninoxidation stattfindet, muss der Perylenbaustein ein Reduktionspotential von mindestens 1,3 eV im angeregten Zustand aufweisen. Dies lässt sich aus Cyclovoltammetrie-Messungen (CV) und dem E_{00} -Wert (Energiedifferenz zwischen Grundzustand und erstem angeregten Zustand, jeweils im Schwingungsgrundzustand) berechnen. Für die CV-Messungen wurde der Baustein **4** in DMF mit Ferrocen als internem Standard vermessen (Abb. 19). Der Wert für die Normalwasserstoffelektrode ergibt sich durch Addition von 0,63 V.^[149] Mit dem gemessenen E_{00} -Wert lässt sich nach der *Rehm-Weller-Gleichung*^[150, 151] die Triebkraft vorhersagen. Die Gleichung besagt:

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

$$\Delta G_{CT} = e[E_{ox} - E_{red}] - E_{00} + C \quad (\text{Gleichung 4-1})$$

mit : ΔG_{CT} : freie Enthalpie des Ladungstransfers (*charge transfer, CT*),

e : Elementarladung,

E_{ox} : Oxidationspotential des Grundzustands,

E_{red} : Reduktionspotential des Grundzustands,

E_{00} : Singulett-Energie des HOMO-LUMO Übergangs,

C : Änderung der Coulomb-Energie, in diesem Fall näherungsweise 0

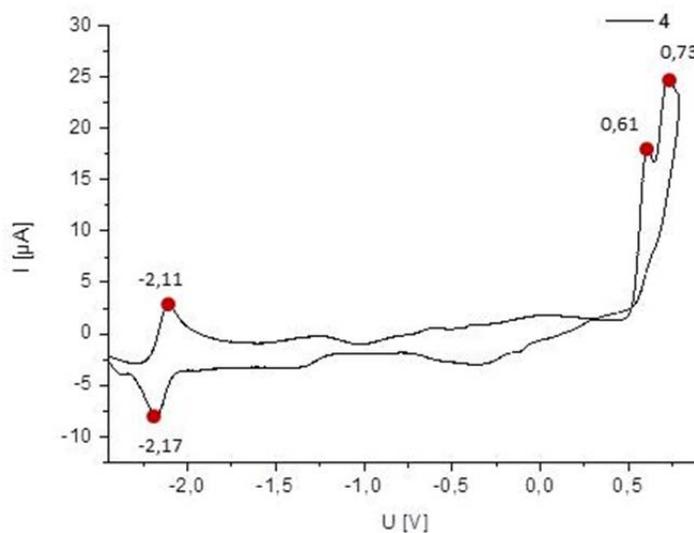


Abb. 19 CV Spektrum von **4** in DMF gegen Ferrocen korrigiert; Leitsalz: 50 mM TBAHFP, $\nu = 200$ mV/s. Die roten Punkte verweisen auf die reduktiven und oxidativen Prozesse. Nur der reduktive Prozess ist reversibel.

Da nur der reduktive Prozess reversibel ist, wird lediglich der Wert für den oxidativen Lochtransfer bestimmt. Zur vollständigen Darstellung sind die Gleichung für den reduktiven Elektronentransfer ebenfalls aufgeführt.

Das Potential für den Donor (Do) im angeregten Zustand berechnet sich aus:

$$E_{red}^* = E_{red}(Do) + E_{00} \quad \text{oxidativer Lochtransfer} \quad (\text{Gleichung 4-2})$$

$$E_{ox}^* = E_{ox}(Do) - E_{00} \quad \text{reduktiver Elektronentransfer} \quad (\text{Gleichung 4-3})$$

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Dadurch ergibt sich für die vereinfachte *Rehm-Weller* Gleichung:

$$\Delta G_{HT} = e[E_{ox}(Ak) - E_{red}^*(Do)] \quad \text{oxidativer Lochtransfer (HT)} \quad (\text{Gleichung 4-4})$$

$$\Delta G_{ET} = e[E_{ox}(Do) - E_{red}^*(Ak)] \quad \text{reduktiver Elektronentransfer (ET)} \quad (\text{Gleichung 4-5})$$

(Ak entspricht dem Akzeptor)

In Tab. 2 sind die Reduktionspotentiale des Perylen Bausteines **4** angegeben. Es ergibt sich eine Triebkraft ΔG von ungefähr +0,1 eV. Der Energieunterschied ist vergleichsweise gering, so dass eine Guaninoxidation wahrscheinlich ist, wenn man bedenkt, dass diese Abschätzung sehr ungenau ist.

Tab. 2 Übersicht über die Redoxpotentiale von PerDU

	E_{00} [eV]	E_{red} [eV]	E_{red}^* [eV]	$E_{ox}(G/G^{*+})^{[152]}$ [eV]
PerDU	+2,70	-1,51	+1,19	ca. +1,30

Die Schmelzpunkte der Duplexe sind in Tab. 3 dargestellt:

Tab. 3 Schmelztemperaturen der Perylen Oligonukleotide. Die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf vollständig komplementäre Referenzduplexe^[153], in denen die Modifikation gegen ein T ersetzt wurde.

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
Per-DNA1	53,0	-8,0
Per-DNA2	57,5	-8,5
Per-DNA3	60,8	-7,2
Per-DNA4	51,7	-10,8

Die Destabilisierung durch die Modifikation liegt in einem für 5-Modifikationen typischen Bereich.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

4.1.2 Anwendung der perylenmodifizierten Oligonukleotide in der Bioanalytik mittels korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie

Den Weg der DNA/RNA-Transfektion bzw. deren Verlauf in der Zelle zu verstehen ist nicht nur von großem wissenschaftlichen Interesse, sondern spielt auch für medizinische und pharmazeutische Anwendungen eine entscheidende Rolle (Übersichtsartikel hierzu Lit.^[154, 155]). Die Schwierigkeit in der Behandlung besteht darin, die therapeutisch notwendige Menge an DNA in die Zelle bzw. den Zellkern zu transfizieren.^[155] Hierzu werden Transfektionshilfen, meist in Form von polykationischen Polymeren, z.B. Lipidstrukturen, verwendet (aktuelle Übersichtsartikel hierzu Lit.^[156-159]). Die DNA-Polymer-Strukturen, im Falle der Lipidstrukturen sogenannte Lipoplexe, überwinden die Zellmembran und transportieren die DNA in das Cytosol bzw. bis zum Zellkern.^[154] Somit spielt die Effektivität der Transporthilfe eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Therapie.^[160] Um dies besser quantifizieren zu können und um die Wege der DNA in der Zelle besser zu verstehen, ist dabei eine effiziente Bildgebung notwendig.

Die Lichtmikroskopie (*laser scanning microscopy*, LSM) eignet sich um den Weg chromophormarkierter Objekte zu verfolgen, jedoch ist die Auflösung dieser Methode zu gering um einzelne Organellen darzustellen. Eine höhere Auflösung bietet die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Um die Objekte in der TEM-Aufnahme sichtbar zu machen, wird unter anderem die photoinduzierte Polymerisation des 3,3'-Diaminobenzidins (DAB) genutzt. Da die Polymerisation in diesem Fall nur in der direkten Umgebung des Chromophors stattfinden kann, lässt sich dadurch dessen Position genau bestimmen. Die Kombination dieser beiden Mikroskopie-Techniken unter Verwendung von Chromophoren wurde bereits 1982^[161] beschrieben und wurde seitdem mit verschiedenen Fluorophoren eingesetzt.^[162-168] Der Mechanismus der photoinduzierten Polymerisation von DAB ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch zeichneten sich als eine der Hauptgründe reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ab.^[162, 163] Untersuchungen mit Eosin^[169] und weiteren Farbstoffen^[163-165] bestätigten, dass Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Sauerstoffradikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$), welche in situ aus dem photoangeregten Zustand des Chromophors entstehen, hauptverantwortlich für die DAB-Polymerisation sind (Abb. 20). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist eine Polymerisation durch Elektronentransferprozesse^[169] zwischen

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Farbstoff und DAB. DAB ist ein guter Elektronendonator ($E_{\text{ox}} = 0,53 \text{ V}$ gegen $\text{NHE}^{[170]}$) und kann beispielsweise durch den Perylenbaustein (PerDU Kapitel 4.1.1) oxidiert werden (Triebkraft nach der *Rehm-Weller*-Gleichung etwa $-0,66 \text{ eV}$).

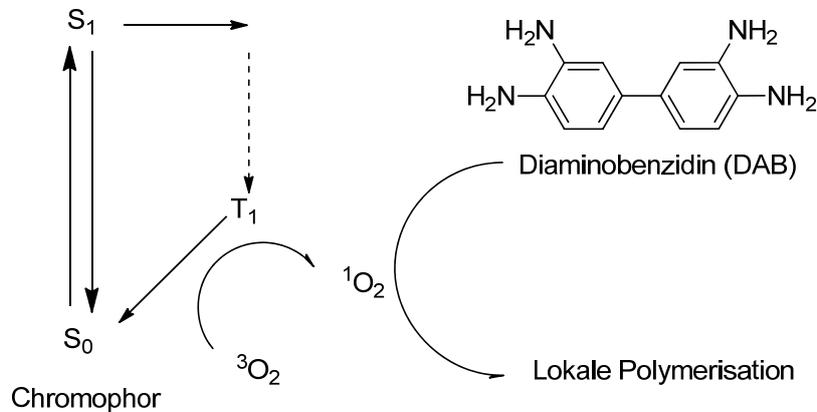


Abb. 20 Photoinduzierte Polymerisation von DAB durch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), welcher in situ aus dem angeregten Zustand des Chromophors gebildet wurde. Abbildung in Anlehnung an *Tsien et al.*^[165]

Die Arbeitsgruppe *Witzgall* vom Institut für Vorklinische Medizin an der Universität Regensburg kombinierten etablierte Methoden der Histologie und die Verknüpfung aus Licht- und Elektronenmikroskopie, um Nukleinsäuren zu detektieren. Zu diesem Zweck wurde folgendes Oligonukleotid mit dem Perylenbaustein PerDU synthetisiert. Die Sequenz ist rein zufällig gewählt und besitzt keine gezielte biologische Relevanz.

Per-DNA5 3'-ACG-CAG-TAT-CGT-AGT-CAG-TGT-CAT-PerDU-5'

Dessen Absorption- und Fluoreszenzspektrum ist in Abb. 21 dargestellt:

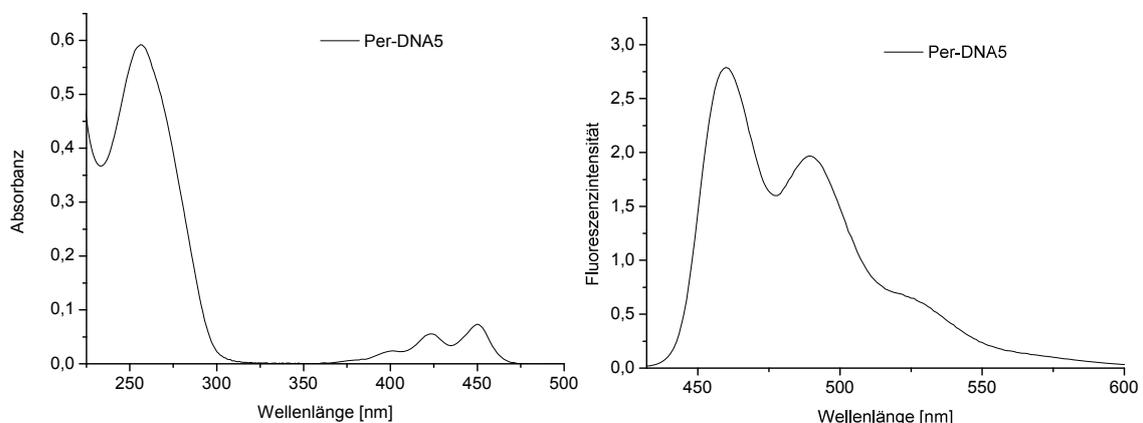


Abb. 21 Links: Absorptionsspektrum; rechts: Fluoreszenzspektrum des Oligonukleotides **Per-DNA5**. $\lambda_{\text{ex}} = 426 \text{ nm}$.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Im ersten Schritt der Probenvorbereitung wurde **Per-DNA5** durch LipofectaminTM 2000 als Transfektionshilfe in Epithelzellen aus Schweinenieren (LLC-PK1) eingeschleust. Nach 31 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend DAB zugegeben, dessen Polymerisation durch Belichtung erfolgte.

Die Transfektion der DNA in die Zelle konnte in Echtzeit mittels Lichtmikroskopie über mehrere Minuten verfolgt werden. Die Fluoreszenzbilder sind in Abb. 22 abgebildet. Deutlich zeigte sich die Perylenemission als partikelartige Strukturen (blaue Punkte in Abb. 22, die Farbe wurde nachträglich bearbeitet um einen besseren Kontrast zu liefern). Hierbei sind die Fluoreszenzsignale sowohl intra- als auch extrazellulär zu erkennen.

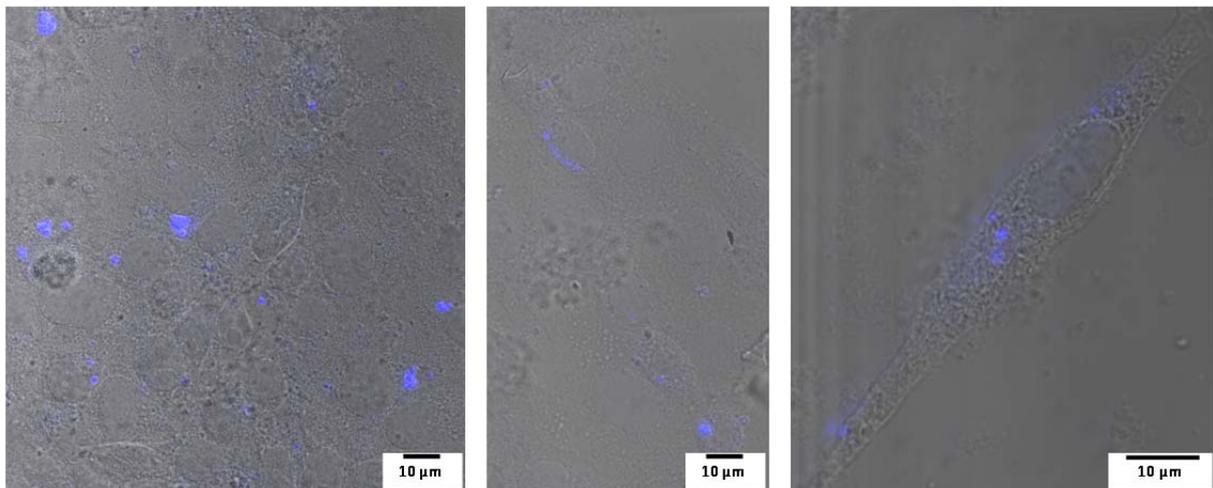


Abb. 22 Überlagerte Phasenkontrast-Fluoreszenzaufnahmen nach Inkubation mit **Per-DNA5** in den Lipoplexen. Skala: 10 µm, $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$

Die LSM-Bilder Abb. 22 bestätigten die Transfektion der DNA in die Zelle. Dabei lagerten sich die Lipoplexe in der Nähe des Zellkerns an. Nach Zugabe von DAB und anschließender Belichtung wurden Zellschnitte angefertigt, um die Proben mittels TEM zu vermessen. Durch die Photopolymerisation des DAB sind die Stellen schwarz kontrastiert, an denen sich die DNA befindet. Diese Stellen sind deutlich in Abb. 23 erkennbar. Es zeigte sich, dass sich die DNA sowohl intrazellulär, wie auch extrazellulär an der Membran befand (Abb. 23 A)

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

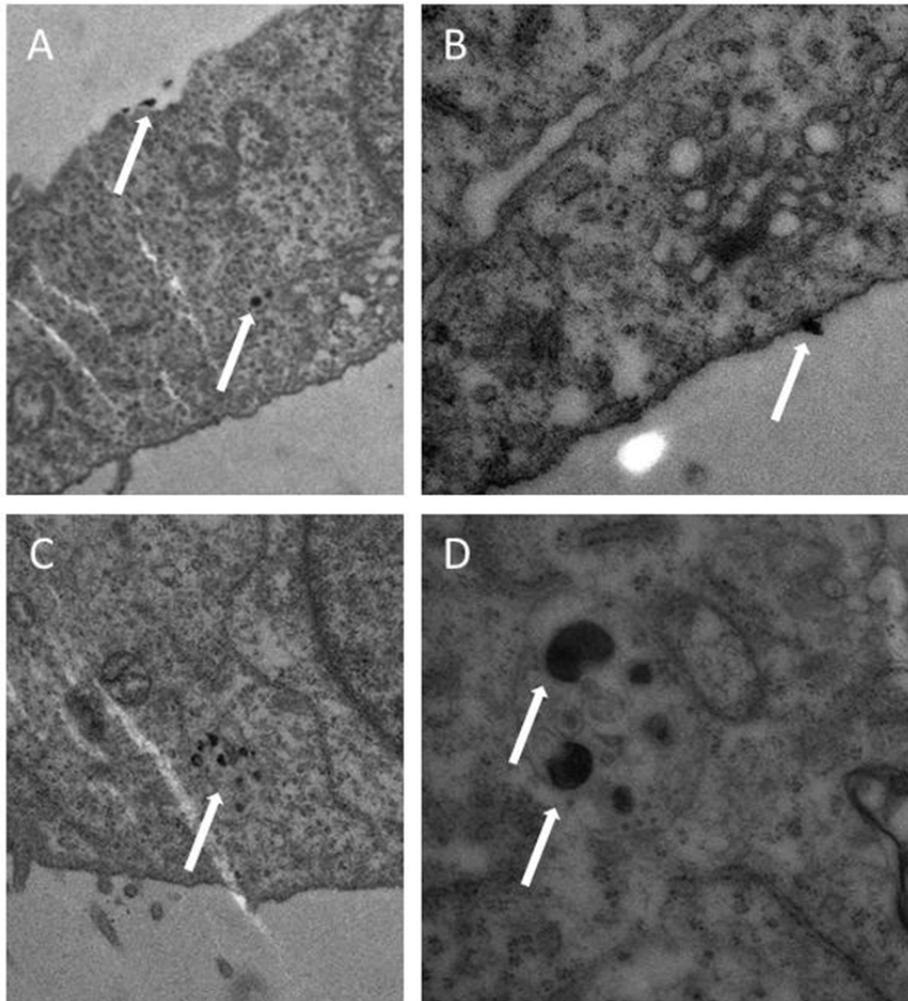


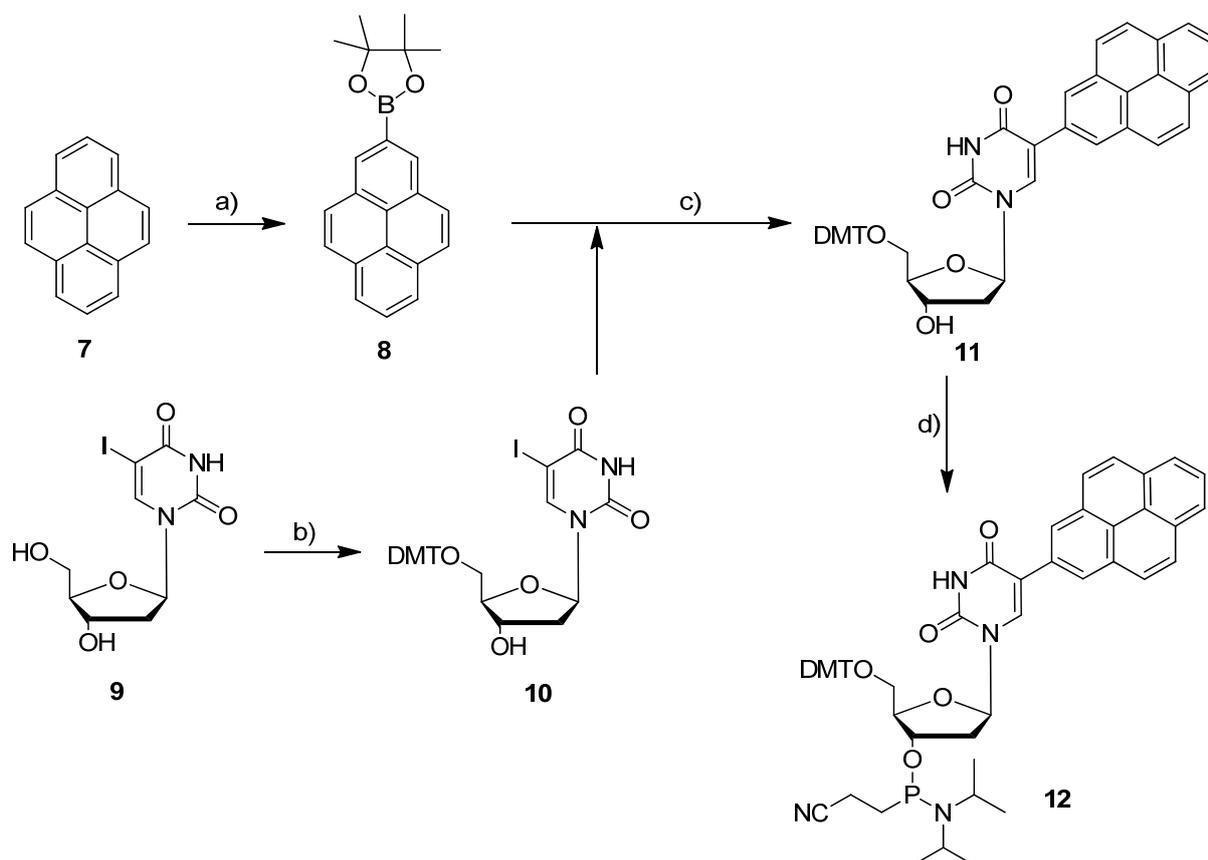
Abb. 23 TEM Aufnahmen von Zellschnitten von bereits mittels LSM betrachteten Zellen. A, B, C, und D sind Aufnahmen von verschiedenen Bereichen der Zelle. B und D sind vergrößerte Aufnahmen. Die weißen Pfeile markieren die Orte der DAB-Polymere.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die perylenmodifizierte Oligonukleotide für einen Einsatz in der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie eignen und damit eine vielversprechende bioanalytische Anwendbarkeit aufweisen.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

4.1.3 Synthese des Pyren-Bausteins 12

Die Synthese des Pyren-Bausteins (2PydU) wurde von *Wagenknecht et al.*^[171] entwickelt (Schema 2) und hier in einer leicht abgewandelten Variante angewandt. Im ersten Schritt wurde das Pyren **7** mit Bispinakolatodiboron und einem Iridiumkatalysator selektiv an der 2-Position zum entsprechenden Boronsäureester **8** umgesetzt. **8** wurde mit dem nach Literaturvorschrift^[172] synthetisierten DMT geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin **10** in einer palladium-katalysierten Suzuki-Miyaura-Reaktion zum modifizierten Nukleotid **11** gekuppelt. Als letzter Schritt erfolgte die Umsetzung zum phosphorylierten Baustein **12**. Dieser konnte mittels Festphasensynthese in DNA eingebaut werden. Diese Synthese unterscheidet sich zu der bereits bekannten Synthese,^[171] weil das 5-Iod-2'-desoxyuridin zuerst DMT geschützt und dann für den Kupplungsschritt verwendet wurde.



Schema 2 Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **12**: a) Bispinakoldiboron (1,1 eq.), dtbpy (0,1 eq.), [Ir(OMe)(COD)]₂ (0,05 eq.), abs. Cyclohexan, 48 h, 80 °C, 35%; b) DMT-Cl (1,3 eq.), abs. Pyridin, abs. NEt₃ (5% v/v), 48 h, RT, 93%; c) Pd(dppf)₂Cl₂ (0,06 eq.), Na₂CO₃ (2,1 eq.), MeCN:H₂O 2:1, 48 h, 80 °C, 38%; d) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit (1,0 eq.), DIPEA (3,6 eq.), abs. DCM, 1 h, RT, 98%.

4.1.4 CCVD oder HiPCO SWCNT

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, gibt es mehrere Herstellungsverfahren für SWCNTs. In dieser Arbeit wurden SWCNTs verwendet, die nach dem CCVD- oder HiPCO-Verfahren hergestellt wurden. Da nicht alle Verfahren die gleiche Qualität an SWCNTs liefern, wurden diese zwei Chargen mittels Raman-, UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie näher untersucht.

Als erste Methode wurde die Raman-Spektroskopie gewählt. Hierzu wurden HiPCO- und CCVD-SWCNTs in D₂O suspendiert und mit einem 10-fach Objektiv vermessen. Die Messung ist in Abb. 24 dargestellt.

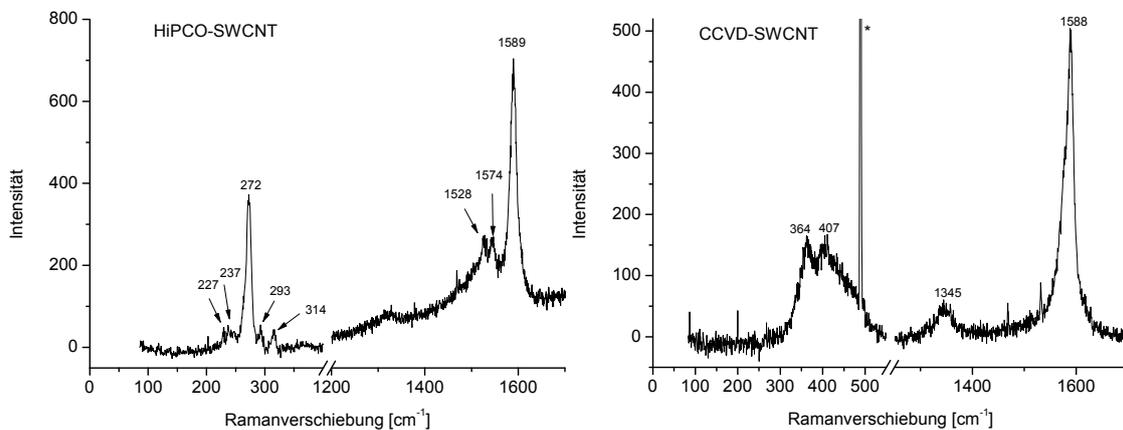


Abb. 24 Raman-Spektren der-SWCNTs in D₂O, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$. Links: HiPCO-SWCNTs, rechts: CCVD-SWCNTs. Das mit einem * gekennzeichnete Signal bei den CCVD-SWCNT stammt nicht von der Probe.

Am deutlichsten zeigten sich die Unterschiede im Bereich der RBM. Die HiPCO-SWCNTs zeigten klar erkennbare Signale, wodurch einzelne (n,m)-Spezies eindeutig zugeordnet werden können. Dahingegen ist eine (n,m)-Zuordnung für die CCVD-SWCNTs nur schwer möglich, da die Signale stark verbreitert sind und dadurch überlagern. Der G-Peak für die HiPCO-SWCNTs zeigte eine klare Aufspaltung in den G⁺- und zwei G⁻-Anteil auf. Bei den CCVD-SWCNTs ist ein stärker ausgeprägter D-Peak erkennbar, wodurch definitiv auf Defekte geschlossen werden kann. Die beiden Messungen machten deutlich, dass die HiPCO-SWCNTs für Raman-Messungen besser geeignet sind.

Für die Untersuchung mittels UV/Vis/NIR-Spektroskopie wurden die beiden SWCNT Chargen jeweils mit unmodifizierter **DNA4** (3'-(GT)₆-5') in wässrigen Medium gelöst. Dazu wurden die

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

SWCNTs und DNA in einem Glaskolben im Massenverhältnis 1:1 über zwei Stunden mit Ultraschall behandelt. Die schwarze Lösung wurde zentrifugiert, um größere Bündel an SWCNT zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und im UV/Vis Spektrometer vermessen (Abb. 25). Bei etwa 860 nm befindet sich der Lampensprung des verwendeten Gerätes.

Aus Abb. 25 ist erkennbar, dass nur die HiPCO-Hybride eine Feinstruktur aufzeigen, an der die einzelnen Übergänge der vHS erkennbar sind. Das Spektrum ähnelt dem aus Abb. 8, außer, dass die einzelnen Peaks durch das Wickeln der DNA um etwa 10 – 20 nm bathochrom verschoben sind. Die CCVD-Hybride zeigen über das ganze Spektrum keinerlei verwertbare Signale, wodurch sie für Absorptionsmessungen ungeeignet sind.

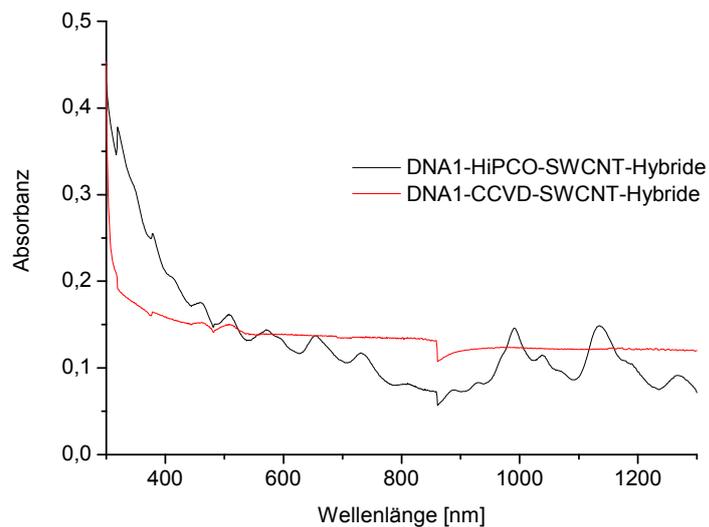


Abb. 25 SWCNT mittels **DNA1** gelöst. Nur die HiPCO-Probe zeigt deutliche Signale, die auf die vHS zurückzuführen sind. Der Absatz bei $\lambda = 860$ nm ist ein Artefakt des Messgerätes aufgrund des Lampenwechsels.

Um zu bestätigen, dass DNA an CCVD-SWCNTs bindet und damit die SWCNTs löst wurden TEM-Aufnahmen angefertigt (Abb. 26). Hierzu wurde CCVD-SWCNTs mit **DNA6** (3'-TTC-GGA-TAC-ATA-GAT-ACA-TAG-ATA-GTC-TG-5') gelöst. **DNA6** wurde gewählt, da diese größer und damit leichter in den TEM-Aufnahmen erkennbar ist.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

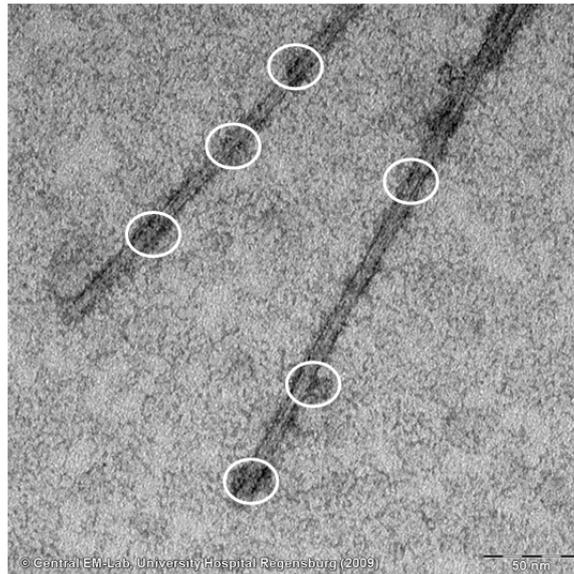


Abb. 26 TEM Aufnahme der **DNA6-CCVD-SWCNT** Hybride. Die weiß eingekreisten Bereiche zeigen die DNA an.

Die weiß eingekreisten Bereiche in Abb. 26 kennzeichnen die DNA. Dies bestätigt, dass die DNA um den CCVD SWCNT gewickelt vorlag.

Die beiden ersten Methoden zeigten klar, dass HiPCO- gegenüber den CCVD-SWCNTs überlegene Eigenschaften aufweisen. Um nun die CCVD-SWCNTs endgültig auszuschließen, wurden mit diesen Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Diese sind von Bedeutung, da Wechselwirkungen zwischen Chromophor und SWCNT durch Fluoreszenzlöschung nachgewiesen werden können.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden folgende modifizierte Oligonukleotide synthetisiert:

2PydU-DNA1 3'-TTC-GGA-TAC-ATA-GA**2PydU**-ACA-TAG-ATA-GTC-TG-5'

2PydU-DNA2 3'-TTC-GGA-TAC-A**2PydU** A-GAT-ACA-**2PydU** AG-ATA-GTC-TG-5'

2PydU-DNA3 3'-TTC-GGA-TAC-A**2PydU** A-GA**2PydU** -ACA-**2PydU** AG-ATA-GTC-TG-5'

2PydU-DNA4 3'-TTC-GGA-**2PydU** AC-A**2PydU** A-GA**2PydU** -ACA-**2PydU** AG-A**2PydU** A-GTC-TG-5'

Die SWCNT wurden analog zur UV/Vis-Messung mittels Ultraschall und DNA in Lösung gebracht. Nach dem Abtrennen ungelöster Bündel an SWCNTs wurde der Überstand durch einen Größenausschlussfilter (50 kDa) zentrifugiert. Dadurch verblieben die DNA-SWCNT Hybride im Filter und nicht gebundene DNA befand sich im Filtrat (Abb. 27). Die nun von überschüssiger DNA befreiten DNA-SWCNT-Hybride wurden resuspendiert und deren Fluoreszenzintensitäten bestimmt.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

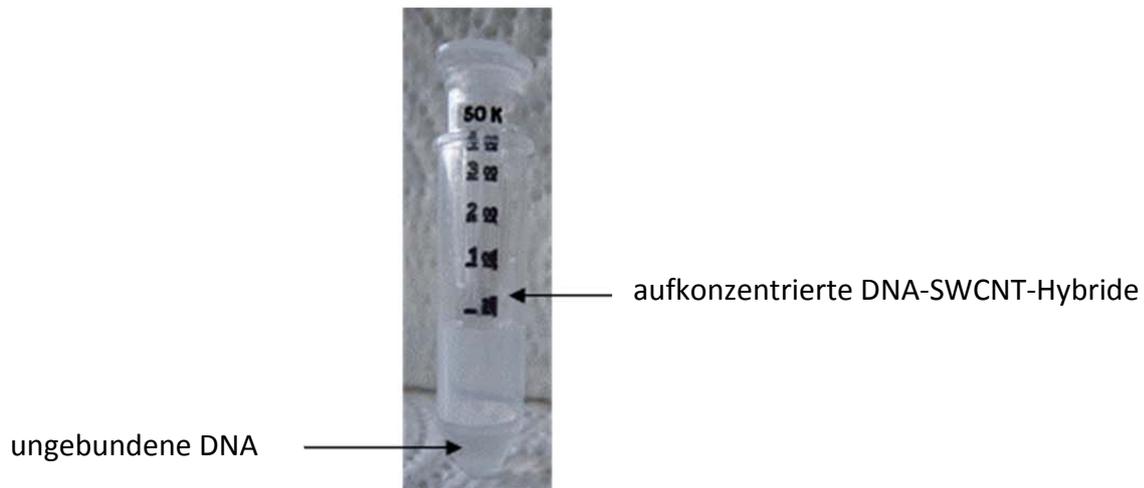


Abb. 27 Größenausschlussfilter (50 kDa) zur Abtrennung der überschüssigen DNA.

Aus der Differenz zwischen den Stoffmengen an eingesetzter DNA und ungebundener DNA (durch UV/Vis-Messungen aus dem Filtrat bestimmt) lässt sich ungefähr die gebundene Stoffmenge von DNA am SWCNT berechnen. Die Fluoreszenzspektren der **2PydU-DNA1–4**-SWCNT-Hybride sind in Abb. 28 dargestellt. Die Fluoreszenz der Kontrolle entspricht der berechneten DNA Stoffmenge, die an den SWCNT gebunden hat. Die Fluoreszenzlöschung ($1-F/F_{\text{Kontrolle}}$) ist in Tab. 4 aufgeführt. Die Werte liegen zwischen 66% - 76% und damit weit entfernt von 98%, wie von *Tan et al.*^[105] beschrieben.

Tab. 4 Fluoreszenzlöschung $F/F_{\text{Kontrolle}}$ der vier DNA-SWCNT-Hybride aus DNA 1–4.

Sequenz	Fluoreszenzlöschung ($1-F/F_{\text{Kontrolle}}$)
2PydU-DNA1	< 73%
2PydU-DNA2	< 76%
2PydU-DNA3	< 66%
2PydU-DNA4	< 70%

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

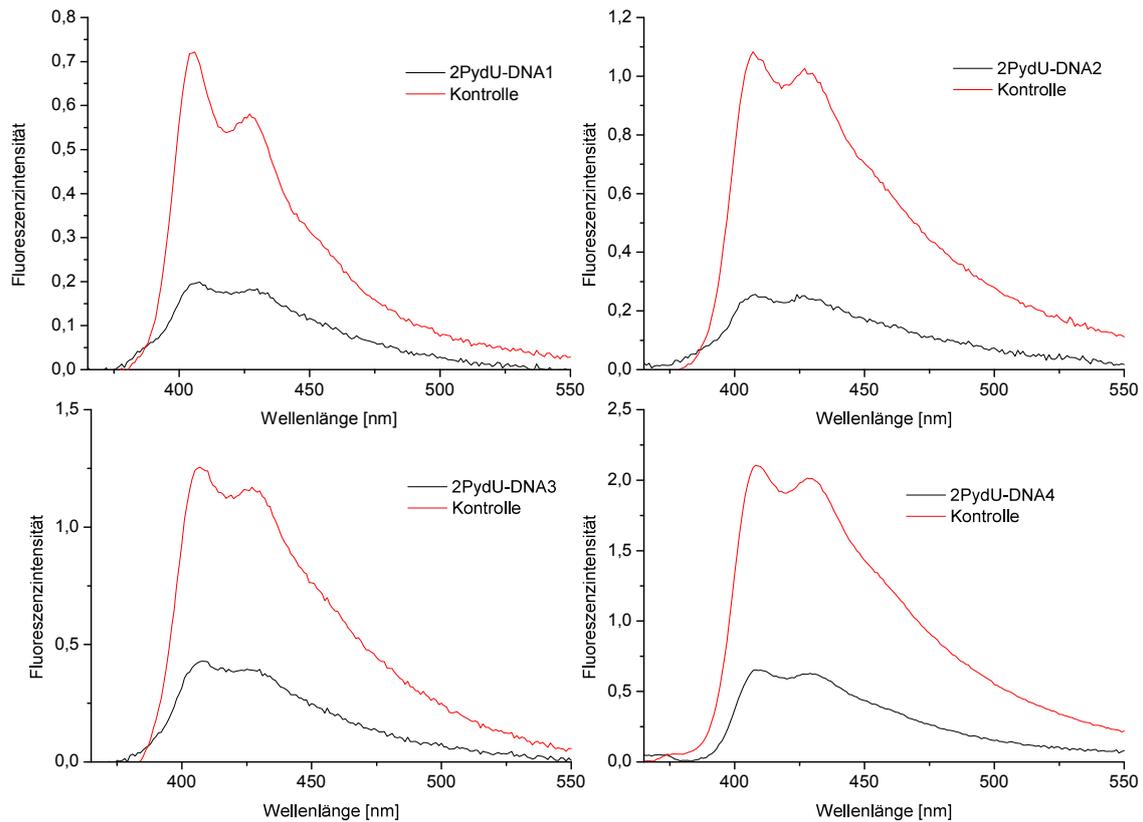


Abb. 28 Fluoreszenzspektren der **2PydU-DNA1-4** –SWCNT Hybride. Die Kontrolle ist die Menge an DNA, die an dem SWCNT gebunden sein sollte (Ergebnis der Differenz zwischen Anfangsstoffmenge und Stoffmenge aus dem Filtrat).

Die Fluoreszenzlöschung beträgt maximal den in Tab. 4 angegebenen Werten, da die Berechnung für die Stoffmenge der Kontrolllösung mit einem Fehler behaftet ist. Zwei Faktoren sind dabei zu berücksichtigen: Zum einen wird DNA, welche an größeren Bündeln haftet, durch das Zentrifugieren aus der Lösung entfernt, zum anderen bindet am Filtermaterial des Größenausschlussfilters eine unspezifische Menge an DNA. Dies wurde durch eine Messung mit einem unmodifizierten DNA Strang **DNA1** (3'-TGC-TGC-TG-5') getestet. Die DNA-Lösung wurde hierzu mehrmals hintereinander durch denselben Größenausschlussfilter zentrifugiert und nach jedem Schritt ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Filter ist erst nach dem vierten Schritt abgesättigt.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

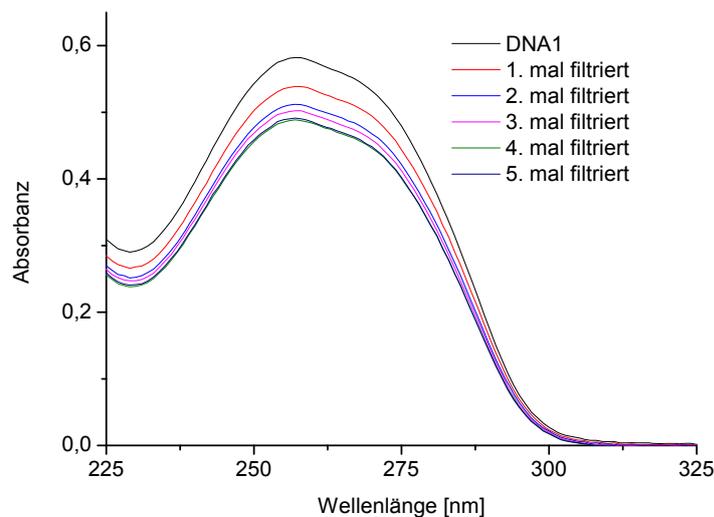


Abb. 29 Absorptionsspektren von **DNA1** nach mehrmaligen Zentrifugieren derselben Lösung durch einen Größenausschlussfilter.

Damit ist die tatsächlich gebundene Stoffmenge an DNA geringer, als die durch Berechnung bestimmte Stoffmenge. Dies führt zu einem kleineren Fluoreszenzsignal für $F_{\text{Kontrolle}}$, wodurch der Quotient aus $F/F_{\text{Kontrolle}}$ größer wird. Eine genaue Berechnung der beiden Fehler ist nicht möglich, da es keine exakten Angaben darüber gibt, welche Menge an DNA an Bündeln bindet, die durch das Zentrifugieren aus der Lösung entfernt wurden.

Diese Fluoreszenzmessungen bestätigen die beiden vorausgegangenen Messmethoden in Bezug auf die ungeeigneten Eigenschaften der CCVD SWCNTs.

Um die Aussagen abschließend zu bekräftigen, fehlt das Experiment der Fluoreszenzlöschung mit **2PydU-DNA1-4** an HiPCO SWCNT. Dies wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Der Grund dafür liegt darin, dass sich das Wissen über die Bindung der DNA an den SWCNT, wie es in Kapitel 3.2.4 beschrieben ist, erst über die letzten Jahre entwickelte. Daher waren zu Beginn dieser Arbeit viele Erkenntnisse nicht bekannt. Betrachtet man sich die Struktur der DNA auf den SWCNT genauer, z.B. Abb. 16, so ist zwischen den DNA-Strängen relativ wenig „freier Raum“. Die direkte Anknüpfung des Pyrens bzw. Perylens an die DNA-Base kann dadurch die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen stören, was vermutlich das Bindungsverhalten beeinflusst. Daher musste ein flexibleres System entwickelt werden. Um die neue Strategie zu testen, wurde vorerst nur ein neuer Pyrenbaustein synthetisiert. Dieser

sollte ein gewisses Maß an konformeller Freiheit aufweisen und nicht direkt an die Base geknüpft sein, wodurch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen nicht gestört werden. Die Synthese, spektroskopische Charakterisierung und das Verhalten in Verbindung mit SWCNTs wird im folgenden Kapitel aufgezeigt. Infolge der in diesem Kapitel besprochenen Ergebnissen zu Raman- und UV/Vis Messungen wurden nur die HiPCO-SWCNTs verwendet.

4.1.5 Synthese und Charakterisierung des „click“-Pyren Bausteines

Die Vorgabe war (i) einen flexiblen Linker zwischen dem Pyren und der DNA einzubauen (ii) und dabei das Pyren nicht direkt an die Base zu binden. Als elegante Lösung wurde ein postsynthetischer Ansatz gewählt.

Die postsynthetische Modifikation an DNA weist einige Vorteile auf:

- Moleküle, welche unter den Bedingungen der Festphasensynthese nicht stabil sind (säure- oder basenlabil) können so in den DNA Strang eingebaut werden
- Die Reaktion läuft meist spezifisch und bioorthogonal unter milden Reaktionsbedingungen in hohen Ausbeuten ab
- Es kann sehr atomökonomisch gearbeitet werden, da nur sehr wenig Substanz des Moleküls benötigt wird.

Über die Jahre haben sich verschiedene Methoden etabliert, darunter die Reaktion einer elektrophilen Gruppe mit einem bereits in das Oligonukleotid eingebrachten nukleophilen Amin, die Staudinger-Ligation an DNA, das Anknüpfen durch Thiolgruppen, Diels-Alder-Reaktionen und 1,3-dipolare Cycloaddition. Einen Übersichtsartikel zu diesen Methoden wurde von *Marx et al.*^[134] verfasst. Die 1,3-dipolare Cycloaddition wurde in dieser Arbeit verwendet und wird nachfolgend kurz näher erläutert.

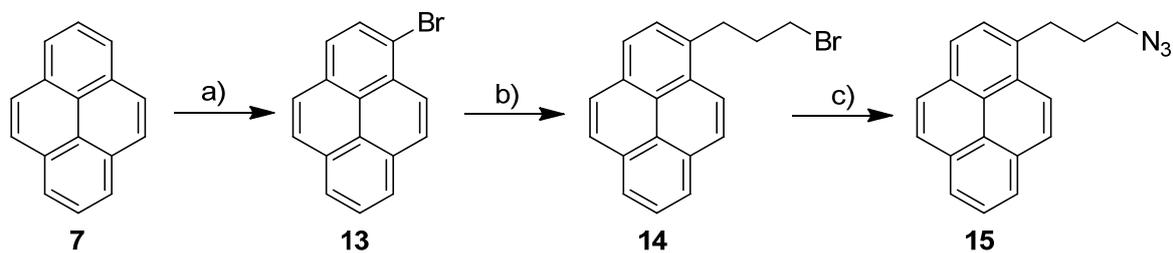
1,3-dipolare Cycloaddition

Die 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen mit Aziden zu stabilen Triazolen^[173] wird oft als „Click-Chemie“ bezeichnet. Der Mechanismus hinter dieser Reaktion wurde von *Huisgen* in den 1950er und 1960er aufgeklärt.^[173] *Sharpless et al.*^[174, 175] und *Meldal et al.*^[176]

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

entwickelten zwischen 2002 und 2004 die Methode weiter, so dass sie für die Anwendung in biologischen Systemen geeignet war. Die Reaktion verläuft unter Kupfer(I)-Katalyse im wässrigem Medium bei Raumtemperatur und liefert, bei Verwendung terminaler Alkine, regioselektiv das 1,4-disubstituierte Triazol.^[174] Jedoch können Kupferionen Schädigungen an der DNA durch Strangbrüche und/oder Oxidationen verursachen.^[177] Dies kann durch den Einsatz eines TBTA-Liganden verhindert werden, der sehr stark an Kupfer (I) bindet und es dadurch stabilisiert.^[175] Seither findet diese Methode eine breite Anwendung.^[178]

Es wurde folgender Azidbaustein synthetisiert:



Schema 3 Synthese des Azidbausteines **15**. a) HBr (1,1 eq.), H₂O₂ (1 eq.), MeOH:Et₂O 1:1, 15 °C – RT, 16 h, 96%; b) n-BuLi (1,2 eq.), 1,3-Dibromopropan (10 eq.), abs. Et₂O, 0 °C – Rückfluss, 2 h, 18%; c) NaN₃ (eq.), DMF, RT, 16 h, 75%.

Zunächst konnte nach Literaturvorschrift^[179] durch eine Bromierung des Pyrens in 1-Position **13** synthetisiert werden. Nach einem Brom-Lithium-Austausch an **13** erfolgte eine nukleophile Substitution mit 1,3-Dibromopropan.^[180] Das erhaltene Produkt **14** wurde in einer weiteren Substitutionsreaktion mit Natriumazid zum Endprodukt **15** umgesetzt.

Als „Click-Partner“ wurde das 2'-O-Propargyl-Uridin **16** (Abb. 30) verwendet. Dadurch ist das Pyren nicht direkt an der Base, sondern am Zuckerrückgrat angeknüpft.

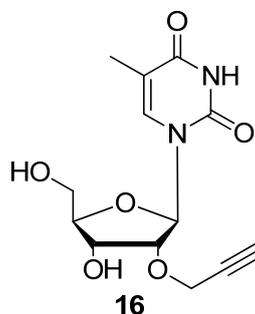
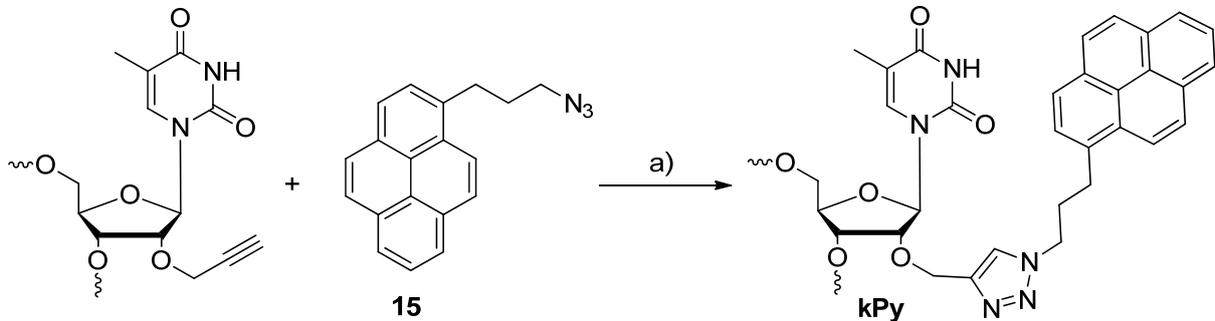


Abb. 30 Struktur des 2'-O-Propargyl Uridin **16**

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Nach Einbau von **16** in den DNA Strang über die automatisierte Festphasensynthese und anschließender Aufarbeitung, wurde der Pyrenbaustein **15** mittels 1,3 dipolarer Cycloaddition an die DNA gebunden (Schema 4).



Schema 4 Postsynthetische 1,3 dipolare Cycloaddition von **15** an DNA. a) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat (1,7 eq.), TBTA (3,4 eq.), Natriumascorbat (10 eq.), DMSO:t-BuOH 3:1, RT. Die Äquivalente beziehen sich auf eine DNA-Ausbeute von 100%

Um für die verwendete SWCNT-Charge geeignete Sequenzen zu synthetisieren wurde eine zweidimensionale Photolumineszenzkarte, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, im Arbeitskreis *Kappes* am Karlsruher Institut für Technologie gemessen. Dadurch sollte sich die Verteilung der einzelnen (n,m)-Spezies in der verwendeten SWCNT Charge zeigen. Hierzu wurden die SWCNTs in einer 0,1 gew.-% SDBS-Lösung in D₂O gelöst. Aus Abb. 31 ließen sich 22 verschiedene (n,m)-Spezies identifizieren.

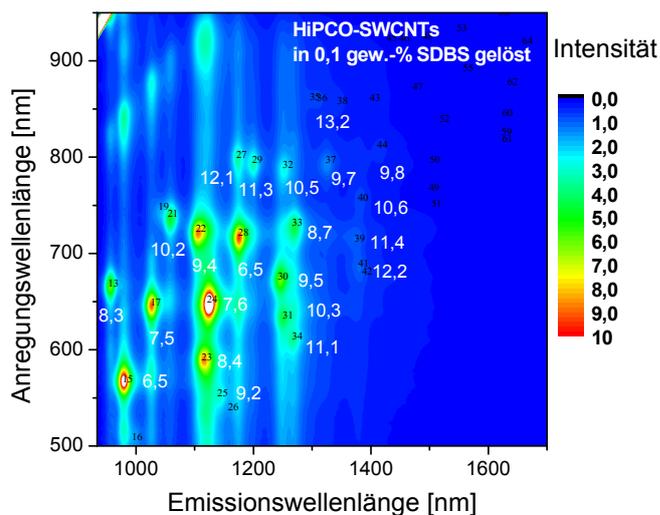


Abb. 31 Zweidimensionale Photolumineszenzkarte von HiPCO SWCNTs, in 0,1 gew.-% SDBS gelöst.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Ausgehend von dieser Photolumineszenzmessung wurden die stärksten Signale gewählt und die dafür selektiven Stränge synthetisiert. Hinter den jeweiligen Sequenzen steht die dazugehörige (n,m)-Selektivität:

kPy-DNA1	3'-TTC-GGA-TAC-ATA-GAkPy-ACA-TAG-ATA-GTC-TG-5'	
kPy-DNA2	3'-TTC-GGA-TAC-AkPyA-GAT-ACA-kPyAG-ATA-GTC-TG-5'	
kPy-DNA3	3'-TAT-TAT-kPyAT-TAT-5'	(6,5)
kPy-DNA4	3'-TAT-TAT-TAT-TAkPy-5'	(6,5)
kPy-DNA5	3'-TAKPy-TAT-TAT-kPyAT-5'	(6,5)
kPy-DNA6	3'-TGC-kPyGC-TG-5'	(9,4)
kPy-DNA7	3'-TGT-GTG-TGT-GkPyG-5'	(8,4)
kPy-DNA8	3'-GTT-GTkPy-GTT-G'-5'	(7,6)
kPy-DNA9	3'-TTT-ATT-TAT-TkPyA-5'	(8,6)

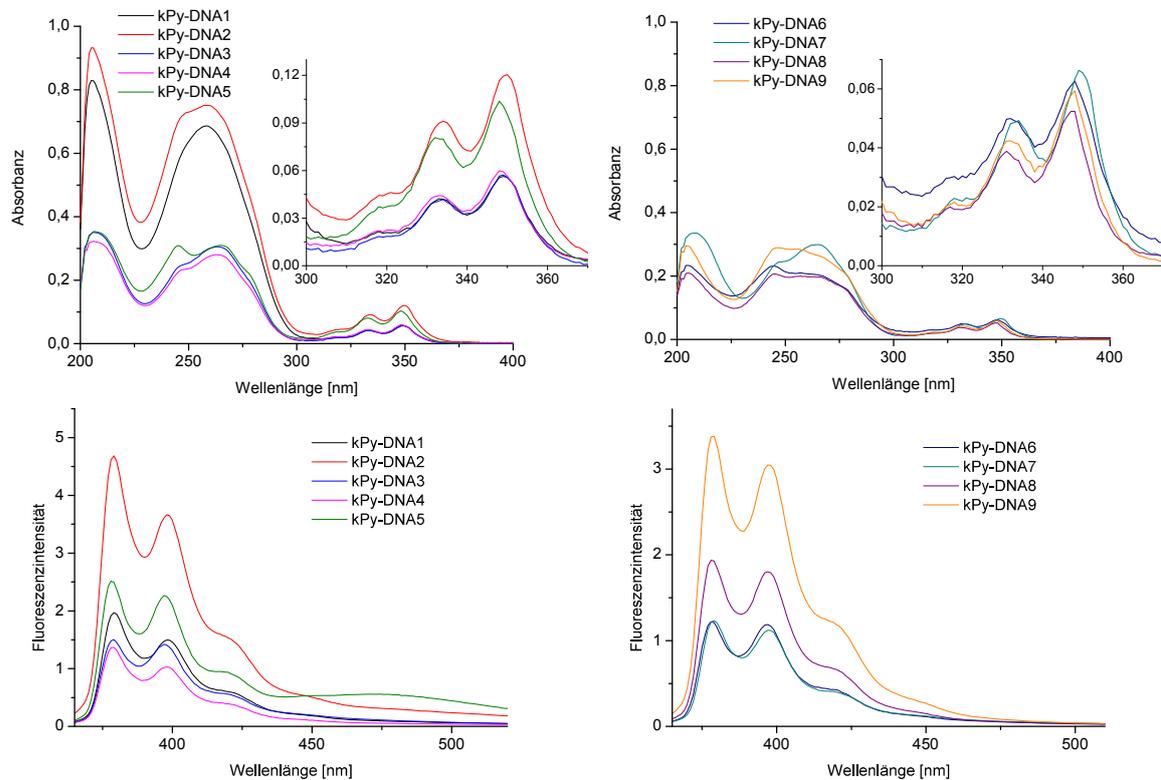


Abb. 32 Absorption- und Fluoreszenzspektren der Stränge **kPy-DNA1-9**, $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Abb. 32 zeigt die Fluoreszenz- und Absorptionsspektren der DNA-Stränge **kPy-DNA1–9**. Klar zu erkennen ist die für Pyren charakteristische Feinstruktur in Absorption und Emission. **kPy-DNA5** zeigte eine eximerartige Fluoreszenz. Bei G als Nachbarbase trat die zu erwartende Fluoreszenzlöschung durch Guaninoxidation auf (als Grundlage wurde das Reduktionspotential im angeregten Zustand für Pyren herangezogen^[181]).

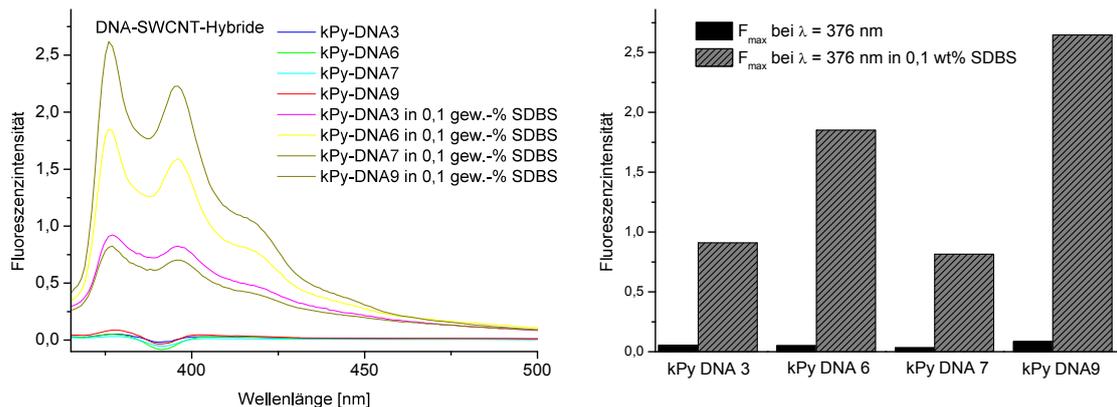


Abb. 33 Links: Fluoreszenzspektrum der Oligonukleotid-SWCNT Hybride **kPy-DNA3**, **kPy-DNA6**, **kPy-DNA7** und **kPy-DNA9** in einer 0,1 gew.-% SDBS Lösung. Rechts: Fluoreszenzmaxima bei $\lambda = 376$ nm ohne und mit SDBS.

Zur Untersuchung der Fluoreszenzlöschung mit SWCNT wurden die Oligonukleotide **kPy-DNA3**, **kPy-DNA6**, **kPy-DNA7** und **kPy-DNA9** verwendet. Die Probenvorbereitung entsprach derjenigen in Kapitel 4.1.4. In den entsprechenden Spektren (in Abb. 33 dargestellt) sind nur sehr schwache Fluoreszenzsignale zu erkennen. Das negative Signal bei etwa 390 nm ist ein Artefakt der Messung: Bei der gewählten Anregungswellenlänge befindet sich an dieser Stelle das Wasser-Raman-Signal. Da die Hybride vermutlich das Licht geringfügig streuten, wurde die Intensität des Wasser-Raman-Signals in der Probe abgeschwächt. Dies führt zu einer negativen Intensität nach Subtraktion der Blindprobe. Jedoch überschneidet sich das Wasser-Raman-Signal nicht mit dem Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 376$ nm. Um die gemessenen Fluoreszenzintensität zur gebundenen Menge an DNA vergleichen zu können, wurde eine elegantere und korrektere Lösung als in Kapitel 4.1.4 angewandt. Die Oligonukleotide auf dem SWCNT wurden durch Zugabe von SDBS verdrängt (eine genauere Erläuterung in Kapitel 4.2.1). Hierzu wurden wenige Mikroliter einer konzentrierten SDBS-Lösung zur Probe gegeben, so dass eine finale Konzentration von 0,1 gew.-% SDBS vorlag.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Die Messung erfolgte nach etwa einer Stunde. Da die Wechselwirkung zwischen Pyren und SWCNT aufgehoben wurde, ließ sich ein großer Fluoreszenzanstieg beobachten.

Die Fluoreszenzlöschung ist in Tab. 5 aufgeführt. Die Fluoreszenzlöschung ist eigentlich noch größer („>“) als angegeben, da die Proben durch die Zugabe an SDBS etwas verdünnt wurden, sowie die maximale Fluoreszenzintensität nach einer Stunde noch nicht ganz erreicht war.

Tab. 5 Fluoreszenzlöschung der Oligonukleotide **kPy-DNA3**, **kPy-DNA6**, **kPy-DN 7** und **kPy-DNA9** durch Wickeln um SWCNT.

Sequenz	Fluoreszenzlöschung ($1-F/F_{\text{Kontrolle}}$)
kPy-DNA 3	> 94%
kPy-DNA 6	> 97%
kPy-DNA 7	> 96%
kPy-DNA 9	> 97%

Dieser Wert entspricht den in der Literatur bereits erwähnten 98%. Infolgedessen wurden diese Hybride für die folgenden Experimente verwendet.

4.1.6 Verbesserte Solvataion einzelner SWCNT durch pyrenmodifizierte Oligonukleotide

Um den Einfluss der pyrenmodifizierten Oligonukleotide auf das Lösen der SWCNT zu untersuchen, wurde die Methode von *Fantini et al.*^[182] angewendet. Sie benutzten SDS, SDBS, SCol und DNA, um SWCNT in eine wässrige Lösung zu bringen. Anschließend wurden die Photolumineszenzintensitäten der jeweiligen (n,m)-Spezies zur Absorption ins Verhältnis gesetzt. Je größer dieser Wert war, desto mehr einzelne SWCNTs sind in Lösung gegangen, d.h. desto besser eignet sich das entsprechende Tensid oder Polymer zum Lösen der SWCNTs.

Für die Oligonukleotide **kPy-DNA1–9** wurden zweidimensionale Photolumineszenzkarten im Arbeitskreis *Kappes* angefertigt. Zur Probenvorbereitung wurden die SWCNTs mit den Oligonukleotiden in D₂O und 100 mM NaCl gelöst. Da die neun Proben in etwa das gleiche

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Verhalten zeigten, sind in Abb. 34 exemplarisch nur drei davon dargestellt: **kPy-DNA2**, **kPy-DNA5**, **kPy-DNA6** und ein unmodifiziertes Oligonukleotide **DNA1** (gleiche Sequenz wie **kPy-DNA6**).

Wie sich aus Abb. 34 zeigt, ist bei den pyrenmodifizierten Oligonukleotiden kaum bzw. gar keine Photolumineszenzintensität erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigt die Probe **DNA1**, welche unter den gleichen Bedingungen angefertigt wurde, ausgeprägte Photolumineszenzsignale. Der Grund dafür ist die Photolumineszenzlöschung der SWCNTs durch das Pyren. Wie bereits in Kapitel 3.2.5 angesprochen, kann die Fluoreszenz eines Chromophors durch einen Elektronentransfer auf den SWCNT gelöscht werden, wodurch im Gegenzug ebenfalls die Photolumineszenz des reduzierten SWCNT gelöscht wird.^[183]

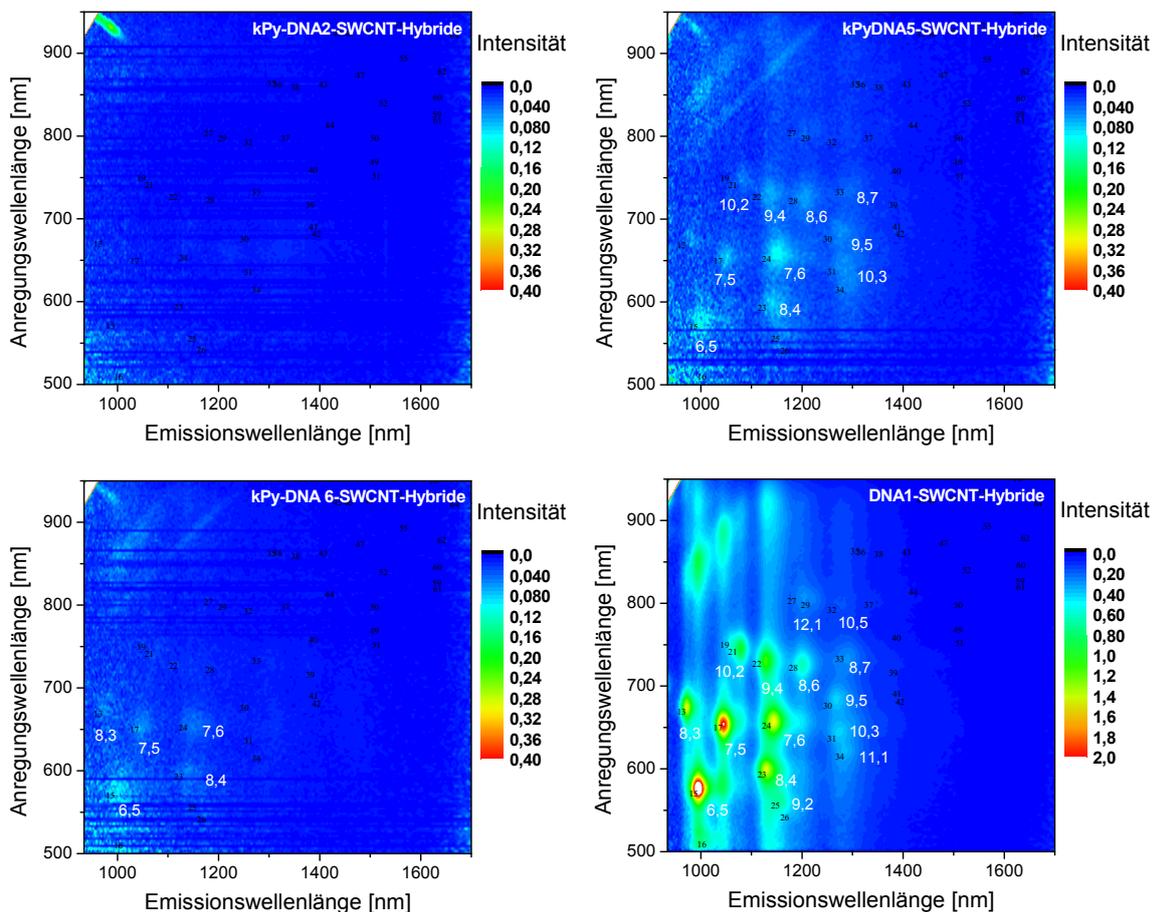


Abb. 34 Zwei-dimensionale Photolumineszenzkarten der Oligonukleotid-SWCNT Hybride **kPy-DNA2**, **kPy-DNA5** und **kPy-DNA6**, sowie eines unmodifizierten Oligonukleotids **DNA1**.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Um diese Wechselwirkung zu unterbrechen, wurde das gleiche Prinzip wie in Kapitel 4.1.5 angewandt: Verdrängen der DNA mittels SDBS. Dadurch ergibt sich ein weiterer Vorteil: Alle zu vergleichenden Proben sind mit SDBS umwickelt. Dies ist wichtig, da die Photolumineszenz der SWCNT unter anderem stark von den gebundenen Molekülen abhängt^[134]. Auszugsweise ist dies am Beispiel der **DNA1** und **kPy-DNA6** in Abb. 35 dargestellt. Klar zu erkennen ist eine starke Steigerung der Photolumineszenzintensität in den SDBS behandelten Proben. Auch zeigen unmodifizierte Oligonucleotide bereits eine leichte Fluoreszenzlöschung auf.

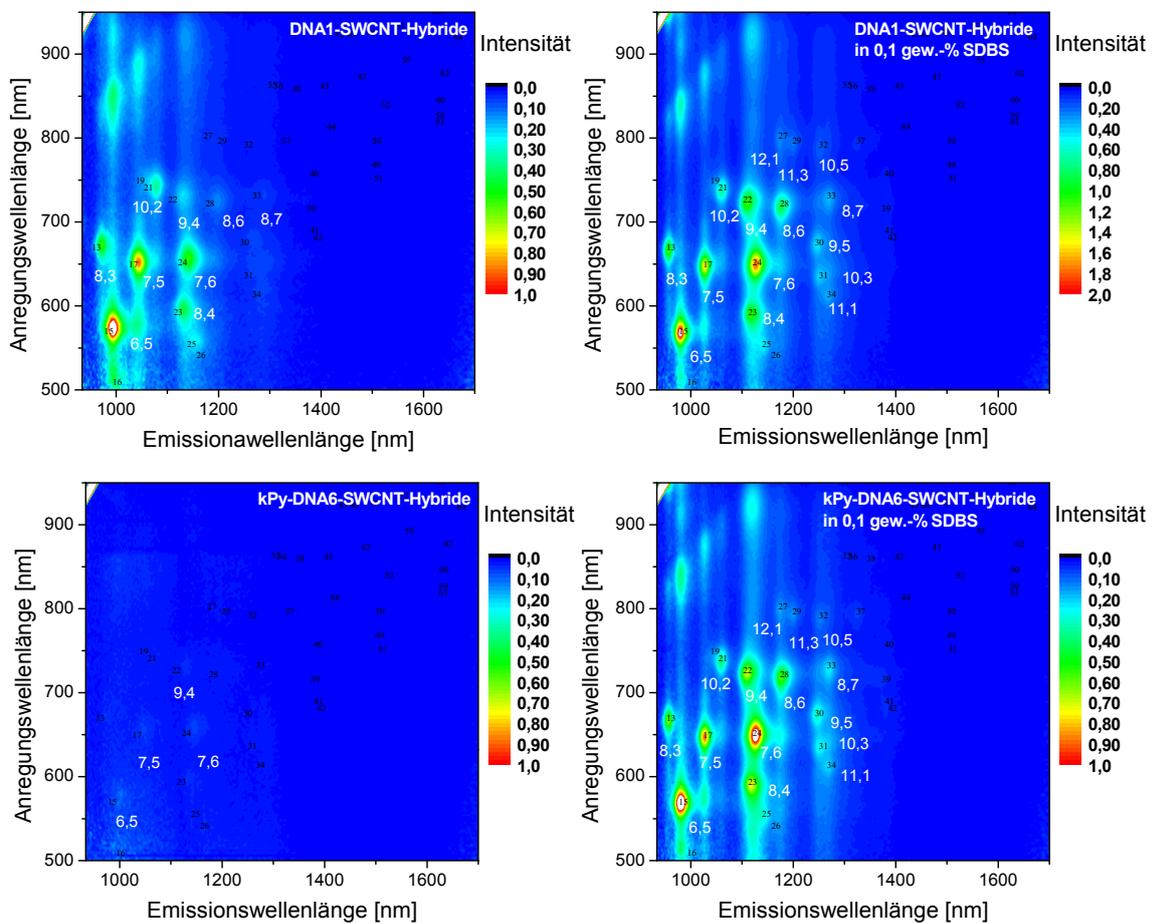


Abb. 35 Links: Photolumineszenz Karten der Oligonukleotid-SWCNT Hybride **DNA1** und **kPy-DNA6**; rechts: in einer 0,1 gew.-% Lösung an SDBS.

Mit den so erhaltenen Photolumineszenzintensitäten wurde das Verhältnis zur Absorption gebildet. Als Absorptionswert wurde das Integral über den E_{11} -Bereich gewählt. *Fantini et al.* nutzten für ihre Auswertung den E_{22} -Bereich, da in diesem die Anregung stattfand. Der E_{11} -

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Bereich wurde hier dennoch gewählt, da die E_{11} -Verteilung auch die E_{22} -Verteilung widerspiegelt. Zwar ist der E_{11} -Bereich stärker anfällig gegenüber Änderungen in der direkten Umgebung,^[185] jedoch weisen die hier vermessenen Proben die gleiche Umgebung auf. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die E_{11} -Signale eine viel höhere Intensität haben als die E_{22} -Signale, wodurch der Einfluss durch metallische SWCNTs und amorphen Kohlenstoffs geringer ausfällt. In Abb. 36 ist das Integral über die Absorption der Oligonukleotide **kPy-DNA6** und **DNA1** über den E_{11} -Bereich dargestellt.

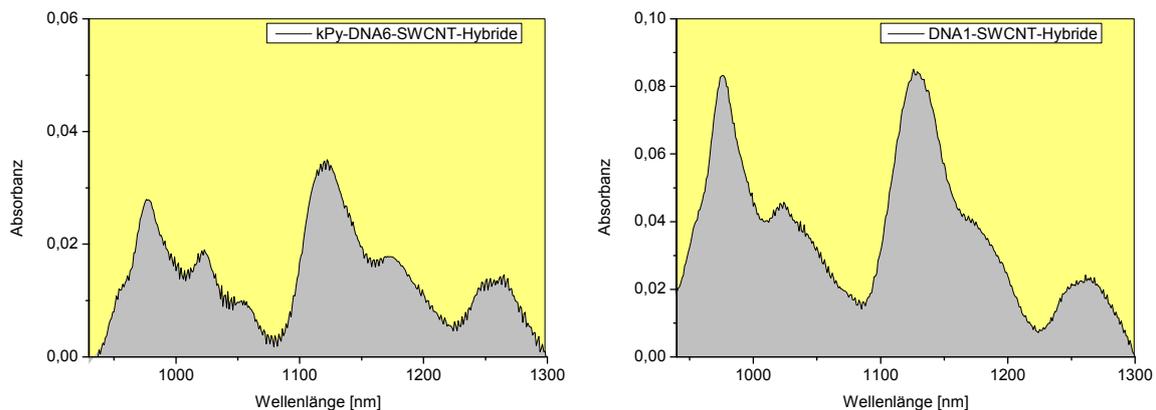


Abb. 36 Integrale über die Absorption der Oligonukleotid-SWCNT-Hybride **kPy-DNA6** und **DNA1** im E_{11} -Bereich.

Sechs Oligonukleotide wurden auf diese Weise untersucht: **kPy-DNA3**, **kPy-DNA6** und **kPy-DNA8**, sowie die dazu analogen unmodifizierten Oligonukleotide **DNA1**, **DNA2** (3'-TAT-TAT-TAT-TAT-5') und **DNA3** (3'-GTT-GTT-GTT-G-5').

Abb. 37 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Es zeigt sich, dass die Werte der pyrenmodifizierten Oligonukleotide größer sind als die der unmodifizierten. Im Fall des Oligonukleotidpaars **kPy-DNA8** und **DNA3** ist dies weniger stark ausgeprägt, jedoch noch klar zu erkennen. Diese Messung ließ darauf schließen, dass durch das Pyren mehr einzelne SWCNT in Lösung vorliegen und damit das Pyren einen Einfluss auf das Lösen der SWCNTs hat.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

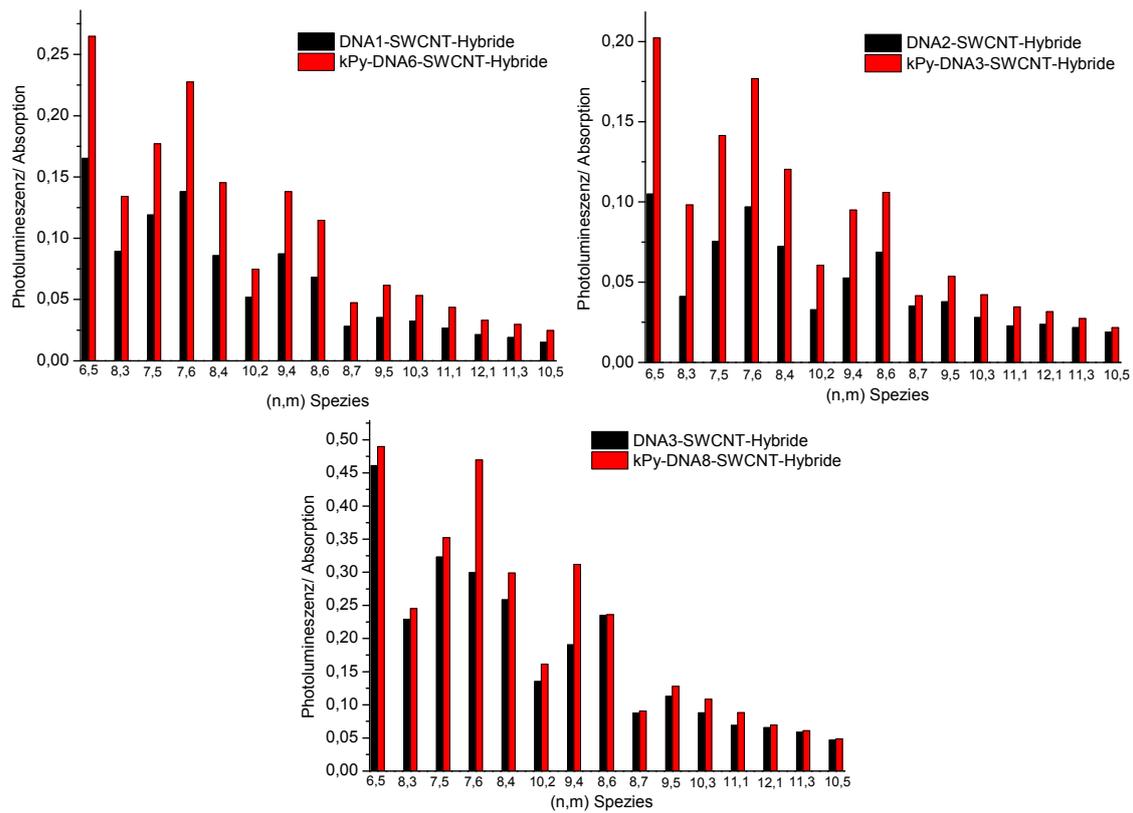


Abb. 37 Photolumineszenz/Absorption der Oligonukleotid-SWCNT-Hybride **kPy-DNA 3** mit **DNA 2**, **kPy-DNA 6** mit **DNA 1** und **kPy-DNA 8** mit **DNA 3**.

Um Aussagen über eine Änderung in der Selektivität für bestimmte (n,m)-Spezies treffen zu können, müssten die Hybride über eine IEX-Säule aufgereinigt werden und die einzelnen Fraktionen über UV/Vis/NIR-Spektroskopie untersucht werden.

4.2 Untersuchungen zur Stabilität der Chromophor-DNA-SWCNT-Konjugate über mehrere Tage bei verschiedenen Temperaturen

Zu Dissoziation und Assoziation von DNA an SWCNT gibt es relativ wenige experimentelle Ergebnisse.^[38, 186] Daher ist auch wenig darüber bekannt, wie sich die DNA um den SWCNT über einen längeren Zeitraum hinweg verhält. In diesem Teil der Arbeit wurde daher die Dissoziation der DNA vom SWCNT mit Chromophor-markierter DNA untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein mit Nilrot markiertes Oligonukleotid synthetisiert. Nilrot wurde gewählt, da die Absorption des Farbstoffes in einem Bereich liegt, in dem der SWCNT nur eine schwache Absorption aufzeigt. Dadurch lassen sich Änderungen besser verfolgen.

Anhand der aus Kapitel 4.1.5 erhaltenen Ergebnisse, wurde Nilrot ebenfalls an das Zuckerrückgrat, über eine flexible C-Kette, mittels kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition angeknüpft. Der azidfunktionalisierte Baustein **17** wurde von *Thomas Ehrenschwender* zur Verfügung gestellt. Die Synthese erfolgte nach den Vorschriften von *Mannini et al.*^[187] und *Swann et al.*^[188]

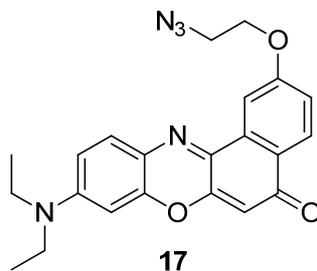


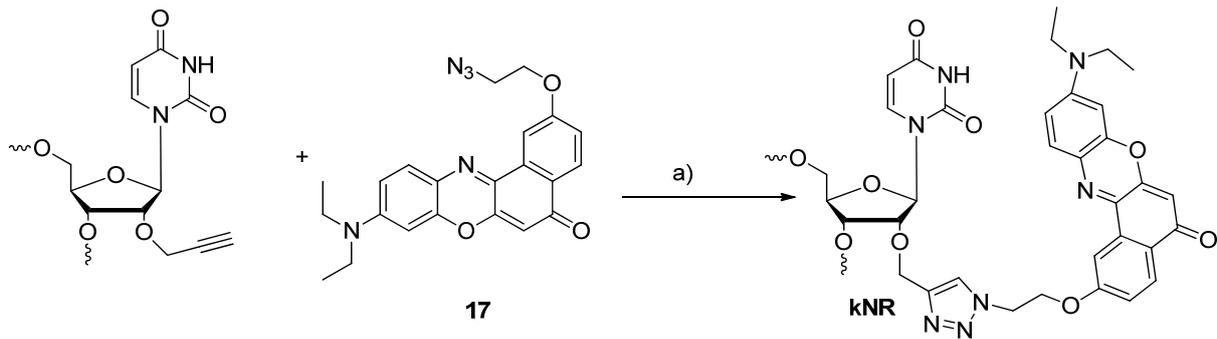
Abb. 38 Azidfunktionalisierter Nilrot Baustein **17**.

Der Baustein wurde analog dem Pyrenbaustein aus Kapitel 4.1.5 postsynthetisch in DNA eingebaut (Schema 5).

Folgendes Oligonukleotid wurde synthetisiert:



4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT



Schema 5 Postsynthetische 1,3-dipolare Cycloaddition von **17** an DNA. a) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat (1,7 eq.), TBTA (3,4 eq.), Natriumascorbat (10 eq.), DMSO:t-BuOH 3:1, RT. Die Äquivalente beziehen sich auf eine DNA Ausbeute von 100%

Das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Einzel- und Doppelstranges (A als Gegenbase) ist in Abb. 39 dargestellt.

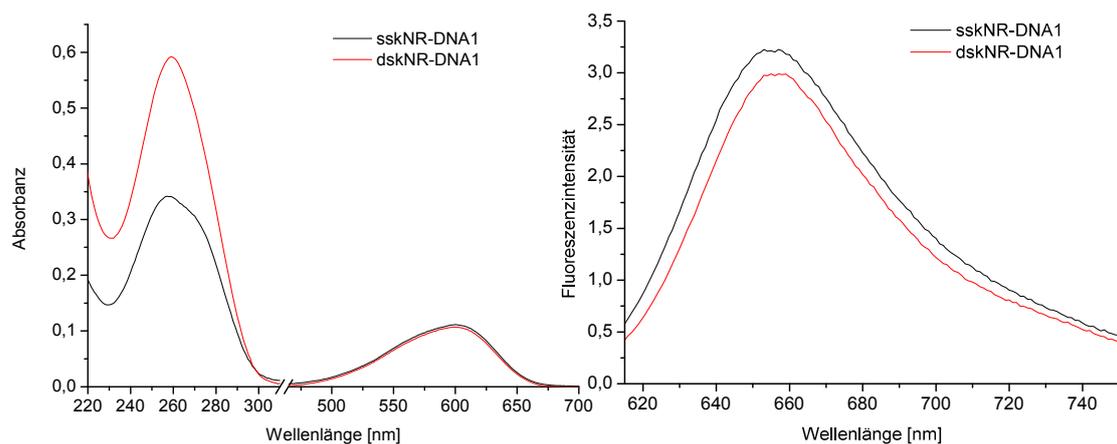


Abb. 39 Links: Absorptionsspektrum, rechts: Fluoreszenzspektrum von sskNR-DNA1 und ds kNR-DNA1, $\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$.

Entsprechend der Begründung in Kapitel 4.1.1 zeigte sich auch hier eine höhere Fluoreszenzintensität für den Einzelstrang.

4.2.1 Vergleich der Bindungsstärken von DNA und Nilrot am SWCNT

Um festzustellen, ob Nilrot oder DNA an den SWCNT stärker bindet, wurden die Änderungen in Absorption und Fluoreszenz bei Zugabe verschiedener Konzentrationen einer SDBS-Lösung bestimmt.

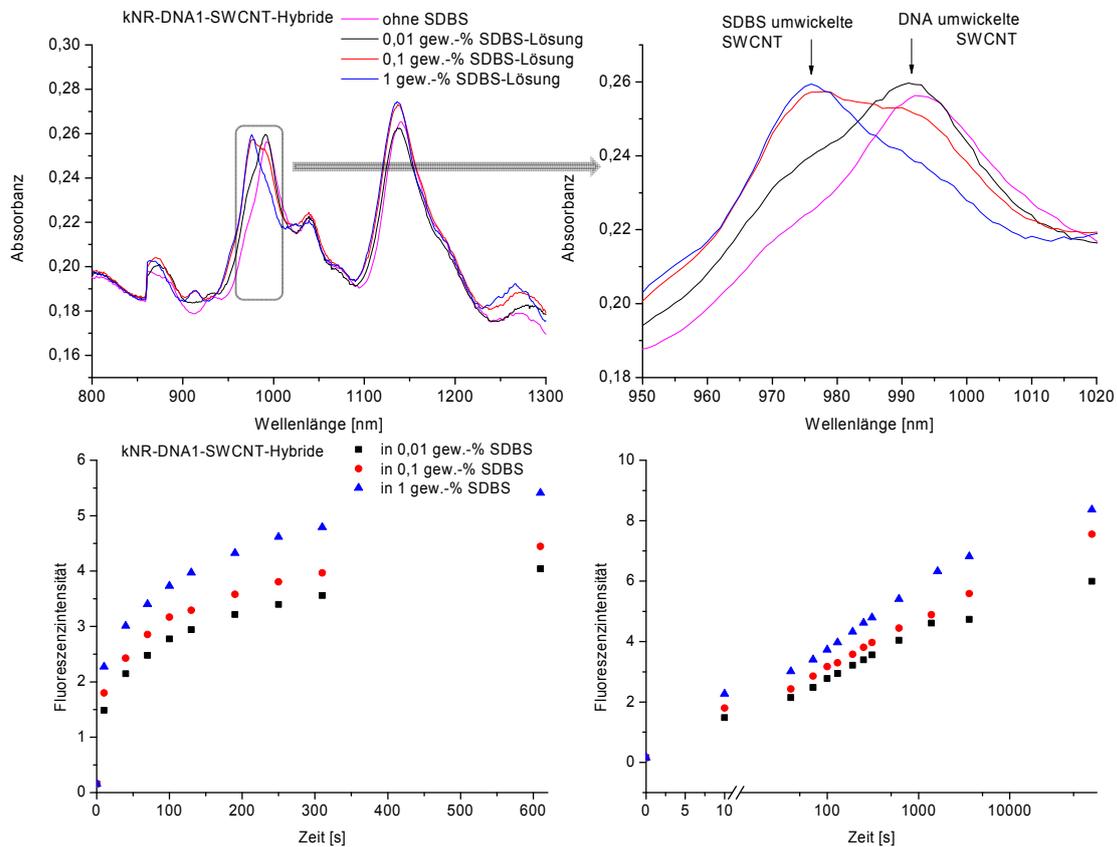


Abb. 40 Oben: Absorptionsspektrum der **kNR-DNA1-SWCNT-Hybride** mit unterschiedlichen Konzentrationen an SDBS nach einer Stunde und einer Kontrolllösung ohne SDBS; Unten: Zwei unterschiedliche Auftragungen der Änderung der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 657 \text{ nm}$ gegen die Zeit. ($\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$)

Hierzu wurden SWCNTs mit nilrotmodifizierter DNA entsprechend dem Verfahren in Kapitel 4.1.4 vorbereitet. Anschließend wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an SDBS zugegeben. Dabei wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit verfolgt. Die Messung des Absorptionsspektrum erfolgte eine Stunde nach Zugabe. Die Spektren sind in Abb. 40 dargestellt. (Anmerkung zu den Absorptionsspektren: Im Spektrum wurden die verschiedenen Werte bei 840 nm normiert. Der Grund liegt in unterschiedlichen Absorptionsanteilen der verwendeten Küvetten. Diese Werte konnten nicht exakt aus dem Spektrum ermittelt und damit abgezogen werden, da die SWCNT über den gesamten

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

messbaren Bereich absorbieren. Die Normierung der Werte ist in diesem Fall zulässig, da zum einen gleiche Konzentrationen aus einer Stammlösung benutzt wurden, zum anderen bei 840 nm keine Absorption der hier verwendeten SWCNT vorhanden ist).

In den Fluoreszenzspektren ist in den ersten Sekunden ein starker Anstieg des Signals zu erkennen, welcher anschließend einen logarithmischen Verlauf annimmt. Dieser Verlauf ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Jagota et al.*^[34]. Sie stellten eine Arbeitshypothese auf, in der bei der Verdrängung der DNA vom SWCNT mit SDBS ein zweistufiger Prozess abläuft: Im ersten Schritt wird diejenige DNA verdrängt, welche Defekte in der Wicklung aufweist. Diese entstehen durch eine unvollständige Wicklung der DNA um den SWCNT. Dieser Prozess läuft schnell ab. Im zweiten Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Entstehung neuer Defektstellen, an denen eine Verdrängung durch SDBS stattfinden kann. Die beiden Schritte sind schematisch in Abb. 41 dargestellt.

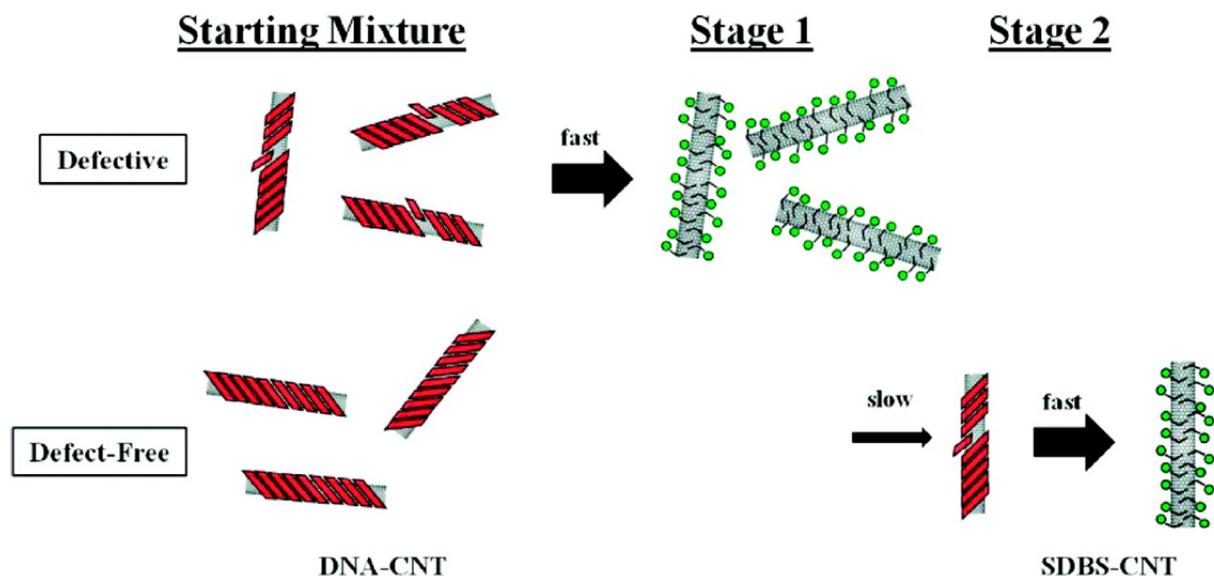


Abb. 41 Zweistufiger Prozess beim Verdrängen der DNA durch SDBS. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[34], Copyright American Chemical Society 2011)

Durch die Verdrängung der DNA mit SDBS tritt im Absorptionsspektrum eine bathochrome Verschiebung auf. Diese ist im Bereich der E_{11} -Absorption des (6,5)-SWCNT gut zu erkennen (Abb. 40 oben rechts). Bei genauerer Betrachtung der Absorptionsspektren in Abb. 40 wird deutlich, dass nur im Fall der 1%-igen SDBS-Lösung eine nahezu vollständige Verdrängung der DNA stattfand. Für die 0,1%-ige SDBS-Lösung lag etwa eine 1:1-Mischung vor. Für die

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

0,01%-ige SDBS-Lösung fand kaum eine Verdrängung statt. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindungsstärke des Nilrots an den SWCNTs schwächer ist als die der DNA, da im Falle der 0.01%-igen Lösung ein starker Fluoreszenzanstieg ohne Verdrängung der DNA stattfand. Der zweistufige Prozess kann, wie für die DNA, auch auf das Nilrot angewandt werden. Dafür lässt sich folgende Hypothese formulieren: Zu Beginn werden die Nilrot-Chromophore verdrängt, welche leicht zugänglich sind. Im zweiten Schritt werden die stärker abgeschirmten Nilrot-Chromophore, durch Bewegungen der DNA auf dem SWCNT, besser zugänglich. Darüber hinaus spielt wahrscheinlich auch die Orientierung des Nilrot in Bezug auf die Längsachse des SWCNT eine Rolle, da das starr planare Nilrot sich nicht an die starke Krümmung des SWCNT anpassen kann.

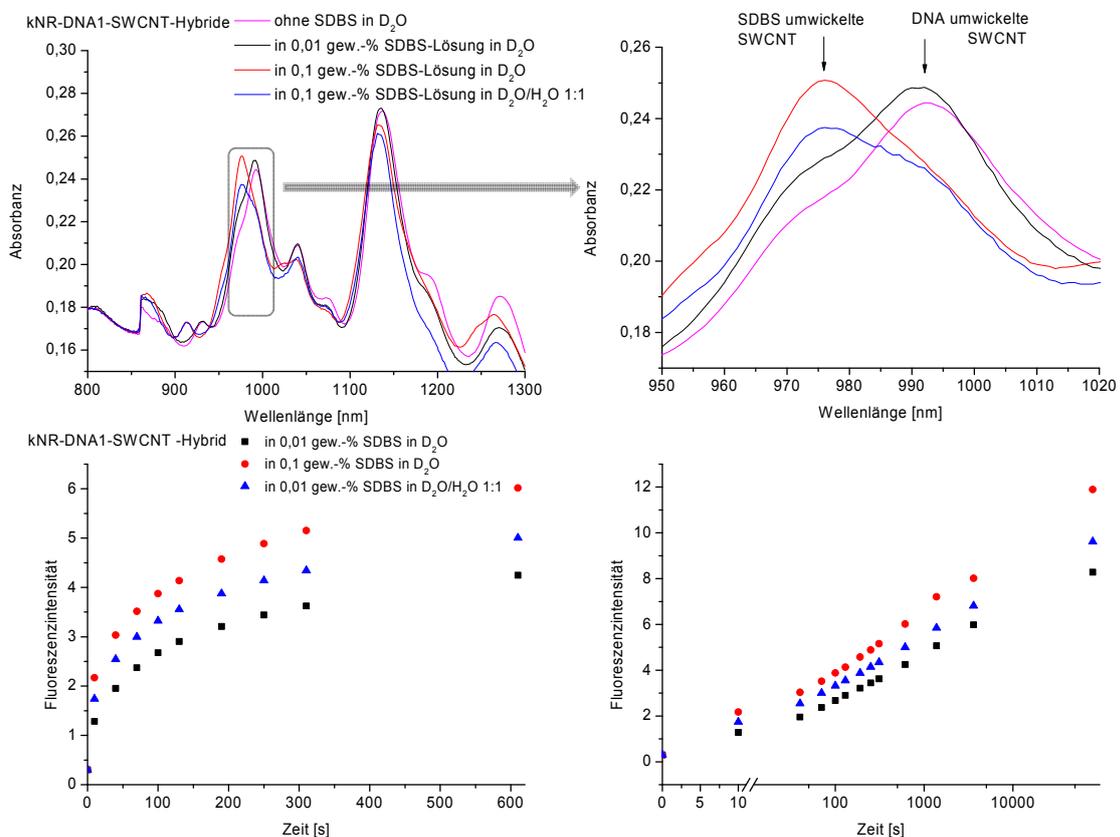


Abb. 42 Oben: Absorptionsspektrum der **kNR-DNA1-SWCNT-Hybride** in D₂O mit unterschiedlichen Konzentrationen an SDBS nach einer Stunde und einer Kontrolllösung ohne SDBS; Unten: Zwei unterschiedliche Auftragungen der Änderung der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 657 \text{ nm}$ gegen die Zeit.

Die gleichen Messungen in D₂O (Abb. 42) zeigten eine schnellere und effizientere Verdrängung der DNA vom SWCNT, was auf einen Isotopeneffekt des Deuteriums zurückzuführen ist.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Eine mögliche Ursache könnte die Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen sein. Dadurch werden die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen schwächer, das wiederum kann zu einem schnelleren Entstehen von Defektstellen führen. Erkennbar ist dies anhand der niedrigeren Konzentration an SDBS, welche für eine nahezu vollständigen Ersatz der DNA nach einer Stunde nötig ist. Darüber hinaus zeigte eine Mischung aus H₂O:D₂O im Verhältnis 1:1 bei ansonsten gleicher SDBS Konzentration einen noch signifikanten Anteil an DNA umwickelten SWCNTs.

Die Kombinationen der Fluoreszenz- und Absorptionsdaten in D₂O entsprechen denen in H₂O und weisen ebenfalls darauf hin, dass die DNA stärker an den SWCNT bindet als Nilrot.

4.2.2 Verhalten der DNA um den SWCNT bei Raumtemperatur

Die Studien von *Richert et al.*^[186] und *Brandon et al.*^[38] zeigten ein Ausflocken der SWCNTs bei hohen Temperaturen. Als Grund dafür wurde eine Dissoziation der DNA vom SWCNT aufgeführt. Durch die dabei entstehenden freien Stellen kann eine Bündelung einsetzen. Es existieren nur wenige Studien^[38, 189] zum Verhalten der DNA am SWCNT bei Raumtemperatur. Allgemein bekannt ist, dass die Hybride über einen längeren Zeitraum nicht stabil sind und ausfallen. Im Folgendem wurde das Verhalten dieser Hybride bei Raumtemperatur mithilfe von **kNR-DNA1** genauer untersucht.

Hierzu wurden die Proben entsprechend Kapitel 4.1.4 vorbereitet und im Abstand von einem Tag vermessen. Nach fünf Tagen wurde die Probe mit wenigen Mikroliter einer SDBS-Lösung versetzt, so dass ein Gewichtsanteil von 0,1% an SDBS vorlag und nach einer weiteren Stunde vermessen. Es wurde nur eine 0,1 gew.-%-ige Lösung gewählt, da nur wenige Mikroliter zugegeben werden sollten, um eine Probenverdünnung zu vermeiden. Eine konzentriertere Lösung war aufgrund des Löslichkeitsproduktes des SDBS jedoch nicht möglich. Ausschlaggebend für die Messung war die ungefähr gebundene Menge an Nilrot am SWCNT, welches bei dieser Konzentration an SDBS bereits effektiv verdrängt wird. Aus der Fluoreszenzintensität lies sich dann indirekt auf die Menge an gebundener DNA schließen. Die Fluoreszenzspektren sind in Abb. 43 dargestellt.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

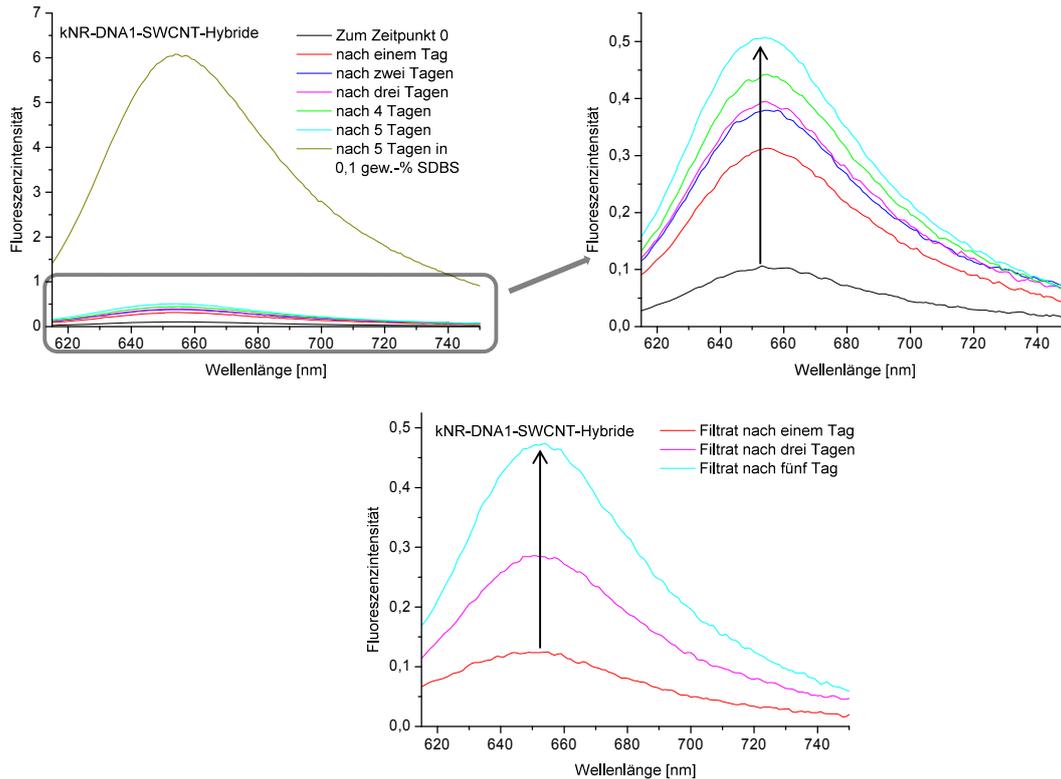


Abb. 43 Oben: Fluoreszenzspektren der **kNR-DNA1-SWCNT-Hybride** über fünf Tage. Unten: Fluoreszenzspektrum der Filtrate.

Deutlich zeigte sich ein Fluoreszenzanstieg in Abhängigkeit von der Zeit, jedoch ist dieser nur sehr schwach ausgeprägt. Die Filtrate wurden entsprechend der Methode in Kapitel 4.1.4 mittels Filtration durch einen Größenausschlussfilter erhalten. Der Filter wurde mit **DNA1** abgesättigt, um eine unspezifische Bindung des Oligonukleotides **kNR-DNA1** an das Filtermaterial zu minimieren. Die Fluoreszenzen steigen in etwa im gleichen Größenordnungsbereich an. Dies lässt auf eine Dissoziation der DNA vom SWCNT schließen. Jedoch verlaufen die Fluoreszenzanstiege von Filtrat und Probe zeitlich versetzt und sind sehr klein, d.h. nur eine kleine Menge DNA hat sich abgelöst. Darüber hinaus wurde durch das Zentrifugieren die Probe aufkonzentriert und damit das System gestört.

Um zusätzliche Informationen zu erhalten, wurden die Absorptionsspektren (Abb. 44) herangezogen.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

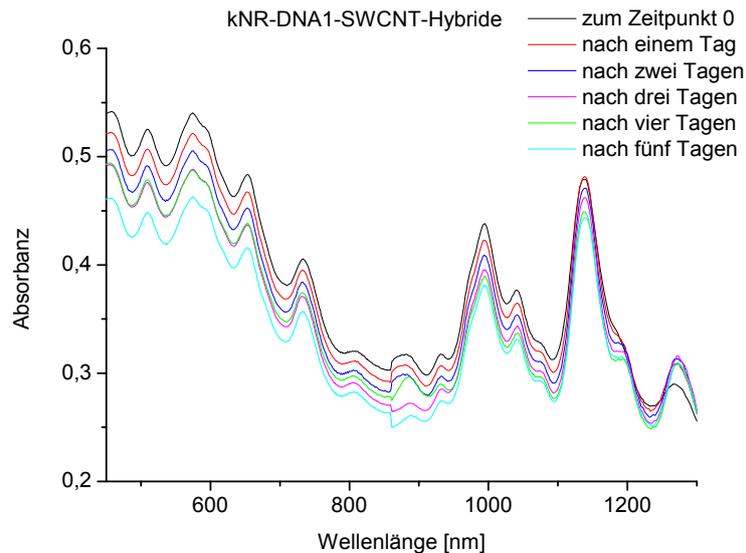


Abb. 44 Absorptionsspektren der **kNR-DNA1**-Hybride über fünf Tage.

Klar zu erkennen ist eine Abnahme der Absorption mit der Zeit und damit ein Ausfallen der SWCNT. Findet ausschließlich Dissoziation statt, so müsste der Anteil an Nilrot-Absorption konstant bleiben. Um dies zu untersuchen, wurde das Verhältnis der E_{22}/E_{11} -Absorption einer (n,m)-Spezies, die im Bereich der Nilrot Absorption liegt, gebildet. Hierfür wurden die Absorptionsbanden der (6,5)-SWCNT gewählt: E_{11} bei etwa 995 nm und E_{22} bei etwa 574 nm.^[72] Der Untergrund wurde analog der Methode von *Fantini et al.*^[182] abgezogen, um das Signal gegen die Absorptionsanteile der Küvette, metallischer SWCNTs und amorphen Kohlenstoffs zu korrigieren. Diese Methode ist nur eine Näherung, jedoch gibt es für eine Mischung aus über 20 (n,m)-Spezies, so weit bekannt, keine exakte Methode, diese Absorptionsanteile abzuziehen. In Abb. 45 ist das Verfahren zur Berechnung der einzelnen Intensitäten am Beispiel des „Zeitpunktes 0“ abgebildet. Im E_{11} -Bereich unterscheidet sich dies von der Methode in Kapitel 4.1.6, da eine Normierung bei 1300 nm nicht möglich war (die Absorption in diesem Bereich steigt über die Zeit teilweise sogar an. Für diesen Effekt gab es bis zum Ende dieser Arbeit keine vollständige Erklärung. Möglicherweise ist dies auf die Bündelung der SWCNTs und damit einer Verbreiterung und Überlagerung der einzelnen (n,m)-Spezies zurückzuführen). Die Methode ist dennoch zulässig, da sie für alle zu vergleichenden Datensätze angewendet wurde. Als Vergleichsstrang wurde das sequenzgleiche, unmodifizierte Oligonukleotid **DNA4** (3'-TGT-GTG-TGT-GTG-5') verwendet.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

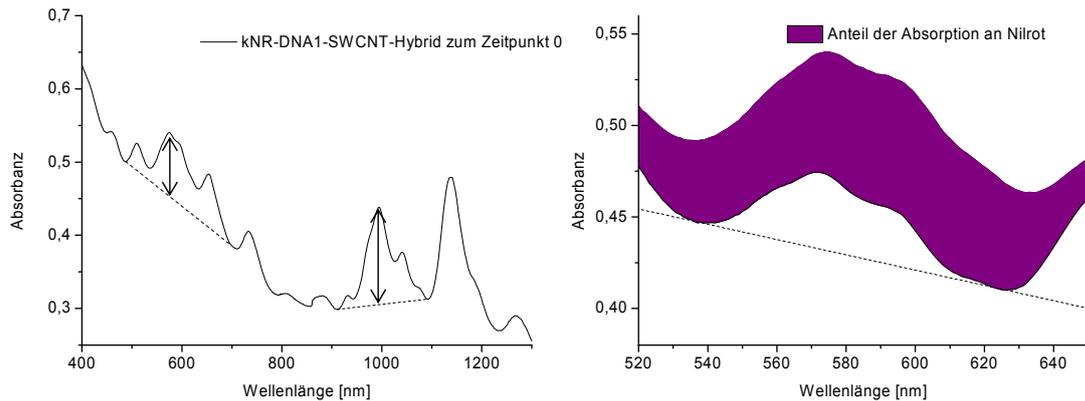


Abb. 45 Links: Methode zur Berechnung der Absorptionsintensitäten des (6,5)-SWCNT; rechts: Anteil der Nilrot Absorption am E_{22} -Signal. Als Referenz diente **DNA4**.

Sollte nun ausschließlich Dissoziation stattfinden, so müsste die Nilrot-Konzentration und damit die Absorption konstant bleiben. Die Absorptionsänderungen im Bereich des Nilrots würden gering ausfallen, da dieses mehr als 60% zum gesamten Signal beiträgt (Abb. 45 rechts). Somit sollte das Verhältnis aus A_{574}/A_{995} deutlich größer werden.

Die Verhältnisse der Intensitäten aus der E_{22} - zur E_{11} -Absorption des (6,5)-SWCNT über fünf Tage sind in Abb. 46 dargestellt (Der Messpunkt an Tag 4 für die Nilrot-Probe wurde als Ausreißer definiert und aus der Darstellung entfernt, da in Wiederholungsexperimenten eine derartige Abweichung nicht mehr auftrat). Deutlich zeigte sich im linken Spektrum eine geringe Abnahme für die Verhältnisse der **DNA4**. Theoretisch sollten die Verhältnisse gleich bleiben, da die beiden Signale aus einer (n,m)-Spezies stammen, jedoch verbreitern sich durch Bündelung die Absorptionssignale, wodurch Anteile anderer (n,m)-Spezies in den beobachteten Wellenlängenbereich fallen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei **kNR-DNA1** umwickelten SWCNTs kaum eine Änderung des Verhältnisses. Dies entspricht zwar einer geringen Zunahme des Verhältnisses im Vergleich zu **DNA4**, jedoch wird nicht der erwartete Wert von etwa 0,7 erreicht (dieser Wert berechnet sich aus der Summe des E_{22}/E_{11} -Verhältnis von 0,49 des konstant bleibenden Nilrot-Anteils und den E_{22}/E_{11} -Verhältnis von 0,21 des SWCNT bei gleichem Verhalten wie **DNA4**) Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass auch die DNA mit ausfällt, wodurch die Annahme einer reinen Dissoziation in Frage gestellt wird. Um dies genauer zu untersuchen, wurde folgendes Gedankenexperiment durchgeführt: Unter Annahme, dass ausschließlich Dissoziation

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

stattfindet, lässt sich das Absorptionssignal des SWCNT bei 574 nm bei konstanter Nilrot-Konzentration für die 5 Messdaten neu berechnen, Die Verhältnisse E_{22}/E_{11} für die theoretisch berechneten Werte sind in Abb. 46 rechts dargestellt. Da auf diese Weise nur die Absorptionsverhältnisse aus den SWCNT-Anteilen gebildet wurden, sollten sich diese entsprechend **DNA4** verhalten und nahezu konstant bleiben. Jedoch ist klar eine Abnahme erkennbar. Wiederholungsexperimente zeigten den gleichen Trend und bestätigen damit die Ergebnisse. Dies führte nun zu dem Schluss, dass neben der Dissoziation noch ein weiterer Prozess stattfindet der zum ausfallen der SWCNTs führte bzw. dass die Dissoziation eine Folge dieses Prozesses ist. Die Theorie zu diesem soll die bisherige Ansicht zur Dissoziation nicht ersetzen, sondern modifizieren/erweitern.

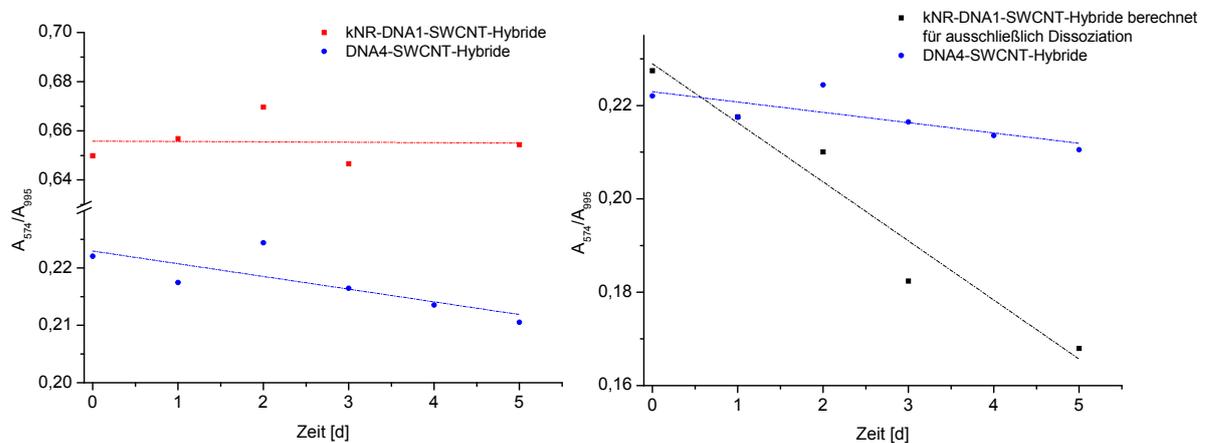


Abb. 46 Verhältnisse der Absorptionen A_{574}/A_{995} gegen die Zeit: links: der gemessenen Werte, rechts: im Vergleich mit theoretisch berechneten Werten falls nur Dissoziation stattfindet.

4.2.3 Neuordnung der DNA um den SWCNT

Hartschuh et al.,^[190] und *Strano et al.*^[39] konnten zeigen, dass sich zwischen den einzelnen DNA Strängen am SWCNT Lücken befinden. *Coleman et al.*^[191] und *Johnson et al.*^[93] konnten mit theoretischen Berechnungen von einzelsträngiger DNA am SWCNT und experimentellen Befunden von doppelsträngiger DNA am SWCNT belegen, dass die DNA mit der Zeit eine kompaktere Struktur am SWCNT einnimmt, wodurch freie SWCNT-Flächen entstehen. Kombiniert man diese Erkenntnisse, so lässt sich eine neue Erklärung für die im vorhergehenden Kapitel gemessenen Daten finden (schematisch in Abb. 47 dargestellt):

Über die Zeit nimmt die DNA aufgrund der starken inter- und intramolekularen Wechselwirkungen eine kompakte Struktur an. Dies wiederum führt dazu, dass an den Randbereichen größere Stellen frei werden, an denen eine Bündelung und damit ein Ausfallen der SWCNT mit der gebundenen DNA einsetzen kann. Bei fortgeschrittener Bündelung könnte die DNA verdrängt werden, wodurch diese vom SWCNT dissoziieren kann. Somit würde nicht Dissoziation die Bündelung auslösen, sondern die Bündelung löst Dissoziation aus.

Die Dissoziierte DNA kann nun in Lösung verbleiben oder an freien Stellen des SWCNTs binden und dadurch mit den SWCNTs ausfallen. Dies erklärt möglicherweise die abschnittswise Anstiege der Verhältnisse von A_{574}/A_{995} .

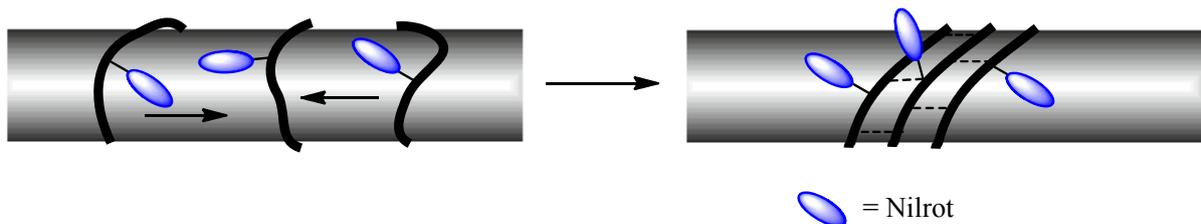


Abb. 47 Schematische Darstellung der Bewegungen der DNA auf einem SWCNT.

Die meisten Effekte lassen sich hierdurch folgendermaßen erklären:

Da die Bindung der DNA an die Oberfläche stärker ist als die des Nilrot-Chromophors (siehe Kapitel 4.2.1) sowie der Platz zwischen zwei DNA-Strängen sehr klein ist (siehe Abb. 16), lässt sich der Anstieg der Fluoreszenz, wie in Abb. 43 gezeigt, durch eine Verdrängung des Farbstoffes von der Oberfläche des SWCNT während der Anordnung der DNA erklären

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

(Abb. 47). Durch den flexiblen Linker ist eine räumliche Trennung zum SWCNT nach dem Ablösen möglich, wodurch die Fluoreszenz nicht mehr gelöscht wird.

Durch Zugabe freier DNA zu den DNA-SWCNT Hybriden konnten *Branton et al.*^[38] zeigen, dass diese Lösungen bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil waren. Als Grund hierfür nannten sie, dass die überschüssige DNA die freien Stellen, die durch Dissoziation entstehen, wieder umwickelte. Die gleiche Erklärung lässt sich auch auf den hier postulierten Mechanismus anwenden. Die überschüssige DNA wickelt sich um die freien Stellen am SWCNT, die durch das Anordnen der DNA entstehen. Dies erklärt auch die lange Stabilität der DNA-SWCNT in Lösung, wie sie von *Coleman et al.*^[189] beschrieben wurde, wo bei der Probenvorbereitung der Überschuss an DNA nicht abgetrennt wurde.

Um diese Theorie weiter zu bestätigen, müssten Untersuchungen an längensortierten oder einzelnen (n,m)-Spezies durchgeführt werden. Die durchgeführten Experimente deuten auf die postulierte Theorie hin, sind jedoch nur Indizienbeweise. Es erscheint auch sinnvoll, dass in einem so komplexen System wie das der DNA-SWCNT-Hybride ein Ausfallen nicht rein durch Dissoziation beschrieben werden kann.

Zur Überprüfung, ob nur eine Neuordnung stattfand, wurde das gleiche Gedankenexperiment wie in Kapitel 4.2.2 durchgeführt. Ausgehend von der Annahme, dass keine Dissoziation stattfand, sollte der Nilrot-Anteil durchgehend 60% betragen. Mit dieser Annahme konnten die Absorptionsanteile des SWCNT bei 574 nm berechnet werden. Die daraus gebildeten Verhältnisse zu 995 nm sollten denen der unmodifizierten Probe entsprechen. In Abb. 48 lässt sich erkennen, dass die Tendenzen voneinander abweichen, jedoch ist die Abweichung in diesem Fall geringer wie zu den berechneten Werten der Dissoziation. Dies deutet darauf hin, dass beide Prozesse parallel stattfanden. Jedoch konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob Dissoziation eine Folge der Neuordnung ist.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

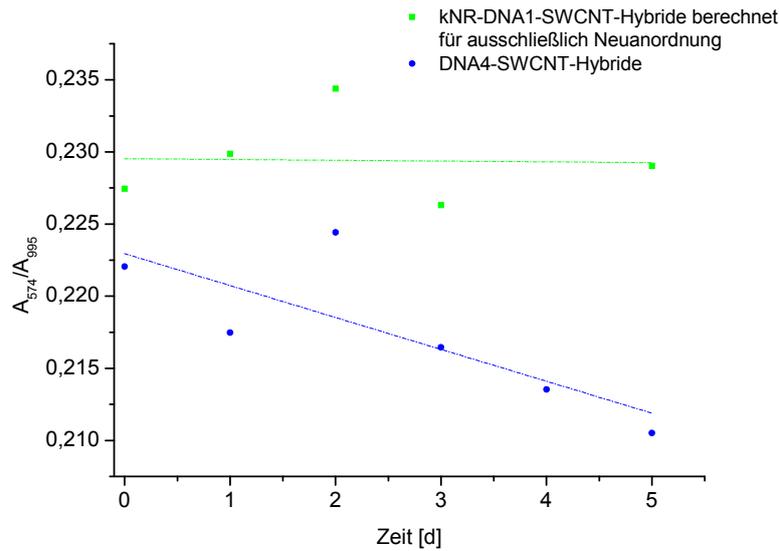


Abb. 48 Verhältnisse der Absorptionen A_{574}/A_{995} gegen die Zeit der theoretisch berechneten Werte für ausschließlich Neuordnung im Vergleich zu **DNA4**.

4.2.4 Verhalten der DNA um den SWCNT bei 90 °C und 55 °C

Mit den Erkenntnissen aus Kapitel 4.2.3 wurde das Verhalten der DNA am SWCNT bei 90 °C neu betrachtet, um unter anderem Hinweise zu erhalten, wie Dissoziation und Neuordnung zusammenhängen. Hierfür wurden **kNR-DNA1-SWCNT-Hybride** bei 90 °C inkubiert. Die Absorptions- und Fluoreszenzmessungen wurden bei 20 °C durchgeführt, damit diese mit Messungen bei anderen Temperaturen vergleichbar sind. Bereits nach zwei Stunden zeigte sich ein ausgeprägtes Ausflocken der SWCNTs (Abb. 49). Um Lichtstreuung bei den Absorptions- und Fluoreszenzmessungen durch die ausgeflockten SWCNTs zu vermeiden, wurden diese durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 15600 g entfernt und der Überstand vermessen. Um die Fluoreszenzintensität der zu Anfang gebundenen DNA zu erhalten, wurden anschließend Präzipitat und Überstand wieder vereinigt und mit wenigen Mikrolitern einer SDBS-Lösung versetzt, so dass eine Konzentration von 0,1 gew.-% an SDBS vorlag. Diese Lösung wurde 15 min im Ultraschallbad behandelt und nach 28 Stunden vermessen. Die Absorptionsintensitäten vor der Inkubation bei 90 °C und nach der Behandlung mit SDBS sind nahezu identisch, wodurch gezeigt werden konnte, dass die ausgefallenen SWCNTs mit dieser Methode wieder in Lösung gebracht werden können.

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

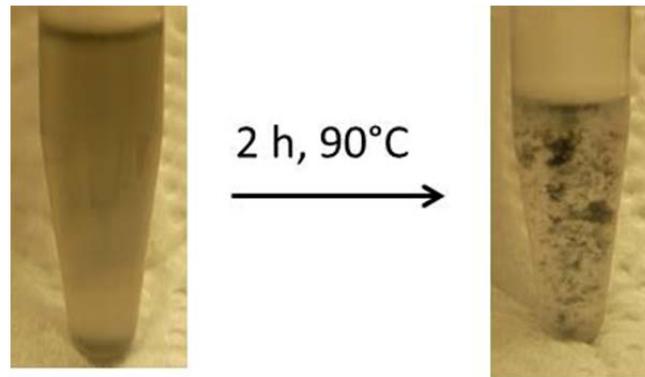


Abb. 49 Links: **kNR-DNA1-SWCNT** Hybride bei Raumtemperatur, rechts: nach zwei Stunden bei 90 °C.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind in Abb. 50 und Abb. 51 dargestellt. Das Ausflocken der SWCNTs zeigte sich in einer deutlichen Abnahme der Absorptionsintensität. Die Verhältnisse aus A_{574}/A_{995} stiegen von 0,6 auf etwa 4,0 an. Dies legte die Vermutung nahe, dass **kNR-DNA1** von den SWCNTs dissoziierte. Bei vollständiger Dissoziation sollte der Nilrot-Anteil (welcher direkt proportional zur Stoffmenge an DNA ist) konstant bleiben, jedoch nimmt dieser deutlich ab (Abb. 50 rechts, der Nilrot-Anteil lies sich ausgehend von einem A_{574}/A_{995} -Verhältnis von 0,22 einer unmodifizierten DNA (siehe Kapitel 4.2.2) abschätzen). Darüber hinaus lieferte das nach reiner Dissoziation berechnete A_{574}/A_{995} -Verhältnis bei zwei Stunden einen negativen Wert. Somit fand keine vollständige Dissoziation statt, sondern ein Großteil der DNA ist mit den SWCNTs ausgefallen.

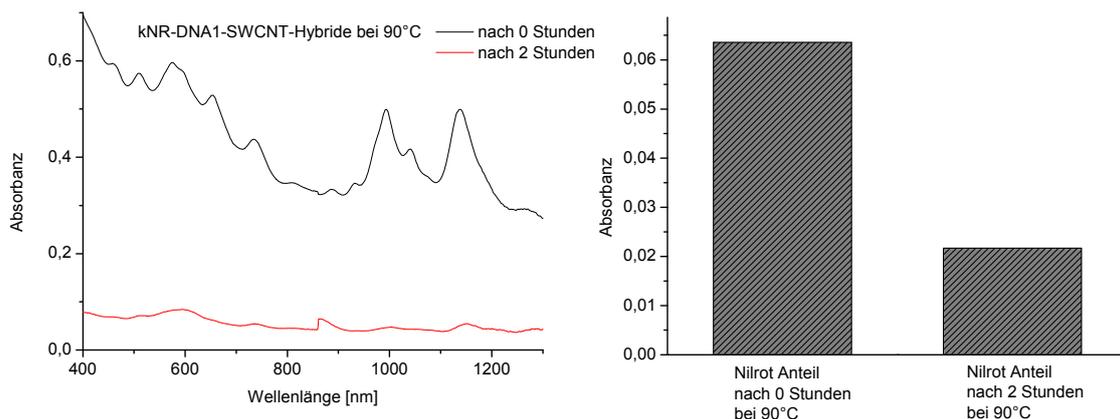


Abb. 50 Links: Absorptionsspektren der **kNR-DNA1-SWCNT** Hybride bei 90 °C; rechts Nilrot-Absorptionsanteile nach 0 und zwei Stunden bei 90 °C.

Das Ausfallen der DNA mit den SWCNTs konnte mittels der gemessenen Fluoreszenzspektren (Abb. 51) bestätigt werden. Hier zeigte sich eine deutliche Zunahme der

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Fluoreszenzintensität, jedoch entsprach diese nur etwa 40% der maximal möglichen Intensität.

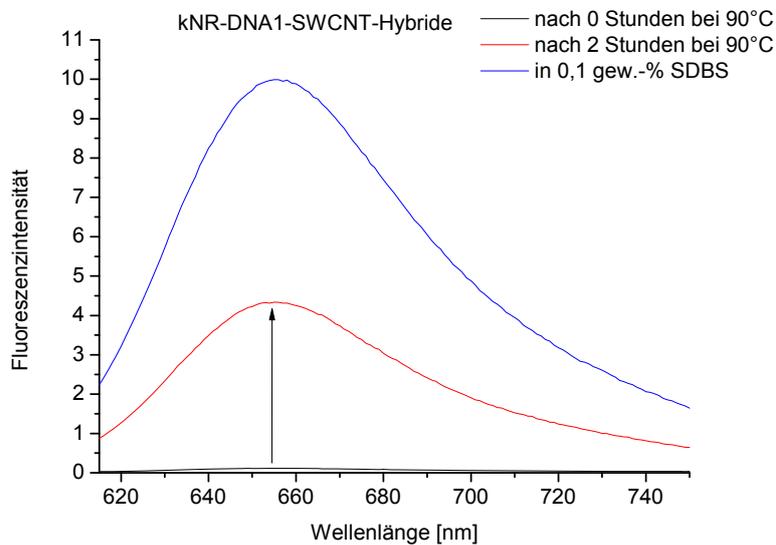


Abb. 51 Fluoreszenzspektren der **kNR-DNA1-SWCNT** Hybride bei 90 °C.

Diese Messungen widerlegen die Annahme in der Literatur^[186], dass bei 90 °C die DNA vollständig dissoziiert. Jedoch ließ sich aufgrund des schnellen Ausflockens der SWCNTs nicht zeigen, ob nun Dissoziation und Neuordnung zwei verschiedene Prozesse sind, oder die Dissoziation eine Ursache der Neuordnung ist. Um dies genauer zu untersuchen wurden Messungen bei 55 °C durchgeführt. Hierbei sollten die SWCNTs schneller ausfallen als bei Raumtemperatur, aber noch so langsam, dass ein Verlauf erkennbar ist. Für die Messungen wurden die **kNR-DNA1-SWCNT-Hybride** bei 55 °C inkubiert und anschließend bei 20 °C vermessen. Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind in Abb. 52 dargestellt. Hierbei zeigte sich wieder ein deutliches Ausfallen der SWCNTs bei gleichzeitigem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Beide Änderungen sind stärker ausgeprägt als bei Raumtemperatur (vgl. Abb. 43 und Abb. 44) und schwächer als bei 90 °C (vgl. Abb. 50 und Abb. 51).

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

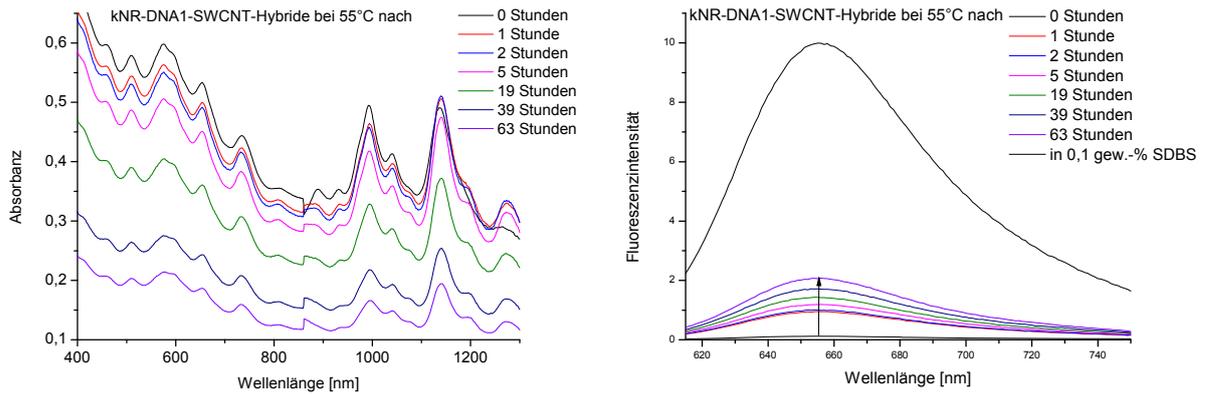


Abb. 52 Links: Absorptionsspektren; rechts Fluoreszenzspektren der **kNR-DNA1-SWCNT** Hybride bei 55 °C.

Die Verhältnisse aus A_{574}/A_{995} sowie die Nilrot Absorptionsanteile sind in Abb. 53 aufgetragen.

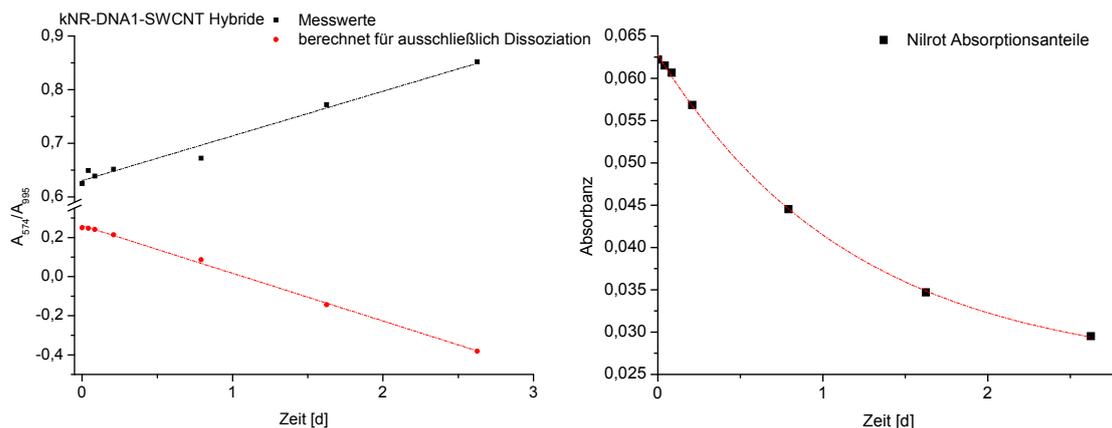


Abb. 53 Links: A_{574}/A_{995} Verhältnisse für die Messwerte und den berechneten Werten nach Dissoziation gegen die Zeit aufgetragen; rechts: Absorptionsanteile des Nilrots gegen die Zeit aufgetragen.

Die Verhältnisse A_{574}/A_{995} der Messwerte zeigten einen Anstieg und folglich eine Dissoziation von Nilrot. Werden jedoch die Verhältnisse für ausschließliche Dissoziation berechnet, so ergaben sich negative und damit unsinnige Werte. Somit konnte eine reine Dissoziation entsprechend den Messungen bei Raumtemperatur und 90 °C ausgeschlossen werden. Gleichzeitig wurde ein Ausfallen der DNA mit den SWCNTs beobachtet, welches durch den exponentiellen Abfall des Nilrot-Absorptionsanteil in Abb. 53 (rechts) dargestellt ist. Jedoch konnte nicht geklärt werden, ob die Dissoziation als eigenständiger Prozess stattfand, oder eine Ursache der Neuordnung der DNA am SWCNT war. Der Grund dafür liegt in der

4. Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

verwendeten Mischung aus mehreren (n,m)-Spezies mit unterschiedlichen Längen der SWCNTs, wodurch mehrere Prozesse parallel stattfanden. Genauere Aussagen würden Messungen an gröÙenselektierten SWCNTs mit einer kleineren (n,m)-Verteilung liefern.

4.2.5 Berechnung der Stoffmengenverhältnisse gebundener DNA zu SWCNT

Aufgrund der starken Absorption der SWCNTs im UV-Bereich ist es nicht möglich, anhand der Absorptionsbande bei $\lambda = 260$ nm auf die Konzentration gebundener DNA am SWCNT zu schließen. Die **kNR-DNA1** bietet durch die zusätzliche Absorptionsbande des Nilrot-Chromophors bei $\lambda = 574$ nm, bei gleichzeitig geringer Absorption des SWCNT, die Möglichkeit, die Konzentration und damit die Stoffmenge an gebundener DNA zu berechnen. Die Stoffmenge an SWCNTs lässt sich durch die Absorption bei $\lambda = 808$ nm und einem Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 7,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnen.^[21] Somit ergibt sich ein Stoffmengenverhältnis $n(\text{kNR-DNA1})/n(\text{SWCNT})$ von 32 ± 4 , d.h. auf jedem SWCNT befinden sich etwa 32 Oligonukleotide. Die Länge eines Oligonukleotides auf dem SWCNT, d.h. der Abstand des 3' terminalen Wasserstoffatoms zum 5' terminalen Wasserstoffatom beträgt für ein 12-mer zwischen 2,1 und 4 nm.^[31] Dies ist abhängig von der jeweiligen DNA-Sequenz und (n,m)-Spezies der SWCNTs. Da in diesem Fall eine Mischung aus verschiedenen (n,m)-Spezies vorlag, wurde eine durchschnittliche Länge von etwa 3,1 nm angenommen. Damit berechnet sich der Platzbedarf der 32 Oligonukleotide pro SWCNT auf 99 nm. Die Länge der SWCNTs wird durch die Dauer und Stärke der Ultraschallbehandlung beeinflusst^[87]. Da in diesem Fall ein Ultraschallbad verwendet wurde, welches eine geringere Leistung besitzt als in der Literatur verwendete Ultraschallfinger, kann davon ausgegangen werden dass die durchschnittliche Länge über 200 nm liegt.^[87, 192] Dies bedeutet, dass weniger als 50% des SWCNT mit DNA bedeckt ist und stimmt damit mit den Ergebnisse von *Hartschuh et al.*^[190] und *Strano et al.*^[39] einer partiellen Belegung der SWCNTs mit DNA überein.

4.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit wurden pyrenmodifizierte Oligonukleotide entwickelt, in denen das Pyren konformationell flexibel angeknüpft ist. Das System aus pyrenmodifizierter DNA und SWCNT besitzt die Eigenschaft mehr vereinzelte SWCNT in Lösung zu bringen als unmodifizierte DNA. Dies konnte durch einen Vergleich der Photolumineszenz- zu Absorptionsdaten mit unmodifizierten Strängen bewiesen werden.

Darüber hinaus konnte mit einem nilrotmodifizierten Oligonukleotid das Ausfallen der DNA-SWCNT-Hybride in Lösung bei verschiedenen Temperaturen besser untersucht werden. Es zeigte sich, dass keine vollständige Dissoziation der DNA von der SWCNT-Oberfläche bei 90 °C stattfand. Anhand der Messdaten konnte zusammen mit literaturbekanntem^[93, 190, 191] Ergebnissen eine neue Theorie beschrieben werden. Diese besagt, dass durch eine Neuordnung der DNA auf dem SWCNT freie Stellen entstehen, an denen eine Bündelung und damit ein Ausfallen der Hybride einsetzen kann. Effekte, die durch Dissoziation erklärt wurden, lassen sich auch mit dieser neuen Theorie erklären. Ob die Dissoziation eine Ursache der Neuordnung ist, oder als eigenständiger Prozess abläuft, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Anhand der Absorptionsbande bei $\lambda = 574 \text{ nm}$ konnte eine partielle Belegungsdichte entsprechend der Literatur^[39, 190] bewiesen werden.

Jedoch muss man jeglichen Messungen mit SWCNT selbstkritisch gegenüber stehen. Betrachtet man z.B. die Photolumineszenz-Karten von **DNA1** und **kPy-DNA6** in Abb. 34 und Abb. 35 so zeigt sich, dass trotz gleicher Bedingungen und Konzentrationen die Spektren unterschiedlich aussehen. Auch zeigen Absorptionsspektren bei gleicher Probenvorbereitung unterschiedliche Startwerte, jedoch identische Form. Die Reproduzierbarkeit von Spektren, vor allem der absoluten Intensitäten, ist ein grundsätzliches Problem bei der Probenvorbereitung von DNA-SWCNT-Hybriden. Daher lassen sich genauere Aussagen aufgrund einer Messung nicht treffen. Gewisse Tendenzen sind dann erkennbar, wenn verschiedene Oligonukleotide bzw. mehrere Messungen vergleichbare Ergebnisse liefern.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Die DNA weist neben dem Vorteil, dass sie relativ einfach modifizierbar ist (siehe Kapitel 4), die Eigenschaft einer hohen selektiven Erkennung durch Hybridisierung auf. Daher wurden zahlreiche Experimente an DNA-SWCNT-Hybriden durchgeführt um den Hybridisierungsprozess genauer zu untersuchen. In der Literatur werden in diesem Zusammenhang verschiedene Methoden beschrieben, in denen die Untersuchungen mittels FET^[43, 193], Impedanzmessungen^[194], Photolumineszenzänderungen^[39, 195] am SWCNT, Aggregation^[196] und den bereits in Kapitel 3.2.5 besprochenen Fluoreszenzlöschungen durchgeführt wurden. Die hier aufgeführten Methoden sind nur einige Beispiele, verdeutlichen aber bereits das große Interesse der Wissenschaft daran. Mögliche Anwendungen finden sich im Bereich der SNP-Detektion^[43, 105, 106, 193-195] und dem Aufbau von geordneten Nanostrukturen^[196].

Jedoch besteht eine Diskussion, ob die Hybridisierung zu einem Ablösen des Doppelstranges führt^[43, 44], oder die beiden hybridisierten Stränge auf dem SWCNT verbleiben^[39, 40]. Darüber hinaus fällt bei genauerer Betrachtung in einigen Fällen auf, dass die SWCNTs mit Tensiden, Polymeren oder organischen Lösungsmitteln vorbehandelt wurden. Da die DNA den SWCNT nicht vollständig bedeckt, ist es fraglich, ob die vorher gebundene Moleküle vom SWCNT durch DNA vollständig verdrängt werden. Wodurch sich die nächste Frage stellt: Zeigen diese Moleküle evtl. einen Einfluss auf die Bindungsstärke zwischen DNA und SWCNT, und damit eine Auswirkung auf die Hybridisierung? Daher wurde der Einfluss von DMF entsprechend der Methode in Kapitel 4.2.1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 54 dargestellt.

In den Absorptionsspektren ist keine Verschiebung erkennbar, jedoch konnte ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Dieser war im Gegensatz zur Zugabe von SDBS nur schwach, dennoch klar erkennbar ausgeprägt. Dies lässt darauf schließen, dass DMF einen Einfluss auf die Bindung von Nilrot am SWCNT zeigte und möglicherweise auch einen geringen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen DNA und SWCNT ausübt. Die Abweichung vom logarithmischen Verlauf zu späteren Zeiten, lässt sich durch eine Kombination aus Verdrängung durch DMF und ein Neuordnen der DNA am SWCNT erklären.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

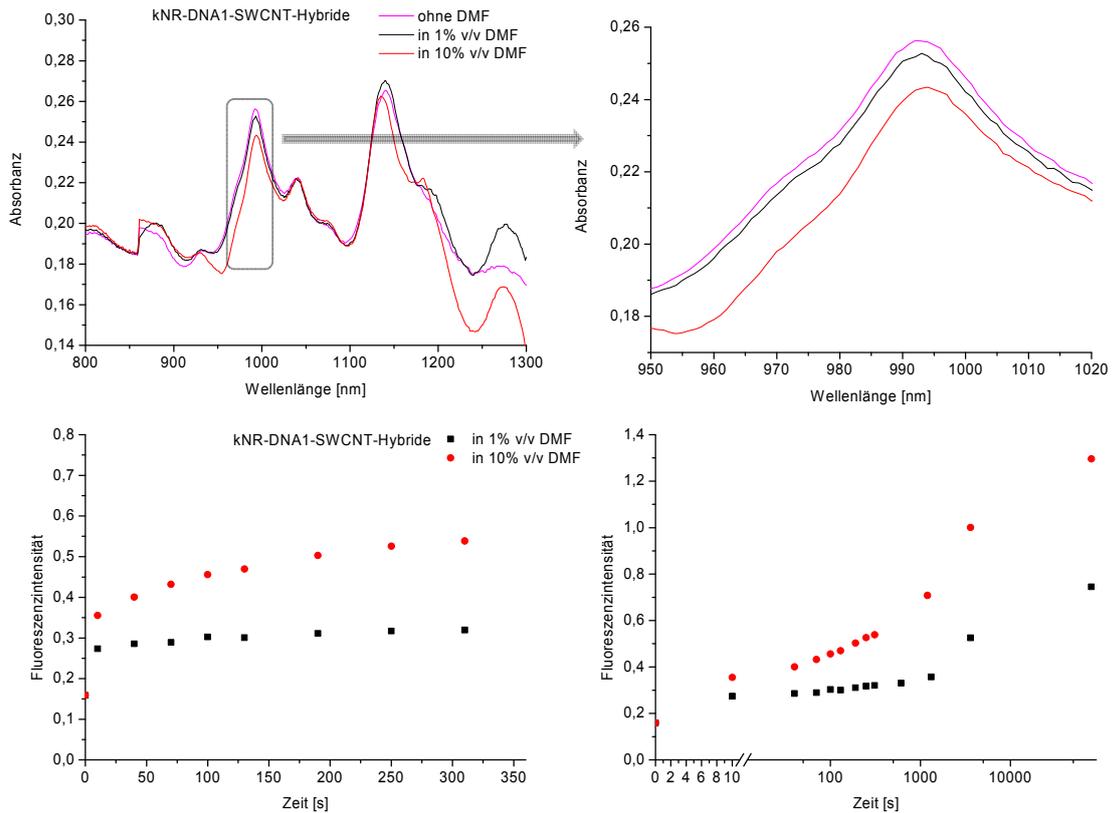


Abb. 54 Oben: Absorptionsspektrum der **kNR-DNA1-SWCNT-Hybride** mit unterschiedlichen Konzentrationen an SDBS nach einer Stunde und einer Kontrolllösung ohne DMF; Unten: Zwei unterschiedliche Auftragungen der Änderung der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 657$ nm gegen die Zeit. ($\lambda_{\text{ex}} = 600$ nm).

Daher war das Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit, die Hybridisierung am SWCNT bzw. Graphen genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotide mit einem metallionenvermittelten Basenpaar (siehe Kapitel 5.1.1) eingesetzt. Diese bilden bei gleicher Basensequenz einen stabileren Duplex aus. Die Idee war, dass durch die Bildung dieses stabilen Duplexes ein Ablösen vom SWCNT bzw. von Graphen schneller bzw. erst dadurch möglich wird.

5.1 Metallionenvermitteltes Basenpaar

Als Überbegriff für die metallionenvermittelten Basenpaare wird der Begriff der Metallkomplex/DNA-Konjugate verwendet.^[197] Diese umfassen die Komplexbildung von Metallionen über Basenpaare oder Liganden. Dabei sind die Liganden meist an den Basen angeknüpft oder werden als Basensurrogat eingesetzt.^[197, 198] Die Metallkomplexe können je nach Ligand und/oder Metallion unterschiedliche photoaktive, elektroaktive, magnetische oder katalytische Eigenschaften aufweisen.^[197, 198] Darüber hinaus erweitern die zusätzlichen Bindungsstellen die Möglichkeiten, Nanostrukturen aufzubauen und diese mit Funktionalität auszustatten. Bisherige Anwendungen sind, unter anderem, im Bereich des Energie- oder Elektronentransfers in Oligonukleotiden, sowie endständiger Verknüpfung von DNA Strängen^[199-202]. Die metallionenvermittelten Basenpaare umfassen die Komplexbildung eines Metallions zwischen zwei Basen oder zwei Liganden. Hierbei ist der Ligand direkt mit der Ribose-Einheit verknüpft.^[143] Diese Nucleoside werden auch als „Ligandoside“ bezeichnet.^[203]

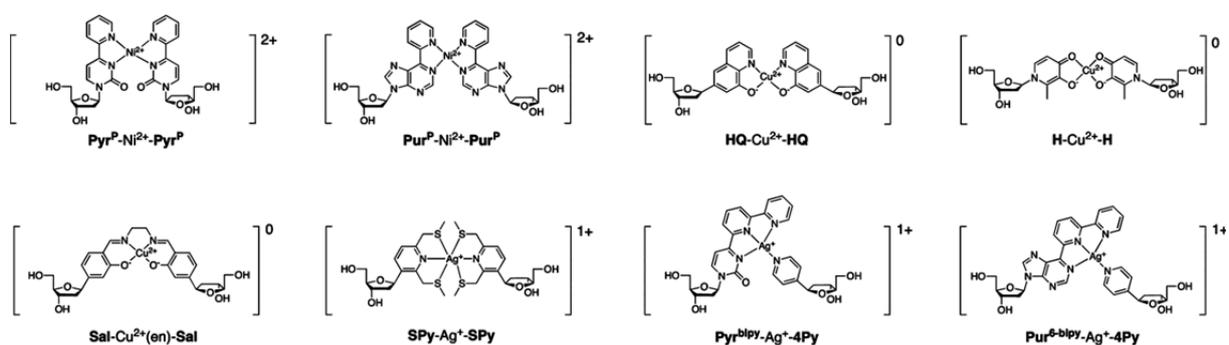


Abb. 55 Metallionenvermittelte Basenpaare. Für weitere Beispiele und genauere Erläuterungen zu den einzelnen Basenpaaren siehe Lit.^[143]. Wiedergabe mit Genehmigung von Lit.^[143], Copyright American Chemical Society 2012).

Die Basenpaarung im Falle der Ligandoside erfolgt durch eine koordinative Metallbindung anstatt der natürlich vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen. Da die Bindungsenergie für koordinative Metallbindungen größer ist als für nicht-kovalente Bindungen, führt dies zu einer Erhöhung der Duplexstabilität. Diverse Ligandoside (Abb. 55) wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen angefertigt (Übersichtsartikel hierzu Lit.^[140, 142, 143]). Die Ligandoside aus Abb. 55 haben zwei gemeinsame Eigenschaften: (i) Bindungsstelle für ein Metallion, (ii) konjugiertes π -System. Der zweite Punkt ist wichtig, da die Duplexstabilität eines DNA-

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Stranges nicht nur von den Wasserstoffbrückenbindungen, sondern auch entscheidend von den hydrophoben Wechselwirkungen abhängt.^[204]

Shionoya et al. benutzten als erste die DNA als Templat um mittels Ligandosid-Komplexen lineare Nanoarrays aufzubauen.^[205] Der dafür verwendete Hydroxypyridon-Ligand bildet mit dem vorwiegend quadratisch planar koordinierenden Cu(II) einen stabilen Komplex (Abb. 56 links). Über UV/Vis-, CD- Spektroskopie und Massenspektrometrie wurde die Bildung helikaler, DNA ähnlicher Doppelstränge nachgewiesen. Die Cu(II) Ionen reihten sich dabei entlang der Helixachse in einem nahezu konstanten Cu(II)-Cu(II) Abstand auf. Zwischen den Kupferatomen konnte eine ferromagnetische Kopplung mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) nachgewiesen werden. Die Feinaufspaltung dieser Messungen ließ auf einen Abstand von etwa 3,7 Å zwischen den beiden Cu(II) Ionen schließen. Dies kommt den Wert von 3,4 Å zwischen zwei benachbarten Basen in der DNA-Helix sehr nahe. *Carell et al.* bestätigten diesen Abstand von 3,7 Å mit einem Salenpaar als Ligandosid und Cu(II)^[206] (Abb. 56 rechts). Jedoch ergaben die ESR-Messungen eine antiferromagnetische Kopplung. Dies verdeutlicht den bereits erwähnten Einfluss des Liganden auf die Eigenschaften des Komplexes.

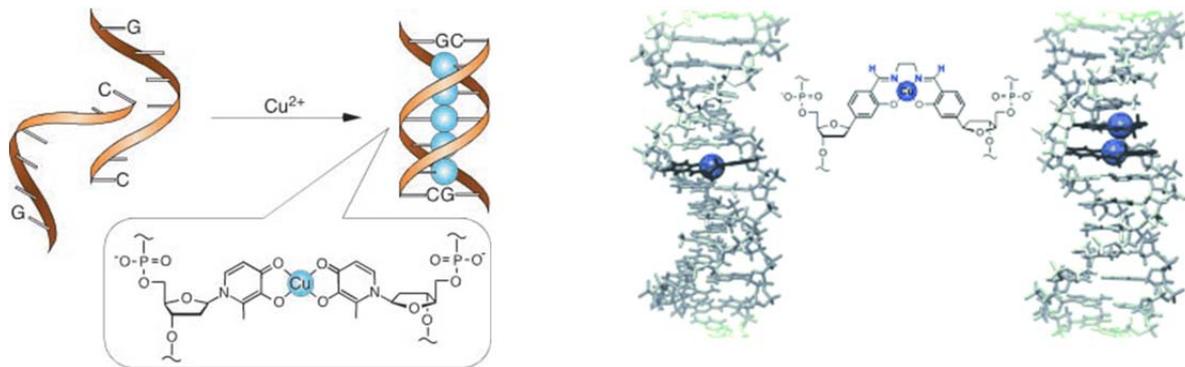


Abb. 56 Links: Struktur des Hydroxypyridon Ligand und schematische Darstellung in der DNA (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[205], Copyright The American Association for the Advancement of Science 2003), Rechts: Struktur des Salen-Liganden und schematische Darstellung in der DNA (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[206], Copyright John Wiley and Sons 2010).

Die Anwendung solcher Komplexe liegt im Bereich der Herstellung neuer molekularer Bauteile, z.B. Nanodrähte für die Nanotechnologie^[207].

5.1.1 Hydroxychinolinvermittelte DNA Basenpaare

In dieser Arbeit wurde ein Hydroxychinolin-Ligandosid (HQ-Ligandosid, Abb. 57) verwendet, welches in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelt wurde.^[208] Das HQ-Ligandosid bildet mit Cu(II) extrem stabile Komplexe in der DNA aus, so dass durch den Ersatz von nur einem Basenpaar die Schmelztemperatur des Duplexes um mehr als 20 °C ansteigt. Die relativ starke Stabilisierung des Doppelstranges lässt sich auf die zwei bereits erwähnten Faktoren zurückführen: (i) die koordinative Metallbindung (ii) das konjugierte π -System.

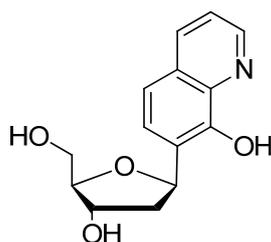
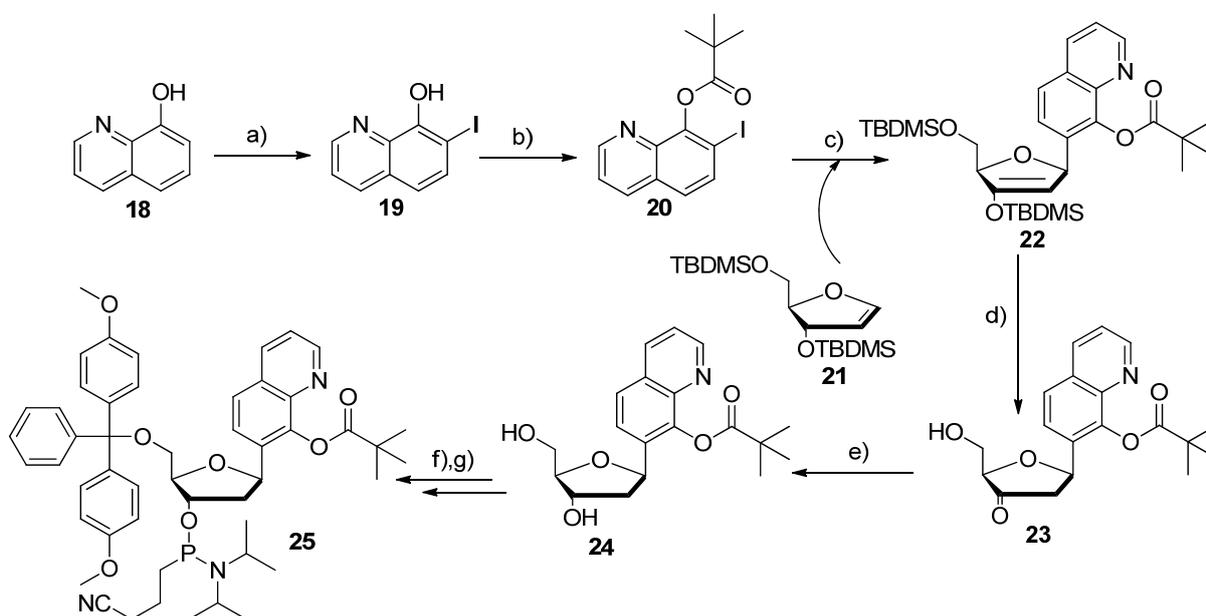


Abb. 57 HQ-Ligandosid

Die Synthese des HQ-Ligandosids Baustein **25** ist in Schema 6 dargestellt.



Schema 6 Synthese des Hydroxychinolin-Posphoramiditbausteins **25**. a) NIS, CHCl_3 , 20 h, 40 °C; 60%; b) DMAP (0,1 eq.), Pivaloylchlorid (3 eq.), abs. Pyridin, 20 h, RT, 80%; c) **21** (0,8 eq.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,1 eq.), AsPh_3 (0,2 eq.), abs. THF, abs. NEt_3 , 16 h, 60 °C, 35%; d) $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ (2,8 eq.), abs. THF, 16 h, 0 °C – RT, 95%; e) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1,5 eq.), $\text{AcOH}:\text{MeCN}$ 1:1, 0 °C, 20 min, 92%; f) DMT-Cl (1,2 eq.), abs. Pyridin, abs. NEt_3 , 24 h, RT, 43%; g) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1,5 eq.), DIPEA (2 eq.), 2 h, RT, 90%.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Zuerst erfolgte eine selektive Iodierung an der 7-Position des 8-Hydroxychinolins^[209] (**18**). Anschließend wurde die freie OH-Gruppe von **19** mit Pivaloylchlorid geschützt. Das geschützte Hydroxychinolin **20** wurde in einer Heck-Reaktion mit den zweifach TBDMS-geschützten Glykal **21** unter Verwendung von Palladiumacetat und Triethylamin als Base umgesetzt. Das Glykal wurde nach Literaturvorschrift ausgehend von Thymidin^[210] von Effi Bätzner und Andreas Dittmer synthetisiert. Durch die beiden sterisch anspruchsvollen TBDMS-Gruppen am Glykal war keine Anomerentrennung nach der Heck-Reaktion nötig, da nur das gewünschte β -Anomer entstand^[211]. Die TBDMS-Schutzgruppen von **23** wurden durch $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ abgespalten. Die Reduktion zum pivaloylgeschützten Ligandosid **24** erfolgte stereoselektiv mittels $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ^[211]. Die anschließende Umsetzung zum Phosphoramiditbaustein **25** wurde unter basischen Bedingungen mit DMT-Cl und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit umgesetzt. Die Pivaloylschutzgruppe war für die DNA Festphasensynthese nötig. Die Schutzgruppe wurde nach der DNA-Festphasensynthese unter den standardmäßigen Abspaltbedingungen mit den basenlabilen Schutzgruppen der Nukleobasen entfernt.

Folgende Stränge wurden synthetisiert:

HQ-DNA1	3'-ATG-TTG-THQA-TTA-CAC-5'
HQ-DNA2	3'-GTG-TAA-THQA-CAA-CAT-5'
HQ-DNA3	3'-ATG-TTG-THQHQ-ATT-ACA-C-5'
HQ-DNA4	3'-GTG-TAA-THQHQ-ACA-ACA-T-5'

Die Duplexe **HQ-DNA1/HQ-DNA2** und **HQ-DNA3/HQ-DNA4** zeigten die erwartete Stabilisierung bei Zugabe von CuCl_2 . Als Beispiel ist die Schmelzkurve des Duplexes **HQ-DNA1/HQ-DNA2** in Abb. 58 dargestellt. Der Duplex wurde in Anwesenheit von 0 eq. bzw. 1,1 eq. CuCl_2 hybridisiert und vermessen. Die Ergebnisse der Schmelzkurven sind in Tab. 6 zusammengefasst. Der T_m -Wert für den **HQ-DNA3/HQ-DNA4** mit 2,2 eq. CuCl_2 konnte nur ungefähr angegeben werden, da eine genaue Bestimmung aufgrund der starken Stabilisierung nicht möglich war.

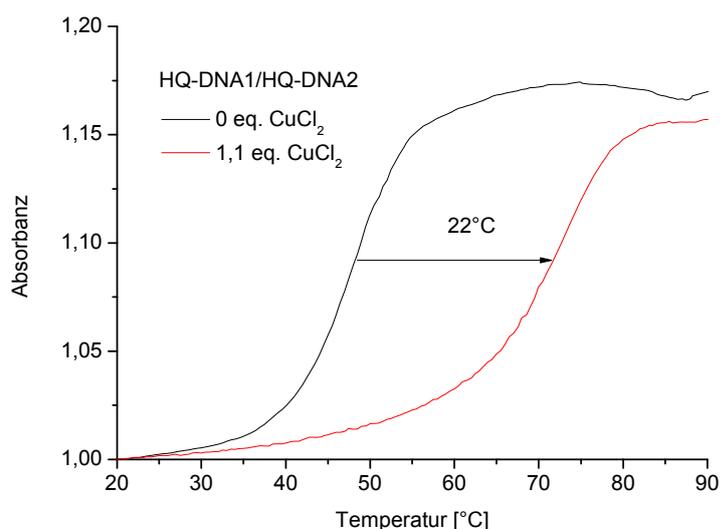


Abb. 58 Schmelzkurve für den Duplex **HQ-DNA1/HQ-DNA2** mit 0 eq. bzw. 1,1 eq. CuCl_2 .

Tab. 6 Schmelzpunkte der verwendeten Oligonukleotide.

Duplex	T_m [°C]
HQ-DNA1/HQ-DNA2 mit 0 eq. CuCl_2	49,0
HQ-DNA1/HQ-DNA2 mit 1,1 eq. CuCl_2	71,0
HQ-DNA3/HQ-DNA4 mit 0 eq. CuCl_2	45,7
HQ-DNA3/HQ-DNA4 mit 2,2 eq. CuCl_2	~ 79,0

Die Komplexierung des Cu(II) lässt sich auch über Absorptionsspektroskopie nachweisen. Für den zweifach modifizierten **HQ-DNA3/HQ-DNA4** Duplex ist das Absorptionsspektrum in Abb. 59 dargestellt.

Bei Duplex **HQ-DNA3/HQ-DNA4** mit 0 eq. Kupferchlorid ist das Maximum der Absorption bei etwa $\lambda = 250$ nm zu erkennen und damit deutlich verzerrt und verschoben zum Maximum der DNA-Bande. Dies ist auf die Absorption des freien Hydroxychinolins zurückzuführen. Duplex **HQ-DNA3/HQ-DNA4** zeigte bei Zugabe von 2,2 eq. Kupferchlorid eine bathochrome Verschiebung des Maximums und einen Anstieg der Absorption bei $\lambda = 260$ nm, was ein Hinweis für die Bildung des Cu(II)HQ_2 -Komplexes darstellt. Bei weitem deutlicher wird der Einfluss der Komplexbildung im Bereich zwischen $\lambda = 350 - 450$ nm. Hier konnte ein Anstieg der Absorption für den mit Kupferchlorid versetzten Duplex festgestellt werden. Die

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Absorptionsbande entspricht der des Cu(II)HQ_2 -Komplexes^[212]. Zur weiteren Charakterisierung wurden beide Duplexe über ESR-Spektroskopie vermessen.

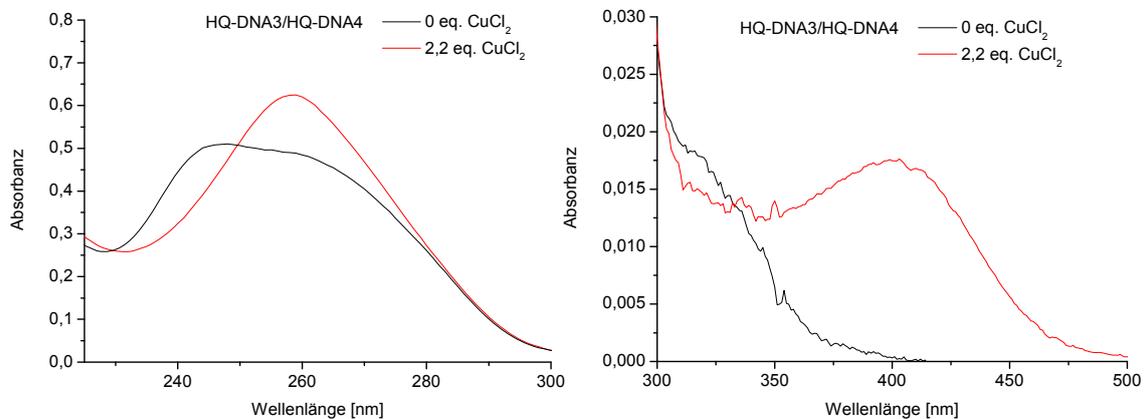


Abb. 59 Absorptionsspektrum des zweifach modifizierten HQ-Duplexes **HQ-DNA3/HQ-DNA4** ohne und mit 2,2 eq. CuCl_2 .

5.1.2 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) Messungen

Die ESR-Spektroskopie, oder auch als Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (*electron paramagnetic resonance*, EPR) Spektroskopie bezeichnet, ist entsprechend der Kernresonanz eine spektroskopische Methode, um die Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und magnetischen Momenten zu untersuchen. Statt den magnetischen Momenten der Kerne, wie in der NMR-Spektroskopie, werden in der ESR-Spektroskopie die magnetischen Momente der Elektronen untersucht.

Im Folgenden wird ein kurzer und vereinfachter Einblick in die ESR-Spektroskopie gegeben. Für weitere theoretische Grundlagen zu komplexeren Systemen und die verschiedenen Arten der Wechselwirkungen der Spins miteinander und mit den Kernen sei auf die Literatur verwiesen.^[213-215]

Die ESR Spektroskopie beruht auf dem Elektron-Zeeman-Effekt. Dieser besagt, dass durch Anlegen eines externen magnetischen Feldes B_0 an eine paramagnetische Probe, die Energie der unterschiedlichen Spinzustände linear von B_0 und der magnetischen Quantenzahl m_s abhängt. Für den einfachen Fall eines ungepaarten Elektrons ($S = \frac{1}{2}$, $m_s = \pm \frac{1}{2}$) ist dies in Abb. 60 dargestellt. Das magnetische Feld spaltet das zuvor entartete Energieniveau in zwei

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Energieniveaus mit unterschiedlichen Energiewerten auf. Die Energieseparation ΔE nimmt dabei linear mit der Stärke des magnetischen Feldes B_0 zu.

$$\Delta E = h \cdot \nu = E_\alpha - E_\beta = g\mu_b B_0 \quad (\text{Gleichung 5-1})$$

mit ν : Mikrowellenfrequenz

g : g-Wert des Elektrons

μ_b : Bohr'sches Magneton

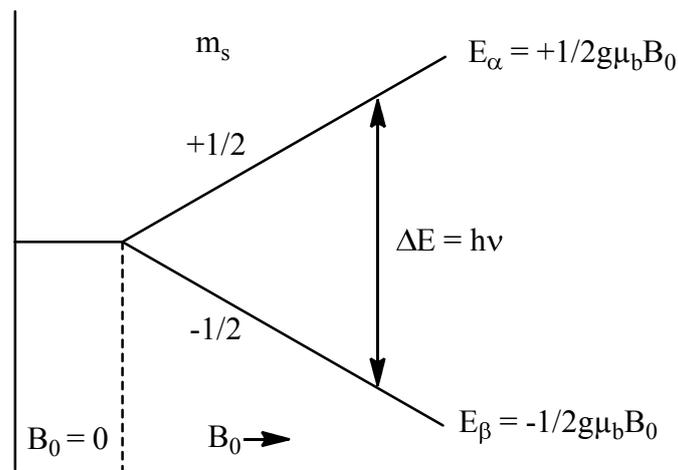


Abb. 60 Schematische Darstellung des elektronischen Zeeman Effekts.

Der g-Wert hängt von der Bindungssituation des Elektrons ab. Da die Orbitale und das Kerngerüst durch die benachbarten Moleküle eine Vorzugsrichtung aufweisen, ist der g-Wert ein Charakteristikum für die lokale Umgebung um das Elektron. Dessen Wert spiegelt dadurch die Symmetrie und Anisotropie in unmittelbarer Nähe wieder. Die in Abb. 60 beschriebene Situation gilt nur für ein System mit einem ungepaarten Elektron und ausschließlich unmagnetischen Kernen in der direkten Umgebung.

Für eine Messung können die Mikrowellenfrequenz ν oder das Magnetfeld B_0 bzw. beide verändert werden. Aus technischen Gründen hat sich die Methode, bei konstanter Mikrowellenfrequenz ν das Magnetfeld B_0 zu variieren, durchgesetzt (*continuous-wave* EPR, CW-EPR).^[214] Die Frequenzen liegen hierbei im GHz Bereich. Der Vorteil an der EPR-Spektroskopie zur NMR-Spektroskopie ist deren höhere Empfindlichkeit^[213]. Jedoch benötigt die EPR-Spektroskopie ungepaarte Elektronen für die Messung, welche in den meisten chemischen Verbindungen nur selten vorhanden sind.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

ESR-Messungen am Duplex **HQ-DNA1/HQ-DNA2** mit 1 eq. CuCl₂

Die ESR-Messungen des Duplexes **HQ-DNA1/HQ-DNA2** mit 1 eq. CuCl₂ wurde in der Arbeitsgruppe *Breher* am Institut für Anorganische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt.

Das gemessene und simulierte Spektrum für den Duplex **HQ-DNA1/HQ-DNA2** ist in Abb. 61 dargestellt.

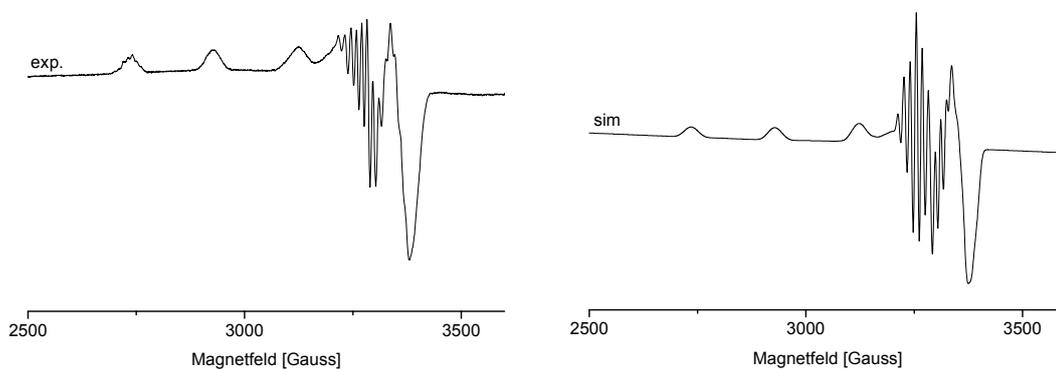


Abb. 61 Links: gemessenes ESR-Spektrum, rechts: simuliertes ESR-Spektrum des **HQ-DNA1/HQ-DNA2** Duplexes.

Das gemessene Spektrum aus Abb. 61 zeigt charakteristische Signale eines quadratisch planaren Cu(II)-Systems mit Spin $S = \frac{1}{2}$. Aufgrund des simulierten Spektrums lassen sich die Spin-Hamiltonian-Parameter abschätzen. Diese sind in Tab. 7 angegeben. Die ESR-Parameter sind in Übereinstimmung mit literaturbekannten Werten^[216] des reinen anorganischen Ligand-Metall-Komplexes, wodurch die postulierte Struktur in Abb. 62 unterstützt wird.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

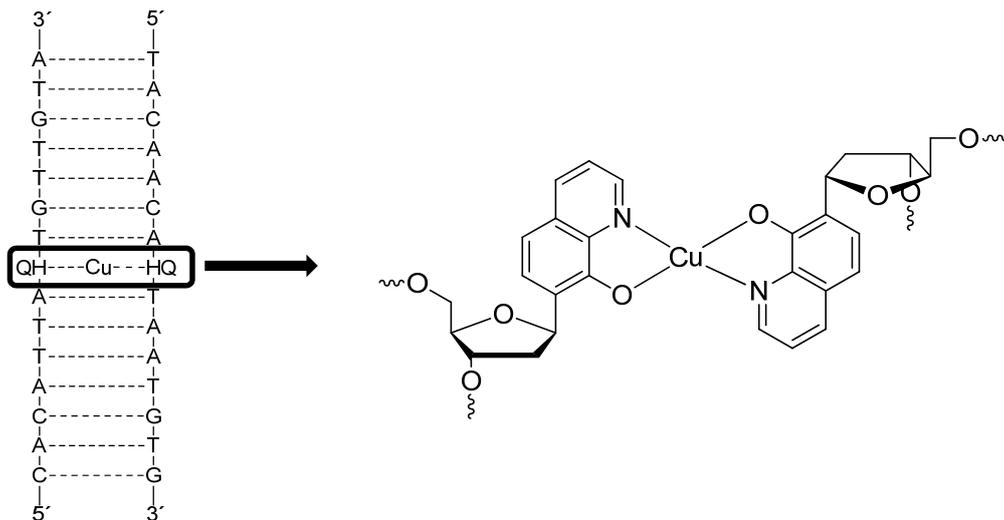


Abb. 62 Duplex HQ-DNA1/HQ-DNA2 mit der Struktur des Cu(II)HQ₂-Komplexes.

Tab. 7 ESR-Parameter für den Cu(II)HQ₂-Komplex aus der Literatur und für den Duplex HQ-DNA1/HQ-DNA2.

	Cu(II)HQ ₂ (Literaturwerte)	HQ-DNA1/HQ-DNA2
g_{\perp}	2,052	2,052
g_{\parallel}	2,202	2,225
$A_{\parallel}(\text{Cu})$	179	193
$A_{\perp} (^{14}\text{N})$	10,5	12,3
$A_{\parallel} (^{14}\text{N})$	13,5	9,8

Die ESR-Messungen an **HQ-DNA3/HQ-DNA4** zur Bestimmung der Art der magnetischen Kopplung (ferromagnetisch oder antiferromagnetisch) und des Abstandes zwischen den beiden Cu(II)-Ionen konnte beim Kooperationspartner im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die Messungen sind jedoch dort in Planung.

5.2 Hybridisierungsexperiment mit HQ-Oligonukleotiden in Lösung

Um einen Hinweis auf den Einfluss der Duplexstabilität auf die Hybridisierung am SWCNT zu erhalten, wurden HQ-modifizierte Oligonukleotide, welche einen stark stabilisierten Duplex ausbilden, verwendet. Hierfür wurde das System HQ-DNA-SWCNT über Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte die Synthese eines mit „click“-Nilrot und HQ-Ligandosid modifizierten Oligonukleotids und der dazu komplementäre Gegenstrang. Die Sequenzen sind wie folgt:

HQ-DNA5 3'-TGT-GHQG-TGT-GkNRG-5'

HQ-DNA6 3'-CAC-ACA-CHQC-ACA-5'

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Einzel- und Doppelstranges (mit 1,1 eq. CuCl₂) für **HQ-DNA5** sind in Abb. 63 dargestellt. Im Absorptionsspektrum für den Einzelstrang war ein abgeflachter Verlauf der Nilrot-Absorption im Bereich um $\lambda = 600$ nm erkennbar. Dies lässt sich auf die ungeordnete Sekundärstruktur im Einzelstrang zurückführen. Hierbei kommen vermutlich die beiden hydrophoben Moleküle (Nilrot und Hydroxychinolin) in räumliche Nähe, wodurch es zu einer Grundzustandswechselwirkung kommt. Die Bildung des Doppelstranges führte zur Separation der beiden Moleküle, wodurch die charakteristische Nilrot-Absorptionsbande auftrat. Diese Grundzustandswechselwirkungen sind auch in der Fluoreszenz erkennbar. Im Falle des Einzelstranges ist die Fluoreszenzintensität erheblich gelöscht. Durch Bildung des Duplexes kommt es zu einem Anstieg um einen Faktor von etwa 4,8.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

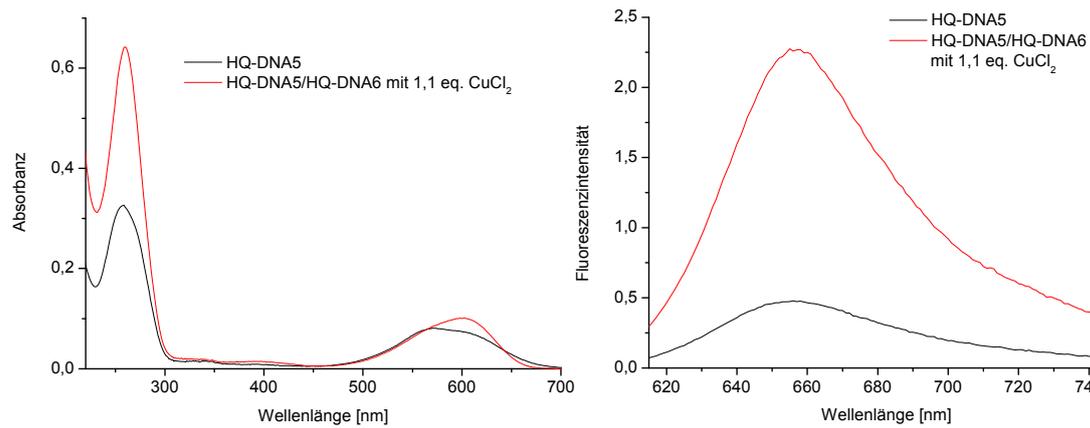


Abb. 63 Links: Absorptionsspektrum, rechts: Fluoreszenzspektrum von **HQ-DNA5** und **HQ-DNA5/HQ-DNA6** mit 1,1 eq. CuCl_2 , $\lambda_{\text{ex.}} = 600 \text{ nm}$.

Durch Zugabe von CuCl_2 zeigte sich die erwartete Stabilisierung um $22 \text{ }^\circ\text{C}$. In Abb. 64 ist die Schmelzkurve des Duplexes mit 1,1 eq. CuCl_2 dargestellt. Die Werte sind in Tab. 8 aufgeführt.

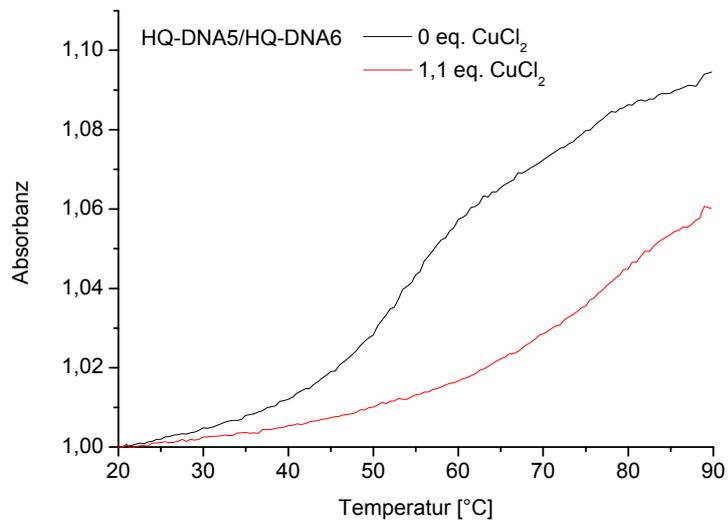


Abb. 64 Schmelzkurve für den Duplex **HQ-DNA5/HQ-DNA6** mit 0 eq. bzw. 1,1 eq. CuCl_2 .

Tab. 8 Schmelzpunkte des Duplexes **HQ-DNA5/HQ-DNA6** mit 0 eq. bzw. 1,1 eq. CuCl_2 .

Duplex	T_m [$^\circ\text{C}$]
HQ-DNA5/HQ-DNA6 mit 0 eq. CuCl_2	55,5
HQ-DNA5/HQ-DNA6 mit 1,1 eq. CuCl_2	78,5

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Der Einfluss der Duplexstabilität auf die Hybridisierung der DNA am SWCNT wurde mit **HQ-DNA5-SWCNT**-Hybriden über Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Probenvorbereitung unterschied sich zu den vorherigen Beispielen insofern, dass die überschüssige DNA nicht entfernt wurde. Zur Probe wurden als Gegenstränge entweder **HQ-DNA6** oder **DNA5** (3'-CAC-ACA-CAC-ACA-5') mit jeweils 1 eq. CuCl_2 (bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an **HQ-DNA5**, dies bedeutet, dass CuCl_2 im Überschuss vorlag, da ein Teil der DNA beim Zentrifugierschritt entfernt wurde) gegeben. Dadurch besteht nur für den Fall **HQ-DNA5/HQ-DNA6** die Möglichkeit einen stabilisierenden Metall-Komplex auszubilden. Im Fall **HQ-DNA5/DNA5** besteht eine Fehlpaarung, wodurch der Schmelzpunkt bei 41,5 °C liegt. Dies bedeutet, dass durch das metallionenvermittelte Basenpaar eine deutliche Duplexstabilisierung von 37 °C besteht. *Strano et al.*^[39] stellten fest, dass die Hybridisierung am SWCNT etwa 13 h dauert, daher wurden die Fluoreszenzintensität über zwei Tage beobachtet. Der Verlauf des Maximums bei $\lambda = 376 \text{ nm}$ ist in Abb. 65 dargestellt.

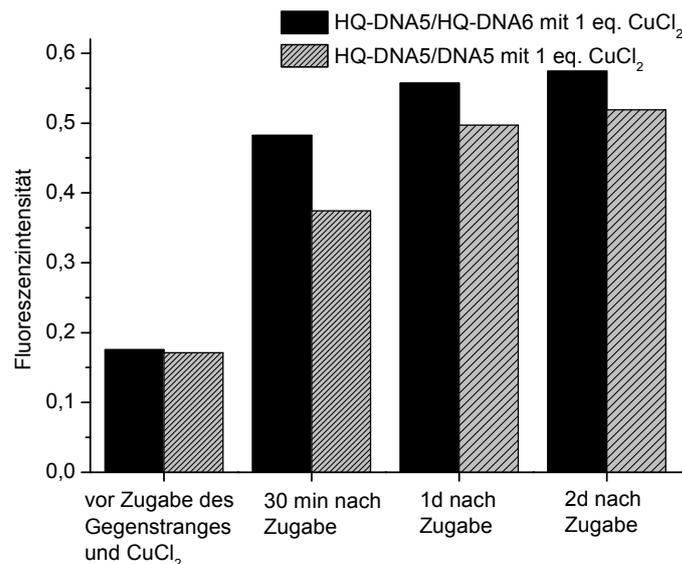


Abb. 65 Anstieg der Fluoreszenz bei $\lambda = 376 \text{ nm}$ von **HQ-DNA5** nach Zugabe des hydroxychinolinmodifizierten Gegenstranges **HQ-DNA6** oder des unmodifizierten Gegenstranges **DNA5** jeweils mit 1 eq. CuCl_2 .

Aus Abb. 65 ist erkennbar, dass die Fluoreszenz mit der Zeit unterschiedlich anstieg. Dabei zeigten die Duplexe **HQ-DNA5/HQ-DNA6** und **HQ-DNA5/DNA5** mit jeweils 1,1 eq. CuCl_2 in Abwesenheit von SWCNTs nahezu identische Fluoreszenzintensitäten (Abb. 66).

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

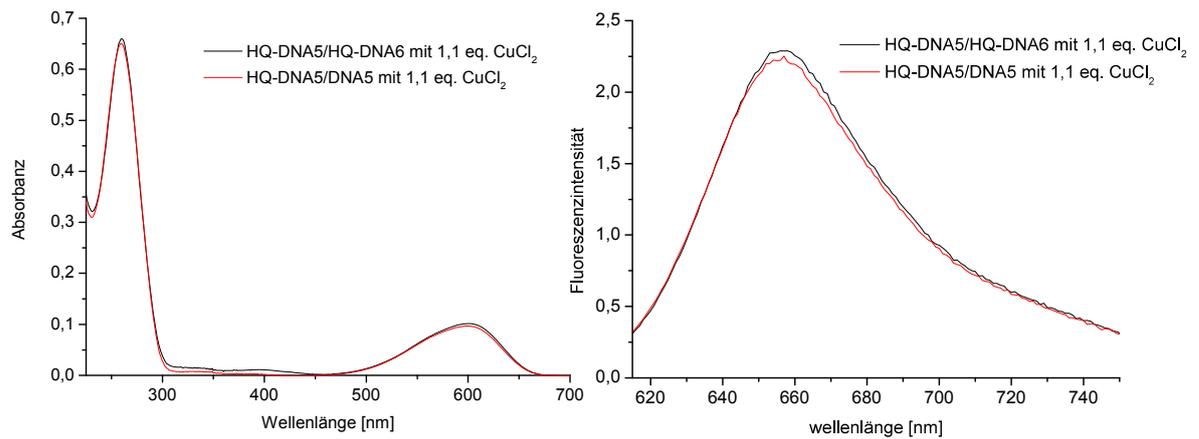


Abb. 66 Absorption und Fluoreszenzspektren der Duplexe **HQ-DNA5/HQ-DNA6** und **HQ-DNA5/DNA5** mit jeweils 1,1 eq. CuCl_2 .

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität (Abb. 65) kann durch drei unterschiedlich Prozesse erklärt werden: (i) Hybridisierung der freien DNA, (ii) Hybridisierung am SWCNT, die zum Ablösen des Duplexes führt, (iii) Hybridisierung am SWCNT, wobei der Duplex gebunden bleibt. Für den Fall (i) und (ii) ist der Fluoreszenzanstieg selbsterklärend, für den Fall (iii) kommt es in Analogie zur Neuordnung der DNA am SWCNT (Kapitel 4.2.3) zur Verdrängung des Nilrot-Chromophors, da weniger freier Platz am SWCNT zur Verfügung steht. Der Fall (ii) und (iii) ist schematisch in Abb. 67 dargestellt

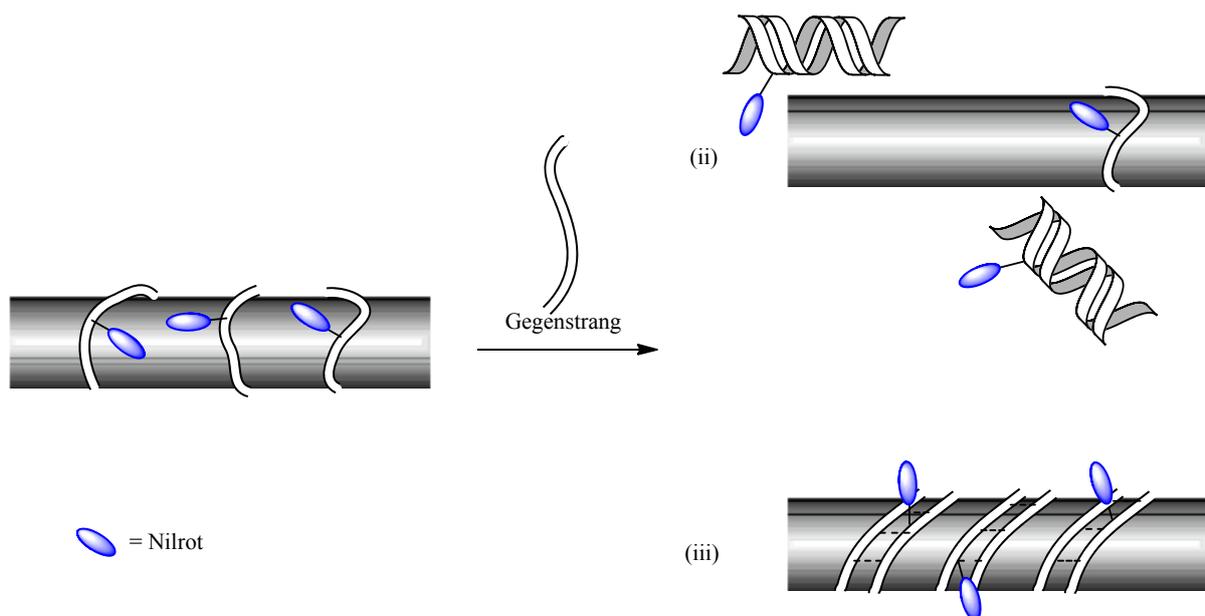


Abb. 67 Schematische Darstellung der Hybridisierung am SWCNT mit Dissoziation (ii) bzw. Bindung des Duplexes (iii).

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

In den ersten Minuten war ein starker Fluoreszenzanstieg erkennbar (Abb. 65), wobei die Intensitätsänderung für **HQ-DNA5/HQ-DNA6** größer war als für **HQ-DNA5/DNA5**. Da beide **HQ-DNA5-SWCNT**-Hybride aus der gleichen Stammlösung verwendet wurden, ist die Menge an freier DNA für beide identisch, wodurch der Fluoreszenzanstieg durch Hybridisierung der freien DNA (Fall (i)) für beide Proben gleich war. Daraus folgte, dass der größere Fluoreszenzanstieg im Falle des **HQ-DNA5/HQ-DNA6** auf den stabileren Duplex durch den Cu(II)HQ_2 -Komplex zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf nahm der Intensitätsunterschied zwischen beiden Proben ab, jedoch spielt mit zunehmender Zeit die Neuordnung am SWCNT eine immer größere Rolle. Aufgrund des komplexen Systems DNA-SWCNT in wässriger Lösung, lässt sich daher keine genauere Aussage treffen, ob durch den stabileren Duplex lediglich eine schnellere Hybridisierung vorliegt oder mehr DNA am SWCNT hybridisiert, bzw. ob nach Hybridisierung der gebildete Duplex dissoziiert (Fall (ii)) oder am SWCNT gebunden bleibt (Fall(iii)). Dennoch konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass das metallionenvermittelte Basenpaar eine verstärkte Hybridisierung am SWCNT durch Bildung eines stabileren Duplexes auslöst.

5.3 Messungen mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Um das Hybridisierungsverhalten am SWCNT, genauer gesagt das Verhalten des Duplexes nach Hybridisierung, zu untersuchen, wurde die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie gewählt. Der Vorteil besteht in der hohen Sensitivität und der Möglichkeit Bindungsereignisse unter Echtzeit, ohne Markierung des Analyten (z.B. mittels eines Chromophors), zu beobachten. Um einen ersten Eindruck über das Hybridisierungsverhalten am SWCNT zu bekommen, wurde dieser durch Graphen ersetzt, welches nach dem Prinzip des chemischen Ablätterns hergestellt wurde. Das Graphen hat jedoch Nachteile gegenüber SWCNTs durch Defektstellen, Hydroxyl-, Epoxy- und Carboxylgruppen, sowie schwächerer inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Basen aufgrund einer fehlenden Krümmung. Dennoch besitzt es wie ein SWCNT ein ausgedehntes π -System und ist bereits ohne DNA in Wasser löslich und leicht modifizierbar. Dadurch ist eine einfachere Handhabung möglich.

Graphen und DNA

Die Kombination aus DNA und Graphen ist relativ neu und wurde durch die Ergebnisse der DNA-CNT-Hybride motiviert. Bisher fanden die DNA-Graphen-Systeme ihre Anwendung im Bereich der Chemo- und Biosensorik (aktueller Übersichtsartikel hierzu Lit.^[217]). Hierbei wird die DNA auf das Graphen kovalent oder durch π - π -Wechselwirkungen gebunden, wobei die nichtkovalente Bindung eines DNA-Einzelstranges an Graphen nur wenige Minuten^[218] dauert. In Hybridisierungsexperimenten an Graphen wurde DNA meist kovalent angebracht.^[41, 217, 219] Nach Hybridisierung richtet sich der Duplex vom Graphen auf. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Duplex nicht bindet oder aufgrund der dichten Beladung mit DNA auf der Oberfläche der Doppelstrang aus sterischen Gründen nach oben stehen muss. Experimente von *Loh et al.*^[41] und *Zhang et al.*^[42] mit DNA, die nur durch π - π Wechselwirkungen am Graphen gebunden ist, belegten, dass der Duplex auf dem Graphen verbleibt. Jedoch finden sich in der Literatur Beispiele für ein Ablösen des Duplexes vom Graphen.^[45, 46] Dies zeigt den Beginn einer ähnlichen Diskussion entsprechend der DNA-SWCNT-Hybride. Daher können durch die SPR-Messungen nicht nur Hinweise für das System

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

der DNA-SWCNT-Hybride, sondern auch Erkenntnisse für die Hybridisierung am Graphen gesammelt werden.

Aufbau des SPR Gerätes

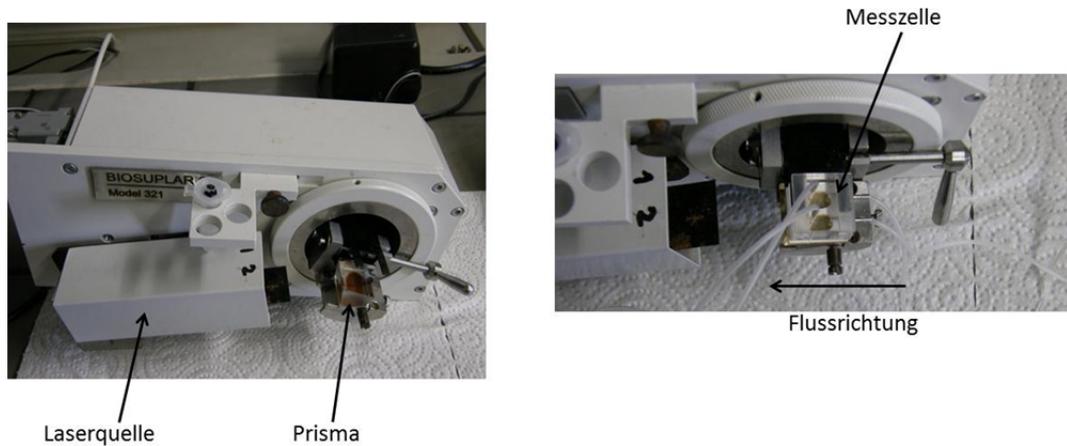


Abb. 68 Aufbau des verwendeten SPR-Gerätes.

Es wurde ein *Biosuplar 6* SPR-Gerät der Firma *Mivitec GmbH* verwendet. Der Aufbau ist in Abb. 68 dargestellt:

Der Aufbau entspricht einem Kretschmann-Aufbau mit einem Prisma als Einkoppelvorrichtung. Als Lichtquelle wird ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 630 - 670$ nm benutzt. An die Messzelle ist eine Pumpe angeschlossen, so dass eine konstante Fließgeschwindigkeit eingestellt werden kann. Zur Messung stehen zwei Kammern zur Verfügung, die durch eine Dichtung voneinander abgetrennt sind (Abb. 69).

Da auf beiden Kammern gleichzeitig gemessen wird, dient eine Kammer als Referenz, wodurch sich unter anderem Temperaturschwankungen ausgleichen lassen. Um die erhaltenen Intensitäten auf RIU umzurechnen, wurde vor jeder Messung eine Kalibrierung mit einer 100 mM und 200 mM NaCl-Lösung durchgeführt.



Abb. 69 Die beiden Messkammern auf dem Goldchip.

5.3.1 Auftrocknen des Graphens

Die Synthese des Graphens erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Hummers^[53, 220] am Arbeitskreis *Wolfbeis*, Institut für analytische Chemie, chemo- und Biosensorik an der Universität Regensburg unter Leitung von *Dr. Thomas Hirsch*. Dazu wurde Graphit mit Salpetersäure, konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumpermanganat erst mit Ultraschall behandelt und anschließend drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden verdünnte Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Reduktion des Graphitoxids zum chemisch abgeblättern Graphen erfolgte durch Hydrazin-Hydrat. Dieses Verfahren liefert stabile Lösungen in Wasser.

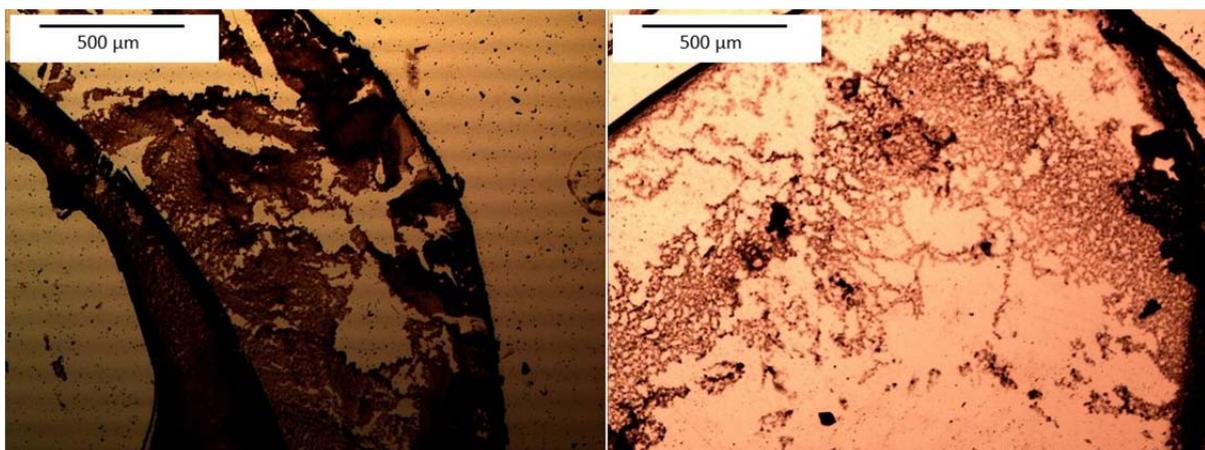


Abb. 70 Mikroskopie Bilder von aufgetrockneten Graphen auf einem SPR-Goldchip.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Das Graphen wurde über Nacht auf einen SPR-Goldchip aufgetrocknet. Die Methode bietet zwei Vorteile: (i) die Probenvorbereitung ist schnell und unkompliziert, (ii) durch die Auftrocknung entstehen dreidimensionale Strukturen, wodurch die Oberfläche und damit die Anzahl an Bindungsstellen erhöht wird. Jedoch entstehen hierdurch auch zwei große Nachteile: (i) befindet sich zu viel Graphen auf der Oberfläche, so wird ein großer Teil des Lichts absorbiert. Dadurch nimmt die Sensitivität der Messung ab bzw., falls die Absorption zu groß ist, kann der Minimumswinkel nicht mehr festgelegt werden, wodurch eine Messung nicht mehr möglich ist. (ii) Die Struktur des Graphens auf dem SPR-Goldchip ist nicht reproduzierbar. Dies lässt sich an den beiden Beispielen in Abb. 70 erkennen. Nach dem Eintrocknen bildete sich keine Monolage des Graphens aus, sondern eine Donut-förmige Struktur, deren Ränder unterschiedliche Dicke aufweisen. Dadurch lassen sich Messungen nur bedingt miteinander vergleichen.

Aufgrund der Erkenntnisse aus Kapitel 5.2 wurde zuerst die Hybridisierung mit den HQ-Oligonukleotiden durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Sättigung des SPR-Goldchips mit 4-Aminothiophenol, um eine unspezifische Bindung der DNA auf der Goldschicht zu verhindern. In die Messkammer wurden anschließend 20 μL einer 0,5 mg/mL konzentrierten Graphenlösung aufgetropft und über Nacht eingetrocknet. Die zweite Messkammer diente als Referenzkanal ohne Graphen. Die SPR-Messung ist in Abb. 71 dargestellt. Nach Kalibrierung mit NaCl wurde **HQ-DNA1** ($c = 5,5 \mu\text{M}$) über die Messkammer geleitet und nach drei Minuten (Totvolumen der Schläuche) die Pumpe für 80 min gestoppt. Deutlich zeigte sich hier ein starker Anstieg, der auf eine Bindung des Oligonukleotides zurückzuführen ist. Anschließend wurde 35 min mit Wasser gespült. Der weitere Anstieg ist vermutlich auf die Bindung der DNA zurückzuführen, die im Schlauch verblieb bzw. an der Messzelle adsorbiert war. Danach erfolgte die Zugabe einer Lösung aus **HQ-DNA2** ($c = 2,9 \mu\text{M}$ 0,53 eq.) in 100 mM NaCl und 1 eq. CuCl_2 . Diese wurde entsprechend **HQ-DNA1** über die Messkammer geleitet und nach Durchlaufen des Totvolumens die Pumpe für 210 min gestoppt. Hier zeigte sich deutlich eine Abnahme des Signals. Dies lässt den Schluss zu, dass nach Hybridisierung der Duplex vom Graphen dissoziierte.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

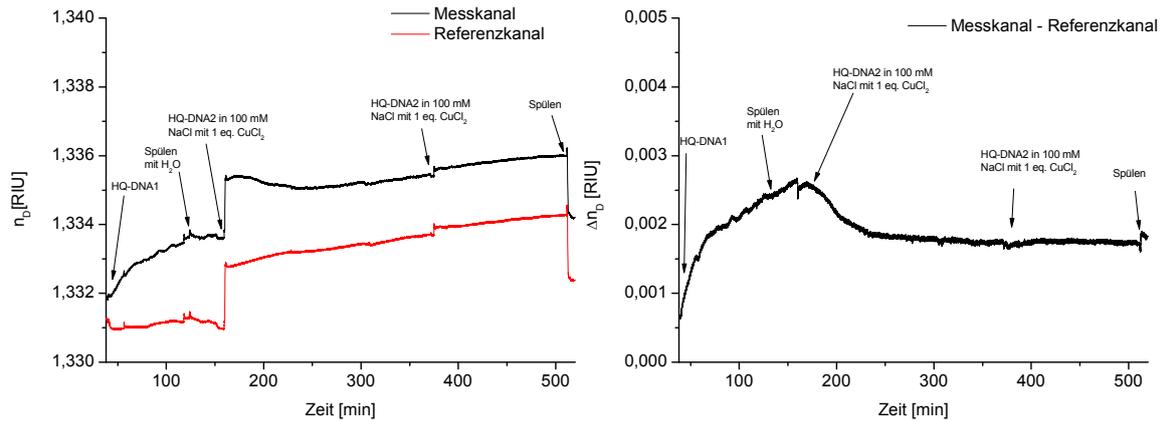


Abb. 71 SPR Messung zur Hybridisierung von **HQ-DNA1** mit **HQ-DNA2** und 1 eq. CuCl_2 .

Die Änderungen des Brechungsindex sind als Balkendiagramm in Abb. 72 zusammengefasst. Dabei zeigte sich eine Signaländerung um etwa 40%. Daraus folgt, dass ein kleiner Anteil an **HQ-DNA2** nicht hybridisierte sondern an frei gewordenen Stellen am Graphen gebunden hat (die Massen der beiden HQ-Oligonukleotide unterscheiden sich lediglich um 18 Da, wodurch bei Bindung an das Graphen für beide eine gleiche Änderung im SPR-Signal erwartet wird). Um zu überprüfen, ob weitere DNA abgelöst werden kann, wurde erneut eine Lösung aus **HQ-DNA2** (2,9 μM) in 100 mM NaCl und 1 eq. CuCl_2 über die Messkammer geleitet und die Pumpe nach drei Minuten ausgeschaltet. Wie aus Abb. 71 erkennbar, zeigte sich hierbei kaum eine Änderung des Signales. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist, dass das **HQ-DNA2** Oligonukleotid teilweise an die nun vorhandenen freien Stellen am Graphen bindet und teilweise mit noch gebundener **HQ-DNA1** hybridisiert und dabei vom Graphen dissoziiert.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

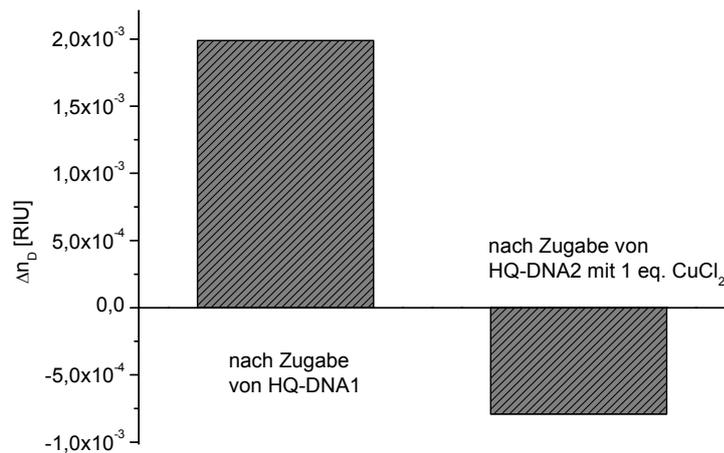


Abb. 72 Balkendiagramm der Änderung des Brechungsindex nach Zugabe von **HQ-DNA1** und anschließender Hybridisierung mit **HQ-DNA2** in Anwesenheit von 1 eq. CuCl₂.

Um diese Messung zu bestätigen sowie Erkenntnisse der Bindung unmodifizierter Oligonukleotide auf dem Graphen zu erhalten, wurden weitere SPR-Messungen durchgeführt. Jedoch konnte eine Sensitivität wie in dem gerade beschriebenen Fall nicht mehr erreicht werden. Der Grund hierfür liegt in der schlechten Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode. Daher wurde nach geeigneten Verfahren gesucht, um die Qualität des Graphens zu verbessern sowie den SPR-Goldchip reproduzierbar mit einer Monolage an Graphen zu modifizieren.

5.3.2 Optimierung der Graphenschicht

Thermische Reduktion

In Zusammenarbeit mit *Alexander Zöpfl* unter Leitung von *Dr. Thomas Hirsch* wurde in einem ersten Schritt versucht, die Qualität des Graphens durch einen zusätzlichen Reduktionsschritt zu verbessern. Hierzu wurde ein Tropfen einer Graphen-Lösung in Wasser auf eine Mikroelektrode mit einer Meander-Struktur aufgetropft (Abb. 73). Nach dem Eintrocknen wurde der Widerstand vermessen. Anschließend erfolgte auf der Mikroelektrode ein weiterer Reduktionsschritt entweder durch Natriumborhydrid, Hydrazin oder thermisch (bei etwa 220 °C für eine Minute). Nachdem die Mikroelektrode gewaschen

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

bzw. abgekühlt war, wurde erneut der Widerstand vermessen. Dabei zeigte sich nur für die thermische Reduktion eine nennenswerte Abnahme des Widerstands um etwa den Faktor 100.

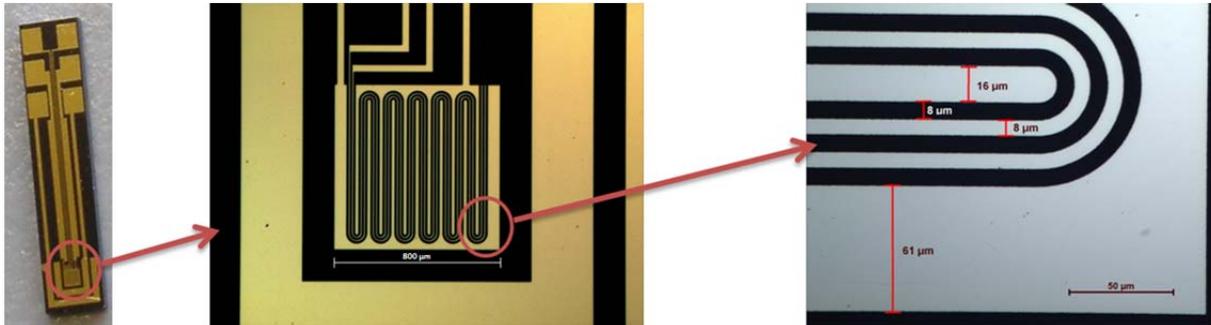


Abb. 73 Mikroelektrode mit Meander-Struktur zur Widerstandsmessung des Graphens. Fotos zur Verfügung gestellt von Alexander Zöpfel.

Diese Erkenntnis wurde auf die SPR-Goldchips übertragen. Hierzu erfolgte die Immobilisierung eines thiolmodifizierten Graphens (auf dies wird im Verlauf dieses Kapitels näher eingegangen) auf dem SPR-Goldchip. Dabei bildeten sich mehrere schwarze Strukturen aus, die auf Stapel von mehreren Graphenlagen schließen lässt. (Abb. 75 mit dem roten Viereck markierte Punkte). Anschließend wurde eine 1 gew.-%-ige SDBS-Lösung vor und nach der thermischen Reduktion in die Messkammer geleitet und die Änderungen des SPR-Signals nach dem Spülen mit Wasser beobachtet. Dabei zeigte sich eine stärkere Abnahme des Signales vor der thermischen Reduktion (Abb. 74). Diese ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das SDBS einen Teil des gestapelten Graphens vom SPR-Goldchip ablöst. Nach der thermischen Reduktion ist der Anteil an Carboxylgruppen des Graphens geringer, wodurch die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Lagen stärker sind und dadurch die Zugabe von SDBS nur einen kleineren Teil des Graphens ablösen kann.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

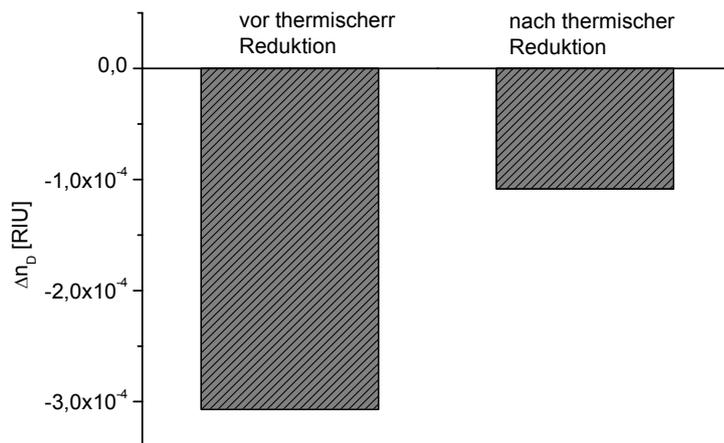


Abb. 74 Änderung des Brechungsindex in RIU nach Behandlung mit einer 1 gew.-%igen SDBS Lösung vor und nach thermischer Reduktion des SPR-Goldchips.

Jedoch zeigte sich bei einigen SPR-Goldchips nach der thermischen Reduktion eine Blasenbildung zwischen Glas- und Goldschicht (Abb. 75). Dies ist vermutlich auf Rückstände von Materialien, die während der Produktion verwendet wurden zu schließen. Aufgrund der Blasenbildung waren derartige Goldchips nicht mehr für SPR-Messungen brauchbar, wodurch diese Methode nur bedingt einsetzbar ist.

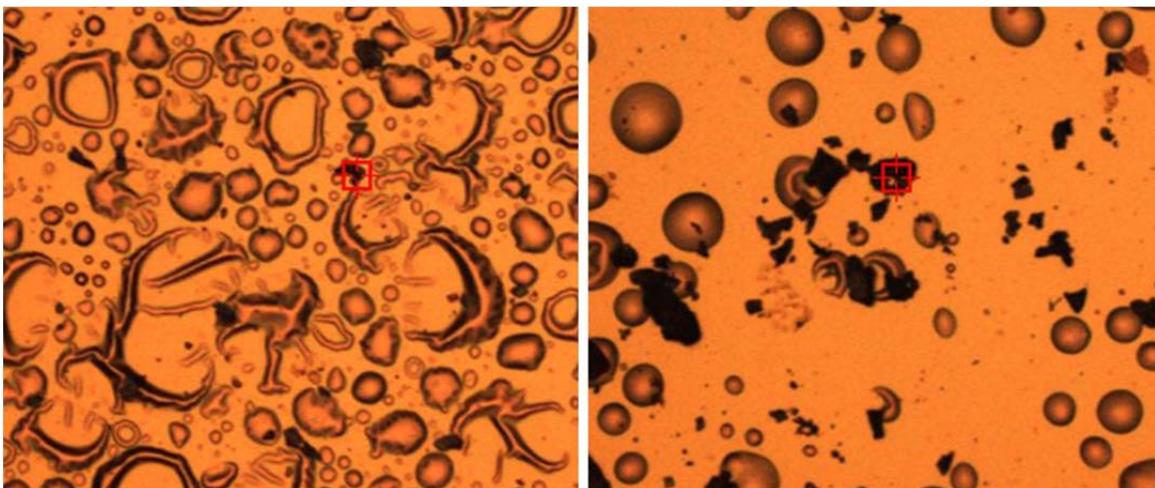


Abb. 75 Mikroskopie Bilder von SPR-Goldchips nach dem Ausheizen bei 220 °C für eine Minute. Das rote Viereck markiert gestapelte Graphenlagen.

Immobilisierung des Graphens auf dem SPR-Goldchip

Parallel zu den vorher erwähnten Experimenten wurde versucht ein Verfahren zu finden, um das Graphen, idealerweise als Monoschicht, auf dem SPR-Goldchip zu immobilisieren. Hierzu wurden drei verschiedene Strategien ausgehend von Graphenoxid behandelt. Graphenoxid wurde als Ausgangsmaterial gewählt, da es diverse funktionelle Gruppen aufweist, an denen Modifikationen vorgenommen werden können. Die drei verschiedenen Verfahren sind in Abb. 76 dargestellt. Diese wurden von *Alexander Zöpfl* und *Sven Kochmann* unter Leitung von *Dr. Thomas Hirsch* durchgeführt.

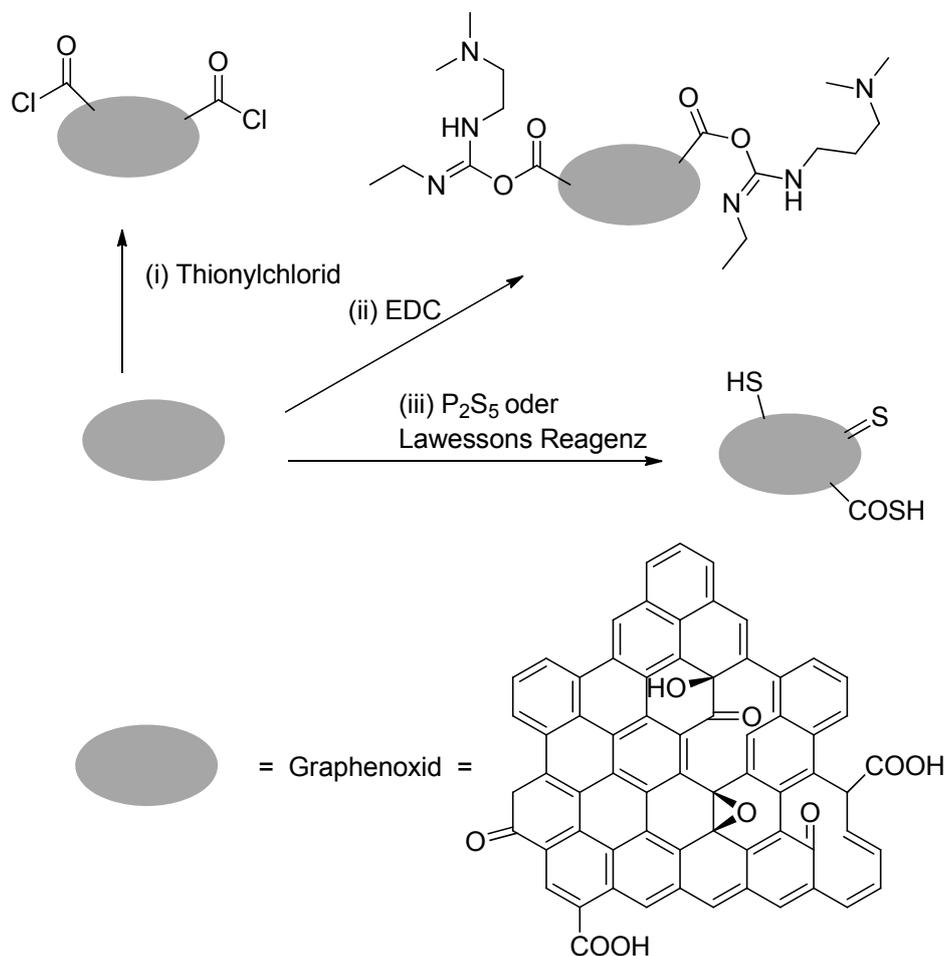


Abb. 76 Schematische Darstellung der Modifikationen des Graphenoxids mit (i) Thionylchlorid, (ii) EDC, (iii) P_2S_5 oder Lawessons Reagenz. Die Defektstellen durch Oxidation am Graphenoxid sind nur repräsentativ dargestellt. Die exakte Struktur ist nicht bestimmbar.

Im Fall (i) und (ii) wurden die Carboxylgruppen des Graphenoxides über Thionylchlorid oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert, um über eine Peptidkuppelung an einen aminmodifizierten SPR-Goldchip gebunden zu werden. Anschließend erfolgte eine

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Reduktion mittels Hydrazinhydrat oder thermisch. Im Fall (iii) wurde eine Sauerstoff-Schwefel Metathese mit P_2S_5 oder Lawessons Reagenz durchgeführt. Das modifizierte Graphenoxid wurde entweder umgehend auf den SPR-Goldchip gebunden und anschließend thermisch reduziert, oder mit Hydrazinhydrat zum thiolmodifizierten Graphen reduziert und dann auf den SPR-Goldchip gebunden. Die verschiedenen Verfahren sind in Abb. 77 schematisch zusammengefasst.

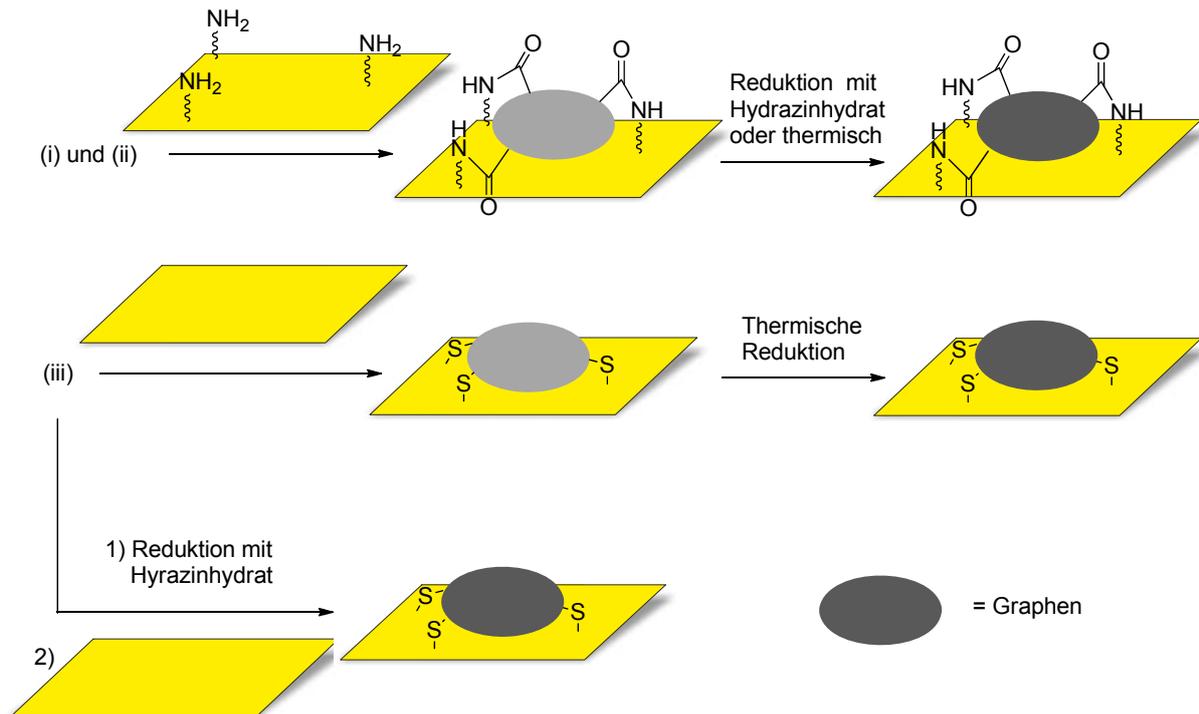


Abb. 77 Schematische Darstellung der Immobilisierung und Reduktion des modifizierten Graphenoxides auf einem SPR-Goldchip.

Um zu untersuchen, ob eine Bindung von DNA auf den so präparierten SPR-Goldchips möglich ist, wurden zwei zueinander komplementäre, unmodifizierte Oligonukleotide **DNA7** (3'-ATG-TTG-TTA-TTA-CAC-5') und **DNA8** (3'-GTG-TAA-TAA-CAA-CAT-5') verwendet.

An den mittels Peptidkupplung modifizierten SPR-Goldchips konnte keine Bindung der DNA detektiert werden. Ein Grund dafür ist, dass bei der Reduktion mit Hydrazinhydrat teilweise auch die Goldschicht abgelöst wurde, wodurch eine Messung nicht mehr fehlerfrei durchgeführt werden kann.

Dahingegen konnte mit einem thiolmodifizierten Graphitoxid beschichteten SPR-Goldchip (mittels P_2S_5), welcher anschließend thermisch reduziert wurde, bzw. mit einem

thiolmodifizierten Graphen beschichteten SPR-Goldchip (mittels Lawessons Reagenz) eine Bindung der DNA detektiert werden. In Abb. 78 (links) ist die SPR-Kurve für den thermisch reduzierten Fall aufgezeigt. Die DNA wurde entsprechend dem Verfahren in Kapitel 5.3.1 auf den SPR-Goldchip aufgetragen, lediglich die Inkubationszeiten wurden etwas verringert. Deutlich zeigte sich nach Zugabe von **DNA8** ($c = 18 \mu\text{M}$) ein Anstieg des Brechungsindex, was auf eine Bindung der DNA zurückzuführen ist. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass eine Sättigung vorlag, da während des Spülvorgangs keine Signaländerung mehr beobachtet wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe des Gegenstrangs **DNA7** ($c = 10 \mu\text{M}$), welcher über den SPR-Goldchip geleitet und die Pumpe kurz darauf gestoppt wurde. Nach dem Spülen mit Wasser zeigte sich ein weiterer Anstieg des Signales. Dies legte die Vermutung nahe, dass **DNA7** teilweise durch Hybridisierung an das Graphen gebunden hat und somit der Duplex am Graphen verblieb. Dass der Anstieg lediglich auf einen Austausch von **DNA8** gegen **DNA7** beruht, lässt sich durch den geringen Massenunterschied von nur 27 Da ausschließen. Dieses Ergebnis wurde durch die Messung an dem über Lawessons Reagenz thiolmodifizierten Graphen SPR-Goldchip bestätigt (Abb. 78 rechts). Um das unterschiedliche Verhalten der Duplexe **HQ-DNA1/HQ-DNA2** und **DNA7/DNA8** zu erklären, lässt sich folgende Vermutung formulieren: Im Falle des Duplexes **DNA7/DNA8** kommt es aufgrund der geringeren Duplexstabilität zu keiner vollständigen Hybridisierung am Graphen. Der Anstieg lässt sich durch eine partielle Hybridisierung, d.h. nur ein Teil des Stranges bildet einen Duplex aus, erklären. Hierfür befindet sich dieser Teil wahrscheinlich über einer der zahlreichen Defektstellen bzw. am Randbereich des Graphens. Um diese Vermutung zu bestätigen und dadurch eine klare Aussage über das Verhalten der Duplexe zu erhalten, müssten die HQ-modifizierten Oligonukleotide parallel zu unmodifizierten Oligonukleotiden mehrmals reproduzierbar vermessen, weitere Experimente mit nicht-komplementären Sequenzen zur Hybridisierung durchgeführt, sowie Bindungskonstanten der verschiedenen Oligonukleotide am Graphen ermittelt werden.

5. Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

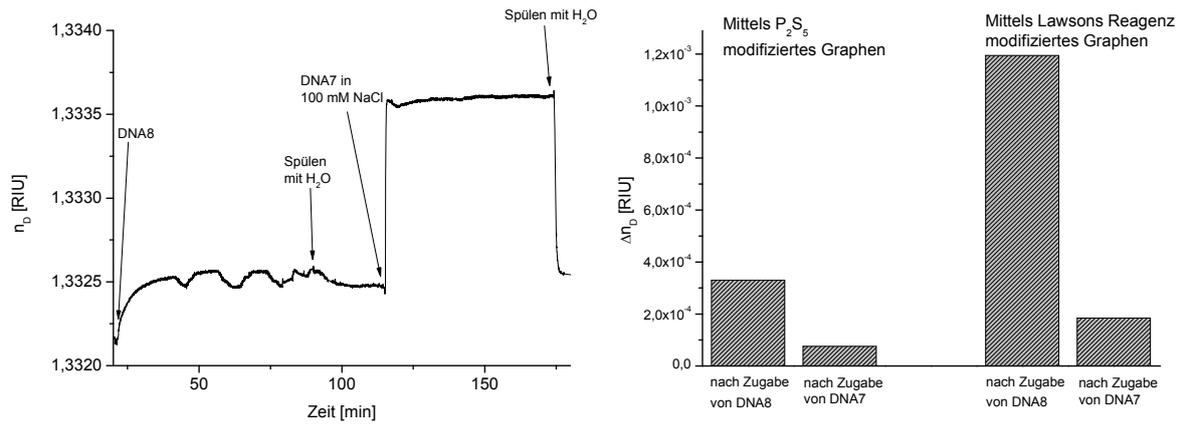


Abb. 78 Links: SPR-Kurve des thermisch reduzierten Graphen-SPR-Goldchips nach Zugabe von **DNA8** ($c = 18 \mu\text{M}$) und anschließender Zugabe an **DNA7** ($c = 10 \mu\text{M}$). Auf die Darstellung des Referenzkanals wurde verzichtet, da dieser einen konstanten Drift aufzeigte. Rechts: Änderungen des Brechungsindex für beide thiolmodifizierte Graphen-SPR-Goldchips jeweils nach Zugabe von **DNA8** und anschließender Zugabe an **DNA7**.

Bevor diese Messungen jedoch durchgeführt werden können, muss das Graphen reproduzierbar auf dem SPR-Goldchip gebunden werden. Der Ansatz über thiolmodifiziertes Graphen zeigte erste vielversprechende Ergebnisse, jedoch sind die Signale noch nicht quantitativ reproduzierbar (Abb. 78 rechts). Eine weitere Optimierung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, wird jedoch vom Arbeitskreis *Wolfbeis* weiter verfolgt.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit konnte die erwartete Struktur des Cu(II)HQ₂-Komplexes in der DNA mittels einer ESR-Messung am Duplex **HQ-DNA1/HQ-DNA2** bestätigt werden.

Anhand dieses stabilen Komplexes konnte der Einfluss der Duplexstabilität auf die Hybridisierung am SWCNT näher untersucht werden. Die Ergebnisse machten deutlich, dass der Duplex mit dem metallionenvermittelten Basenpaar im Gegensatz zu einem Duplex, der eine Fehlpaarung an Stelle des Cu(II)HQ₂-Komplexes aufwies, eine verstärkte Hybridisierung am SWCNT aufzeigte.

Um zu ermitteln ob der Duplex nach Hybridisierung dissoziiert oder gebunden bleibt wurde das System DNA-SWCNT durch das einfacher zu handhabende System DNA-Graphen ersetzt und mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie untersucht. Die vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass der mittels des Cu(II)HQ₂-Komplex stabilisierte Duplex nach Hybridisierung vom Graphen dissoziiert. Im Fall von unmodifizierter komplementärer DNA ist vermutlich die Duplexstabilität im Vergleich zur Bindungsstärke der DNA an das Graphen zu gering, wodurch nur partielle Hybridisierung an Bereichen mit Defektstellen oder am Rand des Graphens stattfindet.

Jedoch ist dies nur eine gut begründete Theorie basierend auf den bisher erzielten Ergebnissen. Um eine genaue Aussage zu erhalten, müssen die erzielten Ergebnisse und aufgestellte Hypothese durch weitere Experimente unterstützt werden. Dafür ist eine reproduzierbare Graphenschicht auf den SPR-Goldchip notwendig. Der hier gefundene Ansatz über thiolmodifiziertes Graphen lieferte vielversprechende Resultate. Jedoch ist noch weitere Forschung notwendig, bis reproduzierbare Messungen möglich sind.

6. Zusammenfassung

6.1 Chromophormodifizierte Oligonukleotide am SWCNT

Modifizierte Oligonukleotide zur Änderung der Bindungseigenschaften am SWCNT

Im ersten Teil dieses Abschnittes wurde versucht, über Oligonukleotide, welche mit den beiden Polyaromaten pyren- und perylenmodifiziert waren, die Bindungseigenschaften der DNA am SWCNT zu beeinflussen. Hierfür wurde in einer fünfstufigen Synthese der Phosphoramiditbaustein des Perylens **6** sowie der literaturbekannte^[171] Phosphoramiditbaustein des Pyrens **12** synthetisiert und über Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut. Das perylenmodifizierte Oligonukleotid zeigte dabei eine Einsatzmöglichkeit in der Bioanalytik mittels korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie. Um eine geeignete SWCNT-Charge aus HiPCO- und CCVD-SWCNTs zu wählen, wurden Raman-Messungen, UV/Vis- und TEM-Messungen an DNA-SWCNT-Hybriden mittels unmodifizierter DNA und Fluoreszenzmessungen mit pyrenmodifizierter Oligonukleotide durchgeführt, wobei sich zeigte, dass HiPCO- gegenüber CCVD-SWCNTs bessere Eigenschaften aufweisen. Aufgrund eigener Resultate und neuer Erkenntnisse aus der Literatur^[31-37] wurde die Verknüpfung zwischen Polyaromat und DNA optimiert. Hierfür wurde das Pyrenazid **15** synthetisiert und anschließend postsynthetisch über 1,3-dipolare Cycloaddition an DNA geknüpft. Anhand der pyrenazidmodifizierten Oligonukleotide konnte über Photolumineszenz zu Absorptions-Verhältnisse, im Vergleich zu unmodifizierter DNA, bewiesen werden, dass Pyren einen Einfluss auf die Bindung des Oligonukleotides zeigt, wodurch vermehrt einzelne SWCNTs in Lösung vorhanden sind.

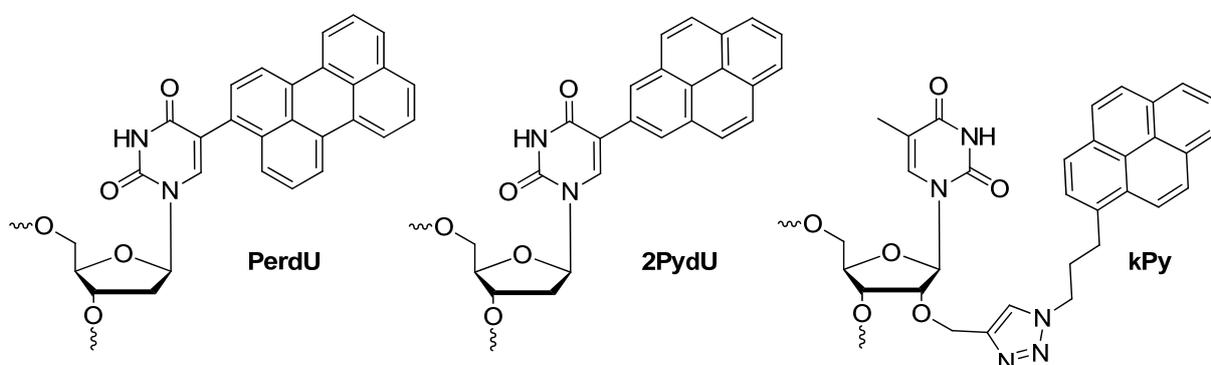


Abb. 79 Struktur des Perylen- (PerdU), des Pyren- (2PydU) und des Pyrenazidbausteins (kPy) in der DNA

Untersuchungen zum Verhalten der Chromophor-DNA-SWCNT-Konjugate über mehrere Tage

Im zweiten Teil des Abschnittes wurde die Stabilität der DNA-SWCNT-Hybride bei unterschiedlichen Temperaturen und verschiedenen Zeitintervallen genauer untersucht. Hierzu wurde ein Nilrot-Chromophor postsynthetisch über 1,3-dipolare Cycloaddition in DNA eingebaut. Die Absorption des Chromophors um $\lambda = 600$ nm (ein Bereich in der SWCNTs nur relativ schwach absorbieren) und die Fluoreszenz zwischen $\lambda = 615 - 750$ nm dienten dabei als zusätzliche Informationsquellen.

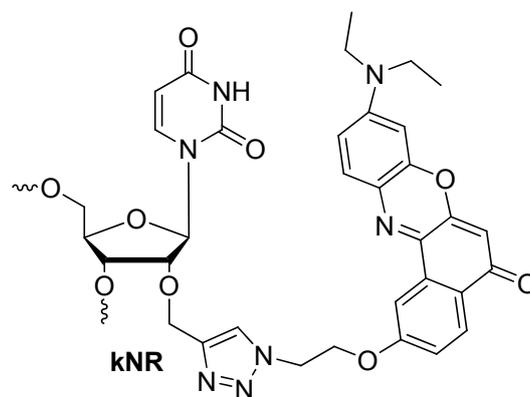


Abb. 80 Struktur des Nilrot-Chromophors in DNA

Zuerst wurde über Verdrängungsexperimente mit SDBS in verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen, dass die Bindungsstärke des Nilrot-Chromophors geringer ist als die der DNA. Mit dieser Erkenntnis wurde das Verhalten der Chromophor-DNA-SWCNT-Konjugate zuerst bei Raumtemperatur über fünf Tage und anschließend bei 90 °C und 55 °C über zwei bzw. 72 Stunden verfolgt. Dabei zeigte sich, dass die DNA größtenteils mit den SWCNTs ausfällt und somit eine vollständige Dissoziation der DNA^[186] ausgeschlossen werden kann. Mit diesen eigenen Erkenntnissen und bereits literaturbekanntem^[93, 190, 191] Ergebnissen konnte eine neue Theorie postuliert werden. Diese besagt, dass durch Neuordnung der DNA auf der SWCNT-Oberfläche freie Stellen entstehen, an denen eine Bündelung und damit ein Ausfallen der SWCNTs einsetzen kann. Die Dissoziation der DNA ist dabei möglicherweise eine Ursache der Bündelung und kein eigenständiger Prozess. Um diese Theorie weiter zu bestätigen, müssten Untersuchungen an längensortierten oder einzelnen (n,m)-Spezies durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Neben diesen Experimenten konnte durch die Absorptionsbande des Nilrot-Chromophors eine Belegungsdichte der DNA am SWCNT von unter 50% abgeschätzt werden. Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Literatur,^[39, 190] in der von einer partiellen Belegung des SWCNTs mit DNA berichtet wird.

6.2 Untersuchung der Hybridisierung am SWCNT

Metallionenvermitteltes Basenpaar

Im ersten Teil dieses Abschnittes wurde das am Arbeitskreis *Wagenknecht* entwickelte Hydroxychinolin-Ligandosid (HQ)^[208] in Oligonukleotide eingebaut und über ESR-Spektroskopie am Arbeitskreis *Breher* (Institut für Anorganische Chemie am Karlsruher Institut für Technologie) genauer charakterisiert. Hierfür wurde der Duplex **HQ-DNA1/HQ-DNA2** vermessen. Anhand der Ergebnisse konnte die erwartete Struktur des Komplexes im Duplex bestätigt werden.

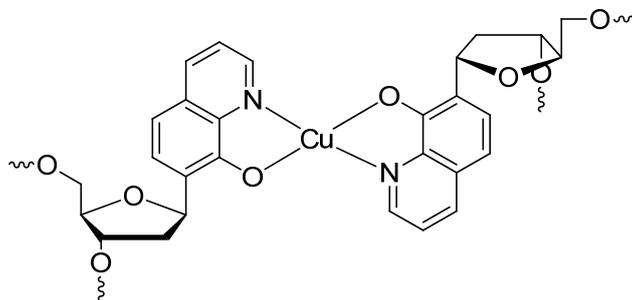


Abb. 81 Struktur des Cu(II)HQ₂-Komplexes im Doppelstrang der DNA

Eine weitere Charakterisierung zur Bestimmung der Abstände und der Art der magnetischen Kopplung zwischen zwei benachbarten Cu(II)-Ionen im Doppelstrang ist in Planung.

Hybridisierungsexperimente in Lösung

Im zweiten Teil dieses Abschnittes wurde der Einfluss der Duplexstabilität auf die Hybridisierung der DNA am SWCNT mittels eines metallionenvermittelten Basenpaares untersucht. Hierbei wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, welches sowohl mit einem HQ-Ligandosid als auch mit einem Nilrot-Chromophor modifiziert war. Dabei zeigte sich nach Zugabe eines HQ-modifizierten bzw. eines unmodifizierten Gegenstranges, dass die

Hybridisierung am SWCNT in Anwesenheit des stabilen Cu(II)HQ₂-Komplexes effizienter bzw. schneller verläuft. Damit zeigte sich, dass durch das metallionenvermittelte Basenpaar eine verstärkte Hybridisierung am SWCNT stattfand.

Messungen mittels Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie

Da in der Literatur noch nicht eindeutig geklärt ist, ob der Doppelstrang nach Hybridisierung am SWCNT bzw. Graphen gebunden^[39-42] bleibt oder dissoziiert^[43-46] wird zur genaueren Untersuchung die spektroskopische Methode der Oberflächenplasmonenresonanz angewandt. Hierzu wurde das einfacher zu handhabende System DNA-Graphen auf einem SPR-Goldchip benutzt, um unter anderem daraus Hinweise auf das Verhalten des Duplexes am SWCNT zu erhalten. Die ersten Ergebnisse zeigten, dass der Doppelstrang, welcher über den Cu(II)HQ₂-Komplex stabilisiert ist, vom Graphen dissoziiert. Jedoch war mit der gewählten Probenvorbereitung eine Reproduzierbarkeit der Messung nur schwer möglich. Daher wurde die Bindung des Graphens auf die Goldschicht optimiert. Dabei stellte sich das System aus thiolmodifizierten Graphen, ausgehend von einer Schwefel-Sauerstoff-Metathesereaktion des Graphitoxides, als vielversprechend heraus. Erste Ergebnisse mit diesen präparierten SPR-Goldchips und unmodifizierten Oligonukleotiden zeigten eine weitere Bindung der DNA durch Hybridisierung am Graphen. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten im Vergleich zu den HQ-modifizierten Oligonukleotiden ist, dass der unmodifizierte Doppelstrang aufgrund der geringeren Duplexstabilität nicht vollständig hybridisiert, sondern nur partiell. D.h. nur ein Teil der Basen des gebundenen Stranges hybridisieren, welche sich vermutlich über den zahlreichen Defektstellen oder an den Randbereichen des chemisch abgeblättern Graphens befinden. Diese Vermutung und die bisherigen Resultate müssen jedoch durch weitere Experimente bestätigt werden. Erst dann lässt sich eine genaue Aussage treffen. Hierzu ist jedoch zuerst eine Optimierung des Systems des bisher recht vielversprechenden thiolmodifizierten Graphens auf dem SPR-Goldchip nötig.

7. Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Methoden

Reagenzien und Lösungsmittel

Die bei der Reaktion verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Acros Organics*, *Alfa-Aesar*, *Merck* und *ABCR* bezogen. Diese hatten mindestens die Qualitätsstufe „zur Synthese“. Die verwendeten Lösungsmittel besitzen mindestens die Qualitätsstufe p.A.. Trockene Lösungsmittel wurden entweder nach Literaturvorschrift^[221] getrocknet oder von *Acros Organics*, *Fluka* und *Alfa Aesar* bezogen. Diese wurden entweder unter Stickstoff oder Argon aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochreine organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*, *Fluka*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Anlage verwendet. CCVD-SWCNT wurden von der Firma *CheapTubes.com*, HiPCO-SWCNT von der Firma *Nanointegris* erhalten.

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden von *Metabion* bezogen. Diese waren bereits über HPLC aufgereinigt und lyophilisiert. Die Stoffmenge betrug 1,0 μmol . Vor ihrer Verwendung wurde die DNA in entionisiertem Wasser gelöst und die Konzentration über UV/Vis Spektroskopie bestimmt.

Sublimationstrocknung

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

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC)

Verwendet wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma Merck. Die Beschichtung bestand aus Kieselgel 60 F254 mit einer Schichtdicke von 0,25 mm. Die visuelle Auswertung erfolgte über Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366 \text{ nm}$ bzw. Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254 \text{ nm}$. Eine chemische Auswertung wurde durch Anfärben mit Schwefelsäure (5% v/v) in Methanol und anschließendem Erhitzen durch Heißluft erhalten.

- Flash-Säulenchromatographie (FC)

Die stationäre Phase war Kieselgel der Firma *Sigma-Aldrich* (Korngröße von 40 – 63 μm). Die Säule wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[222] bei einem Überdruck von etwa 0,3 bar chromatographiert. Dazu wurde die zu reinigende Substanz im Lösungsmittel gelöst.

- Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Reversed-Phase HPLC wurde an einem *Shimadzu* HPLC-System durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul, LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Die Auswertung erfolgte mit der Software *Class VP*. Die Analytik wurde mit einer *Supelcosil* LC-318 Säule (25 cm x 4,6 mm, 5 μm , *Supelco*) durchgeführt. Für die präparative Trennung wurde eine *Supelcosil* LC-318 Säule (25 cm x 10 mm, 5 μm , *Supelco*) verwendet. Die Säulen wurden mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6,5, Laufmittel A) equilibriert. Die Elution erfolgte mit einem Acetonitril (Laufmittel B) Gradienten. Für die analytische Säule wurde eine Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min für die präparative 2,5 mL/min gewählt. Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte bei 260 nm, 290 nm und der entsprechenden Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Chromophors.

- Größenausschlusschromatographie (SEC)

Zum Entsalzen der Klickreaktion wurden fertig gepackte *illustra* NAPTM-5 Säulen (*Sephadex*TM G-25 DNA Grade) der Firma GE-Healthcare verwendet. Es wurde mit einem 5 mM Ammoniumacetatpuffer equilibriert und chromatographiert.

DNA-Festphasensynthese

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

7. Experimenteller Teil

Reaktionsführung

Falls nötig wurden Reaktionen zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Stickstoff (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) oder Argon-Atmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,999% rein) durchgeführt. Die dafür verwendeten Glasapparaturen wurden vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

NMR

Kernspinresonanzspektren wurden an einem *Bruker Avance 300* oder *Bruker Avance 400* durch die Abteilung der Zentralen Analytik an der Universität Regensburg, sowie an einem *Bruker Avance 300* am Karlsruher Institut für Technologie gemessen. Dazu wurden etwa 10 mg der zu vermessenden Substanz in etwa 0,7 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in ein NMR Probenröhrchen (Durchmesser 5 mm) abgefüllt. Die chemischen Verschiebungen wurden in δ angegeben und beziehen sich auf Trimethylsilan (TMS) als Referenznullpunkt. Für unvollständig deuterierte Lösungsmittel dienen die folgenden Referenzwerte (bezogen auf ihre chemische Verschiebung)^[223].

- CDCl_3 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7,26$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77,2$ ppm
- DMSO-d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2,50$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39,5$ ppm

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

Cyclovoltammetrie (CV)

Mittels einer „Drei-Elektroden-Anordnung“ (Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode aus Platin) wurden die CV-Messungen des Perylenbausteines **4** durchgeführt. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, welcher mit der Software *Mastercontrol* angesteuert wurde. Die Messung erfolgte in trockenem DMF unter Argonatmosphäre mit Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat als Leitsalz und Ferrocen als internen Standard. Zu dem gemessenen Signal wurden 0,63 V addiert um den Vergleichswert gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) zu erhalten^[149].

Massenspektrometrie

Massenspektren wurden in der Zentralen Analytik in der Abteilung Massenspektrometrie der Universität Regensburg, sowie im Arbeitskreis Bräse am Karlsruher Institut für Technologie gemessen. Die dafür benutzten Spektrometer sind im Folgenden zusammengefasst:

- ESI-MS: *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000*
- CI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*
- EI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A, Finnigan MAT 95*
- ESI-MS: *Agilent Technologies 6230 TOF LC/MS*

MALDI-TOF-Massenspektren wurden im linearen negativen Modus an einem *BIFLEX-IV*-Spektrometer von *Bruker Daltonics* am Karlsruher Institut für Technologie vermessen. Als Matrix wurde eine Mischung aus Diammoniumcitrat (0,1 M in Wasser) und 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP, 0,3 M in Ethanol) im Volumenverhältnis 1:2 verwendet.

Die Angabe der Signale erfolgte bei allen MS-Analysen in m/z-Verhältnissen mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das TEM-Bild aus Abb. 26 wurde im zentralen Labor für Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikums Regensburg an einem Leo 912AB (120 keV) der Firma *Zeiss* angefertigt. Die TEM-Bilder der Zellschnitte entstanden im Arbeitskreis *Witzgall* am Institut für Anatomie an der Universität Regensburg.

Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Zellen wurden im Arbeitskreis *Witzgall* am Institut für Anatomie an der Universität Regensburg an einem *LSM 710* der Firma *Zeiss* bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ gemessen.

7.2 Optische Spektroskopie

Für UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden Halbmikro-Fluoreszenz-Quarzküvetten der Firma Starna ($d = 1 \text{ cm}$) verwendet. Die Messungen wurden, falls nicht anderes angegeben, bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ in verschlossenen Küvetten durchgeführt. Bei Schmelzpunktmessungen wurde die Probenkammer mit einem kontinuierlichen Stickstoffstrom gespült um ein Beschlagen der Küvetten beim Abkühlen zu verhindern. Für alle Proben wurde das jeweilige Lösungsmittel Basislinienkorrigiert. Die DNA Proben wurden wie folgt zusammengestellt:

$$c(\text{DNA}) = 2,5 \text{ } \mu\text{M}$$

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

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

Die Pufferlösung der DNA-SWCNT-Hybride war, falls nicht anders angegeben, wie folgt:

$$c(\text{NaPi}) = 5 \text{ mM}$$

$$c(\text{NaCl}) = 100 \text{ mM}$$

UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

Die UV/Vis Absorptionsspektren wurden mit einem *Cary 100* der Firma *Varian* mit Temperatureinheit (*Cary 100 Temperature Controller*) gemessen. Dabei blieben folgende Einstellungen konstant: SBW: $2,0 \text{ nm}$, Average time: $0,1 \text{ s}$, Data intervall: $1,0 \text{ nm}$, Light source change over: 350 nm .

Schmelztemperaturmessungen wurden ebenfalls mit einem *Cary 100* der Firma *Varian* mit Temperatureinheit (*Cary 100 Temperature Controller*) gemessen. Hierbei wurde die Absorptionsänderung bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ verfolgt. Die Messungen erfolgten in einem Zyklus von $90 - 10 \text{ }^\circ\text{C}$ und $10 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Messdaten wurden in $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ Schritten erfasst, bei einer Heiz- und Kühlrate von $0,7 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Die UV/Vis-Absorptionsspektren für die DNA-SWCNT Hybride wurden an einem *Lambda 750* der Firma *Perkin Elmer* mit Peltierelement *PTP 6+6 Peltier System* und einem Thermostaten *F4391* der Firma *Haake* gemessen.

Desweiteren wurde zur Bestimmung des Absorptionswertes bei $\lambda = 260$ nm der pyren-, nilrot- und perylenmodifizierten Oligonukleotide ein *ND-1000 Spektrophotometer* der Firma *NanoDrop* verwendet.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Jobin-Yvon* mit einem angeschlossenen Peltier-Element *LFI-3751* gemessen. Die Proben wurden bei 20 °C vermessen. Die Spektren wurden gegen die Basislinie korrigiert. Die Sensitivitätsunterschiede des Detektors wurden durch eine Geräteinterne Korrekturfunktion ausgeglichen. Die folgenden Einstellungen blieben unverändert: Increment: 1 nm, Integrationszeit: 0,2 s. Der Bandpass war für die DNA-SWCNT-Hybride 5 nm, kNR-DNA 3 nm, kPy-DNA 3 nm, Per-DNA 3 nm und 2PydU-DNA 3 nm.

Die Skalierung der Fluoreszenzintensitäten in allen Fluoreszenzspektren ist in „Millionen“ angegeben.

Photolumineszenzspektroskopie

Die Photolumineszenz-Karten wurden an einem selbstgebauten Nah-Infrarot-konfokalen-Lasermikroskop mit einstellbarer Anregungswellenlänge gemessen. Die Anregungswellenlänge kann zwischen den Wellenlängenbereichen 617 – 706 nm, 697 – 863 nm und 840 – 999 nm automatisch gewechselt werden. Als Laserquelle dient ein CW-Farbstoff- und ein Ti-Sa-Laser (*Spectra Physics*) Mittels eines Nah-Infrarot Mikroskopie-Objektivs (100x, NA = 0,95) wurde der Anregungsstrahl fokussiert und das Photolumineszenz-Licht aufgefangen. Die Emissionsspektren wurden mit einer, mittels flüssigen Stickstoff gekühlten InGaAs Photodiodenreihe (Sensitiv im Bereich von 800 – 1600 nm), welche an einen Nah-Infrarot Spectrographen (*Roper Scientific*) angebracht war, vermessen. Sowohl der Anregungslaser als auch der Spectrograph waren an das Mikroskop mittels Glasfaserkabel angeschlossen.

Ramanspektroskopie

Die Raman-Spektren wurden mit einem *TriVista triple Raman System*, welches mit einem stickstoffgekühlten Ladungsgekoppelten Detektor ausgestattet war, gemessen.

7. Experimenteller Teil

EPR-Spektroskopie

EPR-Spektroskopische Untersuchungen wurden an einem *Bruker EMplus X-Band*-Spektrometer (Mikrowellenfrequenz 9,43 GHz) mit stickstoffgekühlten Kryostaten durchgeführt. Das Magnetfeld wurde mit einem g-Wert von 2,0036 (DPPH) kalibriert. Für die Simulation der Spektren wurde die Software *XSophe* der Firma *Bruker* verwendet.

Die Konzentration des Duplexes **HQ-DNA1/HQ-DNA2** für die ESR-Messung betrug 100 µM.

Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

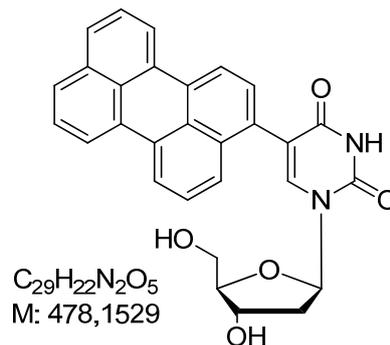
SPR-Messungen wurden an einem *Biosuplar 6* SPR-Gerät der Firma *Mivitec GmbH* mit angeschlossener Pumpe *IPC* der Firma *Ismatec* gemessen. Die SPR-Goldchips stammen von der Firma *Mivitec GmbH*.

7.3 Synthesevorschriften

7.3.1 Darstellung des perylenmodifizierten Bausteins

Die Synthese des 3-Bromoperylen (**2**) und des 4,4,5,5-Tetramethyl-2-(perylene-3-yl)-1,3,2-dioxaborolan (**3**) erfolgte nach Literaturvorschrift.^[146-148]

(4) 5-(perylene-3-yl)-2'-deoxyuridin



280 mg (0,74 mmol) **3** und 247 mg (0,70 mmol) 5-Iod Desoxyuridin (**9**) wurden in 80 mL einer Mischung aus THF/H₂O/MeOH 2:1:1 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 53,0 mg (65,7 mmol, 0,09 eq.) Pd(dppf)Cl₂ und 399 mg (9,98 mmol, 13,5 eq.) NaOH gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 18 h bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde mit 2 N HCl auf pH 7 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde mit EE mehrmals extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FC (EE:MeOH 50:1) aufgereinigt. Man erhielt 124 mg (0,26 mmol, 37% d. Th.) des Produktes als einen gelben Schaum.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ [ppm] 11,59 (s, 1H); 8,38 (m, 4H); 8,10 (s, 1H); 7,82 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,56 (m, 4H); 7,41(d, J = 7,7 Hz, 1H); 6,28 (t, J = 6,6 Hz, 1H); 5,26 (d, J = 4,1 Hz, 1H); 4,89 (t, J = 4,9 Hz 1H); 4,25 (m, 1H); 3,79 - 3,50 (m, 2H); 2,21 (m, 2H)

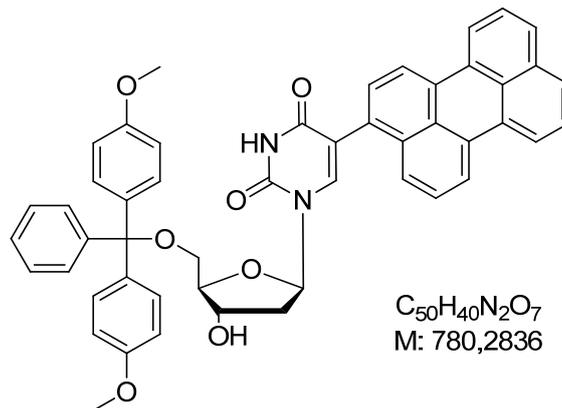
¹³C-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ [ppm] 162,4; 150,5; 149,5; 139,6; 136,8; 134,3; 133,4; 131,4; 130,7; 130,6; 130,6; 130,3; 129,2; 128,1; 128,1; 128,0; 127,8; 127,0; 126,8; 126,3; 120,9; 120,9; 120,3; 113,7; 87,5; 84,6; 70,4; 61,1.

7. Experimenteller Teil

LSI-MS m/z (%): 478,2 [M⁺]

HR-LSI-MS: m/z (ber.) = 478,1529 [M⁺]⁺, m/z (gef.) = 478,1536 [M⁺]⁺

(5) 5'-O-((bis(4-Methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-5-(perylene-3-yl)-2'-desoxyuirdin



144 mg (0,30 mmol) **4** wurden in 15 mL abs. Pyridin und 800 mL NEt₃ gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1,03 g (3,05 mmol, 10.2 eq.) DMT-Cl zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 18 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Feststoff über FC (EE:THF 10:1) aufgereinigt. 193 mg (0,25 mmol, 82% d. Th.) des Produktes wurden als gelber Schaum erhalten.

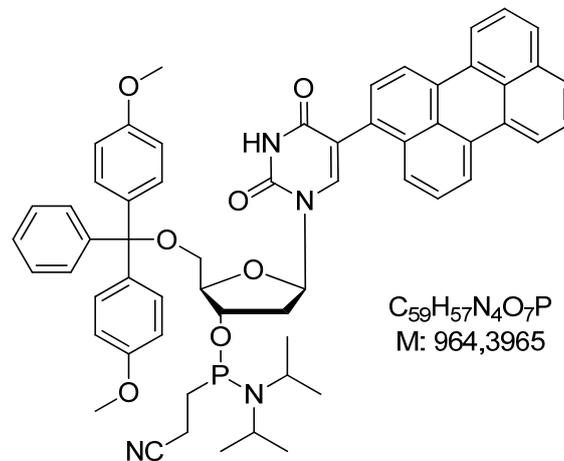
¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ [ppm] 11,62 (s, 1H); 8,39 (d, J = 7,9 Hz, 2H); 8,20 (br m, 1H); 7,80 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 7,69 (br m, 1H); 7,62 – 7,38 (m, 3H); 7,15 – 7,11 (m, 5H); 6,96 - 6,78 (m, 5H); 6,58 – 6,48 (m, 4H); 6,30 (br m, 1H); 5,39 (br, m, 1H); 4,53 (s, 1H); 3,94 (br m, 1H); 3,56 (s, 3H); 3,53 (s, 3H); 3,25 (br m, 1H); 2,44 (br m, 1H); 2.31 (s, 1H).

¹³C NMR (600 MHz, d₆-DMSO) δ [ppm] 162,3; 157,9; 157,9; 157,9; 150,3; 138,5; 134,3; 133,5; 130,6; 130,6; 130,3; 129,6, 129,6; 129,5; 129,0; 128,1; 128,0; 128,0; 127,90; 127,8; 127,3; 127,2; 127,0; 127,0; 126,5; 126,3; 120,9; 120,8; 120,6; 120,0; 113,0; 112,9; 86,0; 54,9; 54,9.

ESI-MS m/z (%): 779,1 (100) [M-H]⁻

HR-ESI-MS m/z (ber.) = 780,2830 [M⁺]⁺; m/z (gef.): 780,2837 [M⁺]⁺

(6) 3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-((bis(4-Methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-5-(perylene-3-yl)-2'-desoxyuirdin



192 mg (0,25 mmol) **5** wurden in 10 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 130 μ L (0,76 mmol, 3.04 eq.) DIPEA und 110 μ L (117 mg, 0,5 mmol, 2 eq) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde direkt über FC (THF:EE:Pyridin 10:100:1) gereinigt. 238 mg (0,25 mmol, 98% d. Th.) des Produktes wurden als gelber Schaum erhalten.

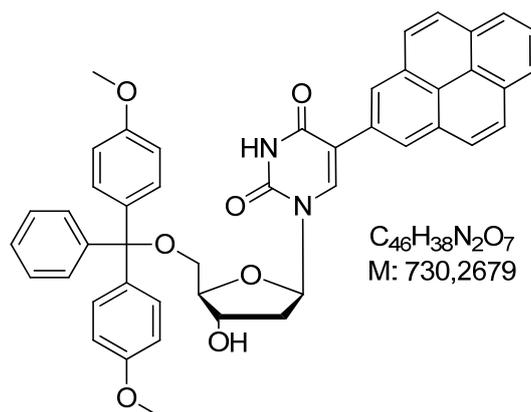
^{31}P -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] 148,5; 148,3

7. Experimenteller Teil

7.3.2 Darstellung des 2PydU-Bausteins

Die Synthese erfolgte größtenteils wie in der Literatur beschrieben.^[171] Das 2'-Deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-iodouridin wurde ebenfalls nach Literaturvorschrift hergestellt.^[172] Lediglich die Synthese des 5'-O-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-5-(2-pyrenyl)-2'-desoxyuridin (**11**) wurde aus atomökonomischen Gründen leicht abgewandelt.

(11) 5'-O-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-5-(2-pyrenyl)-2'-desoxyuridin



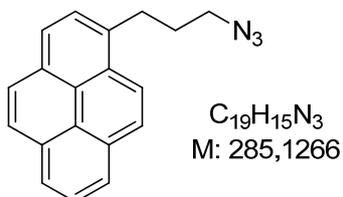
550 mg (1,68 mmol) **8** und 960 mg (1,60 mmol) DMT-geschütztes 5-iod-2'-desoxyuridin (**10**), wurden in 47 mL einer mit Stickstoff entgasten Acetonitril/Wasser-Mischung 2:1 gelöst. Zu dieser Mischung wurden 90 mg (0,10 mmol) Pd(dppf)Cl₂ und 370 mg (3,49 mmol) Na₂CO₃ gegeben und für 48 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte über FC (CH₂Cl₂:MeOH:NEt₃ 100:3:1). Es wurden 460 mg (0,63 mmol, 38%) des Produktes als brauner Feststoff erhalten.

Die Analysedaten stimmten mit denen aus der Literatur überein.^[171]

7.3.3 Synthese des „click“-Pyren-Bausteins

Die Synthesen des 1-Bromoperylens (**13**) und des 1-(3-Bromopropyl)pyren (**14**) erfolgten nach Literaturvorschrift.^[179, 180]

(15) 1-(3-azidopropyl)-pyren



100 mg (0,31 mmol) 1-(3-bromopropyl)-pyren und 30 mg (0,18 mmol, 0,6 eq.) KI wurden in 5 mL DMF gelöst. Zu diesem Gemisch wurden 80 mg NaN₃ (1,23 mmol, 4 eq.) gegeben und über Nacht auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde mit CH₂Cl₂ und Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Rohprodukt über FC (Hexan: CH₂Cl₂ 5:1) aufgereinigt. Nach dem Trocknen an der HV erhielt man 68 mg (0,24 mmol, 76% d. Th.) des Produktes als ein gelbliches Öl.

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ [ppm] 8,53 - 7,84(m, 9H); 3,42 (dt, *J* = 11,3, 4,3 Hz, 4H); 2,19-2,10 (m, 2H)

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] 135,2; 131,6; 131,0; 130,2; 128,8; 127,7; 127,6; 127,5; 127,0; 126,1; 125,3; 125,2; 125,0; 123,2; 77,4; 75,0; 51,1; 30,9; 30,5.

EI-MS *m/z* (%): 285,2 (50) [M]⁺

HR-ESI-MS *m/z* (ber.) = 286.1339 [M-H]⁺; *m/z* (gef.): 286.1351 [M-H]⁺

7. Experimenteller Teil

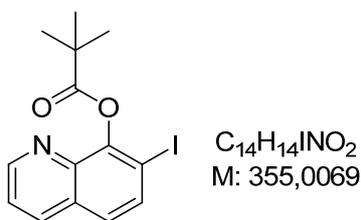
7.3.4 Synthese des „click“-Nil-Rot-Bausteins (17)

Die Synthese erfolgte nach Literaturvorschrift^[187, 188] und wurde von Thomas Ehrenschwender durchgeführt.

7.3.5 Synthese des HQ-Ligandosides

Die Synthese wurde nach Literaturvorschrift^[208] durchgeführt. Die Synthese des Glykals (21) wurde von Effi Bätzner und Andreas Dittmer durchgeführt. Lediglich die Ausbeute der Pivaloylschützung konnte verbessert werden.

(20) 7-Iodochinolin-8-yl-pivalat



10 g 8-Hydroxy-7-iodochinolin (36,2 mmol) wurde zusammen mit 429 mg DMAP (3,43 mmol) in 200 mL abs. Pyridin gelöst. Anschließend wurde unter Eiskühlung langsam 12 mL Pivaloylchlorid (97,3 mmol) zugetropft und die Reaktionsmischung 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel wurde der Rückstand mit 100 mL ges. NH_4Cl -Lsg. und 100 mL CH_2Cl_2 versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und im Anschluss das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde durch FC (Hexan:Diethylether 9:1) gereinigt. 10,3 g (29,0 mmol, 80% d. Th.) des Produktes wurden als farbloser Feststoff erhalten.

Die Analysedaten stimmten mit denen aus der Literatur^[208] überein.

7.4 DNA-Synthese

7.4.1 Synthese modifizierter Oligonukleotide

Die artifiziellen Oligonukleotide wurden an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* nach der Phosphoramidit-Methode auf der festen Phase synthetisiert. Für interne- und 5'-DNA-Modifikationen wurden Standard CPG-Säulen verwendet. Für den Einbau wurden die Phosphoramidit-Bausteine als 0,1 M Lösung in Acetonitril (*amidite diluent* von *Applied Biosystems*) bzw. 0,1 M Lösung in Acetonitril/CH₂Cl₂ 1:1 eingesetzt. Kommerziell erhältliche Phosphoramidite wurden als 0,067 M Lösungen in Acetonitril eingesetzt. Die Kupplungseffizienz wurde durch die Absorption des Dimethoxytritylkations (DMT⁺) bei $\lambda = 470$ nm nach jedem Kupplungsschritt detektiert.

Kupplungsprotokoll

Das Kupplungsprotokoll dient zur Programmierung der einzelnen Teilschritte bei der automatisierten DNA-Festphasensynthese. In jedem Zyklus lassen sich die Anzahl der Pulse und die Kupplungsdauer verändern. Ein Puls steht dabei für 16 μ L des jeweiligen Reagenzes aus der Vorratsflasche. Eine Zeitdauer von 0 s bedeutet ein schnellst mögliches Durchlaufen des Einzelschrittes ohne zusätzliche Reaktionszeit auf der CPG-Säule. Kommerzielle Phosphoramidite wurden nach einem Standardprotokoll in Oligonukleotide eingebaut. Ein Beispiel eines Kupplungsprotokolls für die natürlichen Basen A, G, C und T ist in Tab. 9 gegeben.

7. Experimenteller Teil

Tab. 9 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	Zeit
§Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl 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	6	0
21	T + Act	PULSE	1	8
2	Act	PULSE	4	32
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

Dieses Standardverfahren wurde für die jeweiligen Phosphoramidit-Bausteine nur in dem Bereich „*§ Coupling*“ verändert. In Tab. 10 ist ein repräsentatives Kupplungsprotokoll für den 3Per-dU Baustein dargestellt.

Tab. 10 Repräsentatives Kupplungsprotokoll für den Sonderbaustein 3PerdU. „5“ steht für eine 1:1-Mischung aus CH₂Cl₂ und Acetonitril. „7“ ist der Sonderbaustein 3PerdU.

§Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	8	0
24	7 + Act	PULSE	10	900
22	5 + Act	PULSE	10	450
3	5	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	40	0

Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide

Nach erfolgter DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet. Das CPG-Granulat wurde anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 700 µL Ammoniumhydroxid-Lösung (> 25%, trace select, Fluka) zugegeben. Die Oligonukleotide wurden bei 37 °C über 16 h entschützt und vom CPG abgespalten. Nach Abkühlen wurde zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das verbleibende Pellet wurde noch zweimal mit je 300 µL Millipore-Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (30 min, Heizung 35 °C, 100 mbar und anschließend 180 min, 25 °C, 0,1 mbar) von Ammoniak und Wasser befreit. Das Pellet wurde danach in 300 µL Millipore-Wasser gelöst und durch einen Filter zentrifugiert um noch vorhandenes CPG-Material abzutrennen.

Die Oligonukleotide wurden mittels *reversed-phase HPLC* aufgereinigt. Oligonukleotide die unter postsynthetischen Bedingungen synthetisiert wurden wurden vor der HPLC-Reinigung noch entsalzt (Kapitel 7.4.4) bzw. durch eine *GlenPacTM DNA purification cartridge* der Firma *Glen Research* vorgereinigt (Kapitel 7.4.5). Zur analytischen und präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden die folgenden Bedingungen gewählt:

7. Experimenteller Teil

Tab. 11 Übersicht der verwendeten HPLC-Gradienten und der Detektionswellenlänge bei der Oligonukleotidaufreinigung (A = 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH = 6,5), B = Acetonitril).

Sequenz	mod	Gradient	Detektion
2PyDNA1-4	2PydU	0-20% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 350 \text{ nm}, 370 \text{ nm}$
kPy-DNA1-2	kPy	0-20% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 350 \text{ nm}, 370 \text{ nm}$
kPy-DNA3-9		0-10% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 350 \text{ nm}, 370 \text{ nm}$
kNR-DNA1	kNR	0-20% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 600 \text{ nm}, 620 \text{ nm}$
HQ-DNA1-5	HQ	0-15% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm},$
HQ-DNA6	HQ, kNR	0-20% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 600 \text{ nm}, 620 \text{ nm}$
Per-DNA1-4	3PerdU	0-20% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 473 \text{ nm}, 493 \text{ nm}$
Per-DNA5	3PerdU	0-30% B (50 min)	$\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}, 402 \text{ nm}$

7.4.2 Synthetisierte DNA-Sequenzen

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

3PerdU-modifizierte Oligonukleotide

Per-DNA1	5'-GCA-GTC-TA PerdU -ATC-ACT-GA-3'
Per-DNA2	5'-GCA-GTC-TC PerdU -CTC-ACT-GA-3'
Per-DNA3	5'-GCA-GTC-TG PerdU -GTC-ACT-GA-3'
Per-DNA4	5'-GCA-GTC-TT PerdU -TTC-ACT-GA-3'
Per-DNA5	3'-ACG-CAG-TAT-CGT-AGT-CAG-TGT-CAT- PerdU -5'

Tab. 12 ESI- und Maldi-TOF-Massen, sowie Extinktionskoeffizienten der mit 3PerdU-modifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{260} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
Per-DNA1	5403	1352,2 [M+4H ⁺] ⁴⁺ 1803,3 [M+3H ⁺] ³⁺	171,5
Per-DNA2	5355	1340,5 [M+4H ⁺] ⁴⁺	156,9

		1787,3 [M+3H ⁺] ³⁺	
Per-DNA3	5435	1360,5 [M+4H ⁺] ⁴⁺ 1813,9 [M+3H ⁺] ³⁺	164,8
Per-DNA4	5385	1348,2 [M+4H ⁺] ⁴⁺ 1797,2 [M+3H ⁺] ³⁺	159,6
Per-DNA5	7904	7905,2	247,2

2PydU-modifizierte Oligonukleotide

2PydU-DNA1 3'-TTC-GGA-TAC-ATA-GA**2PydU**-ACA-TAG-ATA-GTC-TG-5'

2PydU-DNA2 3'-TTC-GGA-TAC-A**2PydU** A-GAT-ACA-**2PydU** AG-ATA-GTC-TG-5'

2PydU-DNA3 3'-TTC-GGA-TAC-A**2PydU** A-GA**2PydU** -ACA-**2PydU** AG-ATA-GTC-TG-5'

2PydU-DNA4 3'-TTC-GGA-**2PydU** AC-A**2PydU** A-GA**2PydU** -ACA-**2PydU** AG-A**2PydU** A-GTC-TG-5'

Tab. 13 ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit 2PydU-modifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
2PydU-DNA1	9121	1522,0 [M+6H ⁺] ⁶⁺ 1826,1 [M+5H ⁺] ⁵⁺ 2282,6 [M+4H ⁺] ⁴⁺	307,6
2PydU-DNA2	9308	1553,2 [M+6H ⁺] ⁶⁺ 1863,8 [M+5H ⁺] ⁵⁺ 2329,2 [M+4H ⁺] ⁴⁺	315,9
2PydU-DNA3	9494	1584,0 [M+6H ⁺] ⁶⁺ 1900,8 [M+5H ⁺] ⁵⁺ 2375,5 [M+4H ⁺] ⁴⁺	324,2
2PydU-DNA4	9867	1999,4 [M+5H ⁺] ⁵⁺	340,7

7. Experimenteller Teil

kPy-modifizierte Oligonukleotide

kPy-DNA1	3'-TTC-GGA-TAC-ATA-GA kPy -ACA-TAG-ATA-GTC-TG-5'
kPy-DNA2	3'-TTC-GGA-TAC-A kPy A-GAT-ACA- kPy AG-ATA-GTC-TG-5'
kPy-DNA3	3'-TAT-TAT- kPy AT-TAT-5'
kPy-DNA4	3'-TAT-TAT-TAT-TA kPy -5'
kPy-DNA5	3'-TA kPy -TAT-TAT- kPy AT-5'
kPy-DNA6	3'-TGC- kPy GC-TG-5'
kPy-DNA7	3'-TGT-GTG-TGT-G kPy G-5'
kPy-DNA8	3'-GTT-GT kPy -GTT-G'-5'
kPy-DNA9	3'-TTT-ATT-TAT-T kPy A-5'

Tab. 14 MALDI-TOF-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit kPy-modifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
kPy-DNA1	9263	9261,1	299,7
kPy-DNA2	9588	9586,2	308,0
kPy-DNA3	3948	3947,9	128,9
kPy-DNA4	3948	3948,4	128,9
kPy-DNA5	4273	4271,3	139,0
kPy-DNA6	2741	2738,5	78,6
kPy-DNA7	4062	4062,8	120,8
kPy-DNA8	3404	3401,4	99,7
kPy-DNA9	3939	3938,1	123,0

kNR-modifizierte Oligonukleotide**kNR-DNA1** 3'-TGT-GTG-TGT-GkNRG-5'**Tab. 15** Maldi-TOF-Massen und Extinktionskoeffizient des mit kNR-modifizierten Oligonukleotides.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
kNR-DNA1	4180	4180,9	146,0

HQ-modifizierte Oligonukleotide**HQ-DNA1** 3'-ATG-TTG-THQA-TTA-CAC-5'**HQ-DNA2** 3'-GTG-TAA-THQA-CAA-CAT-5'**HQ-DNA3** 3'-ATG-TTG-THQHQ-ATT-ACA-C-5'**HQ-DNA4** 3'-GTG-TAA-THQHQ-ACA-ACA-T-5'**HQ-DNA5** 3'-TGT-GHQG-TGT-GkNRG-5'**HQ-DNA6** 3'-CAC-ACA-CHQC-ACA-5'**Tab. 16** Maldi-TOF-Massen, ESI-Masse und Extinktionskoeffizienten der mit kPy-modifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
HQ-DNA1	4574	4576,2	138,5
HQ-DNA2	4592	4594,2	150,4
HQ-DNA3	4897	4898,3	139,9
HQ-DNA4	4915	4919,2	151,7
HQ-DNA5	4199	1066,4 [M+6H ⁺] ⁴⁺ 1419,6 [M+5H ⁺] ³⁺	139,4
HQ-DNA6	3561	3561,3	110,1

7. Experimenteller Teil

7.4.3 Unmodifizierte Oligonukleotide für DNA-SWCNT- und DNA-Graphen-Experimente

DNA1	3'TGC-TGC-TG-5'
DNA2	3'-TAT-TAT-TAT-TAT-5'
DNA3	3'-GTT-GTT-GTT-G-5'
DNA4	3'-GTG-TGT-GTG-TGT-5'
DNA5	3'-CAC-ACA-CAC-ACA-5'
DNA6	3'- TTC-GGA-TAC-ATA-GAT-ACA-TAG-ATA-GTC-TG-5'
DNA7	3'-ATG-TTG-TTA-TTA-CAC-5'
DNA8	3'-GTG-TAA-TAA-CAA-CAT-5'

7.4.4 1,3-dipolare Cycloaddition

Für die postsynthetische Modifikation mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition wurde nach der Abspaltung vom CPG die gefriergetrockneten Lyophilisate mit je 34 μL (3,4 μmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO:tBuOH 3:1), 17 μL (0,17 μmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (10 mM in DMSO:tBuOH 3:1), 25 μL (10 μmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser) und 114 μL (1,14 μmol) einer Lösung des Azids (10 mM in DMSO:tBuOH 3:1) versetzt und 16 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde mit einer 100 μL (0,15 mmol) Natriumacetat-Lösung (0,3 M in Wasser) und 1 mL einer Ethanol/Wasser-Mischung (4:1) versetzt und über Nacht bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach Abzentrifugieren (15 min bei 15400 g) wurde der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde noch zweimal mit einer Ethanol/Wasser-Mischung (7:3) gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das DNA-Pellet wurde danach in 500 μL Millipore-Wasser gelöst.

Um die Oligonukleotide von überschüssigen Kupfersalzen zu befreien wurden die DNA-Lösungen, vor der HPLC-Reinigung, mittels *illustra NAP-5-Säulen* der Firma *GE Healthcare*

entsalzt. Hierzu erfolgte eine Equilibrierung der Säulen mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers. Der zu reinigende DNA-Strang wurde in 500 μ L Millipore-Wasser aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Zur Elution des Oligonukleotides wurden 2 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert.

7.4.5 Aufarbeitung der HQ-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide **HQ-DNA1-4** und **HQ-DNA6** wurden DMT-ON gebaut. Dadurch konnten diese mittels einer *GlenPacTM DNA purification cartridge* der Firma *Glen Research* von unvollständig gebauten Oligonukleotiden vorgereinigt werden. Hierzu wurde das entsprechende lyophilisat des Oligonukleotides, nach der Abspaltung vom CPG, in einer Mischung aus 1 mL Millipore-Wasser und 1 mL einer 100 mg/mL konzentrierten NaCl-Lösung gelöst. Mit einer 2 mL Spritze werden die folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge durch die Säule gedrückt: 0,5 mL Acetonitril, 1 mL TEAA (Triethylaminacetat, pH = 7), 2 mL der Oligonukleotidlösung, 2 mL einer Mischung aus 5% Acetonitril in einer 100 mg/mL NaCl-Lösung, 2 mL einer 2%-igen Trifluoressigsäurelösung, 2 mL Millipore-Wasser und 2 mL einer Acetonitril/Wasser-Mischung 1:1 mit 0,5% Ammoniumhydroxid-Lösung. Im letzten Schritt wurde das Oligonukleotid von der Säule gewaschen und aufgefangen. Nach Schockgefrieren und lyophilisieren wurden die DNA-Stränge über RP-HPLC aufgereinigt.

HQ-DNA5 konnte nach der 1,3-dipolaren Cycloaddition mit kNR, ohne Vorreinigung über eine *GlenPacTM*-Säule, mittels RP-HPLC aufgereinigt werden.

Nach Aufreinigung über die RP-HPLC wurden die vereinigten Fraktionen auf 400 μ L aufkonzentriert und mit *chelating resin (iminodiacetic acid)* der Firma *Sigma* versetzt. Die Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt, um noch vorhandene Metallionen zu entfernen. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Rückstand wurde noch zweimal mit je 300 μ L Millipore-Wasser gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden über einen Zentrifugenfilter von noch vorhandenen *resin*-Partikeln befreit.

7. Experimenteller Teil

7.5 Zellkulturen

Die verwendeten Zellkulturen wurden im Arbeitskreis Witzgall am Institut für Anatomie der Universität Regensburg von Sabrina Kracher präpariert. Als Zellen wurde eine Linie von LLC-PK1-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM-Medium über vier Stunden ohne FCS mit einer Mischung aus LipofectaminTM 2000 und **Per-DNA5** inkubiert (1 µL aus einer 1 mM bzw. 100 µM Lösung von **Per-DNA5** auf 249 µL DMEM-Medium). Anschließend wurden die Zellen für 27 h mit FCS inkubiert. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd wurde zu den Zellen DAB gegeben. Daraufhin wurden LSM-Aufnahmen durchgeführt.

7.6 Probenvorbereitung der DNA-SWCNT-Hybride

Zu 60 – 70 µg HiPCO SWCNTs (*Nanointegris*, batch number R1-912) wurde eine äquivalente Masse an entsprechenden Oligonukleotid sowie 2 mL einer 100 mM NaCl-Lösung (für die kPy-DNA-Stränge) bzw. 2 mL eines 5 mM Phosphatpuffers (pH = 7) mit 100 mM NaCl (für alle anderen verwendeten Oligonukleotide) gegeben. Die Suspension wurde für zwei Stunden im Ultraschallbad (*Merck eurolab*, *USR 18 H*) unter Eiskühlung behandelt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde bei 15600 g für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und falls nicht anders erwähnt, durch einen 50 kDa Größenausschlussfilter der Firma *Millipore* zentrifugiert (jeweils 1 min bei 9000 g). Der aufkonzentrierte Rückstand wurde anschließend fünfmal, mit der vorher verwendeten Pufferlösung, gewaschen, danach resuspendiert und auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Um die DNA auf den SWCNTs mit SDBS zu verdrängen wurden die DNA-SWCNT-Hybride entweder in einem 1:1 Verhältnis mit einer 2,0 gew.-%-igen, 0,2 gew.-%-igen oder 0,02 gew.-%-igen SDBS Lösung bzw. mit weigen µL einer 5 gew.-%-igen SDBS-Lösung versetzt.

7.7 Charakterisierung der Oligonukleotide

Alle gereinigten Oligonukleotide wurden Massenspektrometrisch (LC-MS ESI und MALDI-TOF) untersucht.

Die Konzentration der Oligonukleotid-Stammlösungen wurden über das Lambert-Beersche-Gesetz mittels der optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten DNA-Stranges kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\epsilon_{260} = 0,9 \cdot (A \epsilon_A + C \epsilon_C + G \epsilon_G + T \epsilon_T)$$

Hierbei steht A, G, C, T für die entsprechende Anzahl der Nucleobasen. Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität. ϵ beschreibt die Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda = 260$ nm. Für die entsprechenden modifizierten Oligonukleotide muss zu r Konzentrationsbestimmung der Extinktionskoeffizient der Modifikation addiert werden.

Tab. 17 Molare Extinktionskoeffizienten der natürlichen und modifizierten Nucleoside.

natürliche Nucleoside	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]	modifizierte Nucleoside	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
A	15,4	3PerdU	15,5
C	7,3	2PydU	18,0
G	11,7	kPy	20,0
T	8,8	kNR	48,0
		HQ	1,5

Zur Hybridisierung wurden jeweils 1 eq. des Einzelstranges zusammen in 10 mM Phosphatpuffer und 250 mM NaCl für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

8. Literaturverzeichnis

- [1] F. Schätzing, *Limit*, Kiepenhauer & Witsch Verlag, Köln, **2009**.
- [2] "Audacious & Outrageous: Space Elevators" science.nasa.gov. 17 Aug. 2012
http://science.nasa.gov/science-news/science-at-nasa/2000/ast07sep_1/
- [3] "This is a Phase I Study with the performance period from May 01 2000 12:00AM to Oct 31 2000 12:00AM". nica.usra.edu. 17 Aug. 2012
<http://www.niac.usra.edu/studies/472Edwards.html>
- [4] "This is a Phase II Study with the performance period from Mar 01 2001 12:00AM to Jan 31 2003 12:00AM". niac.usra.edu. 17 Aug. 2012
<http://www.niac.usra.edu/studies/521Edwards.html>
- [5] "Euspec European Space Elevator Challenge". euspec.warr.de. 17 Aug. 2012
<http://euspec.warr.de/>
- [6] K. A. Engel, *Acta Astronaut.* **2005**, 57, 277-287.
- [7] N. M. Pugno, *Acta. Mater.* **2007**, 55, 5269-5279.
- [8] N. M. Pugno, *J. Phys.-Condens. Mat.* **2006**, 18, S1971-S1990.
- [9] S. A. Ambartsumian, M. V. Belubekyan, K. B. Ghazaryan, *Acta Astronaut.* **2010**, 66, 563-566.
- [10] N. M. Pugno, F. Bosia, A. Carpinteri, *Small* **2008**, 4, 1044-1052.
- [11] S. Iijima, *Nature* **1991**, 354, 56-58.
- [12] R. Sitko, B. Zawisza, E. Malicka, *Trac-Trend. Anal. Chem.* **2012**, 37, 22-31.
- [13] A. Nunes, K. Al-Jamal, T. Nakajima, M. Hariz, K. Kostarelos, *Arch. Toxicol.* **2012**, 86, 1009-1020.
- [14] N. M. Bandaru, N. H. Voelcker, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 8748-8758.
- [15] T. Fujigaya, N. Nakashima, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, 12, 1717-1738.
- [16] J. Kim, *J. Nanomater.* **2012**.
- [17] S. Basu-Dutt, M. L. Minus, R. Jain, D. Nepal, S. Kumar, *J. Chem. Educ.* **2012**, 89, 221-229.
- [18] X. M. Liu, Z. D. Huang, S. W. Oh, B. Zhang, P. C. Ma, M. M. F. Yuen, J. K. Kim, *Compos. Sci. Technol.* **2012**, 72, 121-144.
- [19] W. B. Lu, M. Zu, J. H. Byun, B. S. Kim, T. W. Chou, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 1805-1833.
- [20] C. Fabbro, H. Ali-Boucetta, T. Da Ros, K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3911-3926.
- [21] N. W. S. Kam, M. O'Connell, J. A. Wisdom, H. J. Dai, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 11600-11605.
- [22] Z. Liu, S. M. Tabakman, Z. Chen, H. J. Dai, *Nat. Protoc.* **2009**, 4, 1372-1382.
- [23] C. Staii, J. Alan T. Johnson, M. Chen, A. Gelperin, *Nano Lett.* **2005**, 5, 1774-1778.
- [24] S. Y. Niu, Q. Y. Li, R. Ren, K. C. Hu, *Anal Lett* **2010**, 43, 2432-2439.
- [25] K. Yang, C. Y. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 28, 257-262.
- [26] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, 440, 297-302.
- [27] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, 321, 1795-1799.
- [28] J. Bath, A. J. Turberfield, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 275-284.
- [29] "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006". Nobelprize.org. 18 Aug. 2012
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/
- [30] C. C. Mello, D. C. Jr., *Nature* **2004**, 431, 338-342.
- [31] D. Roxbury, J. Mittal, A. Jagota, *Nano Lett.* **2012**, 12, 1464-1469.
- [32] D. Roxbury, A. Jagota, J. Mittal, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 13545-13550.
- [33] C. Y. Khripin, S. Manohar, M. Zheng, A. Jagota, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 13616-13621.
- [34] D. Roxbury, X. Tu, M. Zheng, A. Jagota, *Langmuir* **2011**, 27, 8282-8293.
- [35] R. R. Johnson, A. Kohlmeyer, A. T. C. Johnson, M. L. Klein, *Nano Lett.* **2009**, 9, 537-541.
- [36] D. Roxbury, S. Manohar, A. Jagota, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 13267-13276.
- [37] X. Tu, S. Manohar, A. Jagota, M. Zheng, *Nature* **2009**, 460, 250-253.

- [38] F. Albertorio, M. E. Hughes, J. A. Golovchenko, D. Branton, *Nanotechnology* **2009**, *20*.
- [39] E. S. Jeng, A. E. Moll, A. C. Roy, J. B. Gastala, M. S. Strano, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 371-375.
- [40] A. Star, E. Tu, J. Niemann, J. C. P. Gabriel, C. S. Joiner, C. Valcke, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 921-926.
- [41] E. Dubuisson, Z. Y. Yang, K. P. Loh, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2452-2460.
- [42] Z. J. Wang, J. Zhang, P. Chen, X. Z. Zhou, Y. L. Yang, S. X. Wu, L. Niu, Y. Han, L. H. Wang, P. Chen, F. Boey, Q. C. Zhang, B. Liedberg, H. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3881-3886.
- [43] S. Jung, M. Cha, J. Park, N. Jeong, G. Kim, C. Park, J. Ihm, J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10964-10966.
- [44] R. J. Chen, Y. G. Zhang, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 54-57.
- [45] M. Liu, H. M. Zhao, S. Chen, H. T. Yu, Y. B. Zhang, X. Quan, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4213-4216.
- [46] A. Bonanni, M. Pumera, *Acs Nano* **2011**, *5*, 2356-2361.
- [47] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science* **2004**, *306*, 666-669.
- [48] "The Nobel Prize in Physics 2010". Nobelprize.org. 17 Aug 2012 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/
- [49] K. S. Novoselov, D. Jiang, F. Schedin, T. J. Booth, V. V. Khotkevich, S. V. Morozov, A. K. Geim, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10451-10453.
- [50] S. Unarunotai, Y. Murata, C. E. Chialvo, N. Mason, I. Petrov, R. G. Nuzzo, J. S. Moore, J. A. Rogers, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1072-1077.
- [51] A. Reina, X. T. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. B. Son, V. Bulovic, M. S. Dresselhaus, J. Kong, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 30-35.
- [52] C. Berger, Z. M. Song, T. B. Li, X. B. Li, A. Y. Ogbazghi, R. Feng, Z. T. Dai, A. N. Marchenkov, E. H. Conrad, P. N. First, W. A. de Heer, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19912-19916.
- [53] W. S. Hummers, R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1339-1339.
- [54] Staudenmeier, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 1481-1487.
- [55] A. Lerf, H. Y. He, M. Forster, J. Klinowski, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4477-4482.
- [56] D. Li, M. B. Muller, S. Gilje, R. B. Kaner, G. G. Wallace, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 101-105.
- [57] H. J. Shin, K. K. Kim, A. Benayad, S. M. Yoon, H. K. Park, I. S. Jung, M. H. Jin, H. K. Jeong, J. M. Kim, J. Y. Choi, Y. H. Lee, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1987-1992.
- [58] V. Dua, S. P. Surwade, S. Ammu, S. R. Agnihotra, S. Jain, K. E. Roberts, S. Park, R. S. Ruoff, S. K. Manohar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2154-2157.
- [59] S. Daniel, T. P. Rao, K. S. Rao, S. U. Rani, G. R. K. Naidu, H. Y. Lee, T. Kawai, *Sensor. Actuat. B Chem.* **2007**, *122*, 672-682.
- [60] P. M. Ajayan, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1787-1800.
- [61] S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* **1993**, *364*, 737-737.
- [62] D. S. Bethune, C. H. Kiang, M. S. Devries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, *Nature* **1993**, *363*, 605-607.
- [63] M. Endo, K. Takeuchi, S. Igarashi, K. Kobori, M. Shiraishi, H. W. Kroto, *J. Phys. Chem. Solids* **1993**, *54*, 1841-1848.
- [64] J. F. Colomer, C. Stephan, S. Lefrant, G. Van Tendeloo, I. Willems, Z. Konya, A. Fonseca, C. Laurent, J. B. Nagy, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *317*, 83-89.
- [65] T. W. Ebbesen, P. M. Ajayan, *Nature* **1992**, *358*, 220-222.
- [66] T. Guo, P. Nikolaev, A. Thess, D. T. Colbert, R. E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *243*, 49-54.
- [67] P. Nikolaev, M. J. Bronikowski, R. K. Bradley, F. Rohmund, D. T. Colbert, K. A. Smith, R. E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 91-97.
- [68] D. E. Resasco, W. E. Alvarez, F. Pompeo, L. Balzano, J. E. Herrera, B. Kitiyanan, A. Borgna, *J. Nanopart. Res.* **2002**, *4*, 131-136.
- [69] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, *Carbon* **1995**, *33*, 883-891.
- [70] J. Lefebvre, J. M. Fraser, Y. Homma, P. Finnie, *Appl. Phys. A Mater.* **2004**, *78*, 1107-1110.

8. Literaturverzeichnis

- [71] R. B. Weisman, S. M. Bachilo, D. Tsyboulski, *Appl. Phys. A Mater.* **2004**, *78*, 1111-1116.
- [72] S. M. Bachilo, M. S. Strano, C. Kittrell, R. H. Hauge, R. E. Smalley, R. B. Weisman, *Science* **2002**, *298*, 2361-2366.
- [73] E. H. Haroz, S. M. Bachilo, R. B. Weisman, S. K. Doorn, *Phys. Rev. B* **2008**, *77*.
- [74] A. V. Naumov, S. Ghosh, D. A. Tsyboulski, S. M. Bachilo, R. B. Weisman, *Acs Nano* **2011**, *5*, 1639-1648.
- [75] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, 14-19.
- [76] M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. P. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. E. Smalley, *Science* **2002**, *297*, 593-596.
- [77] H. Kataura, Y. Kumazawa, Y. Maniwa, I. Umez, S. Suzuki, Y. Ohtsuka, Y. Achiba, *Synthetic Met.* **1999**, *103*, 2555-2558.
- [78] A. Jorio, R. Saito, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Philos. T. R. Soc. A* **2004**, *362*, 2311-2336.
- [79] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, A. Jorio, *Phys. Rep.* **2005**, *409*, 47-99.
- [80] A. Jorio, M. A. Pimenta, A. G. Souza, G. G. Samsonidze, A. K. Swan, M. S. Unlu, B. B. Goldberg, R. Saito, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*.
- [81] S. D. M. Brown, A. Jorio, P. Corio, M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, K. Kneipp, *Phys. Rev. B* **2001**, *63*.
- [82] J. Maultzsch, S. Reich, C. Thomsen, *Phys. Rev. B* **2001**, *64*.
- [83] A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, S. G. Kim, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, G. E. Scuseria, D. Tomanek, J. E. Fischer, R. E. Smalley, *Science* **1996**, *273*, 483-487.
- [84] L. A. Girifalco, M. Hodak, R. S. Lee, *Phys. Rev. B* **2000**, *62*, 13104-13110.
- [85] G. R. Dieckmann, A. B. Dalton, P. A. Johnson, J. Razal, J. Chen, G. M. Giordano, E. Munoz, I. H. Musselman, R. H. Baughman, R. K. Draper, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1770-1777.
- [86] N. W. S. Kam, Z. Liu, H. J. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12492-12493.
- [87] M. Zheng, A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson, N. G. Tassi, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 338-342.
- [88] R. R. Johnson, A. T. C. Johnson, M. L. Klein, *Small* **2010**, *6*, 31-34.
- [89] M. Zheng, A. Jagota, M. S. Strano, A. P. Santos, P. Barone, S. G. Chou, B. A. Diner, M. S. Dresselhaus, R. S. McLean, G. B. Onoa, G. G. Samsonidze, E. D. Semke, M. Usrey, D. J. Walls, *Science* **2003**, *302*, 1545-1548.
- [90] J. F. Campbell, I. Tessmer, H. H. Thorp, D. A. Erie, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10648-10655.
- [91] G. Dukovic, M. Balaz, P. Doak, N. D. Berova, M. Zheng, R. S. McLean, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9004-9005.
- [92] S. Manohar, T. Tang, A. Jagota, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 17835-17845.
- [93] R. R. Johnson, A. T. C. Johnson, M. L. Klein, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 69-75.
- [94] J. Guo, J. Y. Ju, N. J. Turro, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3115-3125.
- [95] 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.
- [96] R. B. Martin, L. W. Qu, Y. Lin, B. A. Harruff, C. E. Bunker, J. R. Gord, L. F. Allard, Y. P. Sun, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 11447-11453.
- [97] R. Chitta, A. S. D. Sandanayaka, A. L. Schumacher, L. D'Souza, Y. Araki, O. Ito, F. D'Souza, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6947-6955.
- [98] J. P. Casey, S. M. Bachilo, R. B. Weisman, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1510-1516.
- [99] B. F. Pan, D. X. Cui, C. S. Ozkan, M. Ozkan, P. Xu, T. Huang, F. T. Liu, H. Chen, Q. Li, R. He, F. Gao, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 939-944.
- [100] D. X. Cui, B. F. Pan, H. Zhang, F. Gao, R. Wu, J. P. Wang, R. He, T. Asahi, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7996-8001.
- [101] P. W. Fowler, A. Ceulemans, *J. Phys. Chem.-Us* **1995**, *99*, 508-510.
- [102] A. Ahmad, K. Kern, K. Balasubramanian, *ChemPhysChem.* **2009**, *10*, 905-909.

- [103] D. Baskaran, J. W. Mays, X. P. Zhang, M. S. Bratcher, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6916-6917.
- [104] A. S. D. Sandanayaka, R. Chitta, N. K. Subbaiyan, L. D'Souza, O. Ito, F. D'Souza, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13425-13432.
- [105] R. H. Yang, J. Y. Jin, Y. Chen, N. Shao, H. Z. Kang, Z. Xiao, Z. W. Tang, Y. R. Wu, Z. Zhu, W. H. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8351-8358.
- [106] Y. Liu, Y. Wang, J. Jin, H. Wang, R. Yang, W. Tan, *Chem. Commun.* **2009**, 665-667.
- [107] Y. R. Lu, S. Bangsaruntip, X. R. Wang, L. Zhang, Y. Nishi, H. J. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3518-3519.
- [108] A. A. Talin, P. M. Dentinger, F. E. Jones, S. Pathak, L. Hunter, F. Leonard, A. M. Morales, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2004**, *22*, 3107-3111.
- [109] C. Staii, A. T. Johnson, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1774-1778.
- [110] Z. Liu, S. Tabakman, K. Welsher, H. J. Dai, *Nano Res.* **2009**, *2*, 85-120.
- [111] K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 627-633.
- [112] A. Bianco, K. Kostarelos, C. D. Partidos, M. Prato, *Chem. Commun.* **2005**, 571-577.
- [113] K. Y. Zhuang Liu, Shuit-Tong Lee, *J. Mater. Chem.* **2010**, *21*, 586-598.
- [114] C. J. Gannon, P. Cherukuri, B. I. Yakobson, L. Cognet, J. S. Kanzius, C. Kittrell, R. B. Weisman, M. Pasquali, H. K. Schmidt, R. E. Smalley, S. A. Curley, *Cancer* **2007**, *110*, 2654-2665.
- [115] A. Casey, E. Herzog, F. M. Lyng, H. J. Byrne, G. Chambers, M. Davoren, *Toxicol. Lett.* **2008**, *179*, 78-84.
- [116] R. H. Wang, C. Mikoryak, S. Y. Li, D. Bushdiecker, I. H. Musselman, P. Pantano, R. K. Draper, *Mol. Pharmaceut.* **2011**, *8*, 1351-1361.
- [117] L. Dong, K. L. Joseph, C. M. Witkowski, M. M. Craig, *Nanotechnology* **2008**, *19*.
- [118] N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, H. J. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6850-6851.
- [119] H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J. P. Briand, M. Prato, S. Muller, A. Bianco, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 3003-3003.
- [120] M. L. Schipper, N. Nakayama-Ratchford, C. R. Davis, N. W. S. Kam, P. Chu, Z. Liu, X. M. Sun, H. J. Dai, S. S. Gambhir, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 216-221.
- [121] P. Wu, X. Chen, N. Hu, U. C. Tam, O. Blixt, A. Zettl, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5022-5025.
- [122] Z. Liu, C. Davis, W. B. Cai, L. He, X. Y. Chen, H. J. Dai, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1410-1415.
- [123] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sensor. Actuat. B Chem.* **1999**, *54*, 3-15.
- [124] R. W. Wood, *Proc. Phys. Soc. London* **1902**, *18*, 269.
- [125] Kretschm.E, H. Raether, *Z. Naturforsch. Pt. A* **1968**, *A 23*, 2135-&.
- [126] A. Otto, *Z. Phys.* **1968**, *216*, 398-&.
- [127] I. Pockrand, J. D. Swalen, J. G. Gordon, M. R. Philpott, *Surf. Sci.* **1978**, *74*, 237-244.
- [128] J. G. Gordon, S. Ernst, *Surf. Sci.* **1980**, *101*, 499-506.
- [129] C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind, *Sensor. Actuator.* **1982**, *3*, 79-88.
- [130] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, *Sensor. Actuator.* **1983**, *4*, 299-304.
- [131] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, R1-R9.
- [132] O. S. H. Wolfbeis, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Vol. 4*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2006**.
- [133] R. Yang, J. Jin, Y. Shao, H. Kang, Z. Xiao, Z. Tang, Y. Wu, Z. Zhu, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8351-8358.
- [134] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [135] V. L. Malinowski, D. Wenger, R. Häner, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 410-422.
- [136] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2009**, 2615-2624.
- [137] T. J. Bandy, A. Brewer, J. R. Burns, G. Marth, ThaoNguyen, E. Stulz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 138-148.
- [138] M. E. Ostergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771-5788.
- [139] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11551-11558.

8. Literaturverzeichnis

- [140] G. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226-6236.
- [141] C. K. McLaughlin, G. S. Hamblin, H. F. Sleiman, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5647-5656.
- [142] G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2391-2402.
- [143] Y. Takezawa, M. Shionoya, *Acc. Chem. Res.* **2012**, ASAP.
- [144] W. Schmucker, H.-A. Wagenknecht, *Synlett*, angenommen.
- [145] Y. G. Yao, C. Q. Feng, J. Zhang, Z. F. Liu, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1673-1677.
- [146] C. Beyer, H. A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2752-2755.
- [147] H. Maeda, Y. Nanai, K. Mizuno, J. Chiba, S. Takeshima, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8990-8993.
- [148] Y. Avlasevich, C. Kohl, K. Mullen, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1053-1057.
- [149] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- [150] A. Weller, *Z. Phys. Chem. Neue Fol.* **1982**, *133*, 93-98.
- [151] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541.
- [152] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- [153] C. Beyer, Dissertation, *Synthesis and characterization of photoswitchable building blocks based on spirobenzopyrans and new approaches for postsynthetic oligonucleotide labeling*, Universität Regensburg (Regensburg), Institut für Organische Chemie, **2010**.
- [154] A. P. Lam, D. A. Dean, *Gene Ther.* **2010**, *17*, 439-447.
- [155] L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Alvarez, *Gene Ther.* **2005**, *12*, 1734-1751.
- [156] S. B. Zhang, Y. A. Zhao, B. D. Zhao, B. Wang, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1003-1009.
- [157] Y. Gao, X. L. Liu, X. R. Li, *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 1017-1025.
- [158] B. F. Canine, A. Hatefi, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2010**, *62*, 1524-1529.
- [159] L. Casettari, D. Vllasaliu, E. Castagnino, S. Stolnik, S. Howdle, L. Illum, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 659-685.
- [160] Y. W. Cho, J. D. Kim, K. Park, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 721-734.
- [161] A. R. Maranto, *Science* **1982**, *217*, 953-955.
- [162] J. H. Sandell, R. H. Masland, *J. Histochem. Cytochem.* **1988**, *36*, 555-559.
- [163] J. Lübke, *Micros. Res. Techniq.* **1993**, *24*, 2-14.
- [164] M. Malatesta, M. Giagnacovo, M. Costanzo, B. Conti, I. Genta, R. Dorati, V. Galimberti, M. Biggiogera, C. Zancanaro, *Eur. J. Histochem.* **2012**, *56*, 123-128.
- [165] 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.
- [166] C. Meisslitzer-Ruppitsch, M. Vetterlein, H. Stangl, S. Maier, J. Neumuller, M. Freissmuth, M. Pavelka, A. Ellinger, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 407-419.
- [167] 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.
- [168] C. Meisslitzer-Ruppitsch, C. Rohrl, J. Neumuller, M. Pavelka, A. Ellinger, *J. Microsc.-Oxford* **2009**, *235*, 322-335.
- [169] J. E. Natera, W. A. Massad, F. Amat-Guerri, N. A. Garcia, *J. Photoch. Photobio. A* **2011**, *220*, 25-30.
- [170] M. R. Nateghi, M. H. Mosslemin, H. Hadjimohammadi, *React. Funct. Polym.* **2005**, *64*, 103-109.
- [171] C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64-71.
- [172] R. H. E. Hudson, A. Ghorbani-Choghamarani, *Synlett* **2007**, 870-873.
- [173] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- [174] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [175] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [176] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [177] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.

- [178] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
- [179] C. He, Q. G. He, Q. Chen, L. Shi, H. M. Cao, J. G. Cheng, C. M. Deng, T. Lin, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1317-1321.
- [180] H. W. Rhee, C. R. Lee, S. H. Cho, M. R. Song, M. Cashel, H. E. Choy, Y. J. Seok, J. I. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 784-+.
- [181] Nasielsk.J, Kirschde.A, *Tetrahedron* **1973**, *29*, 3153-3157.
- [182] C. Fantini, J. Cassimiro, V. S. T. Peressinotto, F. Plentz, A. G. Souza, C. A. Furtado, A. P. Santos, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *473*, 96-101.
- [183] C. Oelsner, C. Schmidt, F. Hauke, M. Prato, A. Hirsch, D. M. Guldi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4580-4586.
- [184] V. A. Karachevtsev, A. Y. Glamazda, A. M. Plokhotnichenko, V. S. Leontiev, A. S. Linnik, *Materialwiss. Werkst.* **2011**, *42*, 41-46.
- [185] M. S. Strano, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. J. O'Connell, E. H. Haroz, J. Hubbard, M. Miller, K. Rialon, C. Kittrell, S. Ramesh, R. H. Hauge, R. E. Smalley, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6979-6985.
- [186] S. R. Vogel, M. M. Kappes, F. Hennrich, C. Richert, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1815-1820.
- [187] G. Ghini, L. Lascialfari, C. Vinattieri, S. Cicchi, A. Brandi, D. Berti, F. Betti, P. Baglioni, M. Mannini, *Soft Matter* **2009**, *5*, 1863-1869.
- [188] M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. N. Miller, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1997**, 1051-1058.
- [189] H. Cathcart, S. Quinn, V. Nicolosi, J. M. Kelly, W. J. Blau, J. N. Coleman, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 66-74.
- [190] H. Qian, P. T. Araujo, C. Georgi, T. Gokus, N. Hartmann, A. A. Green, A. Jorio, M. C. Hersam, L. Novotny, A. Hartschuh, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2706-2711.
- [191] H. Cathcart, V. Nicolosi, J. M. Hughes, W. J. Blau, J. M. Kelly, S. J. Quinn, J. N. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12734-12744.
- [192] F. Schoppler, C. Mann, T. C. Hain, F. M. Neubauer, G. Privitera, F. Bonaccorso, D. P. Chu, A. C. Ferrari, T. Hertel, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 14682-14686.
- [193] X. W. Tang, S. Bansarutip, N. Nakayama, E. Yenilmez, Y. L. Chang, Q. Wang, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1632-1636.
- [194] S. Basuray, S. Senapati, A. Aijian, A. R. Mahon, H. C. Chang, *Acs Nano* **2009**, *3*, 1823-1830.
- [195] E. S. Jeng, J. D. Nelson, K. L. J. Prather, M. S. Strano, *Small* **2010**, *6*, 40-43.
- [196] Y. Chen, H. P. Liu, T. Ye, J. Kim, C. D. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8696-+.
- [197] S. Ghosh, E. Defrancq, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12780-12787.
- [198] H. Yang, K. L. Metera, H. F. Sleiman, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2403-2415.
- [199] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025-1029.
- [200] W. Bannwarth, W. Pfliederer, F. Muller, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1991-1999.
- [201] K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023-4037.
- [202] S. Nokhrin, M. Baru, J. S. Lee, *Nanotechnology* **2007**, *18*.
- [203] H. Weizman, Y. Tor, *Chem. Commun.* **2001**, 453-454.
- [204] P. H. Kevin E. Riley, *Acc. Chem. Res.* **2012**, ASAP.
- [205] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, *299*, 1212-1213.
- [206] G. H. Clever, S. J. Reitmeier, T. Carell, O. Schiemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4927-4929.
- [207] H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3204-3206.
- [208] T. Ehenschwender, Dissertation, *Funktionalisierte Oligonukleotide–Fluoreszenzsonden, Metallkomplex-Konjugate und Ladungstransfer*, Universität Regensburg (Regensburg), Institut für Organische Chemie, **2011**.
- [209] F. Babudri, A. Cardone, C. T. Cioffi, G. M. Farinola, F. Naso, R. Ragni, *Synthesis-Stuttgart* **2006**, 1325-1332.

8. Literaturverzeichnis

- [210] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069.
- [211] N. Joubert, R. Pohl, B. Klepetarova, M. Hocek, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6797-6805.
- [212] K. Sone, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5207-5211.
- [213] G. A. Webb, *Vol. Vol 1* (Ed.: Springer-Verlag), **2006**.
- [214] F. H. Gerson, Walter, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2003**.
- [215] S. Van Doorslaer, I. Caretti, I. A. Fallis, D. M. Murphy, *Coordin. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2116-2130.
- [216] N. D. Jordanov, M. Stankova, D. Shopov, *Chem. Phys. Lett.* **1976**, *39*, 174-176.
- [217] T. Premkumar, K. E. Geckeler, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 515-529.
- [218] M. Liu, Q. A. Zhang, H. M. Zhao, S. Chen, H. T. Yu, Y. B. Zhang, X. Quan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4084-4086.
- [219] Y. W. Hu, F. H. Li, X. X. Bai, D. Li, S. C. Hua, K. K. Wang, L. Niu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1743-1745.
- [220] H. A. Becerril, J. Mao, Z. Liu, R. M. Stoltenberg, Z. Bao, Y. Chen, *Acs Nano* **2008**, *2*, 463-470.
- [221] K. Hünig, Märkl, Sauer, *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*, **2007**.
- [222] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [223] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

9. Anhang

Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name	Wolfgang Josef Schmucker
Adresse:	Ellerweg 23, 92648 Vohenstrauß
E-Mail-Adresse:	wolfgang.schmucker@kit.edu
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung/Studium

2008 - 2012	Promotionsstudium der Chemie an der Universität Regensburg weiterhin am Karlsruhe Institut für Technologie
2003 - 2008	Studium der Chemie an der Universität Regensburg (Abschluss: Diplom, Note: 1,7)
1994-2003	Kepler-Gymnasium, Weiden (Abschluss: Abitur, Note: 1,7)
1990-1994	Grundschule Vohenstrauß

Publikationsliste

W. Schmucker, H.-A. Wagenknecht, Organic chemistry of DNA functionalization, *Synlett*, accepted

9. Anhang

Konferenzen, Workshops und Posterbeiträge

- 06/2009 4th Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) Symposium, Odense, Posterbeitrag: *“Investigation of interactions between SWNTs and modified DNA”*
- 07/2009 Summer meeting GRK 640, Roding, Vortrag und Posterbeitrag: *„Multichromophoric DNA and their interactions with single walled carbon nanotubes”*
- 09/2009 Vielberth-Symposium on Functional Nucleic Acids, Regensburg
- 10/2010 Workshop GRK 1570, St. Englmar Vortrag und Posterbeitrag: *„Interactions between SWCNTs and pyrene-modified DNA“*
- 11/2011 5th Nucleic Acid Chemistry Meeting, Frankfurt, Posterbeitrag: *“Influence of pyrene modified DNA on the binding behaviour to single wall carbon nanotubes”*

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Karlsruhe den 04.September 2012

Wolfgang Schmucker