

# **Assemblierung von Ethynylnilrot und Ethynylpyren mithilfe von DNA und Pyrrolidinyl-PNA**

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

**Dipl.-Chem. Sabrina Sezi**

aus Röttenbach

**Karlsruhe, 2013**

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent: Prof. Dr. Michael A. R. Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2013



*Meiner ganzen Familie*



*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas,  
in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,  
wieder wegzuwerfen.*

**Albert Einstein**



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2009 bis Oktober 2010 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg, weiterhin von November 2010 bis November 2013 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, sowie für die wissenschaftlichen Freiheiten und die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Des Weiteren möchte ich mich vor allem für die Unterstützung und die vielen hilfreichen Gespräche bedanken.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Dr. Jochen Bürck, Bianca Posselt und Dr. Dirk Windisch (*IBG2, KIT*) am Arbeitskreis von Prof. Dr. Anne Ulrich für die umfangreiche Unterstützung bei den Messungen der CD-Spektren und das tolle Arbeitsklima.
- Tirayut Vilaivan (*Department of Chemistry, Chulalongkorn University*) für die Synthese der PNA und die gute Zusammenarbeit.
- Claudia Stubinitzky für die schnelle Messung der AFM-Proben.
- Frau Weck und vor allem Frau Sommer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen, sowie die vielen netten Gespräche.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die zuverlässige Messung der 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 und Angelika Kernert für die Anfertigung der Massenspektren am KIT, sowie Annette Hochgesand für die MALDI-Massen.
- Daniel Lachmann, Michaela Lutz und Andreas Dittmer für die große Hilfe bei der Synthese, sowie meiner Forschungspraktikantin Heidi Walter für das viele geduldige Pipettieren.
- Sebastian Barrois und Effi Bätzner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Meinen Kollegen Stefanie Arndt, Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Dr. Sina Berndl, Dr. Christoph Beyer, Peggy Bohländer, Andreas Dittmer, Dr. Thomas Ehenschwender, Philipp Ensslen, Nadine Gaß, Annette Hochgesand, Dr. Carolin Holzhauser, Daniel Lachmann, Dr. Florian Menacher, Marcus Merkel, Alexander Penner, Dr. Christa Prunkl, Barbara Reiß, Dr. Moritz Rubner, Dr. Wolfgang Schmucker, Claudia Stubinitzky, Dr. Reji Varghese, Heidi Walter, Dr. Michael Weinberger, Christian Wellner, Dr. Ulrike Wenge, Martin Weiser und Kilian Wüst für die gute Zusammenarbeit, die tolle Arbeitsatmosphäre, den Zusammenhalt und die schönen Jahre im AK Wagenknecht.
- Meinen Laborkollegen Christoph, Kreisl und Wolle, für ihre unkomplizierte, ehrliche Art und die schöne Zeit im und vor allem außerhalb des Labors.
- Den anderen "Exil-Regensburgern":
- Effi, Claudia, Caro, Barry, Wolle, Tom, Kreisl, und Alex. Vielen Dank für die aufbauenden Worte, die Hilfe bei wissenschaftlichen und vor allem nicht wissenschaftlichen Problemen, das Einführen der bayerischen Kultur und die vielen schönen Abende. Dank euch hatte ich das Gefühl, dass ich auch in Karlsruhe immer ein Stück Heimat dabei habe und niemals alleine bin.
- Susa, Paul, Josef, Vroni, Hanni, Andi H., Andi K., Sanne, Doris, Sabine und Bernd, für all die wunderschöne Zeit im und nach dem Studium. Die gemeinsamen Urlaube, Ausflüge, Wein-und-Käse-Abende, sowie eure Besuche in Karlsruhe werden für mich immer unvergessen bleiben. Vielen Dank, dass ihr so treue und tolle Freunde seid.



- Michl, Patricia, Leo, Öpf, Inken, Franzi, Kuss, Silvi, Benni, Piwi und Ness, für eure Freundschaft und die vielen schönen Stunden in Karlsruhe, München, Mannheim, Stuttgart, Zwiesel, Erlangen und Regensburg.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Uli bedanken, der immer für mich da war um mir Ausgeglichenheit und Kraft zu geben und mich sowohl abends vor dem Einschlafen, als auch morgens nach dem Aufstehen zum Lachen bringt!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner ganzen Familie für die Unterstützung und das ehrliche Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Vor allem bei meinen Eltern, die mein Wohl stets vor ihr eigenes gestellt haben. Dank euch werde ich immer Rückhalt und ein Zuhause haben!



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung.....	1
2	Pyren und Nilrot als Energietransfer-Paar in DNA: Hintergrund.....	6
2.1	Grundlagen der optischen Spektroskopie.....	6
2.2	Einbau und Orientierung von Farbstoffen in DNA.....	12
2.3	(PyrrolidinyI)-PNA als Oligonukleotidanalogen .....	24
2.3.1	Vor- und Nachteile der Peptidnukleinsäuren.....	24
2.3.2	PNA-Struktur.....	25
2.3.3	PNA-Modifikationen .....	27
3	Ethynylpyren und Ethynylnilrot als Basen-modifikationen am 2'-Desoxyuridin .....	32
3.1	Ethynylpyren als Basenmodifikation .....	32
3.2	DNA-Systeme mit Ethynylpyren und Ethynylnilrot.....	36
3.3	DNA/PNA-Hybride mit Ethynylpyren und Ethynylnilrot .....	41
3.3.1	Synthese und Sequenzdesign .....	42
3.3.2	Spektroskopische Untersuchungen .....	45
3.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	53
4	Ethynylnilrot als Basenmodifikation am 7-Desazaadenin.....	54
4.1	7-Desaza-2'-desoxypurine als artifizielle Nukleobasen.....	54
4.2	Nilrot-7-desaza-2'-desoxyadenosin als komplementäre Base zu Pyren-2'-desoxyuridin.....	61
4.2.1	Synthese und Sequenzdesign .....	62
4.2.2	Spektroskopische Untersuchungen .....	65
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	73
5	DNA als Templat.....	75
5.1	Wege, Einschränkungen und Alternativen zu farbstoffmodifizierten Oligonukleotiden .....	75
5.2	Entwicklung eines Systems aus Fluorophoren und Templat-DNA .....	84

5.2.1	Synthese und Sequenzdesign .....	85
5.2.2	Variation der Anlagerungsbedingungen.....	86
5.2.3	Variation des Templat-DNA-Strangs.....	94
5.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	114
6	Zusammenfassung.....	116
7	Experimenteller Teil .....	121
7.1	Organische Synthese: Materialien, Geräte und Methoden .....	121
7.2	Synthesevorschriften .....	123
7.2.1	Darstellung des nilrotmodifizierten Uridin-Bausteins 7 .....	123
7.2.2	Darstellung des nilrotmodifizierten Desazaadenosin-Bausteins 19.....	126
7.3	Oligonukleotide.....	131
7.3.1	Allgemeines .....	131
7.3.2	Synthese und Charakterisierung.....	132
7.3.3	Verwendete DNA- und PNA-Stränge .....	136
7.3.4	Optische Spektroskopie .....	139
8	Literaturverzeichnis .....	142
9	Anhang.....	149

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
Å	Angstrøm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	circular dichroism
$c_{\text{End}}$	Endkonzentration
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
$\delta$	chemische Verschiebung
d	Dublett
DCM	Dichlormethan
d.h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
dU	2'-Desoxyuridin
eq	Äquivalent
exc	Anregung ( <i>excitation</i> )
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FC	<i>Flash-Säulenchromatographie</i>
FRET	resonante Fluoreszenzenergietransfer
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
$J$	Kopplungskonstante

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\lambda$	Wellenlänge
LM	Lösungsmittel
M	molar, mol/L
m	Multipllett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation
max.	maximal
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
mind.	mindestens
$\mu$ L	Mikroliter
mL	Milliliter
$\mu$ M	mikromolar
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
Nr	Nilrot
ns	Nanosekunden
p.A.	für Analyse ( <i>pro analysi</i> )
PNA	Peptidnukleinsäure
ppm	<i>parts per million</i>
Py- $\equiv$ -dU	5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-desoxyuridin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SNP	Einzelbasen-Punktmutation ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
sog.	sogenannt
IV	

---

$\theta$	chiraler Winkel
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammonium Fluorid
THF	Tetrahydrofuran
$T_m$	Schmelztemperatur
TMS	Trimethylsilyl
U	Uracil
usw.	und so weiter
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190 – 800 nm)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

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

<sup>1</sup> *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

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



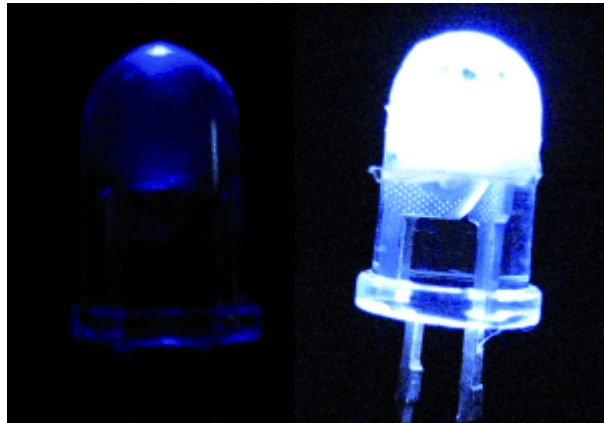


# 1 Einleitung und Themenstellung

Bei der Entwicklung der nächsten Generation von optoelektronischen Geräten und Sensoren entfernen sich die Methoden immer mehr von der klassischen Miniaturisierung durch verbesserte Herstellungsverfahren. Im Gegensatz zu diesen sogenannten „top-down“- Ansätzen ist es mittlerweile möglich, optoelektronische Bauteile, wie zum Beispiel Leuchtdioden, auch über „bottom up“-Verfahren herzustellen. Bei diesen arbeitet man sich von sehr kleinen zu immer größer werdenden Strukturen hoch. Deshalb ist es notwendig, das verwendete photoaktive Material reproduzierbar und mit hoher Präzision auch im Nanometerbereich anordnen zu können.<sup>[1]</sup> Eine Möglichkeit hierfür besteht in der Verwendung von Templaten als strukturgebendem Gerüst für die Aneinanderreihung der einzelnen funktionellen Bausteine. Als solches eignet sich DNA ganz hervorragend, da sie durch den Aufbau aus Adenosin, Guanosin, Thymidin und Cytidin selektive Anknüpfstellen für Wasserstoffbrückenbindungen, sowie eine definierte zweidimensionale Doppelstrangstruktur besitzt. Einige Arbeitsgruppen machten sich diese Eigenschaften bereits zur Entwicklung von DNA-basierten photonischen Drähten zu Nutze. Die ersten, die Oligonukleotide als Template zur Herstellung solcher photonischen Arrays verwendeten waren *Kawahara, Uchimarū* und *Murata* im Jahre 1999.<sup>[2]</sup> Dem folgten weitere Beispiele von *Ohya et al.*,<sup>[3]</sup> *Heilemann et al.*<sup>[4]</sup> und *Tong et al.*<sup>[5]</sup> All diesen Ansätzen ist gemein, dass die für den Energietransfer verwendeten Chromophore kovalent mit den Oligonukleotiden verbunden werden. Kürzlich entwickelten *Schenning et al.*<sup>[6]</sup> ein neues Konzept zur Anlagerung von Fluorophoren an ein einzelsträngiges DNA-Templat über Wasserstoffbrückenbindungen. Entlang dieses eindimensionalen photonischen Drahtes findet ein Energietransfer statt, ohne dass ein komplementärer Gegenstrang zur Anordnung der Chromophore notwendig ist.

DNA findet jedoch nicht nur als photonischer Draht, sondern auch in anderen optoelektronischen Bereichen Anwendung, z.B. in Form von dünnen Filmen. Eines der beeindruckendsten Beispiele stammt von *Sotzing et al.*. Diese konnten zeigen, dass Nanofasern aus einer DNA-Matrix und darin eingebetteten Farbstoffen UV-Licht

in weißes Licht umwandeln, wenn sie sich in einer Licht-emittierende Diode (LED) befinden (Abb. 1).



**Abb. 1:** Photographie einer 400-nm UV LED ohne (links) und mit (rechts) Weißlicht-emittierenden DNA Nanofasern.

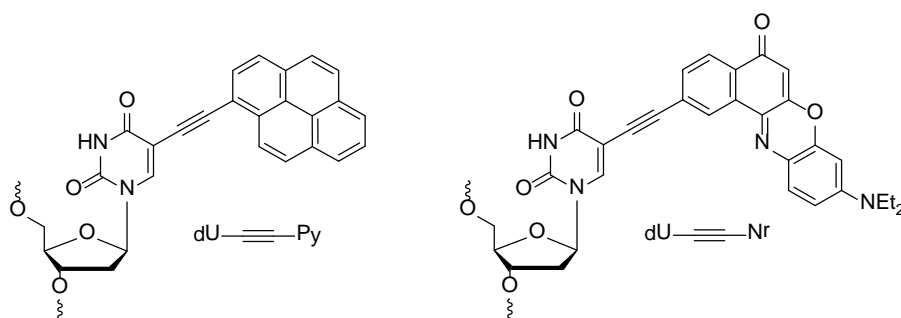
All diese Materialien stehen jedoch erst am Anfang ihrer Entwicklung. Für weitere Fortschritte auf diesem Gebiet ist es wichtig, die Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Chromophoren, vor allem auf molekularer Ebene, zu verstehen. Außerdem sollte das bisherige Spektrum an Systemen zur DNA-basierten Anordnung von Chromophoren erweitert werden, um neue Anwendungen zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Bewältigung dieser Herausforderungen leisten.

## Themenstellung

In den ersten beiden Teilen dieser Arbeit sollen mit Pyren und Nilrot funktionalisierte Oligonukleotide synthetisiert und untersucht werden, um ein besseres Verständnis von den Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Chromophoren zu bekommen. Der dritte Teil beschäftigt sich mit der Anlagerung von Pyren-Nukleosiden an einzelsträngige DNA-Template.

### Ethynylpyren und Ethynylnilrot als Basenmodifikationen am 2'-Desoxyuridin

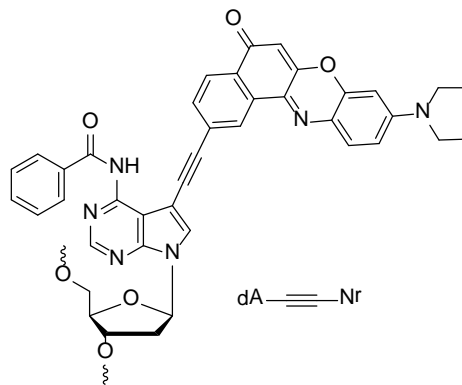
Für die Anwendung von chromophormodifizierten Oligonukleotiden in Bereichen wie der Bioanalytik oder der Optoelektronik ist es wichtig, die photophysikalischen Wechselwirkungen zwischen zwei Farbstoffen als der kleinsten funktionellen Einheit dieser Systeme zu verstehen. Daher sollen Ethynylpyren und Ethynylnilrot im ersten Teil dieser Arbeit mit zwei benachbarten Uracilbasen eines DNA-Einzelstrangs verknüpft und der zwischen ihnen stattfindende Energietransfer untersucht werden. Dazu werden die mit  $\text{Py}\equiv\text{dU}$  und  $\text{Nr}\equiv\text{dU}$  (siehe Abb. 2) modifizierten Oligonukleotide mit komplementären oder fehlgepaarten Gegensträngen von DNA oder PNA hybridisiert. Anschließend werden die optischen Eigenschaften der DNA-Duplexe und der PNA/DNA-Hybride miteinander verglichen. Aus den gewonnenen Erkenntnissen soll abgeleitet werden, welchen Einfluss verschiedene Faktoren auf den Energietransfer zwischen Ethynylpyren und Ethynylnilrot haben.



**Abb. 2:** Struktur von  $\text{Py}\equiv\text{dU}$  und  $\text{Nr}\equiv\text{dU}$  nach dem Einbau in Oligonukleotide.

## Ethynylnilrot als Basenmodifikation am 7-Desazaadenin

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollen die beiden artifiziellen Nucleoside Py-≡-dU (Abb. 2) und Nr-≡-dA (Abb. 3) als vermutlich komplementäres Basenpaar in Oligonucleotide eingebaut werden. Dafür wird Ethynylnilrot zuerst mit der C7-Position von 7-Desaza-2'-desoxyadenosin verknüpft und anschließend als Phosphoramiditbaustein in Oligonucleotide eingeführt. Diese werden danach mit komplementären ethynylpyrenmodifizierten Einzelsträngen hybridisiert. Mit Hilfe von Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie sowie Schmelztemperaturmessungen sollen die Eigenschaften dieser Duplexe und die von einfach mit Nr-≡-dA modifizierten Doppelsträngen charakterisiert werden. Zusätzlich soll festgestellt werden, ob ein Energietransfer von Pyren auf Nilrot auch möglich ist, wenn die beiden Chromophore mit komplementären Basen verknüpft sind und welche Faktoren diesen Energietransfer gegebenenfalls beeinflussen.



**Abb. 3:** Struktur von Nr-≡-dA nach dem Einbau in Oligonucleotide.

### Entwicklung eines Systems aus Fluorophoren und Templat-DNA

Im dritten Teil sollen Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside über komplementäre Basenpaarung an die 2'-Desoxyadenosineinheiten eines einzelsträngigen DNA-Templats angelagert werden. Dafür sollen zunächst einzelne Parameter wie z.B. Temperatur und Lösungsmittel für die spektroskopischen Messungen optimiert werden. Außerdem soll sich die Wechselwirkung der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore mit dem Templat-DNA-Strang klar von der mit einem nicht komplementären Kontroll-DNA-Strang unterscheiden lassen. Anschließend sollen die Eigenschaften der entlang des komplementären Stranges angelagerten Py- $\equiv$ -dU-Moleküle mit denen kovalent in Oligonukleotide eingebauter Farbstoffaggregate verglichen werden. Dieser Vergleich soll zeigen, ob der nicht kovalente Ansatz eine Alternative zu ethinylpyrenmodifizierten Oligonukleotiden darstellt.

## 2 Pyren und Nilrot als Energietransfer-Paar in DNA: Hintergrund

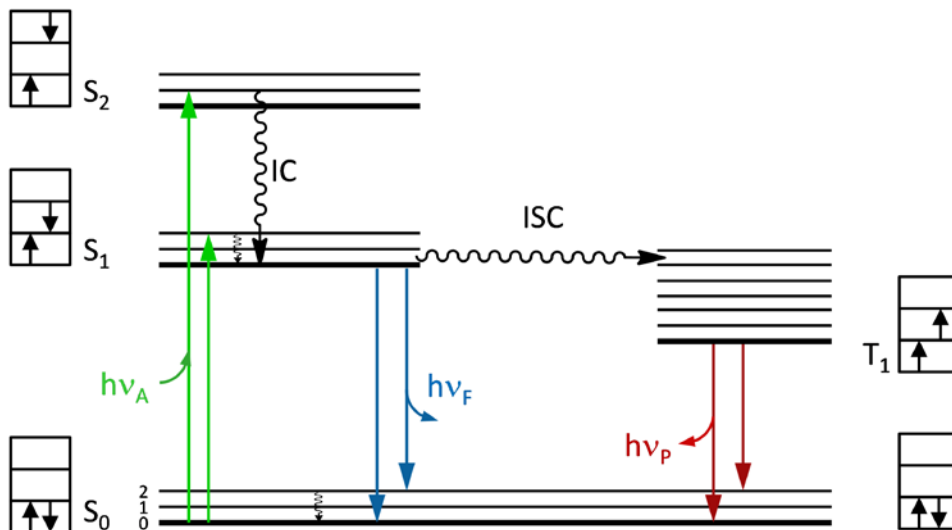
### 2.1 Grundlagen der optischen Spektroskopie

#### Elektronische Übergänge

Das Verhalten von Fluorophoren nach Anregung durch Licht sowie die Wechselwirkung von Chromophoren untereinander erfordert Kenntnisse der zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Prozesse. Nimmt ein Molekül Licht auf, so wird ein Elektron aus einem Molekülorbital des Grundzustands, genannt  $S_0$ , in ein unbesetztes, energetisch höher liegendes Orbital, z.B.  $S_1$  oder  $S_2$ , überführt (Absorption). Der elektronische Übergang erfolgt hierbei hauptsächlich aus dem Schwingungsgrundzustand, da dieser nach der Boltzmann-Verteilung bei Raumtemperatur von den meisten Molekülen besetzt wird. Mit einer Geschwindigkeit von  $10^{-15}$  s findet die Absorption schneller als alle anderen, nachfolgenden Prozesse statt, deshalb verändert sich die Position der Atomkerne während dieser Zeit nicht (Franck-Condon Prinzip).<sup>[7]</sup> Nachfolgende Prozesse können sowohl strahlende, als auch strahlungslose Relaxation, sowie *internal conversion* (IC) und *intersystem crossing* (ISC) sein. All diese werden anschaulich in Abb. 4 dem sog. Jablonski-Diagramm dargestellt.<sup>[8]</sup>

Als Fluoreszenz bezeichnet man normalerweise den Übergang von  $S_1$  nach  $S_0$ . Diese strahlende Relaxation ist unabhängig von der Anregungswellenlänge, da sie aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands erfolgt (*Kasha-Regel*).<sup>[9]</sup> Dieser wird aus energetisch höher liegenden Zuständen, durch einen strahlungslosen Übergang gleicher Spinmultiplizität (*internal conversion*) und durch Schwingungsrelaxation erreicht. Fluorophore in Lösung emittieren Licht bei einer höheren Wellenlänge als die der Absorption. Diese Regel wird *Stokes-Regel*<sup>[10]</sup> genannt und resultiert aus dem Energieverlust im angeregten Zustand durch strahlungslose Relaxation. Als Stokes-Verschiebung bezeichnet man den Abstand zwischen dem Maximum der energieärmsten Absorptionsbande und dem Maximum der Fluoreszenz gemessen in Wellenlängen oder Wellenzahlen.

Die zweite Möglichkeit für angeregte Moleküle, Energie in Form von Strahlung abzugeben, nennt man Phosphoreszenz. Damit wird üblicherweise die spinverbotene Relaxation vom  $T_1$  in den  $S_0$  Zustand bezeichnet. Dieser geht ein strahlungsloser Übergang zwischen elektronischen Zuständen verschiedener Spinmultiplizitäten, genannt *intersystem crossing*, voraus.



**Abb. 4:** Jablonski Diagramm zur Darstellung der elektronischen Übergänge. A = Absorption, F = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz, ISC = intersystem crossing, IC = internal conversion; S = Singulett-Zustand, T = Triplett-Zustand. Unbeschriftete, schwarze Pfeile stellen Schwingungsrelaxationen dar.

Neben den Spinmultiplizitäten gibt es noch andere Auswahlregeln für elektronische Übergänge. Betrachtet man z.B. unsubstituiertes Pyren, welches aufgrund seiner planaren, aromatischen Struktur einen hohen Grad an Symmetrie besitzt, so ist bei diesem, der Übergang vom Grund- in den ersten angeregten Singulettzustand symmetrieverboten. Nichtsdestotrotz, kann dieser Übergang mit einem sehr geringen Extinktionskoeffizienten beobachtet werden. Der Grund hierfür sind Schwingungen des Moleküls, die für eine Abweichung von der idealen Symmetrie sorgen (vibronische Kopplung). Normalerweise erfolgt die Anregung allerdings in den zweiten angeregten Zustand. Das ist auch der Grund, warum bei Pyren neben der Fluoreszenz aus dem  $S_1$ -Zustand weitere Emissionen aus höheren energetischen Zuständen, wie  $S_2$  oder  $S_3$ , zu beobachten sind.<sup>[11-12]</sup> Diese treten sowohl in der Gasphase, als auch in Lösung auf.<sup>[13]</sup>

### Wichtige Größen

Die Lebensdauer eines angeregten Zustands ist definiert als die durchschnittliche Zeit, die das Molekül im angeregten Zustand verbringt, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt. Die Lebensdauer des ersten angeregten Singulett-Zustands  $S_1$  ist:

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_S$  kann somit aus den Geschwindigkeitskonstanten für den strahlenden Übergang  $k_r^S$  und den strahlungslosen Übergang  $k_{nr}^S$ , beide von  $S_1$  ausgehend, berechnet werden. Sie hat normalerweise einen Wert von ca.  $10^{-8}$  s. Der angeregte Zustand eines Moleküls in Lösung kann durch seine Umgebung beeinflusst werden. So hat z.B. Pyren bei Raumtemperatur in Ethanol ( $\tau_S = 410$  ns), eine andere Fluoreszenzlebensdauer als in Cyclohexan ( $\tau_S = 450$  ns).<sup>[7]</sup>

Eine weitere wichtige Größe ist die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$ . Sie beschreibt das Verhältnis der Anzahl emittierter Photonen zur Anzahl absorbierter Photonen. Und lässt sich durch folgende Gleichung darstellen:

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S}$$

Den Zusammenhang zwischen der Absorbanz einer Probe und deren Konzentration stellt das *Lambert-Beersche Gesetz* dar:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cd$$

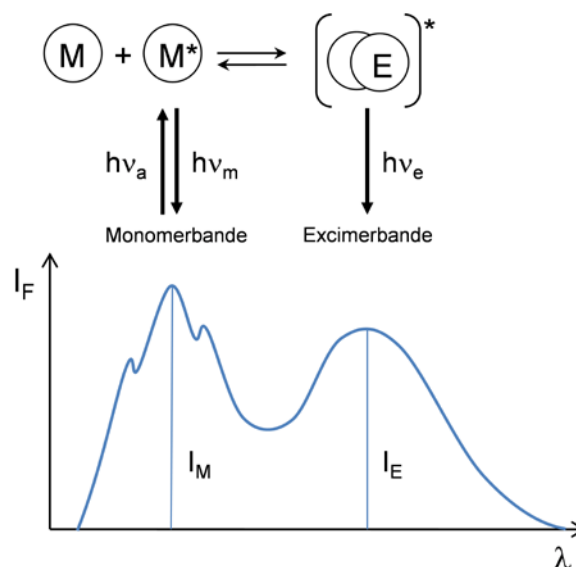
wobei  $A(\lambda)$  die Absorbanz bei einer bestimmten Wellenlänge,  $\varepsilon(\lambda)$  den molaren Absorptionskoeffizienten bei derselben Wellenlänge,  $c$  die Konzentration der absorbierenden Spezies und  $d$  die während der Absorption durchlaufene Strecke bezeichnet. Substanzen mit einem ausgedehnten, konjugierten  $\pi$ -System, wie Pyren und seine Derivate, können bei hohen Konzentrationen in Lösung Aggregate durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausbilden. In diesem Fall kann das obige Gesetz nicht mehr zur Konzentrationsberechnung herangezogen werden, da der lineare Zusammenhang zwischen Absorbanz und Konzentration nicht mehr gegeben ist.



### Excimere und Exciplexe

Die Lebensdauer angeregter Zustände wie dem  $S_1$ - oder  $T_1$ - Zustand ist, verglichen mit der Zeit, die ein Molekül für den Vorgang der Absorption oder der Schwingungsrelaxation benötigt, relativ lang. Daher sind Moleküle im angeregten Zustand in der Lage, Reaktionen einzugehen. Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist die Ausbildung von Dimeren, sog. Excimere (von „**excited dimer**“). Sie entstehen durch Zusammenstoß eines angeregten und eines nicht angeregten identischen Moleküls. Sind die beteiligten Moleküle nicht identisch, spricht man von Exciplexen („**excited complex**“). Da die Ausbildung von Excimeren und Exciplexen über Stöße erfolgt, handelt es sich um einen diffusionskontrollierten Vorgang. Dieser ist erst bei höheren Konzentrationen der beteiligten Spezies zu beobachten und hängt unter anderem von Temperatur und Viskosität des Mediums ab.<sup>[7]</sup>

Aromatische Kohlenwasserstoffe wie Pyren können angeregte Dimere ausbilden. Ein mögliches Fluoreszenzspektrum ist schematisch in Abb. 5 dargestellt. Die Fluoreszenzbande des Excimers liegt bei einer höheren Wellenlänge als die der Monomere und zeigt keine vibronische Feinstruktur. Außerdem ist die Anregungsenergie im Excimer über beide Teilchen delokalisiert.



**Abb. 5:** Schematische Excimerbildung mit zugehöriger Monomer- bzw. Excimerbande.

Der Arbeitskreis um *Masaki Kashiwasake-Jibu* nutzte die Ausbildung von Excimeren durch Pyren zur Visualisierung der DNA-Hybridisierung.<sup>[14]</sup> Zwei kurze DNA-Stränge wurden am 3'- bzw. 5'-Ende kovalent mit Pyren verknüpft. Diese Stränge sind komplementär zu aufeinanderfolgenden Abschnitten der Ziel-DNA. In Abwesenheit

dieser ist nur die strukturierte Emission der Pyren-Monomere bei ca. 400 nm zu sehen. Durch schrittweise Zugabe der Zielsequenz können die pyrenmodifizierten DNA-Sonden mit der Ziel-DNA hybridisieren und die Fluorophore befinden sich in räumlicher Nähe zueinander. Dies lässt sich anhand der sinkenden Monomerfluoreszenz und dem Anstieg der Excimerfluoreszenz bei ca. 500 nm beobachten.

### Resonanter Fluoreszenzenergietransfer

Ein Molekül im angeregten Zustand, kann mit einem anderen Molekül nicht nur Excimere und Exciplexe bilden, sondern auch Energie auf dieses übertragen. Voraussetzung hierfür ist, dass das Emissionsspektrum des Energie-Donors mit dem Absorptionsspektrum des Energie-Akzeptors überlappt.<sup>[15]</sup> Dieser sog. resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET) ist ein strahlungsloser Prozess, findet also ohne die Emission und abschließende Absorption eines Photons statt. Aus diesem Grund wird die Bezeichnung resonanter Energietransfer (RET) gegenüber FRET bevorzugt. Der Energietransfer beruht auf weitreichenden Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donormolekül und Akzeptormolekül. Seine Ratenkonstante ( $k_{FRET}$ ) kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:<sup>[15]</sup>

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_0} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

wobei  $\tau_0$  die Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,  $R_0$  den Förster Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz) und  $r$  den Abstand zwischen Donor und Akzeptor bezeichnet. Neben der spektralen Überlappung von Donoremission und Akzeptorabsorption müssen die Übergangsdipolmomente der Chromophore eine geeignete Orientierung zueinander besitzen, damit es zu einem FRET kommt. Beide Bedingungen spiegeln sich in folgender Gleichung wieder.<sup>[16]</sup>

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{23} \frac{\kappa^2 \Phi_D J}{n^4}$$

Daraus ersichtlich wird die proportionale Abhängigkeit des Förster-Radius vom spektralen Überlappintegral  $J$ , vom Quadrat des Dipol-Dipol-Orientierungsfaktors  $\kappa$ , sowie der Quantenausbeute des Donors, in Abwesenheit des Akzeptors  $\Phi_D$ . In obiger Gleichung steht  $n$  für den Brechungsindex des Mediums zwischen den Chromophoren. Für praktische Anwendungen wird oft die Effizienz des Energietransfers ( $E$ ) herangezogen. Diese gibt denjenigen Teil der absorbierten

Photonen an, die vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden. Sie kann auch durch die Gleichung:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

ausgedrückt werden. Hier zeigt sich die starke Distanzabhängigkeit von  $E$ , wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor nahe bei  $R_0$  liegt. Bei üblichen Farbstoffpaaren liegen die Werte für  $R_0$  zwischen 20 und 60 Å.<sup>[17]</sup>

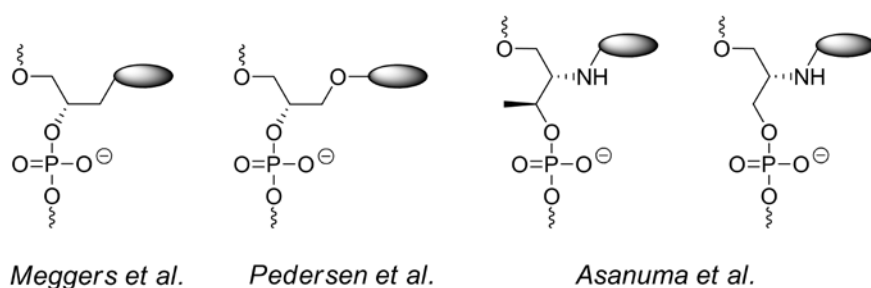
### 2.2 Einbau und Orientierung von Farbstoffen in DNA

Mit Hilfe funktionalisierter DNA ist es möglich, definierte molekulare Strukturen mit modulierbaren, photophysikalischen Eigenschaften herzustellen. Das macht sie zu einem wichtigen Werkzeug bei der Entwicklung und Optimierung von nano- und biotechnologischen Anwendungen wie z.B. photonischen Drähten<sup>[18]</sup>, Lichtsammelsystemen<sup>[19]</sup> und lichtsammelnden Antennen.<sup>[20]</sup> Ein Grundprinzip dieser Anwendungen besteht in der Aneinanderreihung mehrerer Chromophore in räumlicher Nähe zueinander. Diese zeigen im Vergleich zum einzelnen Chromophor insgesamt eine höhere Absorption und können deshalb z.B. in Solarzellen<sup>[21]</sup> verwendet werden. Die Wechselwirkung der Farbstoffe miteinander im Grundzustand, sowie im angeregten Zustand führt zur Ausbildung von Excimeren und Exciplexen und beeinflusst damit unter anderem deren Fluoreszenzspektrum.<sup>[22]</sup> Wechselwirken die Chromophore bereits im Grundzustand miteinander, kann es zur Bildung von H-Aggregaten und J-Aggregaten kommen, welche sich in einem veränderten Absorptionsspektrum bemerkbar machen.<sup>[23-24]</sup> J-Aggregate führen zu einer bathochromen (rotwelligen) Verschiebung, H-Aggregate dagegen zu einer hypsochromen (blauwelligen) Verschiebung. Neben höherer Absorption und veränderbarem optischen Verhalten zeigen multichromophore Systeme einen weiteren Vorteil: Ihre Eigenschaften können durch Änderung von Art, Anzahl und Anordnung der beteiligten Farbstoffe der jeweiligen Funktion angepasst werden. Oligonukleotide stellen das hierfür benötigte, strukturgebende Gerüst dar, welches eine für die photophysikalischen Eigenschaften maßgebende, definierte Position und Orientierung der Farbstoffe zueinander ermöglicht. Die Ausbildung eines DNA-Doppelstrangs durch Watson-Crick Basenpaarung erzeugt eine reguläre, rechtsgängige Helix. In dieser (B-DNA) beträgt der Abstand zwischen zwei Basenpaaren 3.4 Å, vorgegeben durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat.<sup>[22]</sup> Somit bietet der kovalente Einbau von Chromophoren in Oligonukleotide die Möglichkeit, diese an einem bestimmten Punkt der Doppelhelix mit definiertem Abstand und vorhersagbarer Orientierung zueinander anzuordnen. Dank der automatisierten DNA-Festphasensynthese<sup>[25]</sup> sind modifizierte Oligomere mit beliebiger Sequenz und in ausreichender Menge zugänglich.<sup>[26]</sup> Voraussetzung hierfür ist, dass der artifizielle Baustein über Phosphoramiditchemie hergestellt werden kann und die Aufarbeitungs- bzw. Reinigungsschritte nach der DNA-Synthese übersteht. Die

folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten zur helikalen Anordnung von Farbstoffe innerhalb der Oligonukleotidstruktur. Es werden nur Ansätze betrachtet, in denen die Chromophore entweder durch Verknüpfung mit der Riboseeinheit oder der Nucleobase, durch den Ersatz einer DNA-Base oder über einen Linker kovalent mit der DNA verbunden sind. DNA-Modifikationen durch nicht kovalente Wechselwirkungen, sowie postsynthetische Reaktionen werden nicht behandelt.

### Fluorophore als Ersatz für Nucleoside

Die Ringstruktur der 2'-Desoxyriboseeinheiten trägt durch ihre starre und chirale Form wesentlich zum dreidimensionalen Bau doppelsträngiger DNA bei. Allerdings ist die glykosidische Bindung zu Purinbasen anfällig für säurekatalysierte Hydrolyse<sup>[27]</sup> und die Monosaccharide müssen über eine oft aufwändige Schutzgruppenstrategie hergestellt werden. Der Einbau von Farbstoffen in Oligonukleotide über azyklische Linker stellt hierbei eine synthetisch einfachere Alternative dar. Zusätzlich ermöglichen flexible Linker ein Interkalieren der Farbstoffe in den DNA-Basenstapel.<sup>[28]</sup> In Abb. 6 sind repräsentativ einige azyklische Linker verschiedener Arbeitsgruppen dargestellt.

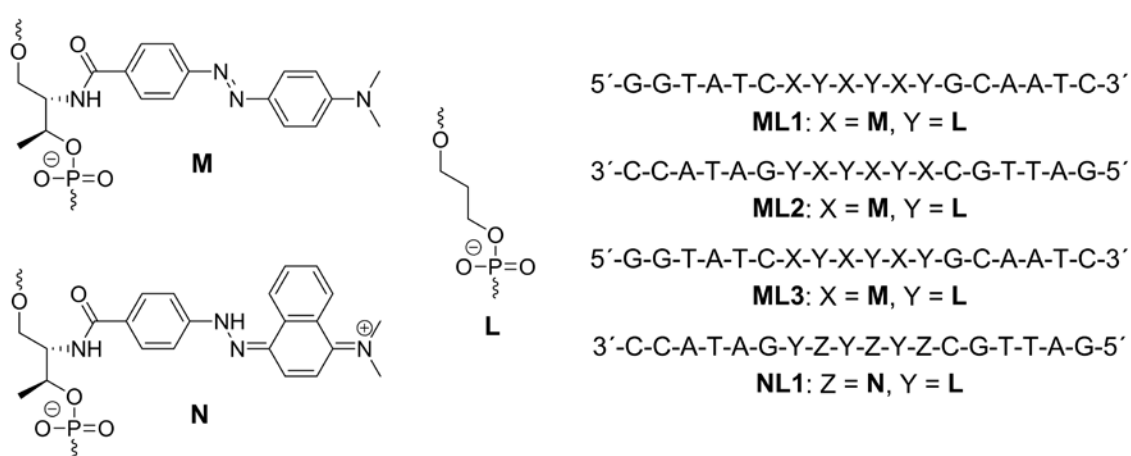


**Abb. 6:** Struktur des (S)-1,2-Propanediol-,<sup>[29]</sup> (S)-1,2,3-Propanetriol-,<sup>[30]</sup> D-Threoninol-<sup>[31]</sup> und des (S)-Serinol-Linkers<sup>[32]</sup> (von links nach rechts).

Das nächste Beispiel macht deutlich, wie es mit Hilfe von DNA möglich ist, über einen Linker eingeführte Moleküle in einer vorgegebenen Art und Weise zu stapeln.

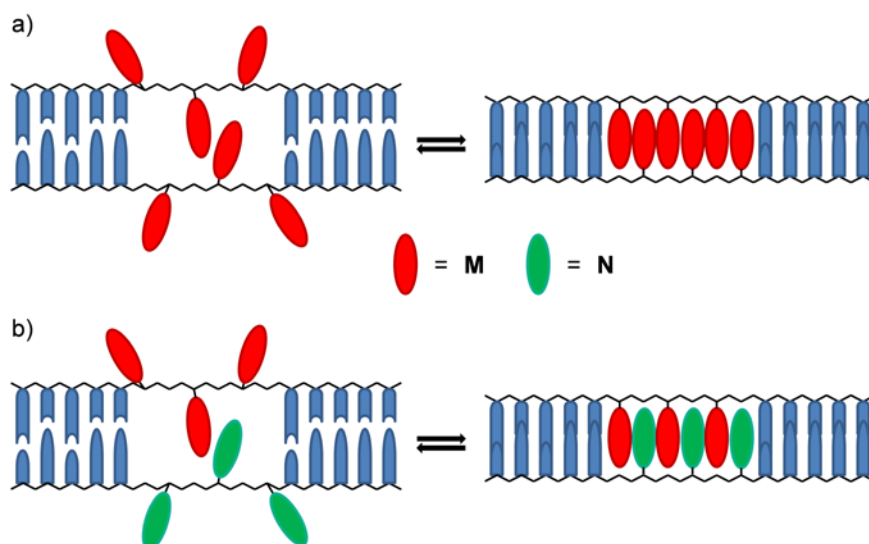
Methylrot (**M**) und Naphthylrot (**N**) (siehe Abb. 7) wurden von *Asanuma, Komiyama* und ihren Mitarbeitern über den azyklischen Threoninol-Linker (entweder D oder L Konfiguration) als künstliche Basenanaloga in einzelsträngige DNA eingebracht.<sup>[33-34]</sup>

Um genug Platz für die Bildung von Homo- und Heterofarbstoffaggregaten bei der Hybridisierung zweier modifizierter Einzelsträngen zu schaffen, wurden die Chromophore alternierend mit 1,3-Propandiol (**L**) in die Mitte der Sequenzen eingebaut.



**Abb. 7:** Darstellung der alternierend mit 1,3-Propandiol eingebauten Modifikationen Methylrot und Naphthylrot, sowie der zugehörigen Sequenzen (**ML1** und **ML3** sind identisch).

Die Absorptionsspektren der DNA-Einzelstränge **ML1** und **ML2** wiesen die charakteristischen optischen Eigenschaften von Methylrot auf und ließen deshalb auf das Fehlen jeglicher Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen schließen.<sup>[26]</sup> Eine signifikante hypsochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum des **ML1/ML2**-Duplexes machte die Ausbildung von H-Aggregaten zwischen den Methylrot-Verbindungen innerhalb der DNA-Helix deutlich. Das konnte zusätzlich anhand von CD Spektren bestätigt werden. In Abb. 8a wird die reversible Bildung der H-Aggregate bei Assoziation bzw. Dissoziation des Duplexes gezeigt.



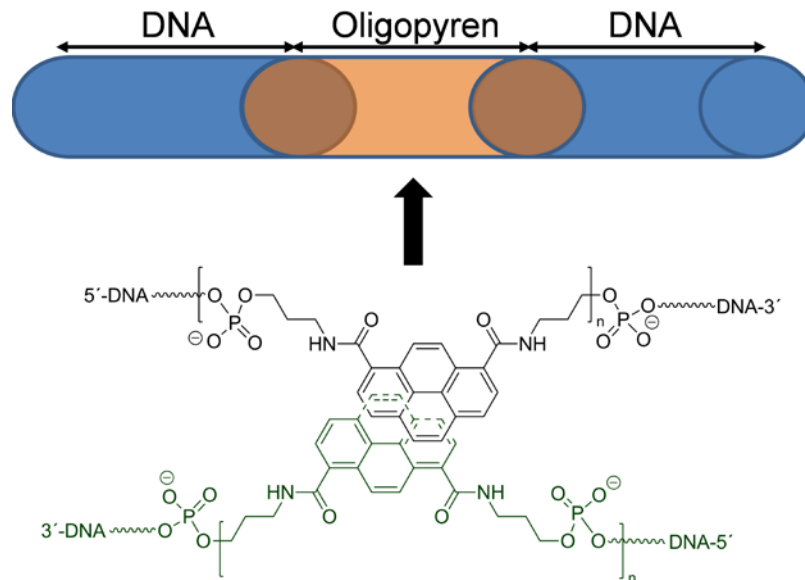
**Abb. 8:** Schematische Darstellung der reversiblen Bildung von a) Homo-H-Aggregaten des Methylrots in **ML1/ML2** und b) Hetero-H-Aggregaten zwischen Methylrot und Naphthylrot in **ML3/NL1**.

Durch Kombination von Methylrot und Naphthylrot modifizierten Strängen ließ sich die Bildung von Hetero-H-Aggregaten beobachten.<sup>[35]</sup> In den Einzelsträngen **ML3** und **NL1** zeigten sich keine wesentlichen Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen, da sie durch 1,3-Propandiol voneinander getrennt waren. Nach Hybridisierung der beiden konnten hingegen Hetero-H-Aggregate über eine scharfe, hypsochrom verschobene Bande im Absorptionsspektrum und ein excitongekoppeltes CD-Signal im Absorptionsbereich der Farbstoffe nachgewiesen werden. Für die Struktur wird eine abwechselnde, reißverschlussartige Stapelung der beiden Farbstoffe innerhalb des Doppelstrangs, wie in Abb. 8b gezeigt, angenommen.

*Häner* und seine Mitarbeiter benutzten einen Carboxamid-Linker, um Phenanthrene,<sup>[36]</sup> Phenanthroline<sup>[37]</sup> und Pyrene<sup>[38]</sup> als nicht nukleosidische Basenanaloga einzubauen. In einem der bemerkenswertesten Ansätze wurden Einzelstränge, die bis zu sieben Pyrenmoleküle enthielten, hergestellt. Die Hybridisierung zweier solcher Stränge ergab Duplexe mit maximal 14 gestapelten Pyrenresten im Inneren der DNA (Abb. 9). Das Auftreten von Inter- und Intrastrang Stapelung der Pyrene wurde von temperaturabhängigen UV/Vis-spektroskopischen Messungen gestützt, welche das Vorhandensein zweier isosbestischer Punkte bei Dehybridisierung des Doppelstrangs zeigten.<sup>[39]</sup> Einzelstränge, die mehr als einen Pyrenbaustein enthielten und die aus ihnen gebildeten Doppelstränge, wiesen hauptsächlich Excimerfluoreszenz auf und bekräftigen damit die Theorie von Inter- und Intrastrangwechselwirkungen der Fluorophore. Enthielt ein DNA-Duplex mehr als

## 2 Pyren und Nilrot als Energietransfer-Paar in DNA: Hintergrund

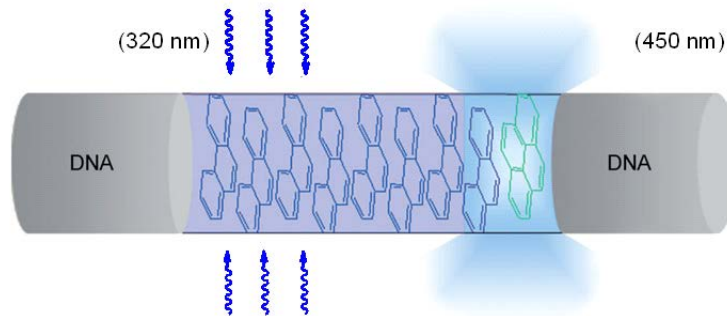
zehn Pyreneinheiten, so nahmen diese eine definierte, rechtsgängige helikale Konformation an, welche durch CD Spektroskopie bestätigt werden konnte. Bei den betreffenden Einzelsträngen war ein solches Phänomen nicht zu beobachten.



**Abb. 9:** Stapelung der Oligopyrene im Inneren des DNA-Duplexes.

Die Anwendbarkeit solcher Systeme zeigt sich in einem Ansatz, der die Stapelung von Phenanthrenen und Pyren im Inneren einer DNA-Helix kombiniert. Diese DNA-basierte Lichtsammelnde Antenne besteht aus drei Grundbausteinen: den UV-Licht absorbierenden Phenanthrenen, einem fluoreszierenden Exciplex aus Phenanthren und Pyren und der DNA-Doppelhelix als strukturgebendem Gerüst (Abb. 10). Die Anzahl der Photonen, die vom Exciplex emittiert wird, ist proportional zur Anzahl der lichtabsorbierenden Chromophore, wobei sich die Quantenausbeute insgesamt kaum ändert.<sup>[40]</sup>

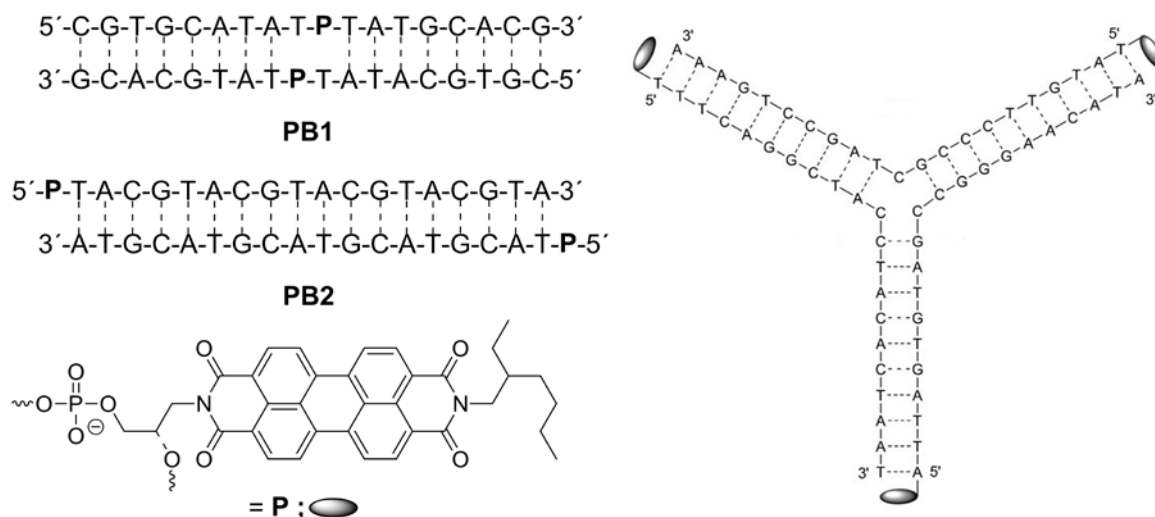




**Abb. 10:** In DNA eingebaute, lichtsammelnde Antenne von *Garo* und *Häner*, bestehend aus Phenanthrenen (violetter Block) und einem fluoreszierenden Exciplex aus Phenanthren und Pyren (blau).<sup>[40]</sup>

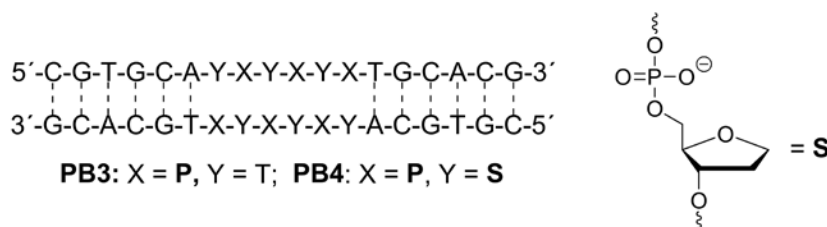
Perylen-3,4:9,10-tetracarbonsäurebisimid (PB) wird wegen seiner exzellenten Photostabilität, seiner hohen Fluoreszenzquantenausbeute und vor allem wegen seiner stark hydrophoben Natur häufig zum Aufbau von supramolekularen Systemen verwendet.<sup>[41]</sup> In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurde PB mit Hilfe eines (S)-Aminopropandiollinkers als künstlicher Basenersatz in DNA eingebaut.<sup>[42]</sup> Dieser azyklische Linker besitzt eine ähnliche Stereochemie wie die 3'-Position von 2'-Desoxyribofuranosiden und diente zur Synthese modifizierter Doppelstränge mit PB in der Mitte (**PB1**) bzw. am Ende (**PB2**) der Sequenzen (vgl. Abb. 11 links).<sup>[43]</sup> Diese wiesen beide die excimerartige Fluoreszenz des PB Dimers bei ca. 660 nm auf. Außerdem konnten durch UV/Vis-spektroskopische Messungen starke  $\pi$ - $\pi$  excitonische Wechselwirkungen der beiden PB Bausteine innerhalb (**PB1**) und außerhalb (**PB2**) des Duplexes festgestellt werden. Die excimerartige Fluoreszenz der am 5'-terminalen Ende modifizierten Oligonukleotide lässt sich nur durch eine Aggregation zweier DNA-Doppelstränge, verursacht durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den PB-Farbstoffen, erklären.

*Florian Menacher* nutzte diese als eine Art Kleber wirkende PB-Aggregation, um mehrere Y-förmige DNA-Stränge (Abb. 11 rechts) über endständige PB-Monomere zu verknüpfen.<sup>[44]</sup>



**Abb. 11:** PB-modifizierte Doppelstränge (links) und Y-förmige DNA-Stränge<sup>[44]</sup> (rechts).

Das oligonukleotidverknüpfte Perylenbisimide auch helikale Strukturen ausbilden können, zeigte der Einbau von sechs PB Molekülen in einen Doppelstrang.<sup>[45]</sup> Diese wurden in den beiden komplementären Einzelsträngen entweder durch Thymin (**PB3**) oder abasische Stellen (**PB4**) getrennt (Abb. 12). Die CD-Spektren ließen darauf schließen, dass die Farbstoffe mit Thymin als Gegenbase eine linksgängige Helix eingehen, während sie in Gegenwart der abasischen Stellen eine rechtsgängige, helikale Organisation annehmen.



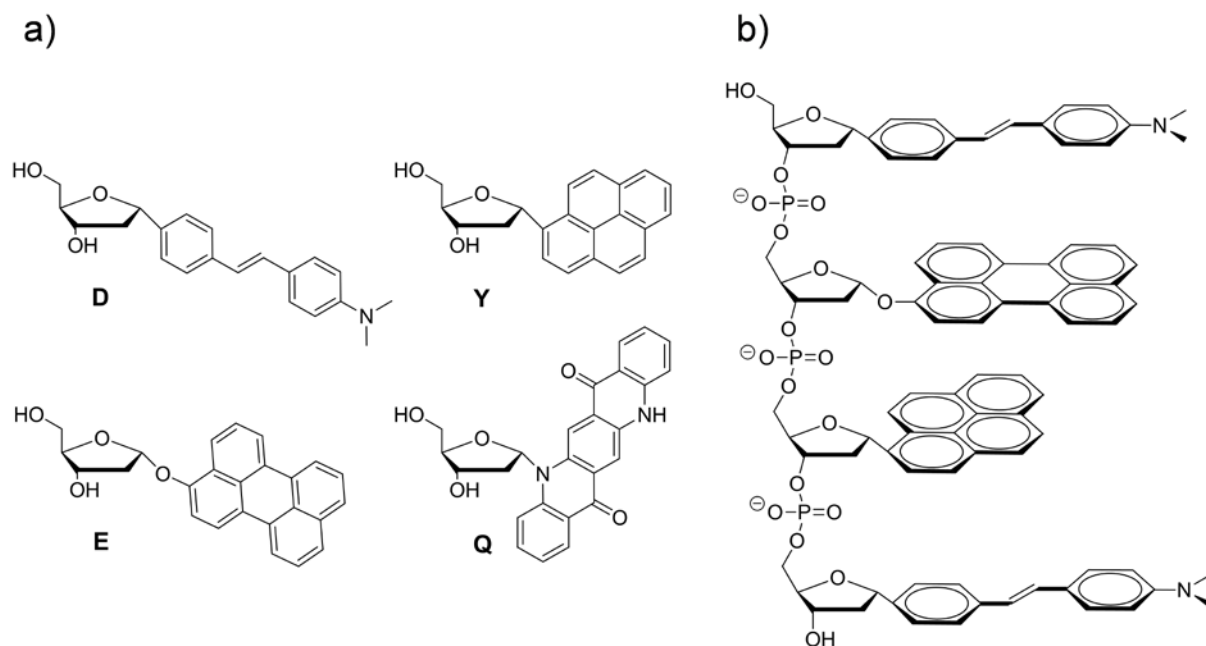
**Abb. 12:** Duplex mit sechs PB Molekülen gegenüber von Thymin oder abasischen Stellen (**S**).

### Nukleobasen-Ersatz durch Chromophore

Um das natürliche Gerüst aus Phosphodiesterbindungen und 2'-Desoxyribose zu erhalten, haben sich viele Arbeitsgruppen dafür entschieden, nur die nukleosidische Base durch einen Farbstoff zu ersetzen.

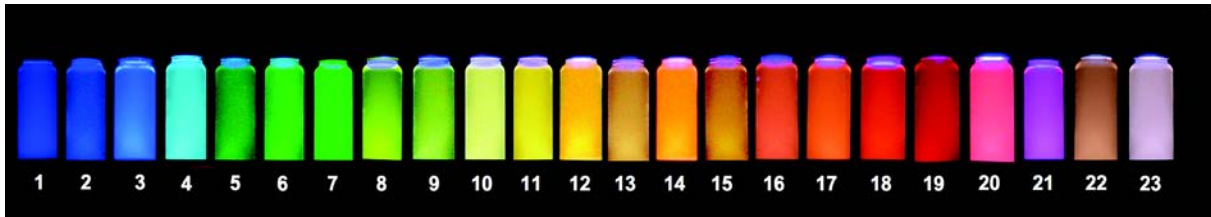
Eine ganze Reihe solcher Moleküle, bei denen aromatische Fluorophore an die anomere Position der Desoxyribose geknüpft sind, wurde von *Kool et al.* entwickelt.<sup>[46]</sup> In einem kombinatorischen Ansatz wurden beispielsweise vier dieser Bausteine (Abb. 13) zu DNA-einzelstrangähnlichen Strukturen verknüpft, den sog. Oligodesoxyfluorosiden (ODFs).<sup>[47]</sup> Die optischen Eigenschaften solcher

Multichromophorstapel weichen stark von denen der Monomere ab, da die Farbstoffe aufgrund ihrer strukturierten Anordnung photophysikalische Wechselwirkungen im angeregten Zustand eingehen können. Darunter fallen Energietransfer, Excimer- und Exciplexbildung, sowie Ladungstransfer-Wechselwirkungen, wodurch Eigenschaften wie z.B. ein hoher molarer Extinktionskoeffizient und große Stokes-Verschiebungen beobachtet werden können.<sup>[26]</sup>



**Abb. 13:** a) Strukturen der Monomere **D**, **E**, **Y** und **Q** b) Oligomer aus vier Farbstoffen mit der Sequenz 5'-DEYD.

Die Synthese aller möglichen Vierfachkombinationen aus **D**, **E**, **Y** und **Q** ergab eine 256 Elemente umfassende Bibliothek, wobei die Fluoreszenz der einzelnen Elemente durch Art und Anordnung der eingebauten Farbstoffe bestimmt wurde. Neben dieser wurden größere Bibliotheken (14 641 Sequenzvarianten durch elf verschiedene Fluorophore),<sup>[48]</sup> sowie eine Reihe von 23 verschiedenen ODFs hergestellt,<sup>[49]</sup> deren Emissionen sich bei nur einer Anregungswellenlänge über den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts erstrecken (Abb. 14). Der apparative Aufwand für eine simultane Detektion verschiedener Emissionsfarben wird dadurch enorm erleichtert.



**Abb. 14:** 23 verschiedene ODF-Lösungen mit  $\lambda_{\text{exc}} = 354 \text{ nm}$ .<sup>[49]</sup>

Eine weitere Methode, Fluorophore kovalent an Oligonukleotide zu binden, ist die Modifikation der Nucleobasen.

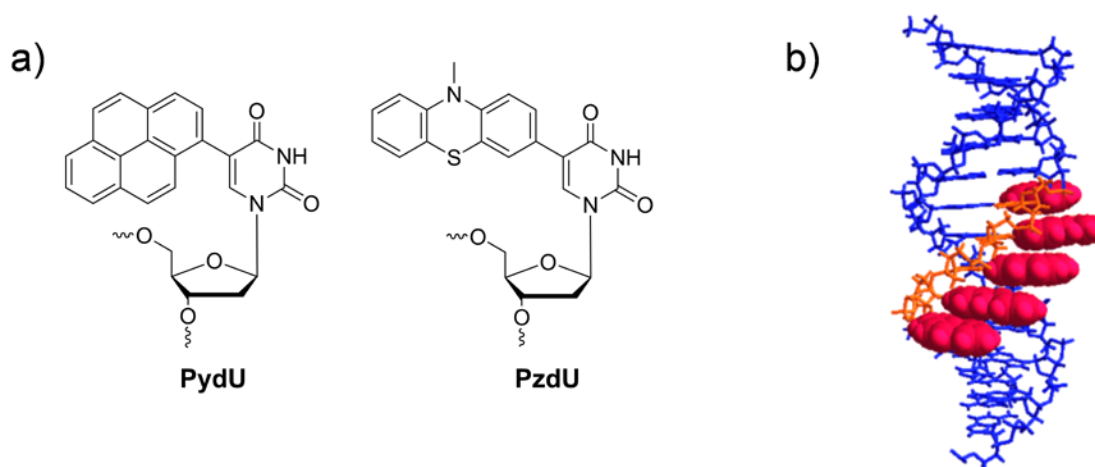
### Verknüpfung von Chromophoren mit der DNA-Base

Es gibt mehrere Positionen, die für das Anbringen von Farbstoffen an DNA-Basen geeignet sind. Modifikationen am C5 von Pyrimidinen oder C7 von 7-Desazapurinen beeinflussen generell die normale *anti*-Konformation der Nucleobase nicht, somit bleibt die Watson-Crick Basenpaarung erhalten.<sup>[50-51]</sup> Werden Farbstoffe an die C8-Position von Purinen geknüpft, so nehmen diese die *syn*-Konformation ein, wodurch die Watson-Crick Basenpaarung oft negativ beeinflusst wird.<sup>[52]</sup> Die Verbindung zwischen Chromophor und Base stellen Phenylbrücken, bzw. Acetylbrücken oder einfache C-C-Bindungen dar. Alle drei können eine starke elektronische Kopplung zwischen Modifikation und Nucleobase gewährleisten.<sup>[22]</sup>

Da sich Kapitel 4.1 genauer mit Modifikationen am C7 von 7-Desazapurinen beschäftigt, werden in diesem Abschnitt zwei Beispiele behandelt, in denen die Fluorophore an die C5-Position von 2'-Desoxyuridin gebunden sind.

Das Erste stammt von der Arbeitsgruppe *Wagenknecht*. Diese stellte mit Hilfe palladiumkatalysierter *Sonogashira*-Kupplung pyren- (**PydU**) und phenothiazinverknüpfte (**PzdU**) 2'-Desoxyuridine her (Abb. 15a). Die Hybridisierung eines fünffach mit **PydU** modifizierten Einzelstrangs mit dem komplementären Gegenstrang führte zu einer Blauverschiebung sowie einem starkem Anstieg der Fluoreszenz.<sup>[53]</sup> Außerdem zeigte das CD Spektrum ein starkes excitongekoppeltes Signal im Absorptionsbereich von Pyren. Beide Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die **PydU**-Einheiten als rechtsgängige Helix in der großen Furche der DNA vorliegen (Abb. 15b). Sie stehen hierbei sowohl durch elektronische Kopplungen, als auch über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen miteinander in Verbindung. Der Einbau von Fehlpaarungen gegenüber der fünf mit 2'-Desoxyuridin (dU) verknüpften Farbstoffe, resultierte in einer starken Abnahme der Fluoreszenzintensität. Grund

hierfür ist vermutlich, die durch eine Strukturänderung bedingte Entkopplung der elektronischen Wechselwirkungen zwischen den **PydU** Bausteinen innerhalb des Chromophorstapels.



**Abb. 15:** a) Struktur der 2'-Desoxyuridine, modifiziert mit Pyren (**PydU**) oder Phenothiazin (**PzdU**) und b) helikale Anordnung der **PydU**-Einheiten in der großen Furche des DNA-Duplex.<sup>[53]</sup>

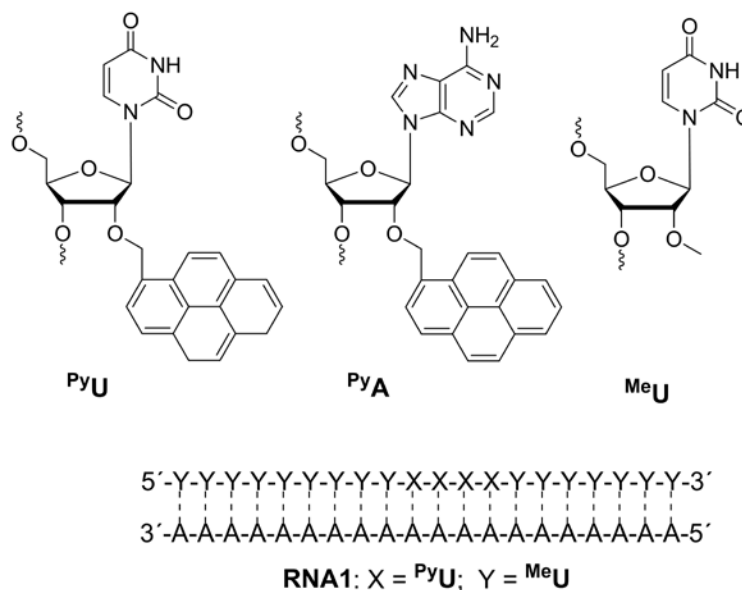
In den oben beschriebenen Dopplesträngen wurden entweder zwei, drei oder alle fünf **PydU**-Modifikationen durch **PzdU** ersetzt.<sup>[54]</sup> Neben unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften zeigten alle drei Duplexe eine rechtsgängige helikale Anordnung der fünf Chromophore.

Im zweiten Beispiel konnten *Stulz et al.* Diphenylporphyrin,<sup>[55]</sup> sowie Tetraphenylporphyrin<sup>[56]</sup> mit Hilfe eines Acetylenlinkers kovalent mit der C5-Position von 2'-Desoxyuridin verknüpfen. Dadurch konnten bis zu elf porphyrinmodifizierte dU-Einheiten in ein Oligonukleotid eingebaut werden. Aufgrund von Berechnungen anhand molekülmechanischer Methoden, wurde vorausgesagt, dass selbst in einzelsträngiger DNA eine helikale Anordnung der Chromophore die energetisch niedrigste Konformation darstellt. Dieselben Berechnungen zeigten, zusammen mit CD spektroskopischen Messungen, dass bei Ausbildung eines Duplexes die Porphyrine in der großen Furche des Doppelstrangs lokalisiert sind.

In einem weiterführenden Experiment wurden zwei, mit unterschiedlichen Porphyrinen am C5 von 2'-Desoxyuridin modifizierte Oligonukleotide zu einem reißverschlussartigen Heteropolymer hybridisiert und dessen Struktur untersucht.<sup>[57]</sup>

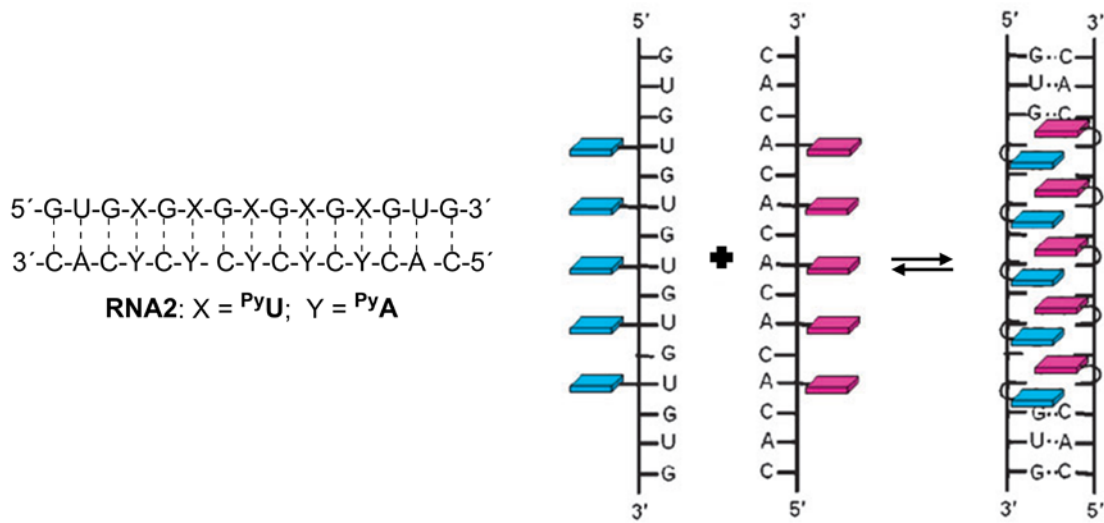
### Modifikationen an der Riboseinheit

Neben den oben genannten Methoden, können Fluorophore auch an der 2'-Position der Zuckereinheiten angebracht werden. Ein Beispiel stammt von *Nakamura und Yamana et al.*, welche die Struktur und spektroskopischen Eigenschaften mehrfach pyrenylmethylmodifizierter RNA untersuchten. Die synthetisierten Oligonukleotide tragen den aromatischen Chromophor an der 2'-Position von Uridin bzw. Adenosin wie in Abb. 16 dargestellt.<sup>[58-59]</sup> Die RNA-Duplexe enthielten eine bis maximal vier (**RNA1**) Pyreneinheiten und zeigten eine starke Excimerfluoreszenz, deren Intensität mit der Zahl der Pyrene anstieg. Dieses Ergebnis wurde mit einer helikalen Anordnung der Farbstoffe begründet und durch die aufgenommenen CD Spektren bestätigt. Moleküldynamische Berechnungen zeigten, dass die Pyrene in der kleinen Furche der RNA-Doppelstränge lokalisiert sind und sich vermutlich parallel zueinander anordnen.



**Abb. 16:** Strukturen der modifizierten Nucleoside und Sequenz der pyrenmodifizierten RNA.

Eine etwas andere Ausrichtung zeigt sich, wenn sowohl RNA-Strang als auch komplementärer Gegenstrang Pyrenmodifikationen enthalten (Abb. 17). Nach Hybridisierung (**RNA2**) stapeln die Pyrene in einer reißverschlussartigen Weise und es kann eine starke Excimeremission beobachtet werden.<sup>[60]</sup> Basierend auf optischen und chiroptischen Studien wurde, wie in Abb. 17 schematisch dargestellt, eine Anordnung der Pyrene entlang der kleinen Furche der RNA vorgeschlagen.



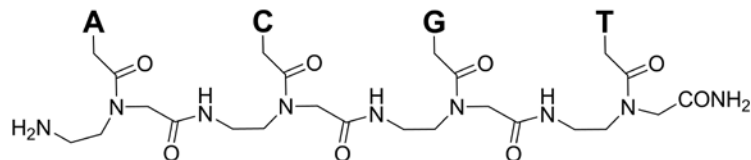
**Abb. 17:** Sequenz (links) und schematische Darstellung der Duplexbildung (rechts) von mehrfach pyrenmodifizierter RNA2.<sup>[60]</sup>

Pyren kann anstatt über eine einfache Methoxygruppe, wie bei *Nakamura* und *Yamana*, auch über einen starren Linker kovalent mit der 2'-Position der Ribose verbunden werden. Diese auf einer Carbamatstruktur basierende Verknüpfung wurde von *Korshun* und seinen Mitarbeitern verwendet.<sup>[61]</sup> Im Gegensatz zur vorher genannten Modifikation wird von dieser angenommen, dass sie Pyren in die große Furche der Duplexe dirigiert.

## 2.3 (Pyrrolidinyl)-PNA als Oligonukleotidanalogen

### 2.3.1 Vor- und Nachteile der Peptidnukleinsäuren

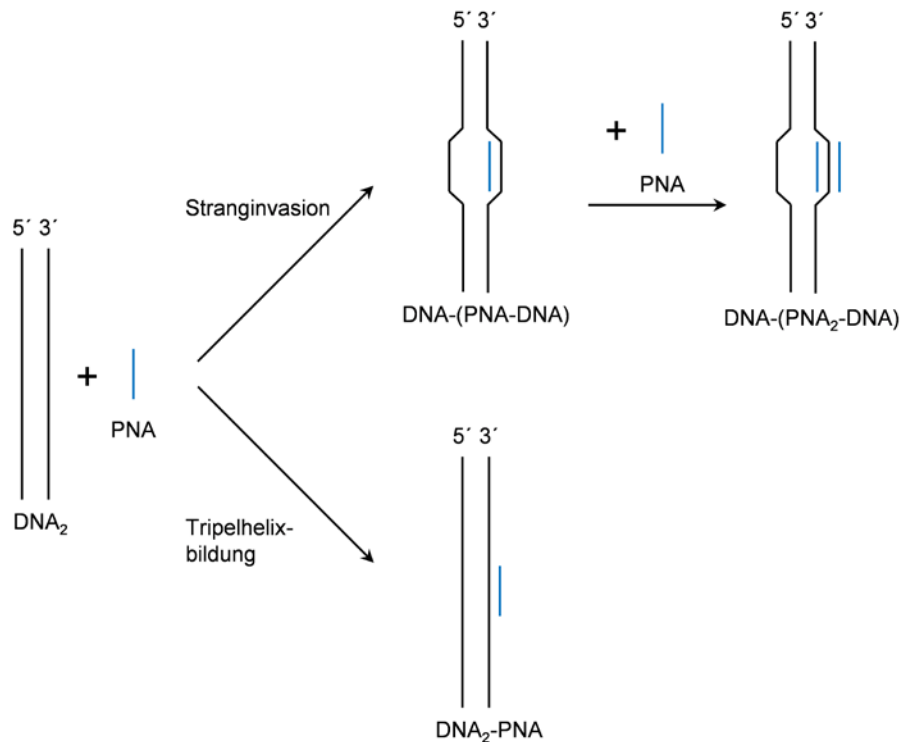
Die im Jahre 1991 von *Nielsen et al.* erstmals beschriebenen Peptidnukleinsäuren (PNAs) leiteten eine neue Ära der Nukleinsäuremimetika ein.<sup>[62]</sup> Ihr Rückgrat besteht aus *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten, bei denen die Nucleobasen über Acetyl-Linker mit dem Stickstoff des Glycins verbunden sind (Abb. 18). Verglichen mit natürlicher DNA wurde in der PNA das gesamte Phosphodiester-Rückgrat durch das eines Pseudopeptids ersetzt.



**Abb. 18:** Struktur der PNA, die Buchstaben A, C, G, und T stehen für die Nucleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin.

Umso bemerkenswerter ist es, dass trotz der tiefgreifenden Änderungen Nucleinsäure-Analoga erhalten wurden, deren Affinität für komplementäre DNA und RNA die der natürlichen Oligonucleotide übertrifft.<sup>[63]</sup> Die PNA bindet dabei nicht nur stark, sondern auch sequenzspezifisch an DNA, RNA oder einen weiteren PNA-Strang. Dabei gilt für die Stabilität der Hybride ( $T_m$ ), im Allgemeinen und für identische Sequenzen, folgende Reihenfolge: PNA-PNA > PNA-RNA > PNA-DNA (> RNA-DNA > DNA-DNA).<sup>[64-66]</sup> Eine einzigartige Eigenschaft der PNA besteht darin, in einer sog. Stranginvasionsreaktion einen DNA-Strang im DNA-Duplex zu verdrängen. Das ist auch der Grund für ihre Anwendung als Antisense- bzw. Antigen-Mittel.<sup>[67]</sup> Homopyrimidin-PNA bildet mit einem Doppelstrang der Ziel-DNA vorzugsweise keine PNA-DNA<sub>2</sub> Tripelhelix aus, sondern formt durch Stranginvasion eine lokale PNA<sub>2</sub>-DNA Tripelhelix mit Hoogsteen- und Watson-Crick-Wechselwirkungen zwischen den Basen (Abb. 19).<sup>[68-69]</sup> Die hohe Stabilität der PNA-DNA-PNA-Tripelhelices<sup>[70]</sup> wird teilweise auf das Fehlen elektrostatischer Abstoßung zwischen dem ungeladenen Rückgrat der PNA und dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA (bzw. RNA) zurückgeführt.<sup>[71]</sup>





**Abb. 19:** Stranginvasion und Tripelhelixbildung mit PNAs.

Ein weiterer Vorteil der PNA ist ihre Resistenz gegenüber Proteasen und Nukleasen.<sup>[72]</sup> Aufgrund der oben genannten, herausragenden Eigenschaften, findet sie hauptsächlich Anwendung als Werkzeug in der molekularen Biologie,<sup>[73]</sup> bei der Weiterentwicklung von Antisense-/ Antigen-Technologie<sup>[74]</sup> und als Biosensor.<sup>[75]</sup> Zu den Nachteilen der Peptidnukleinsäuren gehören, bedingt durch das ungeladene Rückgrat, die schlechte Wasserlöslichkeit und eine geringe Zellpermeabilität. Letztere kann durch Konjugation mit verschiedenen Transfermolekülen, wie z.B. zellgängigen Peptiden, verbessert werden.<sup>[76-77]</sup> Außerdem hybridisieren PNA-Oligomere sowohl in paralleler wie auch in antiparalleler Orientierung mit komplementärer DNA und RNA,<sup>[65, 78]</sup> wobei die antiparallele Orientierung leicht bevorzugt wird. Der PNA-N-Terminus entspricht hierbei dem 5'-, der C-Terminus dem 3'-Ende natürlicher Oligonukleotide.<sup>[63]</sup>

### 2.3.2 PNA-Struktur

Bereits relativ kurze Zeit nach Einführung der Peptidnukleinsäure durch *Nielsen et al.* waren hoch aufgelöste Strukturen von Komplexen mit PNA verfügbar. NMR-spektroskopische Untersuchungen gaben einen Einblick in die Art der Wechselwirkungen zwischen den Basen, sowie den Aufbau und die Form von PNA-

RNA<sup>[79]</sup> und PNA-DNA<sup>[80]</sup> Duplices. Am besten ersichtlich wird die von PNA bevorzugte Struktur, aus einer von *Rasmussen et al.* veröffentlichten Röntgenstrukturanalyse eines selbstkomplementären PNA-PNA-Duplex.<sup>[81]</sup> Die Elementarzelle des Kristalls enthält hier sowohl eine links- als auch eine rechtsgängige Helix. Anders, als die für DNA typische B-Form der Doppelhelix, mit einem Durchmesser von 20 Å und 10 Basenpaaren pro Drehung, besitzt der PNA-Duplex eine sehr breite Helix (28 Å) mit 18 Basen pro Windung. Die Basenpaare stehen nahezu senkrecht zur Helixachse, ähnlich wie bei der B-Form, aber im Unterschied zur A-Form der RNA, bei der die Basenpaare relativ zur Helixachse gekippt sind. Die Struktur ähnelt insgesamt der ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse bestimmten PNA<sub>2</sub>-DNA-Triplex.<sup>[82]</sup> Inzwischen sind weitere Kristallstrukturanalysen von Homoduplexen<sup>[83-85]</sup> und Heteroduplexen<sup>[86]</sup> der PNA bekannt.

Aus den oben beschriebenen, strukturellen Daten lässt sich schlussfolgern, dass, obwohl PNA in der Lage ist DNA oder RNA zu erkennen und effizient an diese zu binden, die Konformation, die sie in diesen Hybriden annimmt, nicht optimal ist. Gründe hierfür sind die Unterschiede zwischen der, von der PNA bevorzugten, sog. P-Form der Helix und der von DNA und RNA bevorzugten B- bzw. A-Form, in wichtigen Parametern, wie dem helikalen Durchmesser oder der Anzahl der Basen pro Drehung. Wie bereits von *Nielsen* vorgeschlagen,<sup>[64]</sup> wäre es deshalb möglich, bessere DNA-Mimetika auf der Grundlage von Peptidnukleinsäuren zu generieren, wenn man ein Rückgrat erzeugen kann, dass in seinem niedrigsten energetischen Zustand eine B-Form der Helix annimmt.

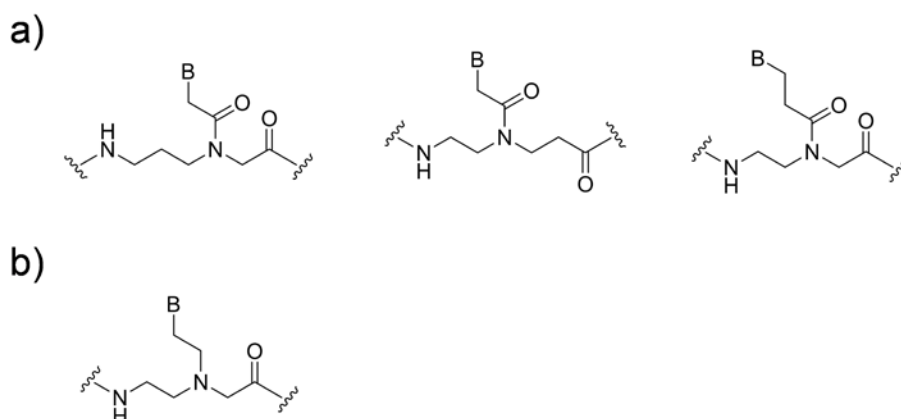
Dieser Gedanke lässt sich weiter führen, wenn man bedenkt, dass die Hybridisierung von komplementären Oligomeren (DNA, RNA oder PNA), durch einen großen Enthalpiegewinn und einen starken Entropieverlust gekennzeichnet ist.<sup>[65, 87]</sup> Das Sinken der Entropie, bei Ausbildung eines Doppelstrangs kommt durch die Entstehung eines hoch geordneten, starren Duplexes aus zwei eher flexiblen und deutlich weniger geordneten Einzelsträngen zustande. Dabei kann der Gewinn an Entropie durch Wassermoleküle, die um die hydrophoben Nukleobasen angeordnet sind und bei Hybridisierung frei werden, den oben genannten Verlust nicht ausgleichen. Würde man die einzelsträngige PNA deshalb in eine Konformation zwingen, die mit der im Hybrid ausgebildeten identisch, bzw. dieser sehr ähnlich ist, sollte das den Entropieverlust stark reduzieren und dadurch die frei werdende

Energie bei der Hybridisierung erhöhen. Das Einführen zyklischer Strukturen, um die Flexibilität des Rückgrats einzuschränken, ist somit eine vielversprechende Strategie bei der Suche nach Oligomeren mit verbesserten Hybridisierungseigenschaften.

### 2.3.3 PNA-Modifikationen

#### Einführen von Methylengruppen

Aufgrund des ihr zugrunde liegenden *N*-(2-Aminoethyl)glycinrückgrats wird die ursprüngliche Form der Peptidnukleinsäuren auch *aeg*-PNA genannt. Diese ist azyklisch, daher besitzen die Aminoethyl- und Glycinabschnitte, ebenso wie der mit der Nukleobase verknüpfte Acetyllinker im Einzelstrang eine konformationelle Flexibilität. Erweitert man nun die *aeg*-PNA Struktur durch zusätzliche Methylengruppen in den Aminoethyl-, Glycin- oder Linkereinheiten<sup>[88]</sup> (Abb. 20a) oder ersetzt den tertiären Amidlinker durch einen Ethylenlinker<sup>[89]</sup> (Abb. 20b) führt das zu einer weiteren Erhöhung der konformationellen Freiheit. Aus den bereits im vorherigen Abschnitt erläuterten, entropischen Gründen, hat diese Erhöhung zur Folge, dass die gebildeten Komplexe mit Ziel-DNA oder RNA eine erheblich verminderte Stabilität zeigen.



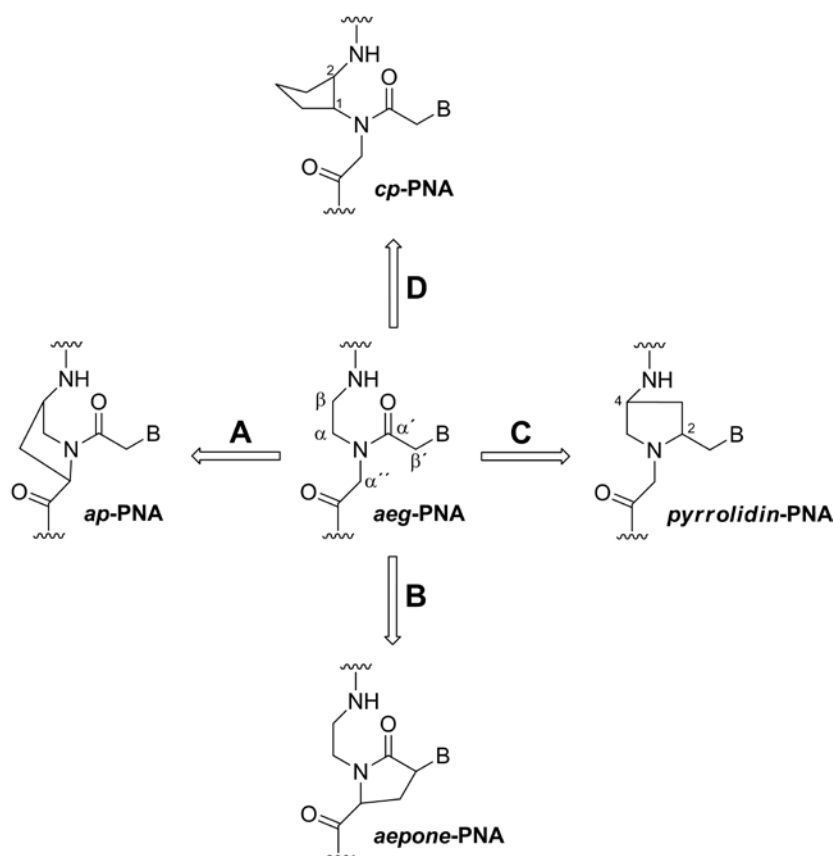
**Abb. 20:** Modifikation der *aeg*-PNA Struktur durch a) zusätzliche Methylengruppen in den Aminoethyl-Glycin- oder Linkereinheiten (von links nach rechts) b) Ersatz des tertiären Amidlinkers durch einen Ethylenlinker.

#### Einführen von zyklischen Strukturen

Nach dem Vorbild von *Nielsen et al.*<sup>[90]</sup> wurden viele konformationell eingeschränkte Modifikationen der *aeg*-PNA synthetisiert. Ziel war es, durch Einführen zyklischer Strukturen oder anderer Beschränkungen, eine vororganisierte Konformation der

PNA-Einzelstränge zu erreichen, welche die Affinität und Selektivität für komplementäre DNA oder RNA erhöht.

4-Aminopropyl PNA (*ap*-PNA) kann durch eine Methylenbrücke zwischen dem  $\beta$ -C-Atom des Aminoethylsegments und dem  $\alpha'$ -C-Atom des Glycinabschnitts der *aeg*-PNA erhalten werden (Abb. 21A). Der entstandene Fünfring sorgt nicht nur für eine erniedrigte Flexibilität, sondern generiert auch zwei neue Stereozentren. Einzelne chirale *D-trans*- oder *L-trans*-Monomere der Aminopropyl-PNA wurden von Kumar und Ganesh entweder am *N*-Terminus oder innerhalb der Sequenz von *aeg*-PNA eingebaut.<sup>[91-92]</sup> Die resultierenden Oligomere zeigten, im Gegensatz zur unmodifizierten PNA, höhere Schmelztemperaturen mit der Ziel-DNA und eine deutliche Präferenz für eine parallele oder antiparallele Orientierung.



**Abb. 21:** Strategien für das Design konformationell eingeschränkter PNA-Analoga.

Die Verknüpfung des  $\alpha'$ -C-Atoms der Glycineinheit mit dem  $\beta'$ -C-Atom des Linkers zur Nukleobase, wieder durch eine Methylengruppe, führt zur Aminoethylpyrrolidinon-PNA (*aepone*-PNA) (Abb. 21B). Sie besteht aus Aminoethylpropyl-5-on-Bausteinen,<sup>[93]</sup> die mit Thymin als Base in *aeg*-PNA-T<sub>8</sub>-Stränge an verschiedenen Positionen eingebaut wurden. Die einfach-, zweifach- oder vollständig mit *aepone*-

Bausteinen modifizierten *aeg*-PNA-Stränge zeigten eine bemerkenswerte Stabilität der gebildeten PNA<sub>2</sub>-DNA Triplexen verglichen mit dem aus nichtmodifizierter *aeg*-PNA.<sup>[94]</sup> Interessanterweise destabilisieren die *aepone*-PNA Oligomere die entsprechenden Komplexe mit Poly(rA) und zeigen so ein umgekehrtes Verhalten zur *aeg*-PNA, da diese mit RNA eine höhere Schmelztemperatur der Tripelhelix besitzt als mit DNA.

Verbrückt man das  $\alpha'$ - mit dem  $\beta$ -C-Atom der *aeg*-PNA, erhält man die sog. *pyrrolidin*-PNA (Abb. 21C).<sup>[72]</sup> Ein mit der Base T entsprechend modifiziertes (2*R*, 4*S*)-Monomer wurde in die Mitte einer Homothymin *aeg*-PNA eingebaut. Diese zeigte daraufhin eine höhere Affinität für die Ziel-DNA als reine *aeg*-PNA. Das (2*S*, 4*S*) diastereomere Monomer bewirkte jedoch im gleichen *aeg*-PNA-T<sub>8</sub> Strang eine Destabilisierung des gebildeten DNA Komplexes. Insgesamt konnte damit eine, durch Stereochemie bedingte Unterscheidung in der PNA:DNA-Erkennung erreicht werden.<sup>[95]</sup> In einem weiteren Experiment wurden alle vier Diastereomere des oben erwähnten T-Monomers synthetisiert. Mehrere *aeg*-PNA Stränge mit einer Sequenz aus allen vier Nukleobasen enthielten jeweils eines der Monomere. Im Vergleich zur nichtmodifizierten *aeg*PNA stabilisierten die beiden 4*R*-Modifikationen den PNA:DNA-Duplex mit einer deutlichen Unterscheidung zwischen paralleler und antiparalleler Orientierung.<sup>[96]</sup>

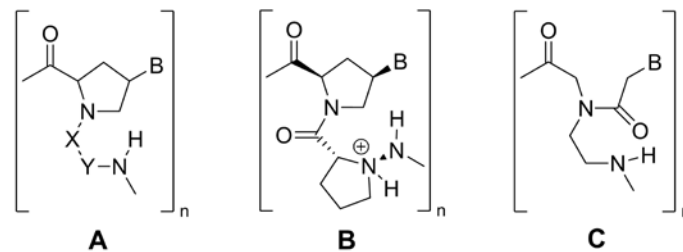
Verglichen mit den vorher besprochenen Strukturen enthält die Cyclopentyl-PNA (*cp*-PNA) keinen Heterozyklus. Die eingeschränkte Flexibilität des Rückgrats wird durch einen Fünfring im Aminoethylsegment erreicht.(Abb. 21D) *Appella et al.* haben zum Beispiel gezeigt, dass durch (1*S*, 2*S*)-*trans*-Cyclopentan-modifizierte PNA, Duplexe, Triplexen und Quadruplexen mit DNA stabilisiert werden können.<sup>[97]</sup>

Neben den oben genannten gibt es etliche weitere Beispiele für die Veränderung der ursprünglichen *aeg*-PNA durch zyklische Strukturen.<sup>[72, 98-102]</sup> Bis auf eine, im nächsten Abschnitt folgende Modifikation werden jedoch keine weiteren besprochen, da das den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde.

### **Pyrrolidinyl-PNA**

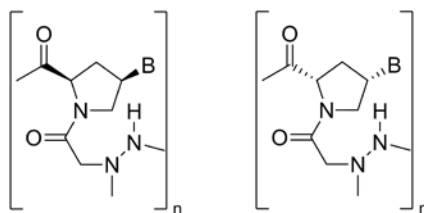
*Vilaivan et al.* beschäftigen sich bereits seit längerem mit der Synthese konformationell beschränkter, chiraler Analoga der Peptidnukleinsäure. Die Kernstruktur bildet dabei ein Pyrrolidinring (Abb. 22A),<sup>[99]</sup> weshalb die Oligomere auch als Pyrrolidinyl-PNA bezeichnet werden (nicht zu verwechseln mit der, aus

demselben Grund als *pyrrolidin*-PNA bezeichneten, des letzten Abschnitts). Solch eine PNA mit einer Aminopyrrolidin-2*R*-Carbonsäure (D-Apc) als zweiter zyklischer Struktur (Abb. 22**B**) wurde auf ihre Affinität und Selektivität gegenüber DNA und RNA untersucht.<sup>[103]</sup> Ein Oligothyminstrang dieser PNA zeigte mit einem poly(dA)-Strang eine Schmelztemperatur von über 85 °C. Unter den gleichen Bedingungen war mit poly(rA) eine viel niedrigere und mit poly(rU) gar keine Schmelztemperatur zu beobachten. Durch CD-Spektroskopie und UV-Titration konnte festgestellt werden, dass das PNA:DNA-Hybrid eine 1:1 Stöchiometrie besaß und keine Tripelhelix ausgebildet wurde. Des Weiteren wiesen zwei gleich aufgebaute, aus verschiedenen A-T-Sequenzen bestehende Pyrrolidinyl-PNA-Stränge, eine hohe Sequenzspezifität mit komplementären Oligodesoxyribonukleotiden auf.



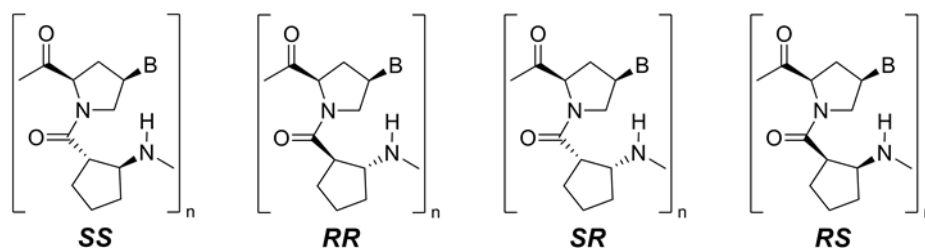
**Abb. 22:** Strukturen der Pyrrolidinyl-PNA: Kernstruktur mit Pyrrolidinring (**A**) und abwechselnder Aufbau aus 4'*R*-Thymin-1-ylpyrrolidin-2'*R*-Carbonsäure und Aminopyrrolidin-2*R*-Carbonsäure (**B**), sowie Struktur der *aeg*-PNA (**C**) zum Vergleich.

Um zu untersuchen, ob die positive Ladung der Aminopyrrolidineinheit oder die richtige Geometrie des starren Apc-Linkers für die hohe Stabilität der gebildeten Hybride aus PNA und DNA verantwortlich ist, wurden zwei neue Pyrrolidinyl-Peptidnucleinsäuren hergestellt.<sup>[104]</sup> Aufgebaut waren die Oligomere aus alternierenden Abschnitten von thyminmodifiziertem D- bzw. L-Prolin und flexiblem *N*-Amino-*N*-methylglycin (Abb. 23). UV- und CD- Titrationsexperimente ließen darauf schließen, dass keines der beiden PNA-Dekamere an komplementäre DNA- oder RNA-Stränge binden konnte, obwohl beide ein positiv geladenes, protoniertes Amin innerhalb der PNA-Struktur besaßen. Das führte wiederum zu dem Schluss, dass der steife Aminopyrrolidin-Carbonsäure-Linker in **B** (Abb. 22) und nicht die positive Ladung der ausschlaggebende Faktor für die ungewöhnlich starken Bindungseigenschaften zwischen Pyrrolidinyl-PNA und DNA darstellt.



**Abb. 23:** Thyminmodifiziertes D-Prolin (links), bzw. L-Prolin (rechts) abwechselnd angeordnet mit einem flexiblen *N*-Amino-*N*-Methylglycin Spacer.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mit vier neuen, in Abb. 24 dargestellten Pyrrolidiny-PNA Strukturen untersucht, welches die richtige Stereochemie eines 2-Aminozyklopentancarbonsäure (ACPC)-Spacers, der basenmodifizierte D-Prolineinheiten miteinander verbindet, ist.<sup>[105]</sup> Hierbei entspricht die PNA, die den *trans*-(1*S*, 2*S*)-ACPC-Spacer enthält, am besten der Struktur von **B** (Abb. 22) außer, dass sie bei neutralem pH ungeladen vorliegen sollte. Wie zu erwarten, bildete diese auch als einzige einen stabilen 1:1 Komplex mit komplementärer DNA in einer sequenzspezifischen Weise.



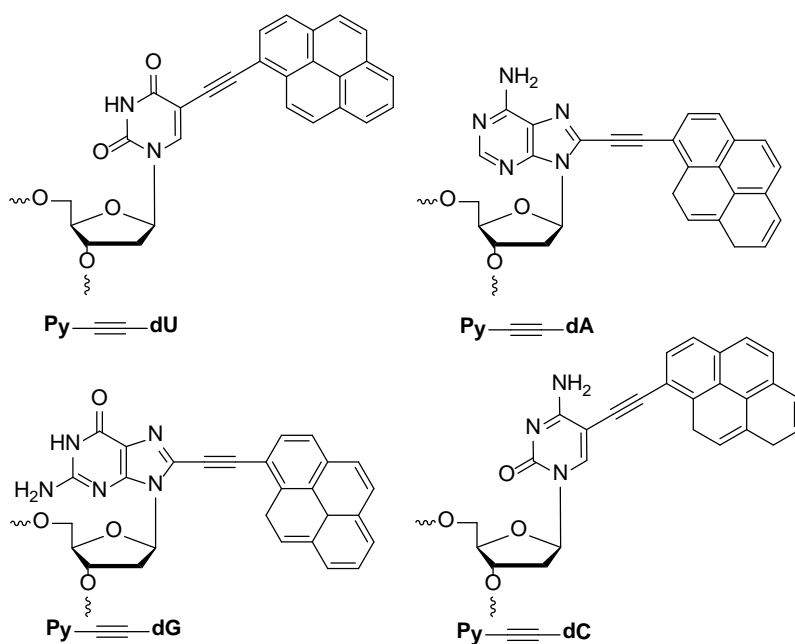
**Abb. 24:** Pyrrolidiny-PNA-Strukturen mit verschiedener Stereochemie des ACPC-Spacers: 1*S*, 2*S*; 1*R*, 2*R*; 1*S*, 2*R* und 1*R*, 2*S* (von links nach rechts).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele der im Zuge der Modifikation von *aeg*-PNA angestrebten Ziele, durch die konformationell eingeschränkte und stereochemisch optimierte *trans*-(1*S*, 2*S*)-ACPC-PNA erreicht werden konnten. Sie bildet nicht nur sehr stabile PNA-DNA-Hybride mit einer hohen Spezifität aufgrund von Watson-Crick Basenpaarungen aus, sondern bindet auch bevorzugt DNA gegenüber RNA und das in einer ausschließlich antiparallelen Orientierung.<sup>[106]</sup>

### 3 Ethinylpyren und Ethinylnilrot als Basenmodifikationen am 2'-Desoxyuridin

#### 3.1 Ethinylpyren als Basenmodifikation

Die mit dem 1-Ethinylpyrenchromophor an der C5- bzw. C8- Position der Base modifizierten natürlichen Nucleoside dA, dG, dC und dU wurden inzwischen von verschiedenen Arbeitsgruppen in Oligonukleotide eingebaut. In Abb. 25 sind die zugehörigen Strukturen gezeigt.



**Abb. 25:** Strukturen der vier 1-Ethinylpyrenmodifizierten Nucleoside.

Angefangen mit *Korshun et al.*, welche die Synthese des 1-ethinylpyrenverknüpften 2'-Desoxyuridins etablierten,<sup>[107]</sup> folgten weitere Ansätze mit anderen Nucleobasen. *Kim* und seine Mitarbeiter<sup>[108]</sup> beispielsweise modifizierten das 5'-Ende von Molecular Beacons mit  $\text{Py}\equiv\text{dA}$  und erreichten dadurch erstens eine Stapelung des Chromophors mit dem benachbarten Basenpaar am Ende der Stammregion über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Zweitens wurde die Fluoreszenz durch photoinduzierten Elektronentransfer des Fluorophors auf eine Nachbarbase am 5'-Ende (C, T und G,



aber nicht A) gelöscht.<sup>[109]</sup> Der Einbau von Py- $\equiv$ -dG in Oligonukleotide konnte z.B. durch *Saito et al.*<sup>[110]</sup> umgesetzt werden.

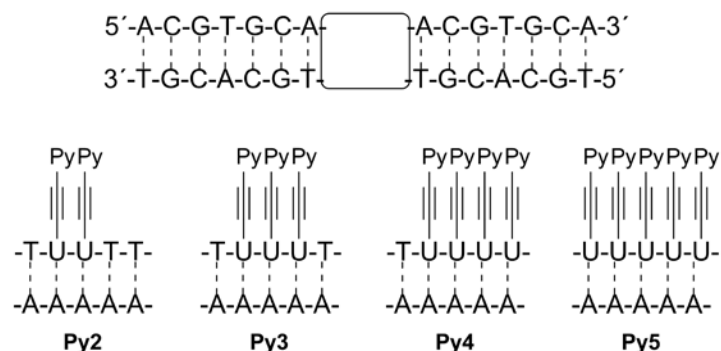
In unserer Arbeitsgruppe wurde sowohl der Einfacheinbau aller vier ethinylpyrenmodifizierten Basen<sup>[111-112]</sup> als auch der Mehrfacheinbau des Py- $\equiv$ -dU-Nukleosids<sup>[113-114]</sup> publiziert.

Die einfach mit Py- $\equiv$ -dX (X steht für A, C, G oder U) modifizierten DNA-Stränge brachten dabei für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente folgende wichtige Ergebnisse. Erstens zeigten die pyrenverknüpften Einzelstränge nach Hybridisierung mit den komplementären Oligonukleotiden eine intensive neue Absorptionsbande bei ca. 420 nm (X = A, G) bzw. bei ca. 400 nm (X = C, U). Diese Bande wurde auf Grundzustandswechselwirkungen zwischen der Py- $\equiv$ -dX-Einheit und den angrenzenden Basenpaaren zurückgeführt. Zweitens bestätigten temperaturabhängige Absorptionsmessungen der Doppelstränge bei den beiden oben genannten Wellenlängen die Vermutung, dass die Py- $\equiv$ -dX-Modifikation nur die lokale Struktur stört, während die B-DNA-Konformation der Duplexe insgesamt nicht beeinträchtigt wird. Anhand der Fluoreszenzspektren der pyrenmodifizierten Doppelstränge konnte die letzte wichtige Beobachtung gemacht werden. Es zeigte sich, dass die Basen der beiden Nukleoside dG und dC eine eher schwache elektronische Kopplung mit dem Pyren-Chromophor eingehen, obwohl sie über eine Acetylenbrücke mit diesem verbunden sind. Im Gegensatz dazu wiesen die Emissionsspektren der DNA-Duplexe mit Py- $\equiv$ -dA und Py- $\equiv$ -dU auf eine starke elektronische Wechselwirkung zwischen den Pyren-Einheiten und der Nukleobase hin.<sup>[111]</sup>

Des Weiteren spielen für diese Arbeit die Wechselwirkungen zwischen zwei nebeneinander kovalent in DNA eingebauten Py- $\equiv$ -dU-Fluorophoren eine Rolle. Die Art und die Dynamik dieser Wechselwirkungen konnte anhand von zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Fiebig* ermittelt werden.<sup>[113]</sup> Dabei wurde klar, dass die für das Pyren-Chromophor typische rot verschobene Excimerfluoreszenz der beiden benachbarten Py- $\equiv$ -dU-Bausteine nicht beobachtet werden konnte. Grund hierfür ist die helikale Verdrehung der beiden Chromophore, verursacht durch die doppelsträngige DNA-Struktur.

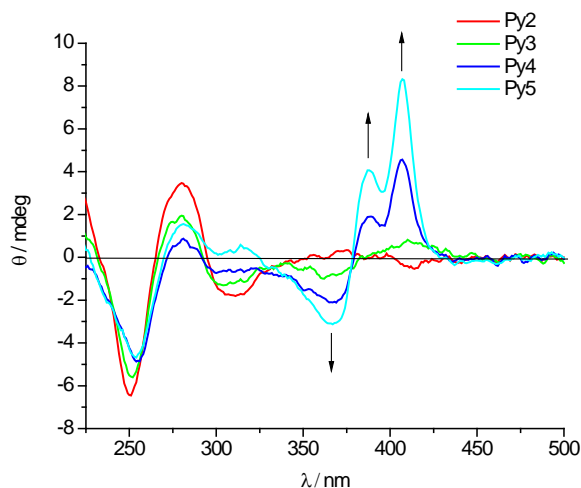
Letztendlich ist der kovalente Einbau von zwei bis fünf aufeinanderfolgenden Py- $\equiv$ -dU-Nukleosiden in Oligonukleotide<sup>[114]</sup> ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung. Die hierbei gemachten spektroskopischen Beobachtungen werden

nachfolgend kurz erläutert. Zur Veranschaulichung sind die zwei- bis fünffach modifizierten Duplexe in Abb. 26 dargestellt.



**Abb. 26:** Sequenzen der zwei- bis fünffach ethinylpyrenmodifizierten Doppelstränge **Py2** bis **Py5**. Hierbei ist Py-≡-U gleich Py-≡-dU.

Die Absorptionsspektren von **Py2** bis **Py5** wiesen im Bereich der Pyrenabsorption zwei Hauptbanden bei 380 nm und 405 nm auf. Verglichen mit dem einfach Py-≡-dU markierten Oligonukleotid ( $\lambda_{\text{abs}} = 375 \text{ nm}$  und  $400 \text{ nm}$ )<sup>[111]</sup> sind diese Peaks um ca. 5 nm bathochrom verschoben und besitzen eine höhere Intensität. Mit der Anzahl der Pyrene stieg die Absorption der Doppelstränge an und zwar stärker, als man es aufgrund eines linearen additiven Verhaltens erwarten würde. Dieses Verhalten deutete auf Grundzustandswechselwirkungen zwischen den Py-≡-dU-Chromophoren hin, welche in **Py2** schon existieren, aber in **Py4** und **Py5** noch intensiver wurden.<sup>[114]</sup> Diese Wechselwirkungen waren auch in den zugehörigen CD-Spektren erkennbar (Abb. 27). Für **Py3** wies das CD-Spektrum ein schwaches, für **Py4** und **Py5** ein starkes excitonisches Signal im Absorptionsbereich von 1-Ethinylpyren zwischen 330 und 430 nm auf. Aufgrund dieses CD-Signals wurde eine helikale Anordnung der Py-≡-dU-Einheiten entlang der DNA-Achse vermutet. Die Abwesenheit eines deutlichen Signals in diesem Bereich für **Py2** ließ erkennen, dass mindestens drei Chromophore zur Ausbildung einer solchen geordneten Struktur benötigt werden.



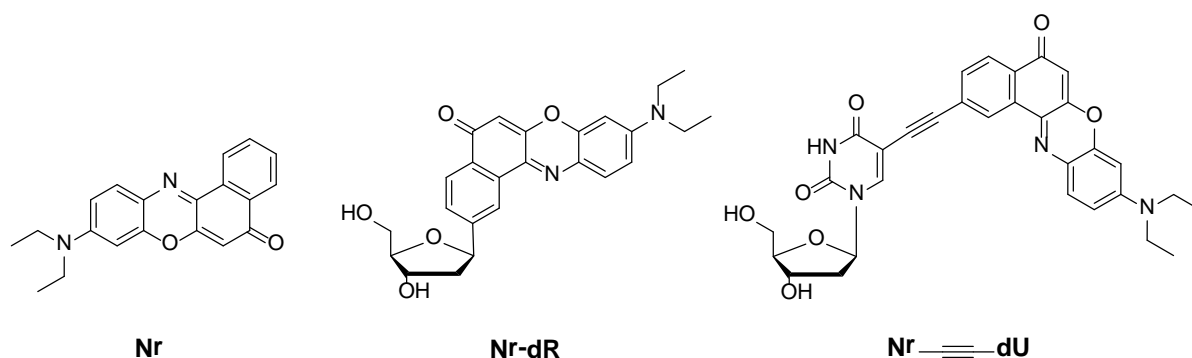
**Abb. 27:** CD-Spektren von **Py2-Py5**,  $c(\text{DNA}) = 2.5 \mu\text{M}$  in 10 mM NaP<sub>i</sub> und 250 mM NaCl bei pH 7.<sup>[115]</sup>

Die Emissionsintensität der Fluoreszenzspektren von **Py2-Py5** stieg zusammen mit der Zahl in die Duplexe eingebauter Py- $\equiv$ -dU-Fluorophore an. Die Emissionsmaxima der Doppelstränge lagen zwischen 485 und 494 nm. Verglichen mit der einfach Py- $\equiv$ -dU-markierten DNA (Maximum bei 445 nm)<sup>[111-112]</sup> waren sie alle um mindestens 40 nm bathochrom verschoben.<sup>[114]</sup>

Die bisher aufgeführten Beispiele beschäftigen sich mit dem kovalenten Einbau von ein oder mehreren ethinylpyrenverknüpften Nucleosiden in Oligonucleotide. Daraus resultieren sowohl Wechselwirkungen der Chromophore untereinander als auch mit den benachbarten Basen und eine meistens lokal veränderte DNA-Struktur. Veranschaulicht wird das ganze über die optischen und chiroptischen Eigenschaften der modifizierten DNA-Stränge. Im Umkehrschluss ist es also möglich, die Wechselwirkungen zwischen Chromophoren und damit ihre optischen Eigenschaften durch den Einbau in die geordnete Struktur der DNA-Doppelhelix zu beeinflussen. Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, lässt sich diese Vorgehensweise von nur einer Art kovalent gebundener Farbstoffe auf zwei verschiedene Farbstoffe ausdehnen. Als zweiter Fluorophor diente in dieser Arbeit Nilrot. Systeme, die beide Chromophore enthalten, werden beispielhaft im nächsten Kapitel besprochen.

### 3.2 DNA-Systeme mit Ethinylpyren und Ethinylnilrot

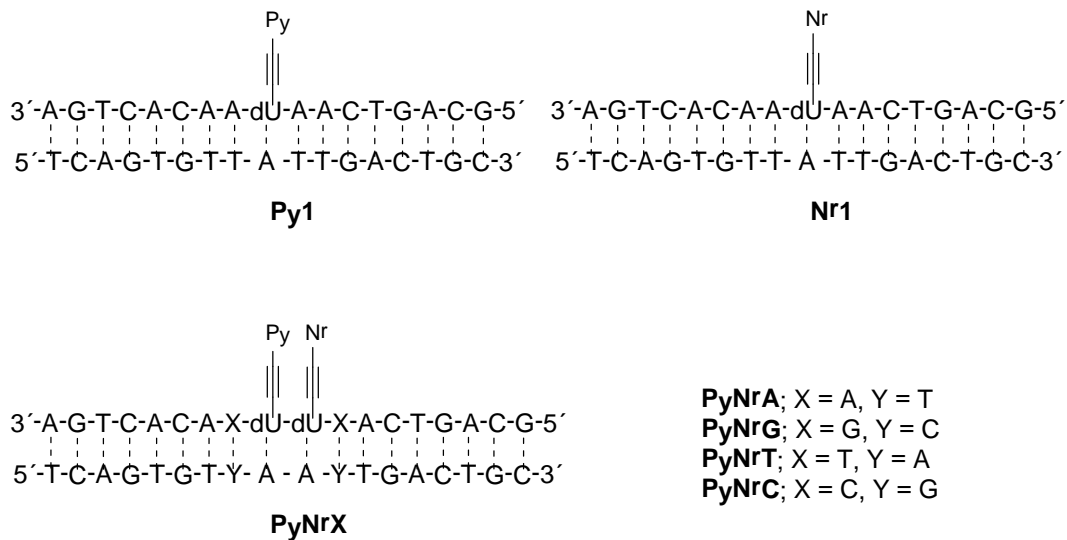
Der Farbstoff Nilrot (**Nr**) wird wegen seines hydrophoben Charakters, seiner hohen Fluoreszenzquantenausbeute<sup>[116]</sup> und vor allem seiner solvatochromen Eigenschaften häufig in praktischen Anwendungen eingesetzt.<sup>[117-119]</sup> Auch wurde dieses Fluorophor bereits über eine Verknüpfung mit dem anomeren C-Atom der 2'-Desoxyribose in Oligonukleotide eingebracht. Hierbei zeigten sich sowohl die optischen Eigenschaften des Nilrot-2'-Desoxyribose-Monomers (**Nr-dR**), als auch die der nilrotmodifizierten DNA empfindlich gegenüber der Polarität des umgebenden Lösungsmittels.<sup>[120]</sup> In unserem Arbeitskreis wurde der Nilrot-Chromophor über eine Ethinylbrücke mit der C5-Position von 2'-Desoxyuridin verknüpft. Dieses Nr≡-dU-Nukleosid (Abb. 28 rechts) zeigt ebenfalls ein solvatochromes Verhalten sowie eine exzellente Fluoreszenzquantenausbeute in mäßig polaren Lösungsmitteln.<sup>[117, 121]</sup> Die maximale Absorptionswellenlänge variiert je nach Solvens zwischen 532 nm und 569 nm.<sup>[121]</sup>



**Abb. 28:** Struktur von Nilrot (**Nr**), der nilrotverknüpften Desoxyribose (**Nr-dR**) und des ethinylnilrotverknüpften Desoxyuridins (**Nr≡-dU**).

Eine Voraussetzung für den resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) ist, wie bereits erwähnt, die spektrale Überlappung von Donoremmission und Akzeptorabsorption.<sup>[15]</sup> Mit anderen Worten, das Überlappintegral  $J$  darf nicht null sein. Nach dem kovalenten Einbau von Nr≡-dU in Oligonukleotide durch Reji Varghese zeigten diese eine maximale Absorption bei  $\lambda = 615$  nm.<sup>[122]</sup> Die im letzten Kapitel behandelten, einfach Py≡-dU-markierten DNA-Stränge<sup>[111, 113]</sup> besitzen ein Emissionsmaximum von ca. 440 nm und kommen deshalb als Donoren für den strahlungslosen Energietransfer auf einen im Oligonukleotidstrang benachbarten Nr≡-dU-Akzeptor in Frage. Die Berechnung des spektralen Überlappintegrals der

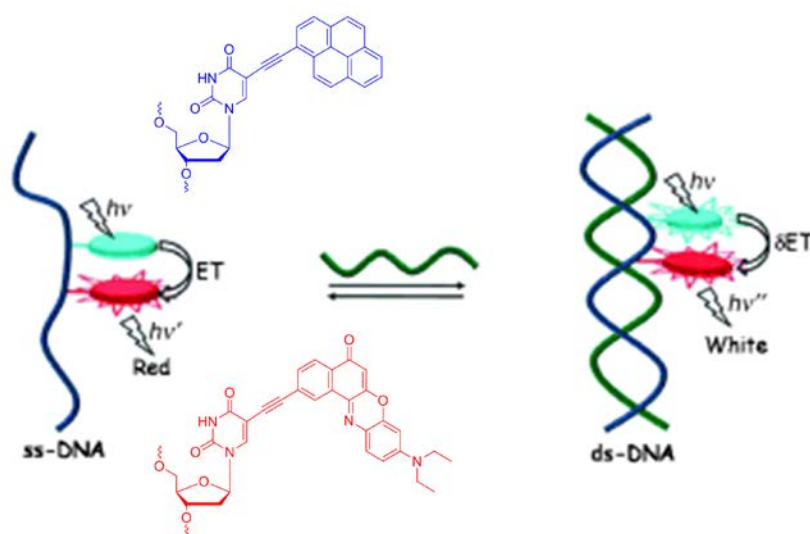
Emission eines einfach ethinylpyrenmodifizierten DNA-Strangs (**Py1**) und der Absorption eines einfach nilrotmodifizierten DNA-Strangs (**Nr1**) bestätigten diese Vermutung. Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres Oligonukleotid (**PyNrX**), welches sowohl Py≡-dU als auch Nr≡-dU enthielt, synthetisiert.<sup>[122]</sup>



**Abb. 29:** Sequenzen der DNA-Stränge **Py1**, **Nr1** und **PyNrX**.

Die Absorptionsspektren der zweifach modifizierten Doppelstränge **PyNrA** bis **PyNrC** wiesen die charakteristischen Absorptionen von Ethinylpyren ( $\lambda \approx 400$  nm) und Ethinylnilrot ( $\lambda \approx 620$  nm) auf. Außerdem konnte anhand der zugehörigen Schmelztemperaturen gezeigt werden, dass der aufeinanderfolgende Einbau dieser beiden Chromophore, die ausgebildeten Duplexe **PyNrA** bis **PyNrC** kaum bzw. gar nicht destabilisiert. Nach Anregung des Einzelstrangs **PyNrA** bei  $\lambda = 380$  nm, einer Wellenlänge bei der Ethinylpyren stark, Ethinylnilrot jedoch kaum absorbiert, wurde die Pyrenfluoreszenz bei  $\lambda = 440$  nm fast vollständig gelöscht. Gleichzeitig konnte die Emission des Nilrot-Chromophors bei  $\lambda = 665$  nm beobachtet werden. Es fand also wie erwartet ein resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET) von Pyren auf Nilrot statt. Nach Ausbildung des entsprechenden Duplexes **PyNrA** verringerte sich die Effizienz des FRET. Diese hängt wiederum stark von der Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor ab. Bei Ausbildung eines Duplex werden die Farbstoffe helikal zueinander verdreht, wodurch sich die relative Lage ihrer Dipole ändert und der Energietransfer weniger effizient stattfinden kann. Im Emissionsspektrum konnte dadurch ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 440$  nm und ein Absinken bei  $\lambda = 665$  nm beobachtet werden, sodass sich ein Verhältnis von ungefähr eins ergab ( $I_{440}/I_{665} = 0.96$ ). Wie in Abb. 30 schematisch

dargestellt verursachte dieses Intensitätsverhältnis eine weiße Emission, weshalb der Doppelstrang auch als *White-Light-Emitting DNA* (WED) bezeichnet wird.<sup>[122]</sup>

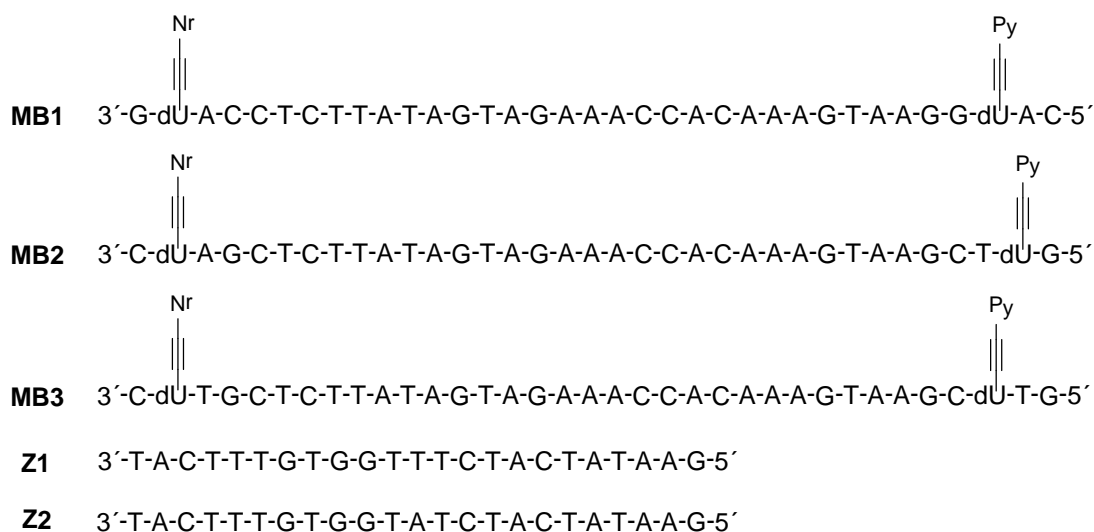


**Abb. 30:** Schematische Darstellung des mit Ethinylpyren und Ethinylnilrot modifizierten DNA-Strangs. In Gegenwart des komplementären Oligonukleotids sendet dieser weißes Licht aus (WED).<sup>[122]</sup>

Interessanterweise wurde die rote Emission des Nilrot-Chromophors beim Übergang vom Einzel- in den Doppelstrang stark erniedrigt, obwohl die FRET-Effizienz nur geringfügig abnahm. Eine Erklärung ist eventuell anhand des großen molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{615} = 2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und der hohen Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_{F665} = 0.30$ ) des Farbstoffs möglich.<sup>[122]</sup> Ähnlich wie beim **PyNrA**-Einzelstrang fand auch in den Einzelsträngen von **PyNrG** bis **PyNrC** ein Energietransfer von Pyren auf Nilrot statt, wie sich durch einen Fluoreszenzpeak im Spektrum bei  $\lambda = 665 \text{ nm}$  nach Anregung bei  $\lambda = 380 \text{ nm}$  erkennen ließ. Die korrespondierenden Duplexe zeigten bis auf **PyNrG** ein Verhältnis von  $I_{440}/I_{665} \approx 1$  und dadurch ebenfalls weiße Emission. Eine für praktische Anwendungen attraktive Eigenschaft der WED ist die Abhängigkeit der Energietransfer-Effizienz von der Assoziation/Dissoziation des zweifach modifizierten Duplex. Bei einer Temperaturerhöhung ändert sich die Farbe der Fluoreszenz von weiß nach rot bedingt durch die Dehybridisierung des Doppelstrangs. Dieser Effekt ist durch eine Erniedrigung der Temperatur umkehrbar.

Ein weiteres System, das sich den innerhalb der WED stattfindenden Energietransfer von Ethinylpyren auf Ethinylnilrot zu Nutze macht, wurde ebenfalls in unserem Arbeitskreis von *Reji Varghese* entwickelt. Es basiert auf mehreren, innerhalb der

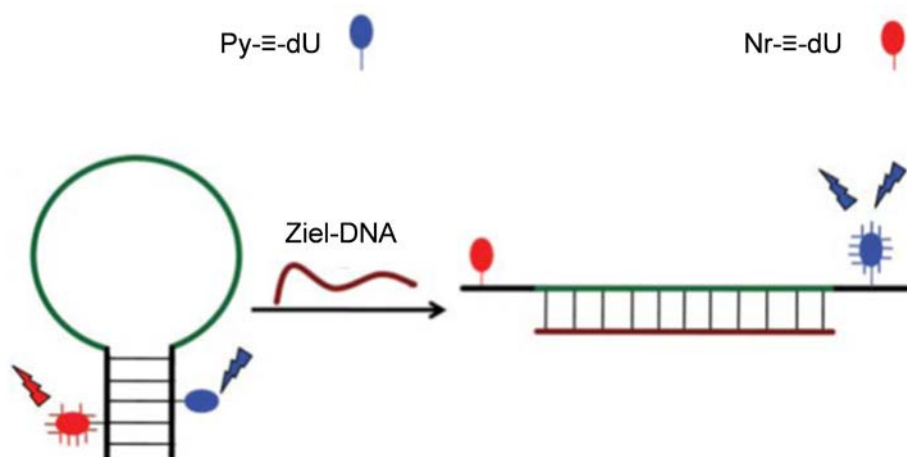
Stammregion mit den beiden oben genannten Farbstoffen modifizierten Molecular Beacons.<sup>[123]</sup> Die zugehörigen Sequenzen sind in folgender Abbildung gezeigt.



**Abb. 31:** Sequenzen der zweifach markierten Molecular Beacons **MB1-MB3** und der Ziel-DNA-Stränge **Z1** und **Z2**. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Stammregion von **MB1-MB3**, bzw. die fehlgepaarte Stelle in **Z2**.

Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Stammregion der Molecular Beacons. Im Falle von **MB1** sind die Sequenzen in diesem Abschnitt komplementär zueinander, wohingegen sie bei **MB2** eine und bei **MB3** zwei Fehlpaarungen aufweisen. In Abwesenheit der Ziel-DNA (**Z1**) sollte **MB1** in einer sog. Haarnadelkonformation vorliegen (Duplexbildung im Bereich der Stammregion). Dadurch liegen die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe zueinander. Nach der Anregung des Pyren-Chromophors bei  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$  konnte eine Emission bei  $\lambda = 660 \text{ nm}$  beobachtet werden. Diese ist auf einen, durch die Haarnadelstruktur von **MB1** möglichen effizienten Energietransfer ( $\approx 75\%$ ) von Pyren auf Nilrot zurückzuführen.<sup>[123]</sup> Anschließend wurde schrittweise **Z1** zum Molecular Beacon gegeben, wodurch die Intensität des Peaks bei  $\lambda = 660 \text{ nm}$  abnahm. Gleichzeitig stieg die Intensität der Pyrenfluoreszenz bei  $\lambda = 435 \text{ nm}$ . Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass sich die Haarnadelkonformation von **MB1** durch die Bindung an die Ziel DNA öffnet, wodurch die FRET-Effizienz in den nun weiter voneinander entfernten Farbstoffen stark sinkt (Abb. 32). Nach Zugabe von einem Äquivalent **Z1** konnte dadurch das Fluoreszenzmaximum von rot (Nilrotemission) nach blau (Pyrenemission) verschoben werden. Interessanterweise zeigte das Emissionsspektrum von **MB1** nach Zugabe von nur 0.5 Äquivalenten der Ziel-DNA zwei Maxima bei  $\lambda \approx 660$  und  $435 \text{ nm}$  mit annähernd gleicher Intensität. Das daraus

resultierende weiße Licht stammt von den beiden nebeneinander vorliegenden Strukturen des Molecular Beacons (geschlossenen Haarnadelstruktur und mit der Ziel-DNA gebildeter Duplex).



**Abb. 32:** Schematische Darstellung der rot-fluoreszierenden, geschlossenen Form eines ethinylpyren- und ethinylnilrotmodifizierten Molecular Beacons (links) sowie der blau-fluoreszierenden, offenen Form nach Bindung an einen Ziel-DNA-Strang (rechts).<sup>[123]</sup>

Pyren und Nilrot sind in den Molecular Beacons über starre Acetylenlinker mit den Nukleobasen der Stammregion verbunden. Eine Basenfehlpaarung in diesem Bereich führt zu einer Strukturänderung, welche auf die beiden Fluorophore übertragen wird. Dadurch ändert sich ebenfalls die relative Orientierung ihrer Übergangsdipolmomente und somit die Effizienz des zwischen ihnen stattfindenden Energietransfers. In den Haarnadelstrukturen von **MB2** und **MB3** erfolgte dieser deshalb nur teilweise und bewirkte damit eine weiße Fluoreszenz der beiden DNA-Stränge. Diese konnten durch die Zugabe von ca. 1.0 Äquivalenten **Z1** genau wie bei **MB1** komplett geöffnet werden, wodurch die blaue Pyrenemission regeneriert wurde. Die Emissionsfarbe wird bei **MB2** und **MB3** somit von weiß nach blau verschoben. Für praktische Anwendungen ist die Diskriminierung zwischen Ziel-DNA und nicht komplementärem Gegenstrang durch den Molecular Beacon von großer Bedeutung. Leider war dies bei **MB1** bis **MB3** nur anhand der Fluoreszenzintensitäten nicht möglich. Sowohl die Ziel-DNA **Z1** als auch der Gegenstrang mit einer Basenfehlpaarung **Z2** bewirkten einen nahezu identischen Anstieg der Emission nachdem sie an die entsprechende Haarnadelstruktur gebunden hatten. Eine andere Anordnung der beiden Farbstoffe innerhalb der Stammregion könnte eventuell eine Diskriminierung zwischen passendem und nicht passendem DNA-Strang bewirken. Auf diese Möglichkeit wird genauer in Kapitel 4 eingegangen.



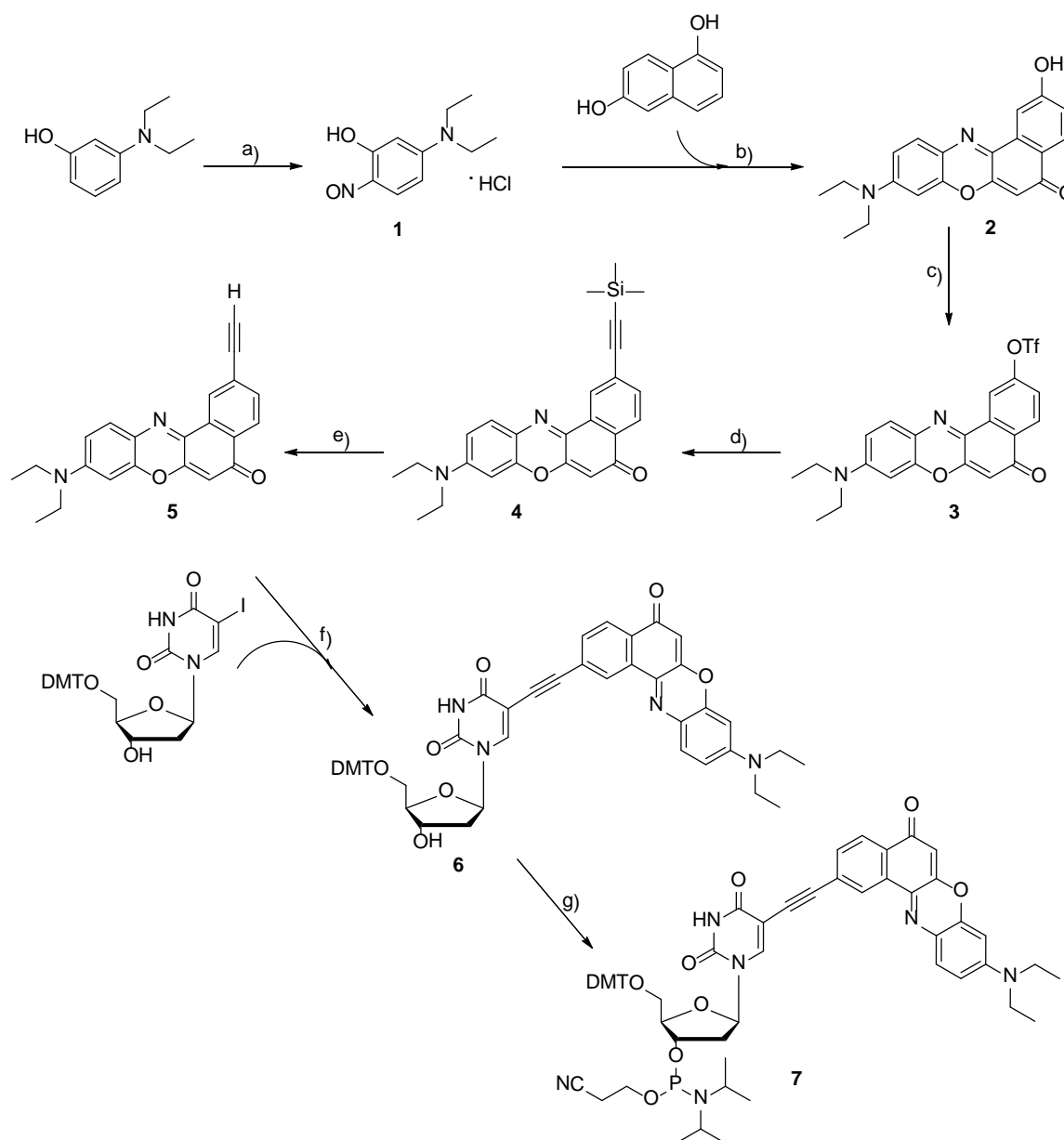
### 3.3 DNA/PNA-Hybride mit Ethinylpyren und Ethinylnilrot

In den beiden in Kapitel 3.2 besprochenen Beispielen konnte aufgrund des teilweise ablaufenden Energietransfers zwischen Ethinylpyren und Ethinylnilrot eine weiße Fluoreszenz beobachtet werden. Die DNA wurde dazu mit den beiden Farbstoffen modifiziert. Die weiße Emission hing jedoch von der Effizienz des FRET ab. Will man dieses System jetzt im Bereich der Bioanalytik als multifluoreszente Sonde<sup>[124]</sup> oder für organische Materialien wie z.B. lichtsammelnde Antennen<sup>[20, 125]</sup> verwenden, ist es zunächst wichtig, die photophysikalischen Wechselwirkungen innerhalb dieses Chromophor-Paares genauer zu verstehen. Wie in Kapitel 2.2 und 3.2 veranschaulicht, können mit Hilfe der DNA als Strukturtemplat sowohl der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, als auch die Orientierung der Fluorophore zueinander präzise festgelegt werden. Die Möglichkeit machten sich auch *Wilhelmsson et al.* zu Nutze.<sup>[126]</sup> Sie entwickelten ein fluoreszentes DNA-Basenpaar, welches sie an verschiedenen Stellen in mehrere Duplexe einbauten. Der Donor-Akzeptor-Abstand sowie die relative Lage der Übergangsdipolmomente wurden dabei über die Geometrie der DNA-Helix bestimmt. Ihr Experiment unterstützte die von Förster aufgestellte Theorie, dass die Effizienz des Energietransfers auch von der Orientierung der beteiligten Übergangsdipolmomente abhängt. Ihr maximaler Wert wurde jedoch durch den Abstand zwischen Donor und Akzeptor festgelegt.

Um die photophysikalischen Wechselwirkungen zwischen Pyren und Nilrot nun besser untersuchen zu können, soll ihre gegenseitige Orientierung im folgenden Abschnitt beeinflusst werden. Mit beiden Farbstoffen über Ethinylbrücken verknüpfte Oligonukleotide werden dazu mit der konformationell eingeschränkten Pyrrolidinyl-PNA hybridisiert. Die entstehenden PNA-DNA Hybride sollten sich in ihrer Struktur und deshalb auch in den Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren von den bereits in Kapitel 3.2 betrachteten zweifach modifizierten DNA-Duplexen unterscheiden.

## 3.3.1 Synthese und Sequenzdesign

Zunächst wurde der für die Oligonukleotidsynthese benötigte nilrotmodifizierte Phosphoramiditbaustein **7** nach literaturbekannten Bedingungen hergestellt.<sup>[122, 127-130]</sup>

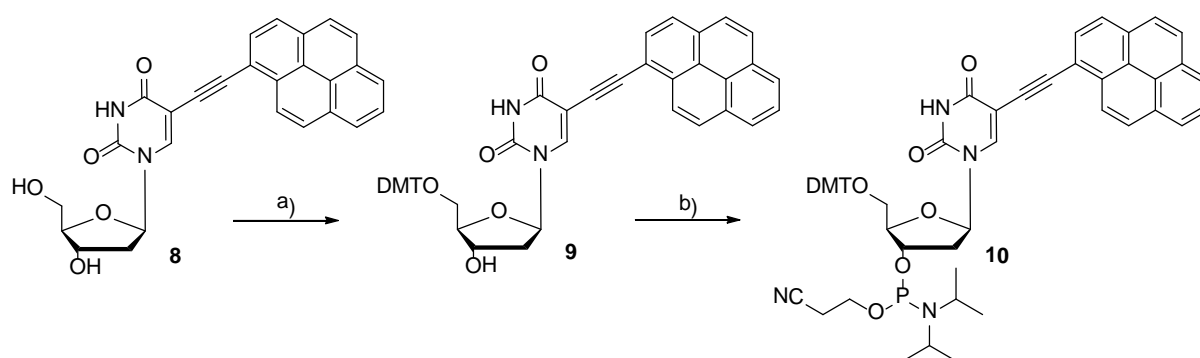


**Abb. 33:** Synthese des ethinylnilrotmodifizierten Phosphoramiditbausteins **7**: **a)** Isopentylnitrit, HCl in Dioxan, 2 h, 0 °C, 95%; **b)** in DMF, 4 h, Rückfluss, 60%; **c)** (Tf)<sub>2</sub>NPh, NEt<sub>3</sub> in abs. THF, 4 d, RT, 73%; **d)** TMS-Acetylen, NEt<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI in abs. DMF, 4 h, 80 °C, 61%; **e)** TBAF in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 h, RT, 71%; **f)** NEt<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI in abs. DMF, 3 h, 60 °C, 70%; **g)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit, DIPEA in abs. DCM, 2 h, RT, 95%.

Dafür wurde im ersten Schritt 5-Diethylamino-2-nitrosophenol-Hydrochlorid (**1**) aus 3-Diethylaminophenol nach einer Anleitung von *Christoph Beyer*<sup>[127]</sup> synthetisiert und anschließend mit 1,6-Dihydroxynaphthalin zum Benzophenoxazin-Grundgerüst **2**

umgesetzt.<sup>[128]</sup> Dieses wird danach über die Triflat-Zwischenstufe **3** zu TMS-Acetylen-Nilrot **4** mittels *Sonogashira*-Kupplung umgesetzt. Die TMS-Gruppe konnte bei Raumtemperatur mit TBAF abgespalten werden und man erhielt Verbindung **5**.<sup>[129]</sup> In einer weiteren *Sonogashira*-Kupplung wurde das Acetylenverknüpfte Nilrot **5** mit 5'-DMT geschütztem 5-Iod-2'-desoxyuridin<sup>[130]</sup> zu **6** umgesetzt. Dabei konnten durch eine verringerte Reaktionstemperatur von ursprünglich 90 °C auf 60 °C höhere Ausbeuten erreicht werden. Unter basischen Bedingungen wurde zum Schluss aus **6** und 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit der Phosphoramiditbaustein **7** hergestellt.<sup>[122]</sup>

Der mit 1-Ethinylpyren verknüpfte Baustein **10** ist zwar käuflich erhältlich, kann aber auch in zwei Stufen hergestellt werden (siehe Abb. 34). Die Synthese von Vorstufe **8** wird in Kapitel 5.2.1 beschrieben. Aus dieser konnte **10** in zwei Stufen erhalten werden.



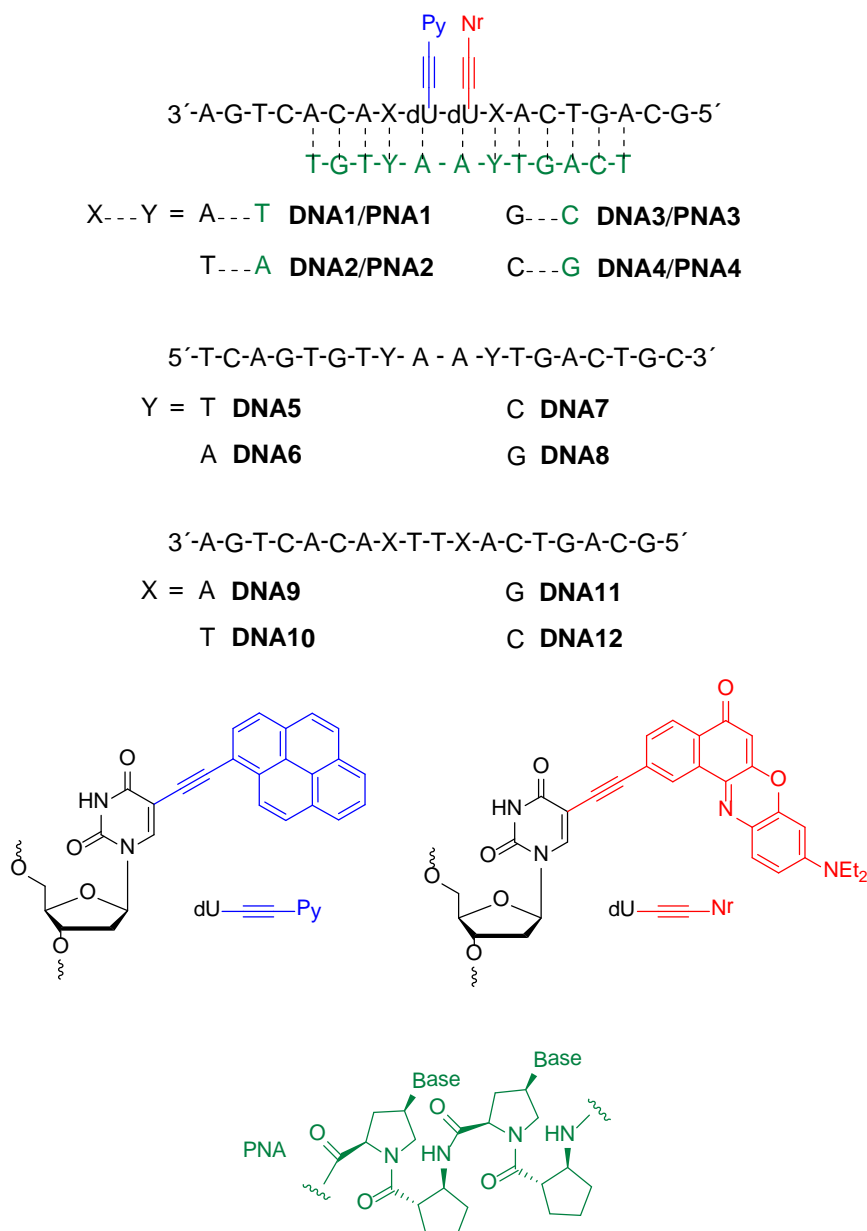
**Abb. 34:** Synthese des ethinylpyrenmodifizierten Phosphoramiditbausteins **10**: **a)** DMT-Cl (3.9 eq.) in abs. Pyridin, 48 h bei RT dann 72 h bei 30 °C und 24 h bei 40 °C, 100%; **b)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit (6.7 eq.), DIPEA (8.5 eq.) in abs. DCM, 8 h, RT, 76%.

Zuerst wurde die 5'-OH-Gruppe von **8** mit DMT-Cl unter basischen Bedingungen geschützt. Dabei konnte durch eine langsame Erhöhung der Reaktionstemperatur über einen längeren Zeitraum ein vollständiger Umsatz erreicht werden. Anschließend wurde das geschützte 2'-Desoxyuridin **9** mit 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit unter ebenfalls basischen Bedingungen zum Phosphoramiditbaustein **10** umgesetzt.

Die beiden Bausteine **7** und **10** wurden durch automatisierte Festphasensynthese nebeneinander in Oligonukleotide eingebaut. Die Synthesebedingungen sind in Kapitel 7.3.2 beschrieben.

### 3 Ethinylpyren und Ethinylnilrot als Basen-modifikationen am 2'-Desoxyuridin

Für die spektroskopischen Untersuchungen wurden die mit Pyren und Nilrot modifizierten Oligonukleotide **DNA1** bis **DNA4** hergestellt. Wie in Abb. 35 dargestellt, können die Pyrrolidiny-PNA Gegenstränge **PNA1** bis **PNA4** (grün) jeweils mit dem mittleren Bereich der genannten DNA-Stränge komplementäre PNA/DNA-Hybride ausbilden (**DNA1/PNA1** bis **DNA4/PNA4**).<sup>[131]</sup>



**Abb. 35:** Sequenzen der modifizierten Oligonukleotide **DNA1** bis **DNA4**, der acpcPNA Gegenstränge **PNA1** bis **PNA4**, der Oligonukleotid-Gegenstränge **DNA5** bis **DNA8** und der Referenz-Stränge **DNA9** bis **DNA12**.

Aus der ebenfalls in Abb. 35 gezeigten Struktur der Pyrrolidiny-PNA wird ersichtlich, dass es sich um die in Kapitel 2.3.3 vorgestellte *trans*-(1*S*, 2*S*)-ACPC-PNA (im folgenden als acpcPNA bezeichnet) handelt. Ihre bereits erwähnten Eigenschaften,

wie die Ausbildung stabiler PNA/DNA-Hybride mit einer hohen Sequenzspezifität und die bevorzugte Bindung von DNA gegenüber RNA in einer antiparallelen Orientierung, sowie die Tatsache, dass sie nicht an andere komplementäre acpcPNA-Stränge bindet, machen die acpcPNA zu einem idealen Gegenstrang für die modifizierten DNA-Stränge. Auch Oligonukleotid-Gegenstränge, **DNA5** bis **DNA8**, wurden synthetisiert. Sie bilden mit **DNA1** bis **DNA4** komplementäre DNA-Duplexe aus, deren Sequenzen denen von **PyNrA** bis **PyNrC** in Abb. 29 entsprechen. Die Eigenschaften der DNA-Doppelstränge können so direkt mit denen der DNA/PNA-Hybride verglichen werden. Die Oligonukleotide **DNA9** bis **DNA12** wurden als Referenz-Stränge synthetisiert, um die thermische Stabilität der unmodifizierten PNA/DNA-hybride (z.B. **DNA9/PNA1**) zu untersuchen.

#### 3.3.2 Spektroskopische Untersuchungen

Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften der acpcPNA/DNA-Hybride anhand von Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie sowie Schmelztemperaturmessungen charakterisiert und mit denen der entsprechenden DNA-Duplexe verglichen. Hierbei werden sowohl komplementäre PNA/DNA-Hybride bzw. DNA-Duplexe (**DNA1/PNA1** bzw. **DNA1/DNA5**) als auch solche mit zwei Fehlpaarungen (**DNA1/PNA2** bzw. **DNA1/DNA6**) untersucht. In Tabelle 1, welche die Ergebnisse der spektroskopischen Messungen zusammenfasst, sind die zueinander komplementären Stränge mit dem Zusatz "m" (für *match*) gekennzeichnet.<sup>[131]</sup> Bilden die DNA/PNA-Hybride oder DNA-Duplexe zwei Basenfehlpaarungen aus, steht hinter ihrer Bezeichnung der Zusatz "mm" (für *mismatch*).

### 3 Ethinylpyren und Ethinylnilrot als Basen-modifikationen am 2'-Desoxyuridin

**Tabelle 1:** Vergleich der optischen Eigenschaften, sowie der Schmelztemperaturen von acpcPNA/DNA-Hybriden und DNA-Duplexen in Pufferlösung (10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl, pH 7) mit c(DNAss) = 2.5 μM, c(DNADs) = 2.5 μM und c(DNA/PNA) = 2.5 μM

Sequenz <sup>[a]</sup>		$T_m$ [°C]	$A_{402}/A_{379}$ <sup>[b]</sup>	$\lambda$ [nm] <sup>[c]</sup>	$I_{665}/I_{440}$ <sup>[d]</sup>
<b>DNA1</b>	-	-	0.97	621	8.9
<b>DNA1/DNA5</b>	m	58.5	0.99	622	2.7
<b>DNA1/DNA6</b>	mm	48.7	1.02	624	9.0
<b>DNA1/PNA1</b>	m	82.3	0.92	618	3.6
<b>DNA1/PNA2</b>	mm	- <sup>[e]</sup>	0.96	622	9.1
<b>DNA9/PNA1</b>	m	86.0	-	-	-
<b>DNA2</b>	-	-	0.94	618	>10
<b>DNA2/DNA6</b>	m	57.2	0.97	620	4.3
<b>DNA2/DNA5</b>	mm	47.9	0.99	618	11.5
<b>DNA2/PNA2</b>	m	76.5	0.90	631	1.2
<b>DNA2/PNA1</b>	mm	- <sup>[e]</sup>	0.96	619	6.3
<b>DNA10/PNA2</b>	m	>90	-	-	-
<b>DNA3</b>	-	-	1.03	621	8.5
<b>DNA3/DNA7</b>	m	63.5	1.01	621	5.2
<b>DNA3/DNA8</b>	mm	51.2	1.06	622	>10
<b>DNA3/PNA3</b>	m	58.2	0.95	623	2.2
<b>DNA3/PNA4</b>	mm	- <sup>[e]</sup>	1.03	621	7.4
<b>DNA11/PNA3</b>	m	71.8	-	-	-
<b>DNA4</b>	-	-	0.91	622	>10
<b>DNA4/DNA8</b>	m	64.3	0.98	623	1.7
<b>DNA4/DNA7</b>	mm	36.4	0.91	621	>10
<b>DNA4/PNA4</b>	m	77.4	0.90	637	1.0
<b>DNA4/PNA3</b>	mm	- <sup>[e]</sup>	0.91	622	8.9
<b>DNA12/PNA4</b>	m	>90	-	-	-

[a] m = match, mm = mismatch. [b] Intensitätsverhältnis der Absorptionen bei 402 nm und 379 nm. [c] Absorptionsmaximum des Nilrot-Farbstoffs. [d] Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzen bei 665 nm und 440 nm mit  $\lambda_{exc} = 380$  nm. [e] Kein messbarer Schmelzpunkt.<sup>[131]</sup>

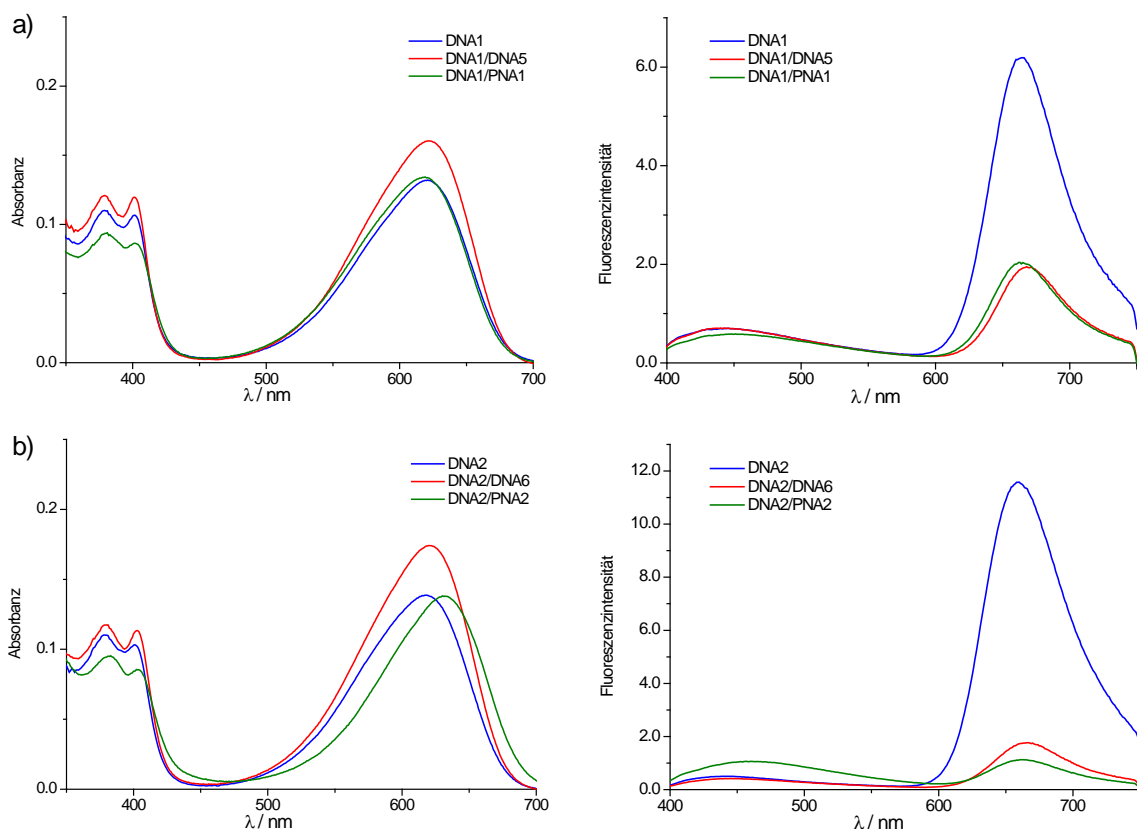
Die Schmelztemperaturen in Tabelle 1 zeigen für die unmodifizierten acpcPNA/DNA-Hybride (**DNA9/PNA1** bis **DNA12/PNA4**) Werte im Bereich von 71.8 °C bis über 90 °C. Berücksichtigt man die Tatsache, dass die PNA-Gegenstränge **PNA1** bis **PNA4** nur zu einem 12 Basen langen Teilbereich des jeweiligen DNA-Strangs komplementär sind, liegen diese Werte sehr hoch. Des Weiteren wiesen **PNA1** und

**PNA3** mit exakt gleich langen, komplementären und unmodifizierten Oligonukleotiden Schmelztemperaturen (85.4 °C und 71.0 °C) auf, die den hier beobachteten (86.0 °C und 71.8 °C) sehr ähnlich sind. Aufgrund dieser Beobachtungen können zwei Schlussfolgerungen getroffen werden. Erstens scheinen die PNA Gegenstränge tatsächlich an die komplementäre, mittlere Region der DNA-Stränge zu binden (siehe Abb. 35). Zweitens bildet die acpcPNA sowohl mit gleich langen, als auch mit in dieser Arbeit verwendeten, längeren Oligonukleotiden extrem stabile PNA/DNA-Hybride aus.<sup>[106]</sup> Die Sequenzen von **DNA9/PNA1** und **DNA10/PNA2** weisen zwei A-T-Basenpaare auf, während diejenigen von **DNA11/PNA3** und **DNA12/PNA4** an den gleichen Stellen zwei G-C Basenpaare enthalten. Ein Austausch von A-T gegen G-C würde bei einem DNA-Duplex normalerweise die Schmelztemperatur erhöhen. Bei den Hybriden mit acpcPNA ist dieses Verhalten jedoch nicht zu beobachten, da die A-T reichen Sequenzen im Vergleich zu den G-C reichen Strängen ähnliche (verglichen mit **DNA12/PNA4**) bzw. höhere Schmelztemperaturen (verglichen mit **DNA11/PNA3**) besitzen.

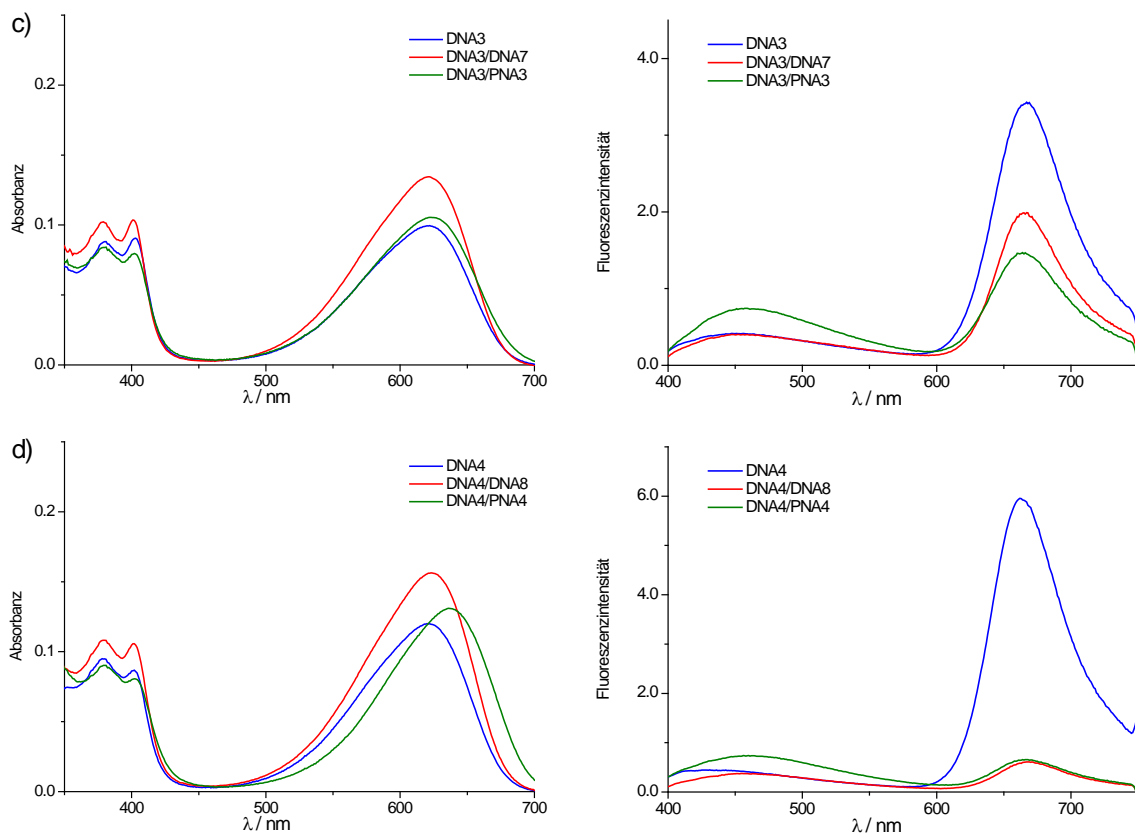
Nach dem Einbau der beiden Fluorophore zeigen die entsprechenden acpcPNA/DNA-Hybride (**DNA1/PNA1** bis **DNA4/PNA4**) erniedrigte Schmelztemperaturen in einem Bereich von 58.2-83.3 °C. Diese Destabilisierung resultiert wahrscheinlich aus einer Störung der ausgebildeten Hybrid-Struktur durch die beiden Farbstoffe. Andererseits sind die Schmelztemperaturen dieser acpcPNA/DNA-Hybride verglichen mit denen der entsprechend zweifach markierten DNA-Duplexe (**DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8**) höher. Die einzige Ausnahme bildet hierbei der Duplex **DNA3/DNA7**, welcher eine höhere Schmelztemperatur als der **DNA3/PNA3**-Hybrid zeigt. Weisen die gebildeten DNA-Duplexe zwei Fehlpaarungen auf (**DNA1/DNA6** bis **DNA4/DNA7**), verringert das ihre Stabilität. Ihre Schmelztemperatur ist deshalb um 9.3 °C bis 27.9 °C niedriger als die der völlig komplementären Duplexe. Die Schmelztemperaturen von acpcPNA/DNA-Hybriden, welche zwei Fehlpaarungen enthalten (**DNA1/PNA2** bis **DNA4/PNA3**), konnten wegen der geringen Absorptionsunterschiede in den entsprechenden Messungen nicht bestimmt werden. Sie sind in Tabelle 1 mit [e] markiert. Aufgrund der bereits durch eine einzige Fehlpaarung hohen Destabilisierung der acpcPNA/DNA-Hybride wird vermutet, dass Hybride mit zwei Fehlpaarungen gar nicht erst ausgebildet werden.<sup>[106, 132]</sup>

### 3 Ethinylpyren und Ethinylnilrot als Basen-modifikationen am 2'-Desoxyuridin

Im Anschluss an die Schmelztemperaturmessungen wurden die optischen Eigenschaften der acpcPNA/DNA-Hybride mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht und mit denen der entsprechenden DNA-Duplexe verglichen. Für die zweifach markierten, komplementären acpcPNA/DNA-Hybride bzw. DNA-Duplexe und die DNA-Einzelstränge sind die Spektren in Abb. 36 gezeigt. Die drei Systeme zeigen alle eine Absorption bei ca. 370-400 nm (Ethinylpyren) und bei ca. 620 nm (Ethinylnilrot) (Abb. 36a-d links).<sup>[131]</sup>

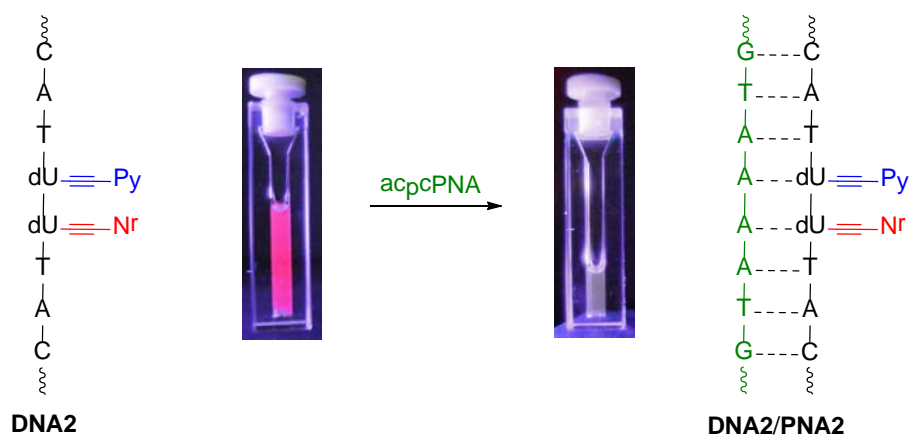






**Abb. 36:** Absorptions- und Emissionsspektren der DNAs (**DNA1-DNA4** je  $2.5 \mu\text{M}$ ), der komplementären acpcPNA/DNA-Hybride (**DNA1/PNA1-DNA4/PNA4** je  $2.5 \mu\text{M}$ ) und der komplementären DNA Duplexe (**DNA1/DNA5-DNA4/DNA8** je  $2.5 \mu\text{M}$ ) in Pufferlösung ( $10 \text{ mM NaP}_i$ ,  $250 \text{ mM NaCl}$ ,  $\text{pH } 7$ ) bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ .

Die Fluoreszenz wurde bei einer für Ethinylpyren selektiven Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$  mit gleichbleibender Spaltbreite für Anregung und Emission aufgenommen (Abb. 36a-d rechts). Die verschiedenen Einzelstränge, Hybride und Duplexe weisen alle eine Fluoreszenz bei ca.  $440 \text{ nm}$  (Ethinylpyren) und bei ca.  $665 \text{ nm}$  (Ethinylnilrot) auf. Diese wird auf einen Energietransfer zwischen den beiden Chromophoren, ähnlich wie bei dem System der WED-DNA aus Kapitel 3.2, zurückgeführt. Bei den Hybriden **DNA2/PNA2** und **DNA4/PNA4** sind die Intensitäten der blaugrünen Pyrenemission und der roten Nilrotfluoreszenz fast identisch, sodass sich insgesamt eine weiße Emission ergibt (Abb. 37).



**Abb. 37:** Farbumschlag von roter Fluoreszenz (**DNA2**) zu weißer Fluoreszenz (**DNA2/PNA2**) nach Ausbildung eines acpcPNA/DNA-Hybrids am Beispiel von **DNA2**;  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ .

Betrachtet man jetzt die UV/Vis-Absorption der einzelnen Proben genauer, lassen sich zwei wesentliche Unterschiede feststellen. Erstens variiert das Verhältnis der beiden Absorptionsbanden von Ethinylpyren bei ca. 402 nm und ca. 379 nm, zweitens ändert sich die maximale Wellenlänge der Nilrotabsorption (siehe Tabelle 1). Wie die in Kapitel 3.1 erwähnten, früheren Experimente mit einfach Py- $\equiv$ -dU modifizierten DNA-Strängen bereits zeigten, ist die Absorptionsbande bei ca. 402 nm auf einen excitonisch gekoppelten Komplex aus Ethinylpyren und einer der benachbarten DNA-Basen zurückzuführen.<sup>[111-112]</sup> Obwohl diese Grundzustandswechselwirkungen bei zufällig gefalteten Einzelsträngen normalerweise weniger stark ausgeprägt sind, kann man einen Unterschied im Verhältnis der Absorptionsintensitäten ( $A_{402}/A_{379}$ ) von **DNA1** und **DNA3** im Vergleich mit **DNA2** und **DNA4** erkennen. Für die ersten beiden Oligonukleotide ist das Intensitätsverhältnis erhöht (0.97 und 1.03, siehe Tabelle 1), da der Pyrenchromophor hier mit den benachbarten Purinbasen (A oder G) besser stapeln kann. Grundzustandswechselwirkungen können den Prozess des Energietransfers behindern, da für diesen weder der Energiedonor (hier Ethinylpyren) noch der Akzeptor (hier Ethinylnilrot) Kopplungen aufweisen sollten. Da in den beiden Oligonukleotiden **DNA2** und **DNA4** der Ethinylpyren-Chromophor im Grundzustand weniger stark gekoppelt vorliegt (ersichtlich aus dem Verhältnis  $A_{402}/A_{379}$ ), besitzen sie eine bessere Energietransfer-Effizienz als **DNA1** und **DNA3**. Diese bewirkt eine höhere Nilrot-Emission und dadurch ein höheres Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ( $I_{665}/I_{440} > 10$ ) in den beiden erstgenannten DNA-Strängen. In den komplementären Duplexen von **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** werden die Grundzustandswechselwirkungen zwischen dem Ethinylpyren-Chromophor und den

benachbarten DNA-Basen noch verstärkt. Veranschaulicht wird diese Tatsache abermals durch die erhöhte Intensität der Absorptionsbande bei ca. 402 nm und dem dadurch ansteigenden Verhältnis  $A_{402}/A_{379}$  für diese DNA-Doppelstränge (vgl. Tabelle 1). Durch die verstärkte excitonische Kopplung wird hierbei der Energietransfer auf Ethinylnilrot verhindert. Deshalb sinkt die Fluoreszenzintensität bei ca. 665 nm stark ab, ohne dass die Emission von Ethinylpyren bei ca. 440 nm entsprechend ansteigt, wie es bei einem teilweise ablaufenden Energietransfer (z.B. innerhalb der WED<sup>[122]</sup>) der Fall wäre. Insgesamt ist ein verringertes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $I_{665}/I_{440}$  für die komplementären Doppelstränge (1.7 bis 5.2) im Vergleich mit den Einzelsträngen (8.5 bis >10) zu beobachten.

Auch in den fehlgepaarten Doppelsträngen (**DNA1/DNA6** bis **DNA4/DNA7**) sind excitonische Wechselwirkungen vorhanden (angedeutet durch ein steigendes bzw. gleich bleibendes Verhältnis von  $A_{402}/A_{379}$  verglichen mit den Einzelsträngen). Diese scheinen den Energietransfer zwischen den beiden Farbstoffen jedoch nicht zu behindern, da das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzen ( $I_{665}/I_{440}$ ) in den fehlgepaarten Duplexen ähnlich oder sogar noch höher ist (9.0 bis 11.5) als das der entsprechenden Einzelstränge **DNA1** bis **DNA4**. Anscheinend sorgen die beiden zu Py-≡-dU und Nr-≡-dU benachbarten Fehlpaarungen für eine größere konformationelle Flexibilität in diesem Teilbereich des Doppelstrangs. Dadurch können die beiden Chromophore (und damit ihre Übergangsdipolmomente) eine für den effizienten Energietransfer günstigere relative Orientierung annehmen.

Vergleicht man jetzt als letztes die optischen Eigenschaften der komplementären acpcPNA/DNA-Hybride (**DNA1/PNA1** bis **DNA4/PNA4**) mit denen der DNA-Duplexe (**DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8**), so fällt auf, dass das Intensitätsverhältnis  $I_{665}/I_{440}$  bei allen Hybriden, bis auf **DNA1/PNA1**, geringer ist, als bei den entsprechenden Doppelsträngen. Ein Zusammenhang zwischen diesem Verhältnis und der thermischen Stabilität ( $T_m$ ) der acpcPNA/DNA-Hybride bzw. der DNA-Duplexe konnte nicht festgestellt werden. Eine offensichtliche Relation besteht jedoch zu der Absorptionsbande des Ethinylpyrens bei ca. 402 nm, da diese und damit das Verhältnis  $A_{402}/A_{379}$  bei allen Hybriden stark reduziert wird. Durch die konformationell eingeschränkte Struktur der acpcPNA werden mit komplementären Oligonukleotiden Hybride ausgebildet, deren Bewegungsfreiheit ebenfalls stark beschränkt ist. Anscheinend werden dadurch die Wechselwirkungen des Ethinylpyrens mit den angrenzenden DNA-Basen (z.B. aufgrund von Stapelung) unterbrochen, was

wiederum zu der beobachteten erniedrigten Absorptionsintensität bei ca. 402 nm führt. Der Zusammenhang zwischen der Intensität dieser Absorptionsbande und dem Verhältnis  $I_{665}/I_{440}$  besteht also darin, dass beide bei Ausbildung der PNA/DNA-Hybride verringert werden. Wie bereits erwähnt, behindern Grundzustandswechselwirkungen zwischen Ethinylpyren und den Nachbarbasen den Energietransfer auf Ethinylnilrot. Daher sollte eine verringerte excitonische Kopplung von Pyren innerhalb der Hybride zu einer im Vergleich zu den DNA-Doppelsträngen erhöhten Nilrotemission bei ca. 665 nm führen. Diese bleibt jedoch annähernd gleich (**DNA1/PNA1** und **DNA4/PNA4**), oder wird sogar erniedrigt (**DNA2/PNA2** und **DNA3/PNA3**) wie man in Abb. 36a-d rechts erkennen kann. Dieses Verhalten kann mit Hilfe von zwei weiteren spektroskopischen Beobachtungen erklärt werden. Erstens, steigt die Fluoreszenzintensität von Ethinylpyren in den acpcPNA/DNA-Hybriden (bis auf **DNA1/PNA1**) verglichen mit der in den DNA-Duplexen leicht an. Daran lässt sich erkennen, dass die veränderte Effizienz des Energietransfers (der Hybride verglichen mit den Duplexen) vermutlich nicht auf Grundzustandswechselwirkungen des Ethinylpyrens mit den angrenzenden DNA-Basen zurückzuführen ist. Viel wahrscheinlicher ist, dass nach Ausbildung eines Hybrids mit komplementärer acpcPNA die Übergangsdipolmomente der beiden Chromophore des Oligonukleotids ihre relative Orientierung zueinander verändern und dadurch ein effizienter Energietransfer teilweise verhindert wird. Dabei nimmt beim Übergang vom DNA-Einzelstrang zum PNA/DNA-Hybrid die Ethinylnilrotfluoreszenz stark ab, während die Ethinylpyrenemission nur leicht ansteigt. Dieses scheinbare Ungleichgewicht resultiert aus dem großen molaren Extinktionskoeffizienten und der hohen Fluoreszenzquantenausbeute des erstgenannten Fluorophors. Beide bewirken, wie auch schon bei der WED-DNA beobachtet werden konnte, ein starkes Absinken der Ethinylnilrotfluoreszenz selbst bei einer geringen Änderung im Energietransfer.<sup>[122]</sup> Zweitens, ändert sich das Maximum der Nilrotabsorption (siehe Tabelle 1 [c]) beim Vergleich der zweifach modifizierten Einzel- und Doppelstränge (ohne Fehlpaarungen) mit den acpcPNA/DNA-Hybriden. Das Absorptionsmaximum ist bei **DNA1/PNA1** und **DNA3/PNA3** leicht, bei **DNA2/PNA2** und **DNA4/PNA4** stark verschoben und deutet auf Grundzustandswechselwirkungen zwischen Ethinylnilrot und Ethinylpyren in den Hybriden hin. Diese beeinträchtigen aus genannten Gründen ebenfalls den Energietransfer auf Nilrot und dadurch dessen Fluoreszenzintensität. Die beiden

genannten Faktoren tragen also entweder einzeln, oder in Kombination in verschiedenem Ausmaß dazu bei, dass die Nilrotemission bei ca. 665 nm in den gebildeten Hybriden aus **DNA1-DNA4** und **PNA1-PNA4** nicht ansteigt, obwohl die excitonischen Wechselwirkungen zwischen Ethinylpyren und den Nachbarbasen dort weniger stark ausgeprägt sind.

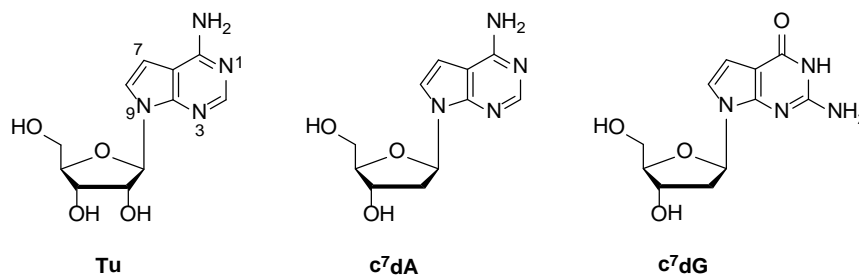
#### 3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnten mehrere mit Ethinylpyren und Ethinylnilrot modifizierte Oligonukleotide hergestellt werden. Die beiden Fluorophore wurden dabei jeweils benachbart in vier unterschiedliche Sequenzen eingebaut. Anschließend wurden sie mit Pyrrolidinyln-PNA- und DNA-Gegensträngen zu zweifach markierten acpcPNA/DNA-Hybriden und DNA-Duplexen hybridisiert. Diese waren entweder komplementär oder enthielten zwei Fehlpaarungen. Die optischen Eigenschaften der markierten Einzelstränge, Doppelstränge und Hybride wurden untereinander verglichen, während ihre thermischen Eigenschaften noch zusätzlich denen unmodifizierter PNA/DNA-Hybride gegenübergestellt wurden. Dabei waren bei letzteren die größten Schmelztemperaturen zu beobachten. Der Energietransfer von Ethinylpyren auf Ethinylnilrot innerhalb aller zweifach modifizierten Systeme wurde von drei Faktoren beeinflusst: 1) excitonische Wechselwirkungen zwischen Ethinylpyren und den benachbarten DNA-Basen, veranschaulicht durch die Absorptionsbande bei ca. 402 nm 2) relative Orientierung der beiden Chromophore und damit ihrer Übergangsdipolmomente, am besten zu beobachten anhand der PNA/DNA-Hybride 3) Grundzustandswechselwirkungen zwischen Pyren und Nilrot. In den untersuchten Einzelsträngen, DNA-Duplexen und acpcPNA/DNA-Hybriden trugen diese drei Faktoren entweder alleine oder in Kombination in verschiedenem Ausmaß zu den beobachteten optischen Eigenschaften bei. Insgesamt konnte dadurch ein tiefer Einblick in die photophysikalischen Wechselwirkungen zwischen Ethinylpyren und Ethinylnilrot gewonnen werden. Dieser ermöglicht es, den bereits vorhandenen multichromophoren DNA-basierten Systemen ein weiteres auf der Grundlage von acpcPNA/DNA-Hybriden hinzuzufügen. Gerade die beiden Hybride aus **DNA2/PNA2** und **DNA4/PNA4** sind für diesen Zweck aufgrund ihrer hohen thermischen Stabilität, ihrer Sequenzspezifität und ihrer weißen Emission (durch nahezu identische Beiträge von Pyren- und Nilrotfluoreszenz) perfekt geeignet.

## 4 Ethinylnilrot als Basenmodifikation am 7-Desazaadenin

### 4.1 7-Desaza-2'-desoxypurine als artifizielle Nukleobasen

Tubercidin (**Tu**) ist ein natürlich vorkommendes Antibiotikum.<sup>[133]</sup> Das zugehörige 2'-Desoxytubercidin wird auch als 7-Desaza-2'-desoxyadenosin (**c<sup>7</sup>dA**) bezeichnet (vgl. Abb. 38). Dieses kann seit mehr als zwanzig Jahren synthetisch hergestellt<sup>[134]</sup> und in Oligonukleotide eingebaut werden.<sup>[135]</sup> Auch die Herstellung des entsprechenden 7-Desaza-2'-desoxyguanosins (**c<sup>7</sup>dG** in Abb. 38) ist bekannt.<sup>[136]</sup>



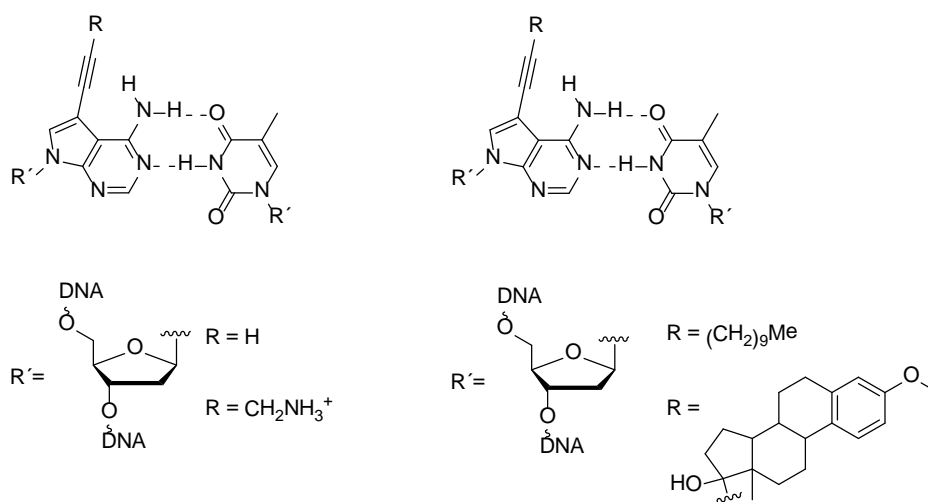
**Abb. 38:** Struktur von Tubercidin (**Tu**, mit Purin-Nummerierung), 2'-Desoxytubercidin (**c<sup>7</sup>dA**) und 7-Desaza-2'-desoxyguanosin (**c<sup>7</sup>dG**).

Wie bereits erwähnt, führen Modifikationen an der C8-Position von Purinen zu einer *syn*-Konformation der Nucleoside,<sup>[137-138]</sup> wodurch diese nicht mehr in der Lage sind Watson-Crick-Basenpaare auszubilden. Werden die Substituenten mit der N7-Position natürlicher Purine verknüpft, so bildet sich dadurch eine positiv geladene Nucleobase. Letztere wird daraufhin zu einer besseren Abgangsgruppe und kann durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung abgespalten werden.<sup>[139]</sup> Diese Reaktion wird als Depurinierung bezeichnet und bewirkt die Bildung einer abasischen Stelle im DNA-Strang.<sup>[27]</sup> Um Oligonukleotide dennoch in dieser Position funktionalisieren zu können, werden alternative, heterozyklische Systeme mit einer CH-Gruppe anstelle des N7-Atoms verwendet (siehe Abb. 38). Es konnte gezeigt werden, dass bei Modifikationen an der C7-Position solcher 7-Desazapurine das Nucleosid die günstige *anti*-Konformation beibehält und deshalb keine Destabilisierung des artifiziellen DNA-Duplex auftritt.<sup>[140-141]</sup> Außerdem befinden sich die so eingeführten

Moleküle nach Ausbildung eines Doppelstrangs innerhalb der großen Furche (wie nach der Verknüpfung mit der C5-Position von Pyrimidinen).<sup>[50, 140]</sup>

*Seela et al.* konnten 7-halogen- bzw. 7-methylsubstituierte 7-Desaza-2'-desoxyadenosine in Oligonukleotide einbauen. Die resultierenden Duplexe zeigten eine deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zu den Oligonukleotiden mit dA oder **c<sup>7</sup>dA**.<sup>[142]</sup> In einem weiteren Ansatz wurden DNA-Stränge, die 7-Desaza-7-(hex-1-ynyl)-2'-desoxyadenosin oder 7-Desaza-7-iod-2'-desoxyadenosin enthielten, synthetisiert.<sup>[141]</sup> Es wurden Schmelztemperaturmessungen durchgeführt, sowie die thermodynamischen Daten der Duplexbildung ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass die ausgebildeten Doppelstränge durch die modifizierten 7-Desazaadenine unter weitgehender Erhaltung der DNA-Struktur stabilisiert werden. Die 7-(Hex-1-ynyl)-verknüpften 7-Desazaadenine gingen außerdem eine selektive Basenpaarung mit dT ein.

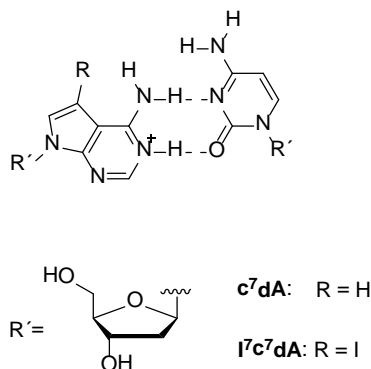
Durch das Einführen von langen Dodecynylketten oder sperrigen Steroidresten an der C7-Position von **c<sup>7</sup>dA** kann aber auch eine Destabilisierung der Oligonukleotid-Duplexe, verglichen mit unmodifizierten Doppelsträngen, erreicht werden (Abb. 39 rechts).<sup>[50]</sup> An der gleichen Position mit kurzen Alkynylresten substituierte 7-Desaza-2'-desoxyadenosine erhöhten allerdings nach Einbau in DNA-Duplexe deren Stabilität, wenn die Länge der Seitenkette nicht viel mehr als die Tiefe der großen Furche der B-DNA betrug (R = H in Abb. 39 links). Eine besondere Rolle bei der Modifikation von 7-Desazaadeninen spielt der 7-(3-Aminoprop-1-ynyl)-rest. In Oligonukleotide eingebaut führte er zu einer Stabilisierung der Doppelstränge (R = CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup> in Abb. 39 links). Diese verschwand jedoch nach dem Einbau mehrerer aufeinanderfolgender Reste.<sup>[50]</sup> Der Grund für den stabilisierenden Effekt der Aminopropargylgruppe wird vor allem auf zwei Tatsachen zurückgeführt. Erstens liegt das Amin bei physiologischem pH-Wert protoniert vor und reduziert dadurch die elektrostatische Abstoßung zwischen den Phosphatgruppen der gegenüberliegenden DNA-Stränge.<sup>[143]</sup> Zweitens sorgt der Alkynylteil für eine bessere Basenstapelung.<sup>[144-145]</sup> Neben den besprochenen Desazaadeninen wurden auch 7-Desaza-2'-desoxyguanosine mit Aminopropargylresten an der C7-Position substituiert. Die entsprechenden Oligonukleotid-Doppelstränge wurden im Vergleich zu den unmodifizierten Duplexen ebenfalls stabilisiert.<sup>[146]</sup>



**Abb. 39:** Basenpaar aus Thymin und 7-Desazaadenin mit Duplex-stabilisierenden (links), bzw. Duplex-destabilisierenden (rechts) Substituenten an der C7-Position des Puringerüsts.

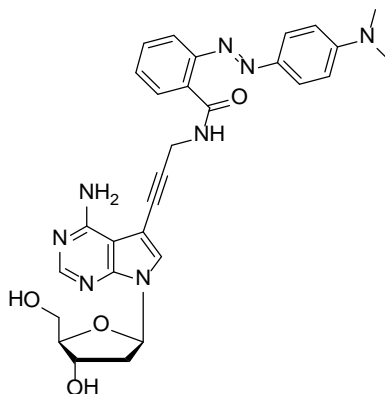
Ein Nachteil von 7-Desaza-2'-desoxyadenosin ist, dass es unter neutralen Bedingungen nicht nur mit dT, sondern auch mit dC ein stabiles Basenpaar ausbildet. Seela und seine Mitarbeiter untersuchten diese Tatsache mit Hilfe eines Doppelstrangs, der eine **c<sup>7</sup>dA**-dC Fehlpaarung enthielt. Ein Referenzstrang mit einem **c<sup>7</sup>dA**-dT Basenpaar an der gleichen Position wurde ebenfalls betrachtet.<sup>[147]</sup> pH-abhängige Messungen konnten zeigen, dass der Duplex mit einer Fehlpaarung im sauren Medium (pH = 6.5) eine ebenso hohe Schmelztemperatur aufweist wie der Referenzstrang. Durch eine schrittweise Erhöhung des pH-Wertes nahm die Stabilität der **c<sup>7</sup>dA**-dC Fehlpaarung (und damit die Schmelztemperatur des zugehörigen Doppelstrangs) immer weiter ab, während sich die Schmelztemperatur des Referenzstrangs kaum veränderte. Ähnliche Beobachtungen wie für die nicht halogenierte Form, konnten für das an der C7-Position mit Iod verbundene **c<sup>7</sup>dA** (= **I<sup>7</sup>c<sup>7</sup>dA**) gemacht werden. Auch hier wurde die Stabilität der Duplexe, die **I<sup>7</sup>c<sup>7</sup>dA**-dC enthielten, mit steigendem pH-Wert erniedrigt. Es konnte also insgesamt eine erhöhte Basendiskriminierung von **c<sup>7</sup>dA** und **I<sup>7</sup>c<sup>7</sup>dA** gegenüber dC unter alkalischen Bedingungen festgestellt werden. Seela *et al.* erklärten dieses Verhalten mit Hilfe des pK<sub>a</sub>-Wertes von **c<sup>7</sup>dA**. Dieser liegt mit einem Wert von 5.30 deutlich über dem von natürlichem dA (pK<sub>a</sub> = 3.50) und kann deshalb bereits unter neutralen Bedingungen zur Protonierung von 7-Desazaadenin innerhalb des DNA-Basenstapels führen. Das dadurch gebildete protonierte Basenpaar zwischen **c<sup>7</sup>dA** (bzw. **I<sup>7</sup>c<sup>7</sup>dA**) und dC (Abb. 40) sorgt für eine pH-abhängige Stabilisierung der entsprechend modifizierten Duplexe.





**Abb. 40:** Struktur des protonierten Basenpaares  $c^7dA$ -dC bzw.  $I^7c^7dA$ -dC.

Eine der wichtigsten Anwendungen für 7-Desaza-2'-desoxyadenosin ist als Anknüpfungspunkt für Farbstoffe zur Markierung von DNA-Strängen. So konnte zum Beispiel ein mit Methylrot an der C7-Position funktionalisiertes  $c^7dA$  von *Brown et al.* in Oligonukleotide eingebaut werden (Abb. 41).<sup>[148]</sup> Der Chromophor diente zusammen mit den Fluorophoren *Carboxy-X-Rhodamin (ROX)* und *Carboxyfluorescein (FAM)* zur Detektion von Produkten der Polymerase-Kettenreaktion (englisch *Polymerase Chain Reaction, PCR*) in Lösung, wobei Methylrot zur Fluoreszenzlöschung verwendet wurde.<sup>[149]</sup>

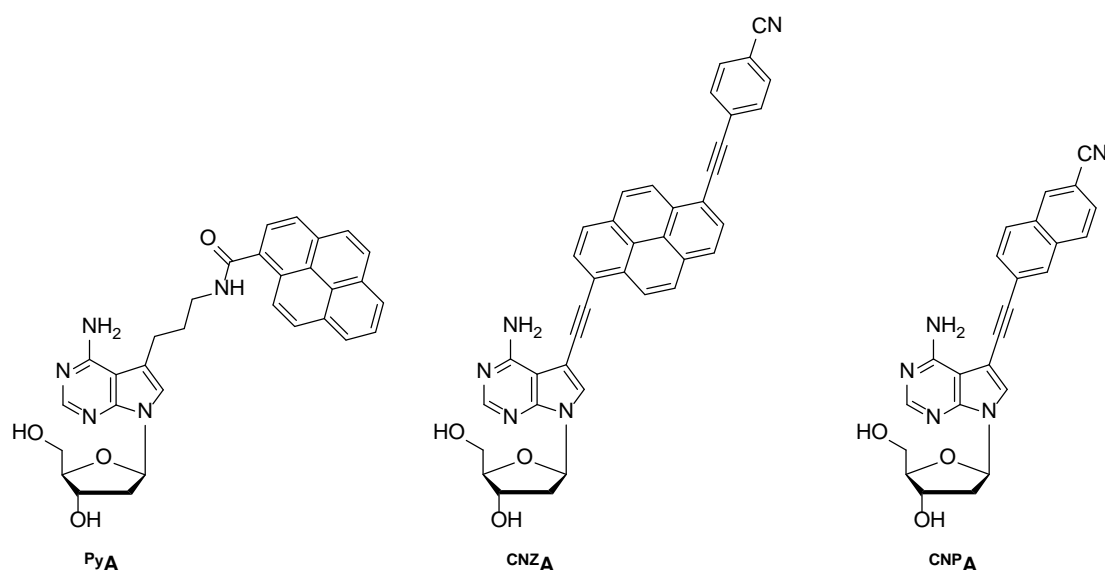


**Abb. 41:** Struktur des methylrotmodifizierten 7-Desaza-2'-desoxyadenosins.

Auch *Saito et al.* beschäftigten sich intensiv mit der Farbstoffmodifikation von 7-Desazaadeninen. Der dabei häufig verwendete Pyren-Fluorophor wurde zum Beispiel über einen Carboxamidopropyllinker mit der C7-Position des Puringerüsts verbunden und anschließend in Oligonukleotide eingeführt ( $^{Py}A$  in Abb. 42). Die ausgebildeten Doppelstränge zeigten bei einer Basenfehlpaarung (C, G oder A) gegenüber von  $^{Py}A$  eine starke Pyrenemission, während die Fluoreszenz des passenden Duplex (T gegenüber von  $^{Py}A$ ) nahezu komplett gelöscht wurde.<sup>[150]</sup>

Aufgrund dieser Eigenschaft wurden mit  $\text{PyA}$  modifizierte Oligonukleotide außerdem als Sonden zur SNP-Detektion verwendet.<sup>[150]</sup>

Wird Pyren mit Hilfe einer Acetylenbrücke an der üblichen Position der 7-Desazaadeninbase verknüpft, sorgt diese Verbindung für eine elektronische Kopplung zwischen den beiden Chromophoren.<sup>[151-152]</sup> Durch einen ebenfalls über ein Acetylenmolekül verbrückten 4-Cyanophenylrest am anderen Ende der Pyreneinheit entsteht eine sog. *Push-pull*-Verbindung mit 7-Desazaadenin als Elektronendonator und 4-Cyanophenyl als Elektronenakzeptor ( $\text{CNZA}$  in Abb. 42). *Saito* und seine Mitarbeiter untersuchten dieses intramolekulare Donor-Akzeptor-System auf seine photophysikalischen Eigenschaften.<sup>[153]</sup> Dabei zeigte die Fluoreszenz (Intensität und Wellenlänge) des Nucleosids  $\text{CNZA}$  eine deutliche Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels. Nach dem Einbau in DNA-Doppelstränge ließen die gemessenen Schmelztemperaturen darauf schließen, dass  $\text{CNZA}$  sowohl mit Thymin, als auch mit Cytosin ein stabiles Basenpaar bilden kann. Diese Vermutung wird durch ähnliche, bereits erwähnte, Beobachtungen von *Seela et al.* mit 7-Desaza-2'-desoxyadenosin unterstützt.<sup>[147]</sup>

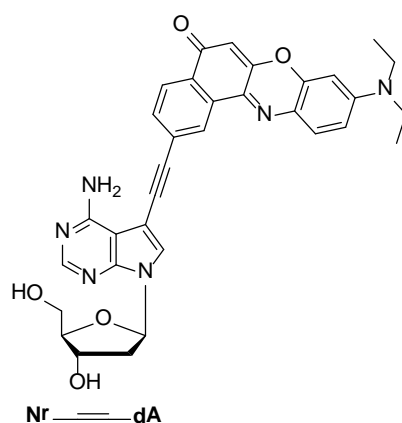


**Abb. 42:** Strukturen der modifizierten 7-Desaza-2'-desoxyadenosine  $\text{PyA}$ ,  $\text{CNZA}$  und  $\text{CNpA}$ .

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung untersuchten *Saito* und seine Mitarbeiter, neben anderen Verbindungen, erneut *Push-pull*-Chromophore. Hierbei wurde diesmal nicht Pyren, sondern ein 2,6-disubstituiertes Naphthalen-Derivat ( $\text{CNpA}$  in Abb. 42) betrachtet.<sup>[140]</sup> Die nach Anregung des  $\text{CNpA}$ -Nucleosids beobachtete Emission zeigte sich empfindlich gegenüber der Polarität des Lösungsmittels. Diese

Tatsache wurde auf die Bildung eines intramolekularen Donor-Akzeptor-Systems zwischen der elektronenschiebenden 7-Desazaadenineinheit und dem elektronenziehenden Cyanonaphthalenrest zurückgeführt.

Auch in unserem Arbeitskreis wurden modifizierte 7-Desaza-2'-desoxyadenosine auf ihre optischen Eigenschaften untersucht. Der Farbstoff Nilrot eignet sich aufgrund seines solvatochromen Charakters besonders gut als Fluoreszenzmarker und wurde deshalb über einen Acetylenlinker mit der C7-Position der artifiziiellen Purinbase verknüpft (**Nr**≡**dA** in Abb. 43).<sup>[121]</sup> Ein, mit dem gleichen Chromophor an der C5-Position modifiziertes, 2'-Desoxyuridin wurde ebenfalls synthetisiert (**Nr**≡**dU** siehe Kapitel 3.2 Abb. 28).



**Abb. 43:** Struktur des ethylnilrotverknüpften 7-Desaza-2'-desoxyadenosins **Nr**≡**dA**.

Anschließend wurde das Absorptions- sowie Emissionsverhalten von **Nr**≡**dA** und **Nr**≡**dU** in Lösungsmitteln verschiedener Polarität betrachtet. Beide Verbindungen zeigten bei Erhöhung der Polarität des Lösungsmittels eine bathochrome Verschiebung, sowohl im Absorptions- als auch im Fluoreszenzspektrum. Genauer betrachtet bedeutete das für **Nr**≡**dA** eine maximale Absorptions-/Emissionswellenlänge von beispielsweise  $\lambda = 529/582$  nm in Diethylether,  $\lambda = 551/622$  nm in Acetonitril und  $\lambda = 569/645$  nm in MeOH (bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 530$  nm). Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass das für den Nilrot-Farbstoff typische solvatochrome Verhalten auch nach der Verknüpfung mit 7-Desazaadenin, bzw. Uracil erhalten bleibt. Außerdem deutete die durch eine Erhöhung der Lösungsmittelpolarität beobachtete Rotverschiebung in den Emissionsspektren von **Nr**≡**dA** und **Nr**≡**dU** auf einen sog. *Bonded Exciplex*-Charakter<sup>[154]</sup> des angeregten Zustands der beiden Verbindungen hin. Bei der Betrachtung der Fluoreszenzquantenausbeute konnte festgestellt werden, dass diese für **Nr**≡**dA** beim Wechsel von Diethylether ( $\Phi_{\text{F}} = 0.68$ ) über

Ethylacetat ( $\Phi_F = 0.73$ ) zu Acetonitril ( $\Phi_F = 0.76$ ) zunächst leicht ansteigt, um anschließend durch weitere Erhöhung der Lösungsmittelpolarität stetig abzusinken ( $\Phi_F(\text{DMF}) = 0.48$ ;  $\Phi_F(\text{DMSO}) = 0.32$ ;  $\Phi_F(\text{MeOH}) = 0.16$ ). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für Nr- $\equiv$ -dU gemacht werden. Insgesamt zeigten sowohl 2'-Desoxyuridin als auch 7-Desaza-2'-desoxyadenosin nach Substitution mit Ethinylnilrot exzellente Fluoreszenzquantenausbeuten in mäßig polaren Lösungsmitteln. Nr- $\equiv$ -dU wurde außerdem in Oligonukleotide eingebaut.

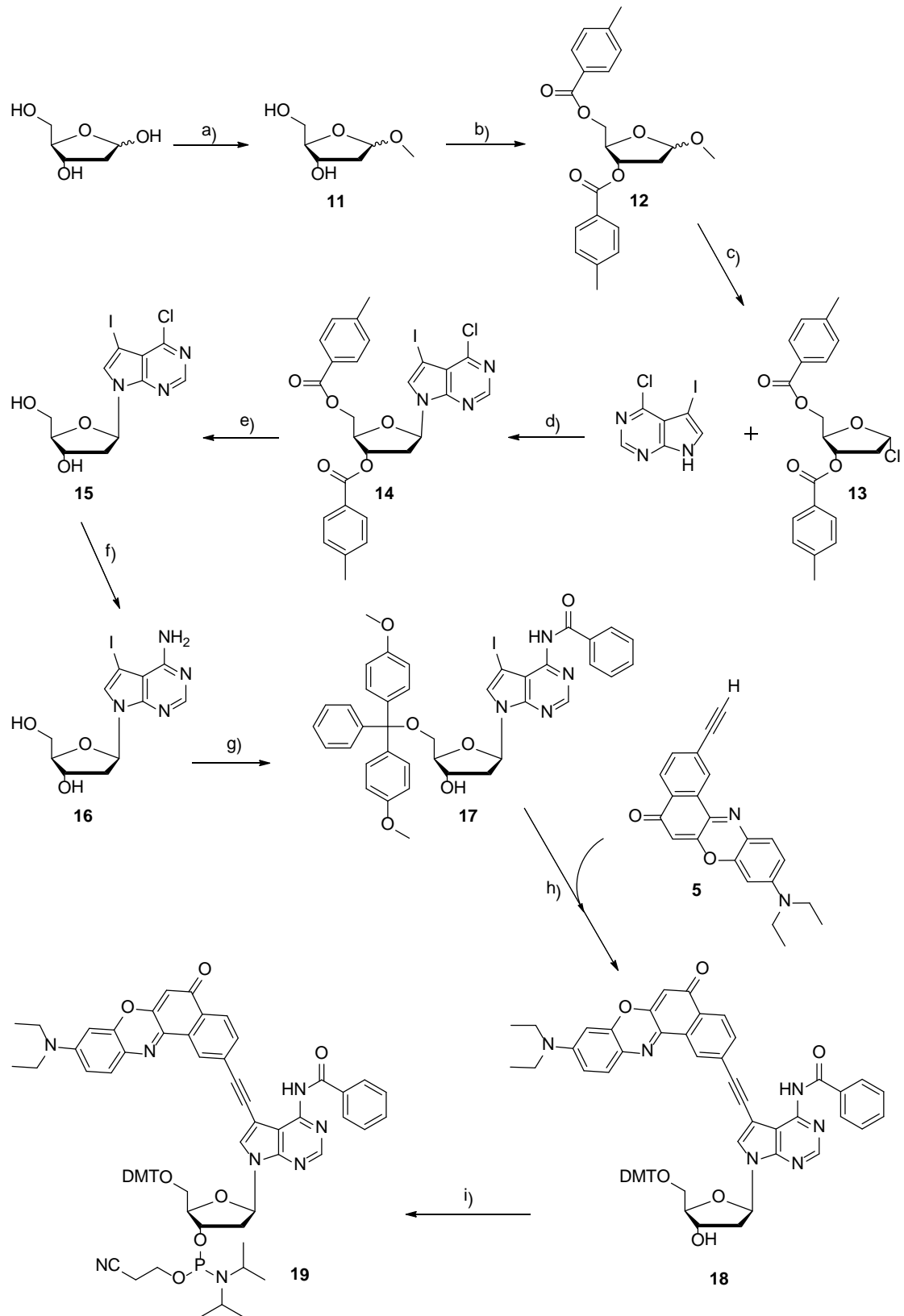
Während einfach- und mehrfach mit Nr- $\equiv$ -dU-modifizierte DNA-Stränge bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben wurden,<sup>[117, 123, 155]</sup> konnte der Einbau von Nr- $\equiv$ -dA in DNA bis jetzt noch nicht realisiert werden. Der nächste Abschnitt dieser Doktorarbeit beschäftigt sich deshalb mit der Synthese artifizierlicher Oligonukleotide, welche einen Nr- $\equiv$ -dA-Baustein enthalten.

## 4.2 Nilrot-7-desaza-2'-desoxyadenosin als komplementäre Base zu Pyren-2'-desoxyuridin

Das vorangegangene Kapitel 3 beschäftigte sich eingehend mit dem zwischen Ethynylpyren und Ethynylnilrot ablaufenden Energietransfer. Die Effizienz des letzteren hängt, neben anderen Faktoren wie z.B. Grundzustandswechselwirkungen, vor allem von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der beiden Chromophore ab. In den bisher betrachteten Ansätzen mit Ethynylpyren und Ethynylnilrot wurden diese nur mit der C5-Position von 2'-Desoxyuridinen verknüpft. Deshalb konnten sie, unter Erhaltung der Watson-Crick-Basenpaarung, auch nur nebeneinander oder mit einer Base Abstand gegenüber voneinander in Oligonukleotide bzw. Molecular Beacons eingebaut werden. Ein komplementäres Basenpaar aus C5-modifiziertem 2'-Desoxyuridin und C7-modifiziertem 7-Desaza-2'-desoxyadenosin würde es ermöglichen, die beiden Farbstoffe im Duplex gegenüber voneinander anzuordnen. Durch die jeweilige Verknüpfung über eine starre Acetylenbrücke würden sich die Fluorophore vermutlich in der großen Furche des DNA-Doppelstrangs befinden.<sup>[113, 140]</sup> Diese Voraussetzungen sorgen für eine neue relative Orientierung der Übergangsdipolmomente im Vergleich zu der des vorherigen Kapitels. Wie bereits erläutert, behält Ethynylnilrot nach dem Anbringen an 7-Desazaadenin seinen solvatochromen Charakter sowie seine hohen Fluoreszenzquantenausbeuten weitgehend bei,<sup>[121]</sup> weshalb es sinnvoll erscheint, dieses artifizielle Nukleosid in Oligonukleotide einzubauen. Demzufolge muss die Uracilbase mit Ethynylpyren substituiert werden, um ein farbstoffmodifiziertes, komplementäres Basenpaar zu erhalten. Der nachfolgende Teil dieser Doktorarbeit beschäftigt sich deshalb mit der Synthese von komplementären, einfach mit Nr-≡-dA bzw. Py-≡-dU modifizierten Oligonukleotiden. Durch Hybridisierung mit den jeweiligen unmodifizierten Gegensträngen bzw. miteinander sollen Rückschlüsse auf die thermische Stabilität und das optische Verhalten der Duplexe getroffen werden. Durch den Vergleich mit einfach Nr-≡-dU verknüpften Oligonukleotiden sowie mit den Doppelsträngen **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** aus Kapitel 3.3 soll außerdem untersucht werden, in wieweit die Veränderung der Nukleobase (am Ethynylnilrot) und die Orientierung der Übergangsdipolmomente den Energietransfer von Pyren auf Nilrot beeinflussen.

### 4.2.1 Synthese und Sequenzdesign

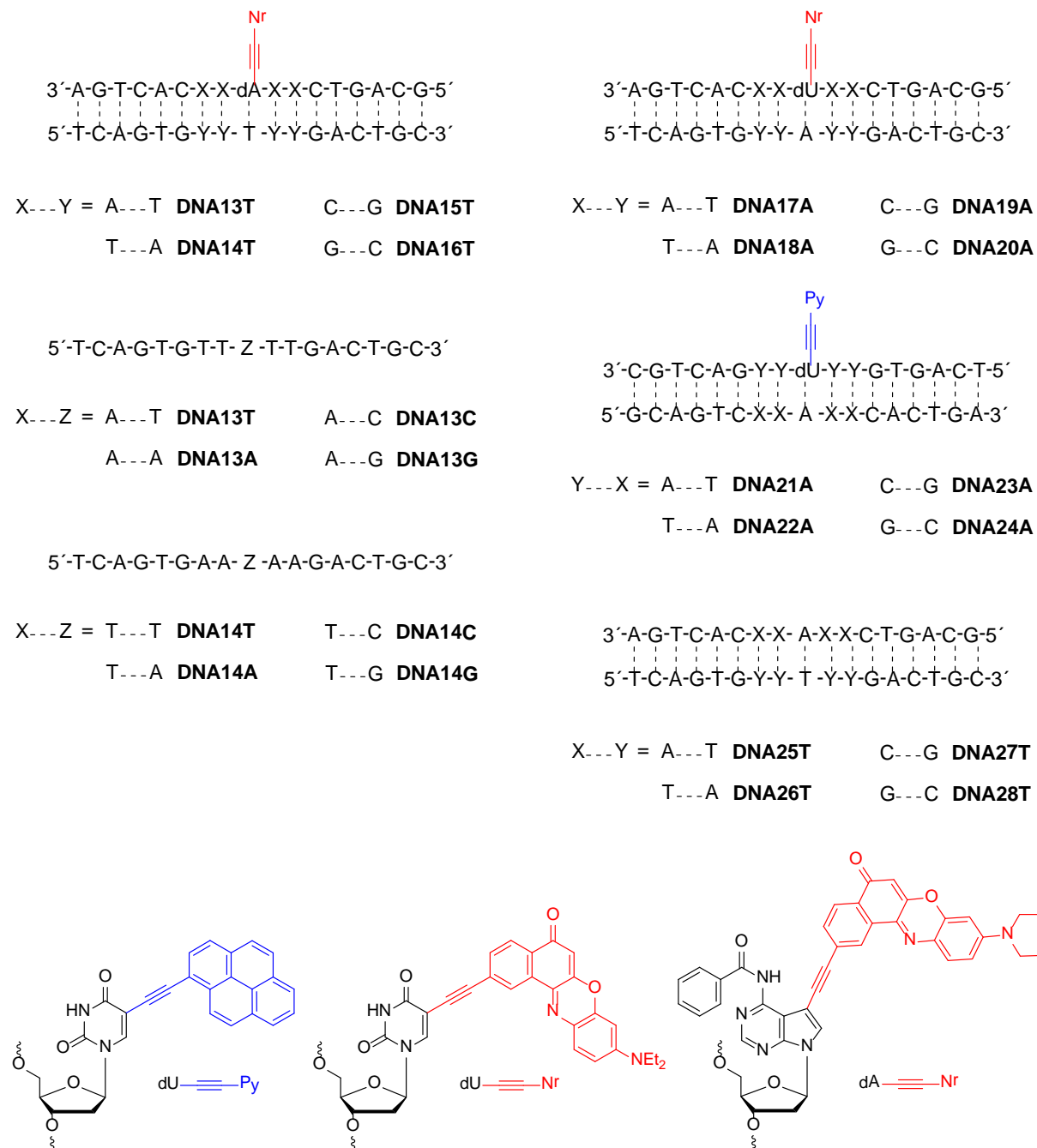
Die Synthese des sog. Hofferschen Chlorzuckers<sup>[156]</sup> **13** wurde nach einer Vorschrift von Michael Weinberger durchgeführt.<sup>[157]</sup> Hierbei wurde die kommerziell erhältliche 2-Desoxy-D-ribose im ersten Schritt zum Vollacetal **11** umgesetzt.<sup>[158]</sup> Anschließend wurden die 3- und 5-Hydroxyfunktionen mit p-Toluoylchlorid geschützt.<sup>[159]</sup> Die Umsetzung zu **13** erfolgte in 100%iger Essigsäure durch Zugabe einer 4 M Lösung von HCl in 1,4-Dioxan.<sup>[160]</sup> Die weitere Synthese bis zu Verbindung **16** ist ebenfalls literaturbekannt und erfolgte in drei Schritten nach einer Vorschrift von *Seela* und *Zulauf*.<sup>[133]</sup> Dafür wurde das geschützte Pentofuranosylchlorid **13** zunächst mit 6-Chlor-7-iod-7-deazapurin in einer stereoselektiven Glycosylierung zum Nukleosid **14** umgesetzt. Danach folgte dessen Entschützung zum Halogennukleosid **15** durch eine Lösung von Ammoniak in Methanol. Der Chlorsubstituent am Puringerüst wurde schließlich in wässriger Ammoniaklösung und unter Druck durch eine NH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt. Hierbei konnte die Ausbeute im Vergleich zur Literatur deutlich erhöht werden. Das entstandene 7-Iod-7-Desaza-2'-desoxyadenosin **16** wurde mit Pyridin als Lösungsmittel in einem Reaktionsschritt DMT- und benzoylgeschützt.<sup>[161]</sup> Das zweifach geschützte Nukleosid **17** wurde daraufhin mit dem acetylenverknüpften Nilrot **5** in einer *Sonogashira*-Kupplung zu **18** umgesetzt.<sup>[121]</sup> Die Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **19** wurde durch Umsetzung von **18** mit 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit unter basischen Bedingungen erreicht. Das entsprechende Syntheschema ist in Abb. 44 dargestellt. Der Baustein **19** wurde durch automatisierte Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut. Die Synthesebedingungen sind in Kapitel 7.3.2 beschrieben.



**Abb. 44:** Synthese des ethynylnitrotmodifizierten Phosphoramiditbausteins **19**: **a)** HCl/MeOH in MeOH, 0.5 h, RT, 95%; **b)** p-Toluoylchlorid, NEt<sub>3</sub> in abs. Aceton, 72 h, RT, 85%; **c)** HCl/Dioxan in Eisessig, 2 h, 0 °C, 62%; **d)** KOH, TDA-1 in abs. MeCN, 10 min, RT, 74%; **e)** NH<sub>3</sub>/MeOH, 23 h, RT, 92%; **f)** Dioxan/NH<sub>3</sub>, 15 h, 110 °C, 80%; **g)** 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, NEt<sub>3</sub>, TMS-Cl, Bz-Cl in abs. Pyridin, 8 h, RT, 24%; **h)** NEt<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Cul in abs. DMF, 19 h, 90 °C, 48%; **i)** 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosphoramidit, DIPEA in abs. DCM, 6 h, RT, 100%.

#### 4 Ethynylnilrot als Basenmodifikation am 7-Desazaadenin

Folgende Abbildung zeigt die synthetisierten Oligonukleotide. Hierbei wurden die modifizierten Einzelstränge mit **DNA13** bis **DNA24** nummeriert. Der entsprechende Duplex ist jeweils durch den Zusatz **A**, **T**, **C** oder **G** (je nach Gegenbase) gekennzeichnet. Die unmodifizierten Duplexe **DNA25T** bis **DNA28T** dienen als Referenz-Stränge.



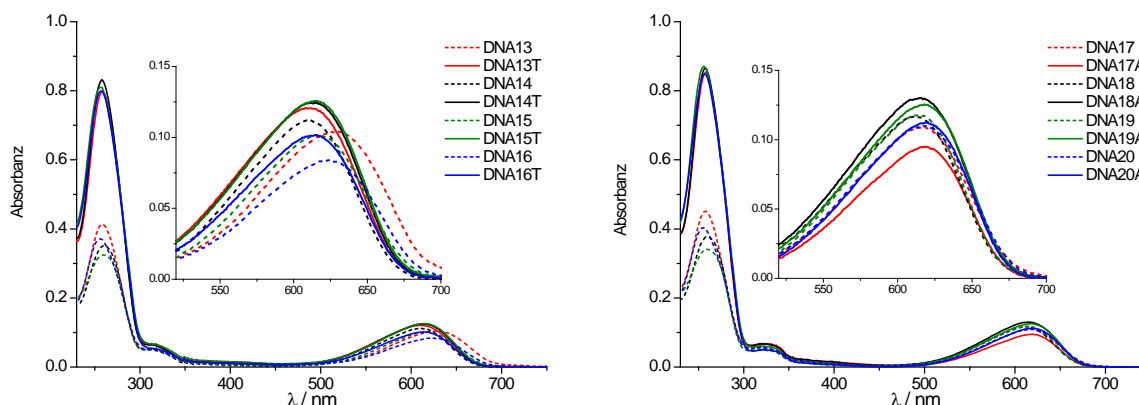
**Abb. 45:** Sequenzen der einfach modifizierten Oligonukleotide **DNA13** bis **DNA24** mit jeweils komplementären Gegensträngen, sowie der fehlgepaarten Duplexe **DNA13A** bis **DNA13G** und **DNA14A** bis **DNA14G** und der unmodifizierten Referenz-Doppelstränge **DNA25T** bis **DNA28T**.



Mit Hilfe der Duplexe **DNA13T** bis **DNA16T** soll der Einfluss der Nachbarbasen, mit **DNA13A** bis **DNA13G** und **DNA14A** bis **DNA14G** derjenige der Gegenbase auf Nr- $\equiv$ -dA untersucht werden. Die ethynylpyrenmodifizierte Einzelstränge **DNA21** bis **DNA24** sind zu den Einzelsträngen **DNA13** bis **DNA16** komplementär und bilden mit dem jeweiligen unmodifizierten Gegenstrang die Duplexe **DNA21A** bis **DNA24A** aus. Zum Vergleich der optischen und thermischen Eigenschaften wurde Nr- $\equiv$ -dU in gleicher sequentieller Umgebung wie Nr- $\equiv$ -dA in Oligonukleotid-Doppelstränge eingebaut (**DNA17A** bis **DNA20A**).

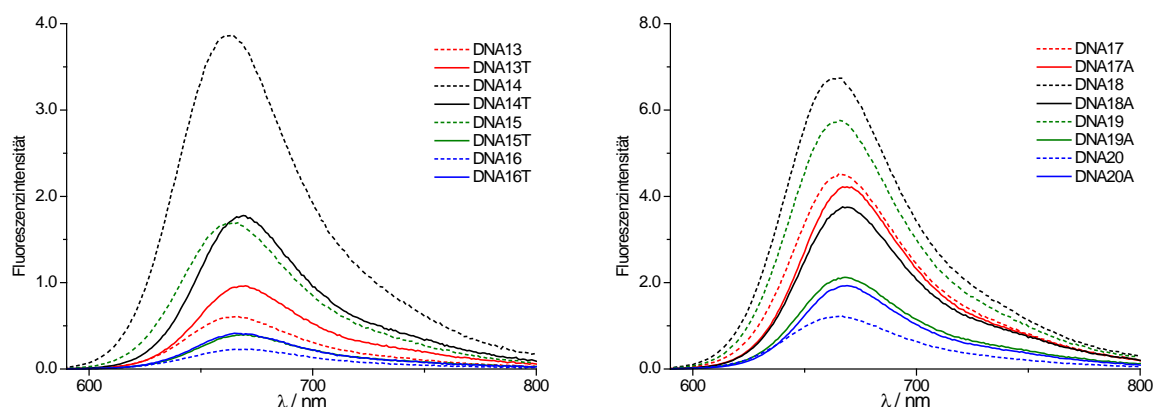
#### 4.2.2 Spektroskopische Untersuchungen

Als erstes wurden die Absorptions- und Emissionseigenschaften der mit Nr- $\equiv$ -dA modifizierten Oligonukleotide in Abhängigkeit von der Nachbarbase untersucht. Die betreffenden Einzel- und Doppelstränge **DNA13** bis **DNA16** bzw. **DNA13T** bis **DNA16T** wurden außerdem mit **DNA17** bis **DNA20** und **DNA17A** bis **DNA20A**, welche Nr- $\equiv$ -dU enthalten, verglichen.



**Abb. 46:** Absorptionsspektren der mit Nr- $\equiv$ -dA (links) bzw. Nr- $\equiv$ -dU (rechts) modifizierten Einzel- und Doppelstränge.

Die Absorptionsspektren der Oligonukleotide mit Nr- $\equiv$ -dU (Abb. 46 rechts) weisen alle eine Ethynylnilrotabsorption von  $\lambda_{\max} \approx 618$  nm auf. Obwohl die meisten der mit Nr- $\equiv$ -dA modifizierten DNA-Stränge (Abb. 46 links) ein Absorptionsmaximum bei einer ähnlichen Wellenlänge zeigen, ( $\lambda_{\max} \approx 615$  nm) ist bei den beiden Einzelsträngen **DNA13** und **DNA16**, welche Purinbasen in direkter Nachbarschaft zu Nr- $\equiv$ -dA besitzen, eine deutliche bathochrome Verschiebung zu erkennen.



**Abb. 47:** Fluoreszenzspektren der mit Nr≡-dA (links) bzw. Nr≡-dU (rechts) modifizierten Einzel- und Doppelstränge bei  $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$ .

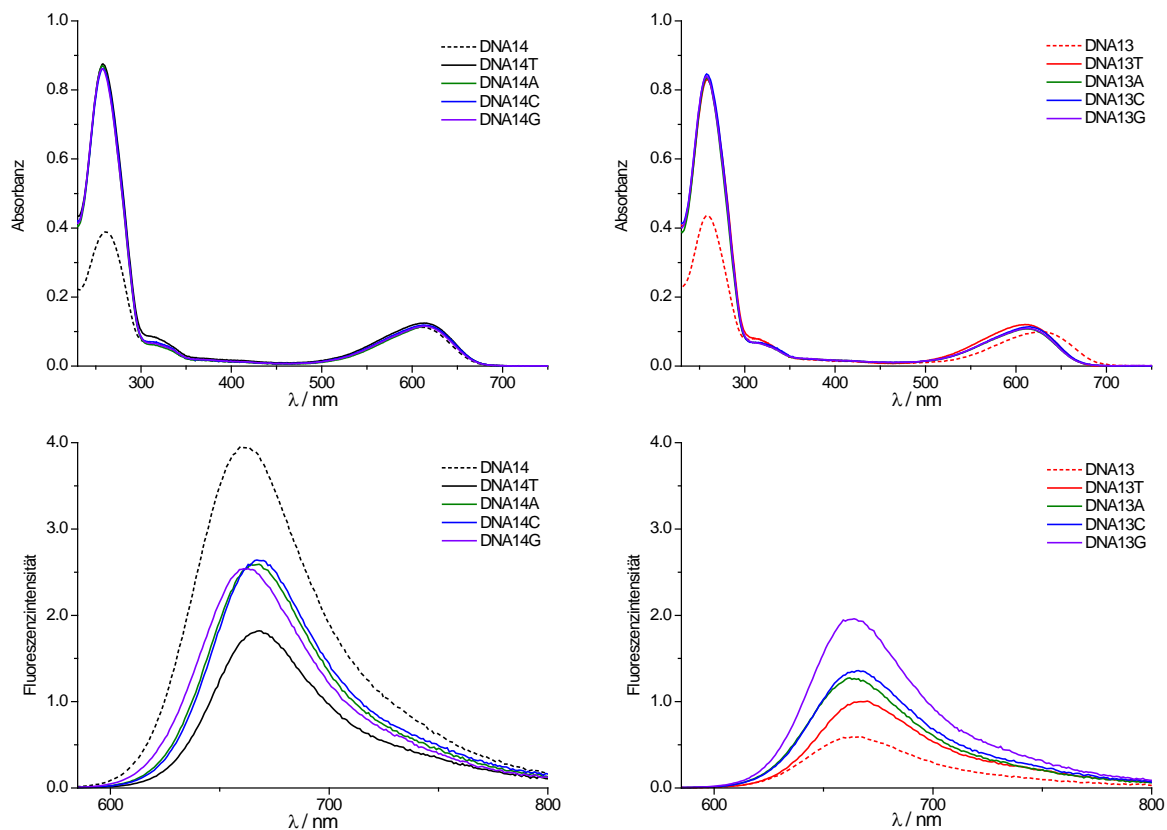
In den entsprechenden Fluoreszenzspektren besitzt Nr≡-dA nach dem Einbau in Oligonukleotide (Abb. 47 links) eine wesentlich geringere Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{\text{max}} \approx 665 \text{ nm}$  als der Nr≡-dU-Baustein in Einzel- und Doppelsträngen der gleichen Sequenz (Abb. 47 rechts). Wie bereits erwähnt, ist für den angeregten Zustand sowohl des Nr≡-dA- als auch des Nr≡-dU-Nukleosids ein *Bonded Exciplex*<sup>[154]</sup>-Charakter denkbar. Die unterschiedlichen Emissionsintensitäten deuten darauf hin, dass der Anteil des ladungstrennten Zustands im *Bonded Exciplex* von Nr≡-dA (innerhalb der Oligonukleotide) größer ist als bei Nr≡-dU. Es ist bekannt, dass das 7-Desazaadeningerüst eine höhere elektronenschiebende Fähigkeit besitzt, als eine natürliche Adeninbase, da das Oxidationspotential von 7-Desazaadenin dem von Guanin entspricht.<sup>[140, 162]</sup> Im Gegensatz dazu scheint der Einfluss der Nachbarbase auf die Emissionsintensität von Nr≡-dA bzw. Nr≡-dU in etwa gleich zu sein. In beiden Fällen zeigen die Einzelstränge mit Thymin benachbart zur Modifikation (**DNA14** bzw. **DNA18**) die größte und die Oligonukleotide mit Guanin als Nachbarbase (**16**, **16T**, **20** und **20A**) die geringste Intensität.

Vergleicht man die Schmelztemperaturen von **DNA13T** bis **DNA16T** mit denen von **DNA17A** bis **DNA20A** lassen sich ebenfalls keine großen Unterschiede zwischen der Nr≡-dA- und der Nr≡-dU-Modifikation bei gleicher Nachbarbase feststellen (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Vergleich der Schmelztemperaturen von **DNA13T** bis **DNA16T** mit **DNA17A** bis **DNA20A** in Pufferlösung (10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl, pH 7) mit  $c(\text{DNAs}) = 2.5 \mu\text{M}$

Sequenz	$T_m$ [°C]	Sequenz	$T_m$ [°C]
<b>DNA13T</b>	56.6	<b>DNA17A</b>	55.9
<b>DNA14T</b>	54.6	<b>DNA18A</b>	54.9
<b>DNA15T</b>	64.4	<b>DNA19A</b>	65.6
<b>DNA16T</b>	64.2	<b>DNA20A</b>	67.2

Der Einfluss der Gegenbase auf die optischen Eigenschaften der Nr≡dA-modifizierten Oligonukleotide wurde mit Hilfe der Duplexe **DNA13T** bis **DNA13G** und **DNA14T** bis **DNA14G** untersucht. Die zugehörigen Spektren sind in der folgenden Abbildung zu sehen.



**Abb. 48:** Absorptionsspektren (oben) und Fluoreszenzspektren (unten) von **DNA14T** bis **DNA14G** (links) und **DNA13T** bis **DNA13G** (rechts), sowie der jeweiligen Einzelstränge (**DNA14** und **DNA13**) zum Vergleich ( $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$ ).

Vergleicht man den komplementären Doppelstrang (**DNA14T** bzw. **DNA13T**) mit den Doppelsträngen, die eine Fehlpaarung gegenüber von Nr≡dA enthalten (**DNA14A** bis **DNA14G** bzw. **DNA13A** bis **DNA13G**), lassen sich keine wesentlichen Unterschiede in den Absorptionsspektren (Abb. 48 oben) feststellen.

Bei den Emissionsspektren (Abb. 48 unten) ist auffällig, dass der jeweilige Einzelstrang verglichen mit den Duplexen einmal die größte (**DNA14**) und einmal die kleinste (**DNA13**) Fluoreszenzintensität besitzt. Nach der Hybridisierung hingegen zeigen die komplementären Duplexe (**DNA14T** bzw. **DNA13T**) eine niedrigere Intensität als die anderen Doppelstränge.

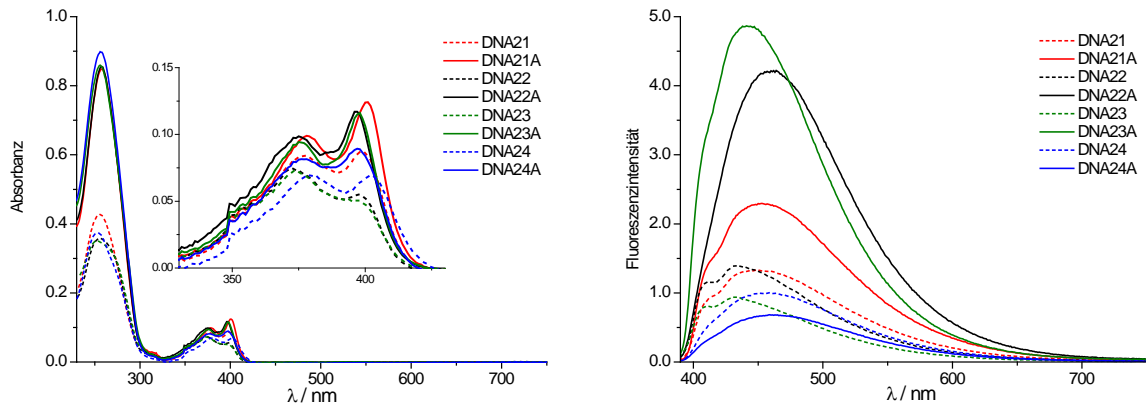
Zusätzlich zu den optischen Eigenschaften wurde die thermische Stabilität der fehlgepaarten Oligonukleotide untersucht. Die zugehörigen Schmelztemperaturen werden in Tabelle 3 mit denen der komplementären Doppelstränge verglichen.

**Tabelle 3:** Schmelztemperaturen von **DNA13T** bis **DNA13G** und **DNA14T** bis **DNA14G** in Pufferlösung (10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl, pH 7) mit c(DNAds) = 2.5 µM

Sequenz	$T_m$ [°C]	Sequenz	$T_m$ [°C]
<b>DNA13T</b>	56.9	<b>DNA14T</b>	54.7
<b>DNA13A</b>	53.6	<b>DNA14A</b>	53.5
<b>DNA13C</b>	54.6	<b>DNA14C</b>	53.2
<b>DNA13G</b>	54.1	<b>DNA14G</b>	54.1

Zusammen mit den spektroskopischen Beobachtungen ergibt sich ein stimmiges Bild. Da **DNA13T** und **DNA14T** die jeweils größte Schmelztemperatur bzw. die kleinste Fluoreszenzintensität (verglichen mit den nicht komplementären Duplexen) aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass sich der Ethinylnilrotfarbstoff in diesen beiden Fällen am besten in die Struktur des Doppelstrangs „einfügt“. Dadurch besitzen diese Duplexe zwar die höchste thermische Stabilität, jedoch muss die Nr-≡-dA-Modifikation bei der Hybridisierung auch die größte strukturelle Änderung vollziehen. Das bedeutet wiederum einen verstärkten Anteil des ladungstrennten Zustands und eine dadurch bedingte Abnahme der Fluoreszenzintensität (Fluoreszenzlöschung) dieses Chromophors.

Auch die optischen Eigenschaften der kovalent mit Py-≡-dU verknüpften Oligonukleotide wurden mit Hilfe von Absorptions- und Emissionsspektroskopie charakterisiert. Die Spektren der Einzelstränge (**DNA21** bis **DNA24**) sowie der einfach modifizierten Doppelstränge (**DNA21A** bis **DNA24A**) werden in der nachstehenden Abbildung gezeigt.

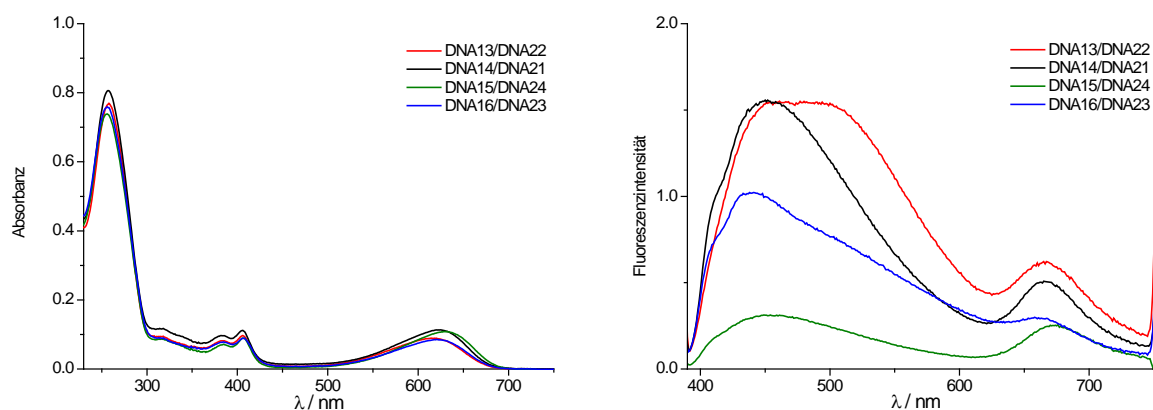


**Abb. 49:** Absorptions- und Emissionsspektren der mit Ethinylpyren modifizierten Einzel- und Doppelstränge ( $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ ).

Die Einzelstränge **DNA21** bis **DNA24** besitzen alle eine Absorption in dem für Ethinylpyren typischen Bereich, mit Maxima bei  $\lambda \approx 376 \text{ nm}$  und  $\lambda \approx 399 \text{ nm}$ . Ähnlich wie bei den Duplexen **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** (siehe Kapitel 3.3.2) steigt beim Übergang vom Einzel- zum jeweiligen komplementären Doppelstrang die Absorptionsintensität bei  $\lambda \approx 399 \text{ nm}$  an (wodurch das Verhältnis  $A_{\approx 399}/A_{\approx 376}$  ebenfalls größer wird). Anscheinend werden innerhalb der Duplexe genau wie bei **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** die Grundzustandswechselwirkungen zwischen dem Ethinylpyren-Chromophor und den benachbarten DNA-Basen verstärkt.<sup>[111-112, 131]</sup>

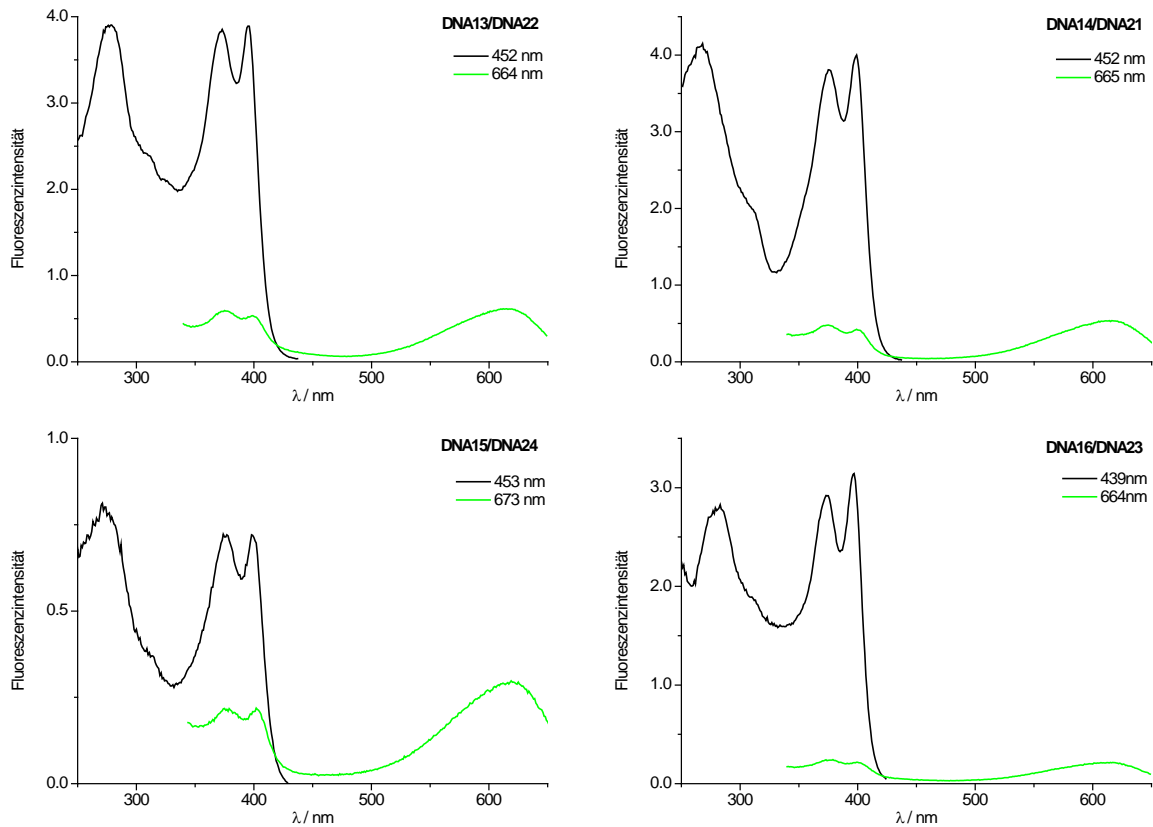
Auch die Emissionsspektren zeigen mit Werten von  $\lambda_{\text{max}} = 431 \text{ nm}$  bis  $\lambda_{\text{max}} = 462 \text{ nm}$  eine für einfach ethinylpyrenmodifizierte Oligonukleotide typische Fluoreszenz.<sup>[111]</sup>

Um einen möglichen Energietransfer von Ethinylpyren auf Ethinylnilrot zu untersuchen, wurden die zueinander komplementären Oligonukleotide **DNA13** bis **DNA16** und **DNA21** bis **DNA24** miteinander hybridisiert. In den resultierenden Duplexen **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** befinden sich die beiden Farbstoffe an gegenüber voneinander liegenden Basen. Sowohl die Nilrot-, als auch die Pyrenabsorption ist in den zugehörigen Spektren (Abb. 50 links) zu sehen.



**Abb. 50:** Absorptions- und Emissionsspektren der mit Py- $\equiv$ -dU und Nr- $\equiv$ -dA modifizierten Doppelstränge ( $\lambda_{\text{exc}} = 380$  nm).

Nach Anregung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 380$  nm kann in den Emissionsspektren (Abb. 50 rechts) eine Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{max}} \approx 449$  nm (Ethinylpyren) und  $\lambda \approx 667$  nm (Ethinylnilrot) beobachtet werden. Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.3.2 betrachteten Duplexen **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** (vgl. Abb. 36) ist die Intensität der Nilrotemission nicht größer als die der Pyrenemission, sondern deutlich geringer (**DNA13/DNA22**, **DNA14/DNA21** und **DNA16/DNA23**). Lediglich **DNA15/DNA24** besitzt, ähnlich wie **DNA4/DNA8**, ein annähernd identisches Verhältnis der beiden Intensitäten. Um diese Beobachtungen erklären zu können, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Einer davon ist die erniedrigte Fluoreszenzquantenausbeute von Nr- $\equiv$ -dA im Vergleich zu Nr- $\equiv$ -dU innerhalb der Oligonukleotide. Des Weiteren ist die Pyrenemission in **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** immer noch relativ hoch, was auf einen nicht vorhandenen oder unvollständig ablaufenden Energietransfer hindeutet. Ein Grund hierfür könnte die neue Positionierung von Pyren und Nilrot innerhalb des Doppelstrangs sein (an zwei gegenüberliegenden, anstatt an zwei benachbarten Basen wie in **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8**), da die Effizienz des Energietransfers neben anderen Faktoren auch von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor und vom Abstand der Chromophore zueinander abhängt.<sup>[126]</sup> Um zu überprüfen, ob zwischen den beiden Chromophoren tatsächlich ein Energietransfer stattfindet, wurden Anregungsspektren von **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** bei verschiedenen Wellenlängen gemessen.

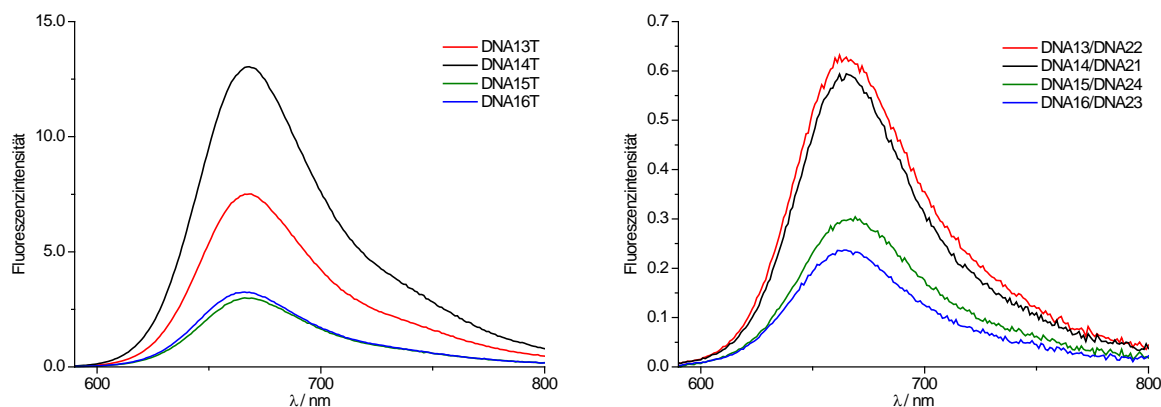


**Abb. 51:** Anregungsspektren der zweifach modifizierten Doppelstränge **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23**.

In Abb. 51 wird für jeden Duplex eine für die Ethinylpyrenemission ( $\lambda = 439 \text{ nm} - 453 \text{ nm}$ ) und eine für die Ethinylnilrotemission ( $\lambda = 664 \text{ nm} - 673 \text{ nm}$ ) selektive Wellenlänge betrachtet. Aus allen vier Spektren wird ersichtlich, dass die Fluoreszenz im Bereich von  $\lambda \approx 450 \text{ nm}$  (schwarze Linie) durch die Anregung der Nukleobase ( $\lambda \approx 275 \text{ nm}$ ) und des Pyrenchromophors ( $\lambda \approx 374 \text{ nm}$  und  $398 \text{ nm}$ ) erzeugt wird. Im Gegensatz dazu resultiert die Emission bei  $\lambda \approx 667 \text{ nm}$  (grüne Linie) sowohl aus der Anregung des Pyren- als auch des Nilrotfarbstoffs ( $\lambda \approx 617 \text{ nm}$ ). Anhand dieser Messungen konnte der Energietransfer von Pyren auf Nilrot eindeutig nachgewiesen werden.

Es bleibt die Frage, warum die Fluoreszenzintensität des Nr- $\equiv$ -dA-Bausteins innerhalb der zweifach modifizierten Doppelstränge trotzdem so gering ist. Um diese zu beantworten, wurden erneut Emissionsspektren der Duplexe **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** aufgenommen. Die Anregungswellenlänge wurde dabei von ursprünglich  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$  auf  $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$  geändert, um eine selektive Anregung des Ethinylnilrotchromophors zu gewährleisten (Abb. 52 rechts). Zum Vergleich wurde die Fluoreszenz von **DNA13T** bis **DNA16T** unter den gleichen Bedingungen

gemessen (Abb. 52 links). Es sollte hierbei erwähnt werden, dass die Unterschiede in den Emissionsintensitäten von **DNA13T** bis **DNA16T** in Abb. 47 und Abb. 52 durch unterschiedliche Geräteeinstellungen (Spaltbreiten) bei diesen beiden Messungen zustande kommen.



**Abb. 52:** Vergleich der einfach mit Nr-≡-dA (links) und zweifach mit Nr-≡-dA und Py-≡-dU (rechts) modifizierten Doppelstränge ( $\lambda_{exc} = 580$  nm).

Betrachtet man die einfach und zweifach modifizierten Doppelstränge in Abb. 52, so ist offensichtlich, dass die Intensität der Ethinylnilrotfluoreszenz durch den Einbau von Py-≡-dU gegenüber von Nr-≡-dA drastisch verringert wird. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung, ist ein von Nilrot auf Pyren stattfindender photoinduzierter Ladungstransfer,<sup>[163]</sup> welcher für die Fluoreszenzlöschung des erstgenannten Chromophors verantwortlich ist. Mit dieser Annahme lässt sich auch die geringe Emissionsintensität des Nr-≡-dA-Bausteins bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 380$  nm (Abb. 50) erklären. Hierbei würde zuerst ein Energietransfer von Ethinylpyren auf Ethinylnilrot stattfinden, dem anschließend der schnelle photoinduzierte Ladungstransfer folgt. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten jedoch zeitaufgelöste Messungen durchgeführt werden.

Als letztes wurde die thermische Stabilität von **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** untersucht. Die Schmelztemperaturen der Duplexe wurden dafür mit denen von **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** und denen der unmodifizierten Referenz-Doppelstränge **DNA25T** bis **DNA28T** verglichen. Tabelle 4 gibt eine Übersicht der drei verschiedenen Systeme.



**Tabelle 4:** Schmelztemperaturen von **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23**, **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** und **DNA25T** bis **DNA28T** in Pufferlösung (10 mM NaP<sub>i</sub>, 250 mM NaCl, pH 7) mit  $c(\text{DNAdS}) = 2.5 \mu\text{M}$

Sequenz	$T_m$ [°C]	Sequenz	$T_m$ [°C]	Sequenz	$T_m$ [°C]
<b>DNA13/DNA22</b>	64.3	<b>DNA1/DNA5</b>	58.5	<b>DNA25T</b>	62.6
<b>DNA14/DNA21</b>	64.3	<b>DNA2/DNA6</b>	57.2	<b>DNA26T</b>	60.1
<b>DNA15/DNA24</b>	71.9	<b>DNA4/DNA8</b>	64.3	<b>DNA27T</b>	69.9
<b>DNA16/DNA23</b>	72.8	<b>DNA3/DNA7</b>	63.5	<b>DNA28T</b>	71.1

Die Doppelstränge, in denen sich Py- $\equiv$ -dU gegenüber von Nr- $\equiv$ -dA befindet (Tabelle 4 linke Spalte), enthalten insgesamt ein Basenpaar weniger als die Oligonukleotide, welche Py- $\equiv$ -dU und Nr- $\equiv$ -dU als benachbarte Modifikationen tragen (Tabelle 4 mittlere Spalte). Ein direkter Vergleich von **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** mit **DNA1/DNA5** bis **DNA4/DNA8** ist deshalb nicht möglich. Man kann jedoch sagen, dass die Duplexe **DNA1/DNA5** und **DNA2/DNA6** neben einem zusätzlichen Basenpaar die gleiche Anzahl von AT- und GC-Basenpaaren wie **DNA13/DNA22** und **DNA14/DNA21** aufweisen. Trotzdem zeigen sie niedrigere Schmelztemperaturen. Da sich die beiden Systeme in der Anordnung der Farbstoffe unterscheiden, sorgen vermutlich stärkere  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den mit gegenüber voneinander liegenden Basen verknüpften Modifikationen für eine höhere Stabilität der entsprechenden Stränge. Diese Behauptung wird dadurch bestärkt, dass selbst die unmodifizierten Stränge **DNA25T** bis **DNA28T** (Tabelle 4 rechts) mit gleicher Sequenz wie **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** niedrigere Schmelztemperaturen aufweisen. Insgesamt zeigt sich, dass der Nr- $\equiv$ -dA-Baustein alleine die Doppelstrangstruktur destabilisiert (vgl. Tabelle 2 links und Tabelle 4 rechts), während der Einbau von Py- $\equiv$ -dU gegenüber dieser Modifikation zu einer Stabilisierung der Duplexe (selbst im Vergleich zu den unmodifizierten Strängen) führt.

### 4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im vorangegangenen Abschnitt dieser Doktorarbeit konnte das bereits bekannte Nukleosid **18** hergestellt und das erste Mal als Phosphoramiditbaustein **19** in Oligonukleotide eingebaut werden. Obwohl die einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge ähnliche Schmelztemperaturen und Absorptionseigenschaften wie entsprechend mit Nr- $\equiv$ -dU modifizierte Stränge zeigten, wies Ethynylnilrot nach der

Verknüpfung mit 7-Desaza-2'-desoxyadenosin eine wesentlich geringere Emissionsintensität auf als Nr- $\equiv$ -dU. Es wird vermutet, dass diese Beobachtung auf einen erhöhten Anteil des ladungstrennten Zustands bei Nr- $\equiv$ -dA zurückzuführen ist (welches vermutlich, wie Nr- $\equiv$ -dU, im angeregten Zustand als eine Art *Bonded Exciplex* vorliegt). Der Einfluss der Gegenbase auf die optischen und thermischen Eigenschaften von Nr- $\equiv$ -dA wurde anhand der fehlgepaarten Duplexe **DNA14A** bis **DNA14G** und **DNA13A** bis **DNA13G** untersucht. Beim Vergleich mit den komplementären Doppelsträngen **DNA14T** bzw. **DNA13T** zeigte sich, dass diese sowohl die größten Schmelztemperaturen als auch die niedrigsten Fluoreszenzintensitäten besitzen. Beides deutete darauf hin, dass der artifizielle Baustein in den komplementären Strängen die größte strukturelle Änderung erfährt, was wiederum zu einem verstärkten Anteil des ladungstrennten Zustands und dadurch zu Fluoreszenzlöschung führt. Mit Hilfe der Anregungsspektren von **DNA13/DNA22** bis **DNA16/DNA23** konnte bewiesen werden, dass ein Energietransfer von Ethinylpyren auf Ethinylnilrot auch stattfindet, wenn sich die beiden Farbstoffe innerhalb der Sequenz an gegenüber voneinander liegenden Basen befinden. Die Fluoreszenz des letztgenannten Chromophors wird wahrscheinlich jedoch durch einen direkt darauffolgenden photoinduzierten Ladungstransfer zu Ethinylpyren gelöscht. Außerdem konnte anhand von Schmelztemperaturmessungen gezeigt werden, dass der Nr- $\equiv$ -dA-Baustein alleine zu einer Destabilisierung der Doppelstrangstruktur führt, während der Einbau von Py- $\equiv$ -dU gegenüber dieser Modifikation die entsprechenden Duplexe stabilisiert.

## 5 DNA als Templat

In den vorangegangenen Kapiteln wurde ausschließlich der kovalente Einbau von Farbstoffen in DNA betrachtet. Im Folgenden werden einige Möglichkeiten zur Herstellung solcher chromophormodifizierten Oligonukleotide vorgestellt. Weiterhin soll gezeigt werden, dass die Anlagerung von Farbstoffen an DNA-Stränge eine Alternative zu diesen Methoden darstellen kann.

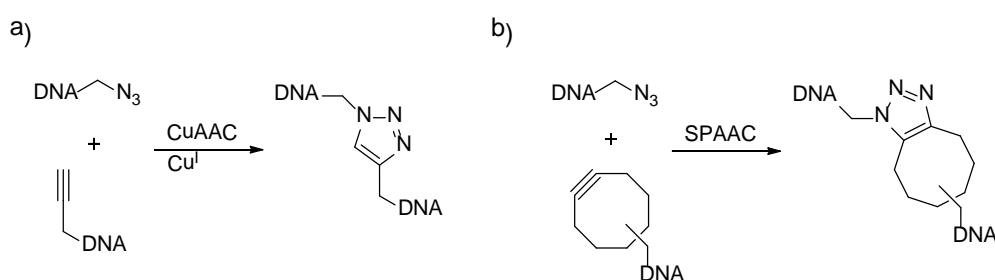
### 5.1 Wege, Einschränkungen und Alternativen zu farbstoffmodifizierten Oligonukleotiden

#### DNA-Festphasensynthese

Oligonukleotide werden heutzutage vor allem über die automatisierte Festphasensynthese nach der von *Caruthers* und *Beaucage* entwickelten Phosphoramiditmethode hergestellt.<sup>[25, 164-166]</sup> Ein typischer Synthesezyklus zum Einbau eines Phosphoramidits umfasst vier Schritte: Kupplung, *Capping*, Oxidation und Entschützung. Mit dieser Methode lassen sich ebenfalls künstliche Bausteine einbauen, um modifizierte Oligonukleotide zu erhalten.<sup>[167]</sup> Dazu müssen die artifiziellen Moleküle mit den Synthesebedingungen kompatibel sein, d.h. sie dürfen weder basen-, oder säurelabil sein, noch dürfen sie sich bei der Oxidation durch Iod zersetzen. Ein weiterer Nachteil der automatisierten DNA-Festphasensynthese besteht darin, dass sich mit ihrer Hilfe nur Oligonukleotide bis zu einer maximalen Länge von ca. 150 Basen effizient herstellen lassen.<sup>[22]</sup> Bei der chemischen Synthese längerer Oligomere wird die Gesamtausbeute stark erniedrigt. Die genannten Gründe führen dazu, dass artifizielle Oligonukleotide immer mehr über postsynthetische Ansätze hergestellt werden.

### Postsynthetische Modifikation und chemische Ligation von Oligonukleotiden

Empfindliche Moleküle, die unter den Bedingungen der Festphasensynthese nicht stabil sind, können über verschiedene postsynthetische Methoden in Oligonukleotide eingebracht werden. Dafür werden zunächst kleine reaktive Gruppen während der chemischen DNA-Synthese eingebaut um anschließend postsynthetisch mit der gewünschten Modifikation zu reagieren. Die Reaktion sollte dabei regioselektiv und bioorthogonal sein, außerdem sollte sie effizient ablaufen, d.h. hohe Ausbeuten erzielen und unter milden Bedingungen durchgeführt werden können.<sup>[168]</sup> In den letzten Jahren haben sich viele Methoden etabliert, welche die genannten Bedingungen erfüllen. Unter anderem können Moleküle über Diels-Alder-Reaktionen,<sup>[169-170]</sup> Nitriloxid-Alkin-Cycloaddition (NOAC),<sup>[171-172]</sup> Thiol-Gruppen,<sup>[173]</sup> Staudinger Ligation<sup>[174]</sup> oder 1,3-dipolare Cycloaddition (Huisgen [3+2] Cycloaddition)<sup>[175-177]</sup> postsynthetisch in Oligonukleotide eingeführt werden. Anhand der aufgeführten Methoden können zwar längere *modifizierte* Oligonukleotide hergestellt werden, die maximale Anzahl der Basen ist jedoch weiterhin durch die Phosphoramiditchemie auf ca. 100-150 beschränkt. Eine Möglichkeit, trotzdem längere DNA-Sequenzen zu erhalten, besteht darin, die Festphasensynthese der Oligonukleotide mit einer anschließenden chemischen Ligation zu kombinieren. Beispielsweise konnten zwei DNA-Stränge über eine Cu<sup>I</sup>-katalysierte [3+2] Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), dem wohl bekanntesten Vertreter der sog. Klick-Reaktionen,<sup>[178]</sup> miteinander verbunden werden (Abb. 53 a).<sup>[179]</sup> In einer kupferfreien Variante wurden mit Hilfe der ringspannungsvermittelten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)<sup>[180]</sup> ebenfalls zwei Oligonukleotide verknüpft (Abb. 53 b).<sup>[181]</sup> Für beide Beispiele wurde ein komplementärer Templat-DNA-Strang benötigt, um die beiden beteiligten Oligonukleotide in die richtige Position zu bringen und dort während der Reaktion zu halten.



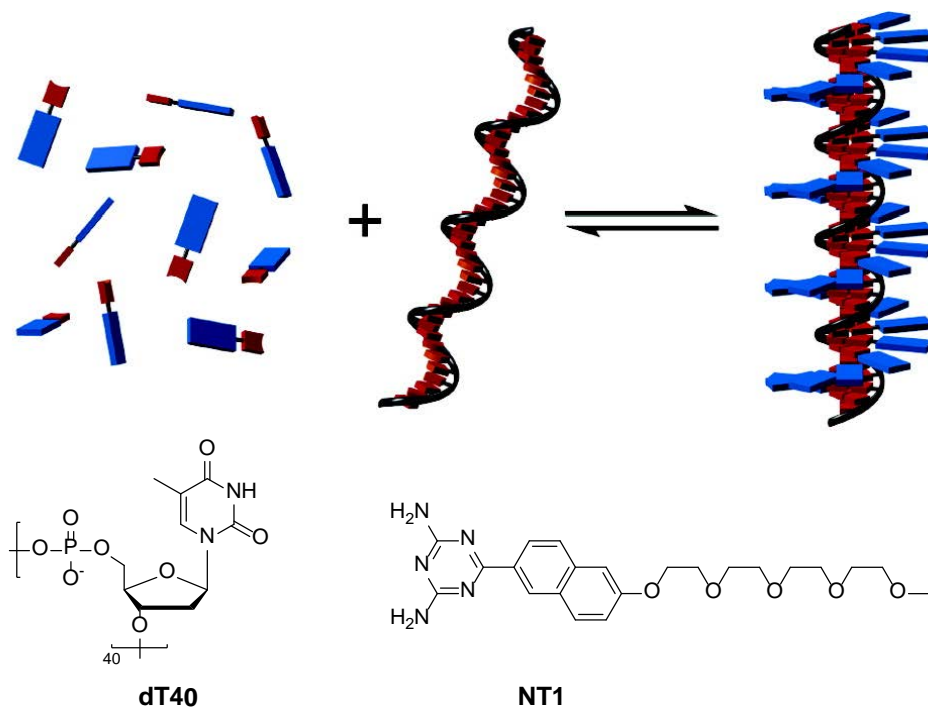
**Abb. 53:** DNA Ligation mit Hilfe der a) CuAAC-Reaktion bzw. b) der SPAAC-Reaktion.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde sowohl die CuAAC-, als auch die SPAAC-Reaktion dafür verwendet, ein Oligonukleotid bereits an der festen Phase, durch chemische Ligation mit einem weiteren DNA-Strang, zu verlängern.<sup>[182]</sup> Diese Verlängerung konnte auch ohne Templat-DNA stattfinden und ergab Stränge, die bis zu 186 Basen enthielten. Zusammengefasst ist es also möglich, die über Festphasensynthese hergestellten Oligonukleotide postsynthetisch zu modifizieren und die Anzahl ihrer Basen durch chemische Ligation zu erhöhen. Dadurch erweitert sich der Anwendungsbereich für diese kovalenten Systeme. Außerdem haben sie den Vorteil, dass die Farbstoffe mit einem festgelegten Abstand und einer definierten Orientierung zueinander vorliegen. Demgegenüber steht ihre relativ kostenintensive Herstellung, bedingt durch die teuren natürlichen und artifiziellen DNA-Bausteine, sowie der zeitliche Aufwand der Synthese. Ein alternativer Ansatz zum kovalenten Farbstoffeinbau besteht deshalb darin, die Chromophore durch Selbstaggregation aneinander zu reihen. Dabei führen die intrinsischen Eigenschaften der Monomere, wie die zwischen ihnen stattfindenden van-der-Waals-Kräfte oder hydrophoben Wechselwirkungen dazu, dass sich insgesamt ein supramolekulares, multichromophores System ausbildet.<sup>[22]</sup> Um die einzelnen Bausteine effektiv und in der gewünschten Weise anordnen zu können, werden seit längerem Template benutzt.<sup>[183]</sup> Als solche eignen sich DNA-Einzelstränge ausgezeichnet, da die Nukleobasen durch ihre spezifischen Wasserstoffbrückenbindungsstellen ideale Anlagerungspunkte für entsprechend modifizierte Farbstoffmonomere bieten. Die relativ festgelegte Struktur des Oligonukleotids durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat sorgt zusätzlich dafür, dass ein geordnetes Aggregat entstehen kann. Der klare Vorteil dieser nicht kovalenten Systeme besteht darin, dass die Eigenschaften der Fluorophore ohne zeit- und kostenaufwändigen Einbau in einen DNA-Duplex genutzt werden können. Im nächsten Abschnitt werden einiger dieser Ansätze erläutert.

### **DNA-gestützte Selbstassemblierung von Farbstoffen**

Der erste Ansatz zu einer DNA-Einzelstrang-gestützten Selbstassemblierung von Chromophoren stammt aus der Arbeitsgruppe *Schenning*. Hierbei diente ein Oligonukleotid aus 40 Thyminenheiten, **dT40**, als Templat für die Anlagerung eines supramolekularen Strangs aus Naphthalin-Farbstoffen (**NT1**). Letztere waren mit Diaminotriazin-Einheiten verknüpft, damit sie über diese Modifikationen

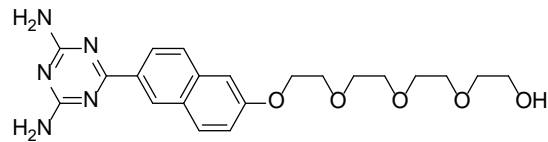
Wasserstoffbrückenbindungen zu den komplementären Basen im Oligothyminstrang ausbilden konnten (Abb. 54).<sup>[184]</sup>



**Abb. 54:** Schematische Darstellung der DNA-Einzelstrang gestützten Selbstassemblierung von Chromophoren (oben)<sup>[184]</sup> und der Struktur von **dT40** bzw. **NT1** (unten).

Mit Hilfe von spektroskopischen Messungen konnte die Bindung zwischen **NT1** und **dT40** bestätigt werden. Entsprechende CD-Spektren zeigten ein positives Signal im Absorptionbereich der achiralen Naphthalin-Einheiten, wodurch ihre supramolekulare Organization entlang des chiralen Templat-DNA-Strangs wiedergegeben wurde. Des Weiteren konnte durch temperaturabhängige optische Messungen gezeigt werden, dass die Bildung des Komplexes aus **NT1** und **dT40** vollständig reversibel verläuft, wobei die Farbstoff-Monomere zuerst an den Oligothyminstrang binden, bevor sie sich in einer helikalen Weise anordnen.<sup>[184]</sup> Konzentrationsabhängige UV-Vis- und CD-Spektren ließen erkennen, dass bei einer hohen Konzentration der Naphthalin-Monomere, deren Anlagerung an den DNA-Strang gestört wird. Grund hierfür ist die, zu diesem Zeitpunkt auftretende, nicht templatgestützte Selbstaggregation der Chromophore. Aus diesem Grund wurde von *Schenning* und seinen Mitarbeitern ein neues diaminotriazinmodifiziertes Naphthalin-Molekül (**NT2**) hergestellt (Abb. 55). Dieses kann ebenfalls Aggregate entlang von Oligothymin-Templaten verschiedener Länge **dT<sub>q</sub>** (wobei *q* die Anzahl der Thyminen ist) ausbilden. Dabei entsteht ein rechtsgängiges Hybrid aus einzelsträngiger DNA

und einem supramolekularen Strang aus **NT2**.<sup>[185]</sup> Wie *Schenning et al.* zeigen konnten, sorgte die Hydroxygruppe innerhalb der Struktur von **NT2** dafür, dass sowohl die ohne Templat ablaufende Selbstaggregation des Farbstoffs als auch die weitere Aggregation eines **dT40-NT2**-Hybrids unterdrückt wurde.

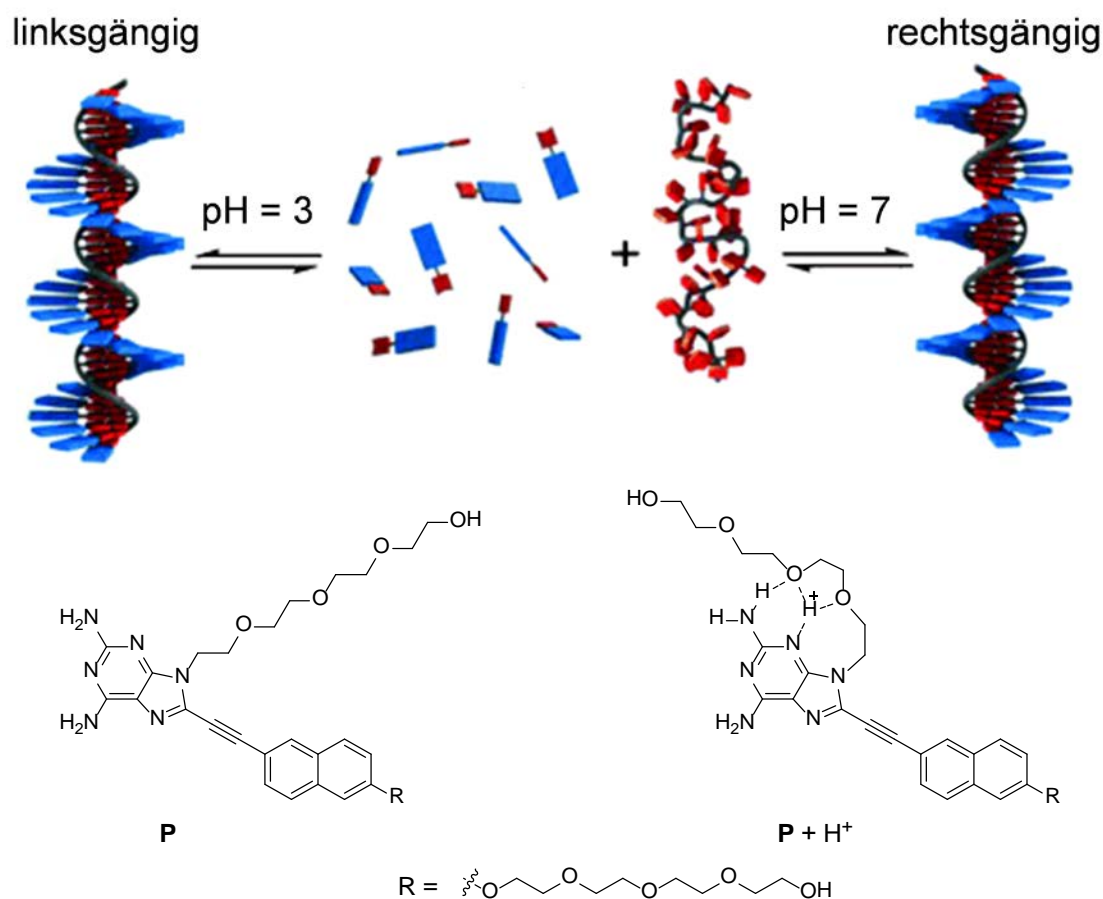


**NT2**

**Abb. 55:** Struktur von **NT2**.

Zusätzlich zu **dT40** wurden weitere Templatgrößen ( $q = 5, 10$  und  $20$ ) untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Naphthalin-Moleküle an kürzere Template weniger effizient binden. Deshalb wurden in diesem Fall mehr als nur stöchiometrische Mengen an Chromophoren benötigt, um einen hohen Bindungsgrad zu erreichen. Daraus konnte wiederum abgeleitet werden, dass die Wechselwirkungen zwischen den Naphthalin-Monomeren im Hybrid aus DNA und Farbstoffen wichtig für die Stabilisierung des gesamten Komplexes sind. Außerdem muss der Templatstrang eine bestimmte Länge besitzen, um ein stabiles Hybrid ausbilden zu können. Zum Schluss wurde ein mathematisches Modell entwickelt, mit dessen Hilfe die Effizienz der templatgestützten Selbstassemblierung von Chromophoren beschrieben werden konnte.<sup>[185]</sup>

Um diese Effizienz zu erhöhen, wurde eine weitere achirale Naphthalin-Modifikation (**P**) hergestellt, diesmal ausgestattet mit einer Diaminopurin-Einheit (Abb. 56 unten). Letztere kann mit dem Oligothymine-Templat **dTq** ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und verfügt außerdem über ein größeres  $\pi$ -System als das vorher verwendete Diaminotriazin.<sup>[186]</sup> Im Vergleich mit dem Komplex aus diaminotriazinmodifiziertem Naphthalin und **dT40** zeigte das entstandene Hybrid aus **dT40** und **P** bei  $\text{pH} = 7$  keine erhöhte Stabilität, dafür aber eine pH-abhängige Helikalität. Bei hohen pH-Werten (z.B.  $\text{pH} = 9$ ) bildet der Komplex aus DNA-Einzelstrang und den Diaminopurin-verknüpften Farbstoffen (**P**) eine rechtsgängige Struktur aus. Beim Übergang zu niedrigeren pH-Werten kehrt sich die Helikalität dieses Hybrids um und es entsteht, wahrscheinlich durch die Protonierung von **P**, eine linksgängige Struktur (Abb. 56).

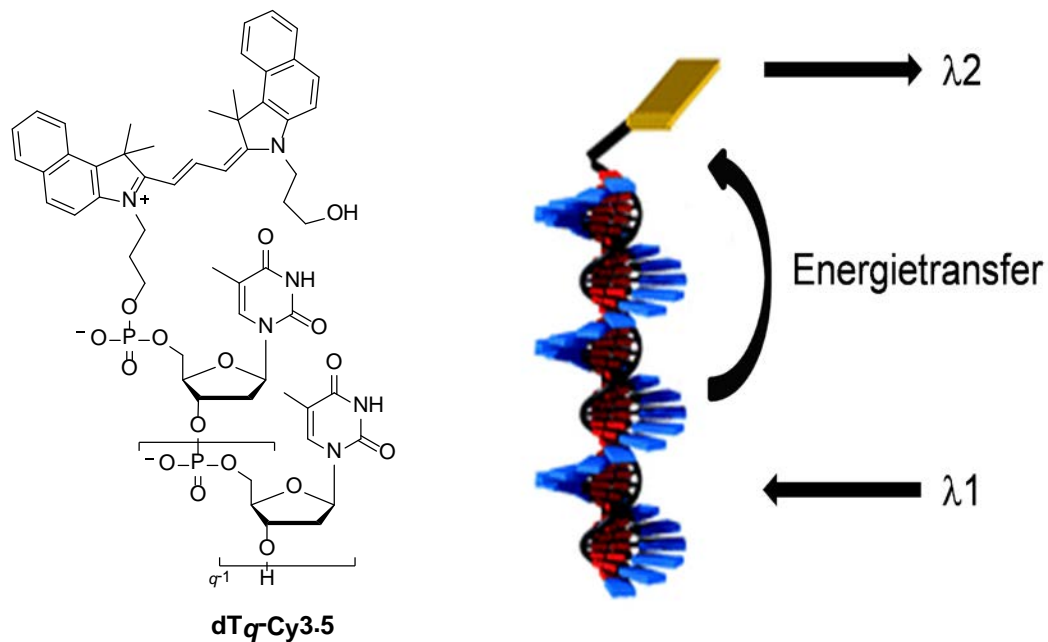


**Abb. 56:** Schematische Darstellung des Systems aus DNA-Einzelstrang und Chromophor, sowie der entsprechenden, über den pH-Wert schaltbaren Helikalität (oben)<sup>[186]</sup> und der Strukturen der ungeladenen (**P**) und der protonierten (**P + H<sup>+</sup>**) Form des diaminopurinmodifizierten Naphthalin-Derivats (unten).

In den bisher betrachteten Ansätzen wurde die Selbstassemblierung von Chromophoren entlang eines Templat-DNA-Einzelstrangs beschrieben. Der supramolekulare Strang aus Farbstoffmolekülen bindet hierbei über Wasserstoffbrückenbindungen an das Oligonukleotid und wird über  $\pi$ - $\pi$ - sowie hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten. In einer Weiterentwicklung dieses Systems wurde das 5'-Ende des als Templat dienenden Oligothyminstrangs (**dTq**) mit einem Cyanin-Farbstoff ausgestattet (**dTq-Cy3.5** siehe Abb. 57). Der supramolekulare Chromophorstapel wurde erneut aus diaminopurinmodifizierten Naphthalin-Molekülen (**P**) gebildet.<sup>[6]</sup> Da das Fluoreszenzspektrum von **P** ( $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ ) mit dem Absorptionsspektrum von **Cy3.5** ( $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ und } 590 \text{ nm}$ ) überlappt, kann theoretisch ein Energietransfer vom Donor (**P**) auf den Akzeptor (**Cy3.5**) stattfinden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Emissionsspektren einer Lösung von **P** bei  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$  aufgenommen. Nach Zugabe eines **dT40-Cy3.5** Templatstrangs nahm die Fluoreszenzintensität von **P** ab. Gleichzeitig konnte



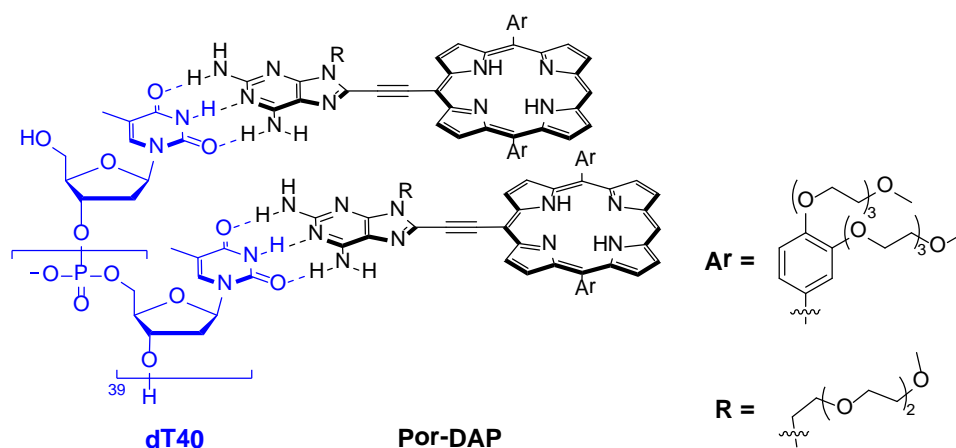
die Entstehung einer neuen, dem **Cy3.5**-Farbstoff zugehörigen Absorptionsbande bei  $\lambda_{em,max} = 620 \text{ nm}$  beobachtet werden. Eine Lösung, die nur **dT40-Cy3.5** enthielt zeigte dagegen bei einer ähnlichen Konzentration nach Anregung ( $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ) nur eine schwache Emission. Beide Beobachtungen sprechen dafür, dass der Energietransfer vom angelagerten Farbstoffaggregat auf den kovalent gebundenen Akzeptor **Cy3.5** stattfindet (Abb. 57).



**Abb. 57:** Schematische Darstellung der Struktur von **dT<sub>q</sub>-Cy3.5** und des Energietransfers von den an **dT<sub>q</sub>** angelagerten Donor-Farbstoffen (blau) auf den **Cy3.5**-Akzeptor (gelb).<sup>[6]</sup>

Zum Schluss wurde die Effizienz des Energietransfers anhand von Templat-DNA-Strängen verschiedener Länge (**dT<sub>q</sub>-Cy3.5** mit  $q = 10, 20, 30, 40$ ) untersucht. Nachdem die Farbstoffe (**P**) an die unterschiedlich langen Oligonukleotide gebunden hatten, wiesen die entsprechenden Fluoreszenzspektren alle eine erhöhte Emissionsintensität des Akzeptors auf ( $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ). Interessanterweise wurde hierbei für den Oligothyminstrang mit 30 Basen die höchste Akzeptoremission gefunden. Daraus folgt wiederum, dass bei dieser Größe der Templat-DNA ein Optimum zwischen dem durchschnittlichen Donor-Akzeptor-Abstand und der Bindungseffizienz der angelagerten Farbstoffe erreicht ist. Zusammengefasst konnten *Schenning* und seine Mitarbeiter mit diesem Ansatz zeigen, dass die DNA-Einzelstrang gestützte Assemblierung von Farbstoffen dazu verwendet werden kann, den Energietransfer innerhalb dieser eindimensionalen Chromophorstapel zu leiten.<sup>[6]</sup>

Auch andere Arbeitskreise beschäftigen sich mit der Stapelung von Farbstoffen in Gegenwart von Templat-DNA-Strängen. *Balaz et al.* benutzten dafür diaminopurinmodifizierte Porphyrine (**Por-DAP**), die mit einem komplementären Oligothyminstrang (**dT40**) Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (Abb. 58).<sup>[187]</sup> Über diese sollten die Porphyrine entlang des DNA-Einzelstrangs angelagert werden und dabei ein helikales Aggregat formen. Dazu wurde eine Lösung von **Por-DAP** und **dT40** bei 85 °C hergestellt und anschließend langsam auf 20 °C abgekühlt. Das entsprechende CD-Spektrum ließ auf ein aus **Por-DAP** und **dT40** gebildetes Hybrid schließen, innerhalb dessen die Porphyrine entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind (linksgängig; M-Helix).

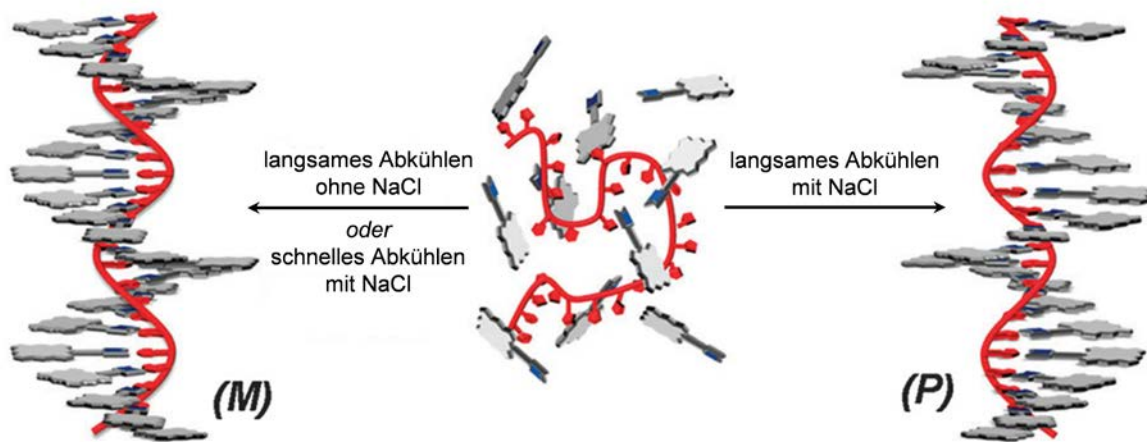


**Abb. 58:** Darstellung der Struktur von **Por-DAP** (schwarz) und **dT40** (blau), sowie der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Diaminopurin und Thymin (- - -).

Als nächstes wurde der Einfluss der Ionenstärke auf die Helikalität des Systems getestet. In Gegenwart von 500 mM NaCl bildet sich durch langsames Abkühlen ebenfalls ein Hybrid aus **Por-DAP** und **dT40**. Dessen CD-Spektrum zeigte einen beinahe spiegelbildlichen Verlauf, verglichen mit dem Hybrid, welches in Abwesenheit von NaCl entstanden war. Das nahezu umgekehrte CD-Signal deutete stark auf eine ebenso umgekehrte Helikalität (rechtsgängig; P-Helix) des bei erhöhter Salzkonzentration gebildeten **Por-DAP**·**dT40**-Komplexes hin.

Neben dem molaren Verhältnis von Porphyrinchromophor zu Oligothyminstrang, wirkte sich auch die für die Probe verwendete Abkühlgeschwindigkeit deutlich auf die Helikalität des **Por-DAP**·**dT40**-Hybrids aus. Veranschaulicht wurde dieses Verhalten durch zwei identische Proben (gleiche Porphyrin-, DNA-, sowie NaCl-Konzentration) von denen eine langsam und eine schnell abgekühlt wurde. Anhand der entsprechenden CD-Spektren konnte die Struktur der Hybride bestimmt werden. Wie

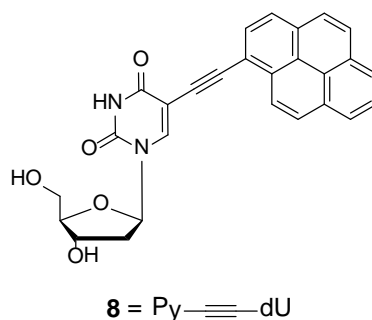
bereits erwähnt, bildete das Aggregat aus **Por-DAP** und **dT40** in Gegenwart von 500 mM NaCl durch langsames Abkühlen eine P-Helix aus (rechtsgängig). Im Gegensatz dazu zeigte der **Por-DAP·dT40**-Komplex bei schneller Abkühlgeschwindigkeit mit 500 mM NaCl eine linksgängige, helikale Struktur (M-Helix). Insgesamt konnte so die supramolekulare Helikalität eines Hybrids aus diaminopurinmodifizierten Porphyrinen **Por-DAP** und einem Oligothymin-Templat-Strang **dT40** mit Hilfe der Ionenkonzentration und der Abkühlgeschwindigkeit bestimmt werden. Einen Überblick gibt die folgende Abbildung.<sup>[187]</sup>



**Abb. 59:** Schematische Darstellung der Helikalität, der unter verschiedenen Bedingungen ausgebildeten **Por-DAP·dT40**-Komplexe (M = linksgängig; P = rechtsgängig).<sup>[187]</sup>

## 5.2 Entwicklung eines Systems aus Fluorophoren und Templat-DNA

In Anlehnung an die vorher erläuterten Experimente der Arbeitsgruppen *Schenning* und *Balaz* sollten Farbstoffe an einzelsträngige Oligonukleotide angelagert und die optischen sowie chiroptischen Eigenschaften der supramolekularen Struktur untersucht werden. Das Pyren sollte hierbei, wie auch schon in den Kapiteln 3 und 4 als Farbstoff dienen. Im Gegensatz zu den Chromophoren der in Kapitel 5.1 besprochenen Ansätze, wurde Pyren nicht mit achiralen Einheiten wie Diaminotriazin oder Diaminopurin modifiziert. Stattdessen wurde es über einen Ethinyllinker mit der C5-Position des chiralen 2'-Desoxyuridins verknüpft (Abb. 60) und kann dadurch Wasserstoffbrückenbindungen zu den komplementären Adeninen in einem Templat-DNA-Strang eingehen. Auch andere Arbeitskreise benutzten nukleosidmonophosphat<sup>[188]</sup>- oder nukleobasenmodifizierte<sup>[189]</sup> Chromophore zur Ausbildung supramolekularer Aggregate. Die hierbei verwendeten Farbstoff-Monomere enthielten jeweils zwei identische Modifikationen und konnten über diese Wasserstoffbrückenbindungen zu einem oder zwei komplementären Oligonukleotid-Templaten ausbilden.

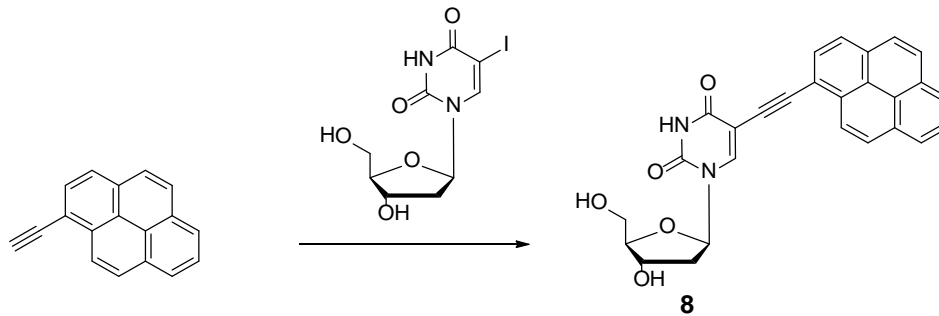


**Abb. 60:** Struktur des Py-≡-dU-Nukleosids **8**.

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit einem System aus Py-≡-dU-Nukleosiden **8**, und diesen als Template dienenden Oligonukleotiden. Hierbei stehen die Optimierung der Systembedingungen, die anschließenden spektroskopischen Untersuchungen, sowie die Sequenzspezifität von **8** im Vordergrund des Interesses. Am Ende sollen die Eigenschaften der, über Wasserstoffbrücken an das Templat-Oligonukleotid angelagerten Farbstoffaggregate aus **8**, mit denen kovalent in Oligonukleotide eingebauter Py-≡-dU-Moleküle verglichen werden. Ziel ist es, mit

Hilfe der einzeln angelagerten Fluorophore ein Aggregat zu erhalten, dessen optisches Verhalten dem eines kovalent eingebauten Py-≡-dU-Stapels ähnelt.

### 5.2.1 Synthese und Sequenzdesign

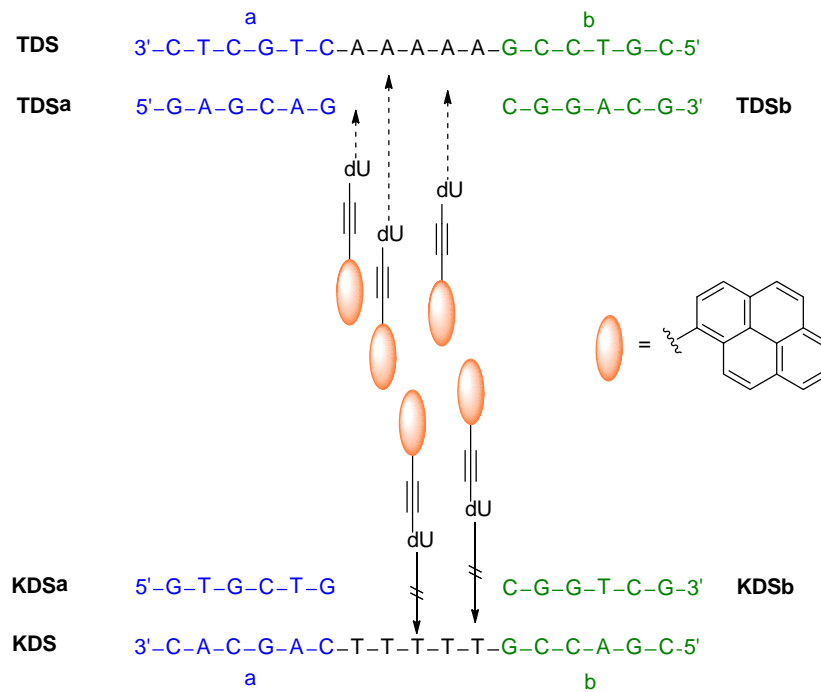


**Abb. 61:** Synthese des Pyren-Nukleosids. Synthesebedingungen: Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI, NEt<sub>3</sub> in DMF, 14 h, 60 °C, 66%.

Die Darstellung von **8** ist literaturbekannt.<sup>[107, 115, 190]</sup> Wie in Abb. 61 gezeigt, erfolgte die Synthese im Rahmen dieser Arbeit durch eine *Sonogashira*-Kupplung zwischen 1-Ethynylpyren und 5-Iod-2'-desoxyuridin in DMF. Bei dem Versuch, eine alternative Synthesestrategie zu entwickeln, wurde 1-Ethynylpyren mit dem 5'-DMT-geschützten 5-Iod-2'-desoxyuridin ebenfalls in einer *Sonogashira*-Kupplung umgesetzt. Anschließend wurde die DMT-Gruppe mit einer Lösung aus DCM und Dichloressigsäure im Verhältnis 97:3 (v/v) abgespalten. Diese Syntheseroute erwies sich jedoch als ungünstig, da Triethylammoniumsalze als Nebenprodukt gebildet und durch mehrmaliges, langwieriges Lyophilisieren entfernt werden mussten.

Um das System aus Py-≡-dU-Nukleosiden und Templat-DNA-Strang möglichst übersichtlich zu halten, wurde für letzteren eine kurze Sequenz aus 17 Basen festgelegt. Wie in Abb. 62 gezeigt, befindet sich in der Mitte des Templat-DNA-Strangs (**TDS**) ein Abschnitt aus fünf Adenosin-Einheiten, an die sich die ethynylpyrenmodifizierten Desoxyuridine mittels Watson-Crick-Basenpaarung anlagern können. Zusätzlich wurden zwei weitere Oligonukleotide **TDSa** und **TDSb** verwendet. Diese sind komplementär zu dem in Abb. 62 markierten Teilabschnitt a, bzw. b von **TDS**. Sie sollen die Wechselwirkungen zwischen Py-≡-dU und den Adeninbasen des Templat-DNA-Strangs erleichtern, da nach Ausbildung eines Doppelstrangs zwischen **TDS** und **TDSa/b** nur die Bindungsstellen für **8** frei bleiben. Um zu kontrollieren, ob die Anlagerung von Py-≡-dU an die Adenosin-Einheiten selektiv verläuft, wurde ein Kontroll-Oligonukleotid (**KDS** in Abb. 62) verwendet. Die

beiden, jeweils zu einem Ende von **KDS** komplementären Stränge **KDSa** und **KDSb** sind ebenfalls in Abb. 62 gezeigt. Die freien Thyminbasen im Doppelstrang aus **KDS/KDSa/b** sollten mit den Py- $\equiv$ -dU-Nukleosiden keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können.



**Abb. 62:** Sequenz des Templat-Oligonukleotids (**TDS**) und des Kontroll-Oligonukleotids (**KDS**), sowie der zu einem Teil von **TDS** komplementären Stränge **TDSa** und **TDSb** und der zu einem Teil von **KDS** komplementären Stränge **KDSa** und **KDSb**. Die Bindungsstellen für Py- $\equiv$ -dU im Duplex sind mit Pfeilen angedeutet.

Es wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide **TDSa** und **TDSb** bzw. **KDSa** und **KDSb** weder selbstkomplementär noch zueinander komplementär sind, damit sie ausschließlich mit dem **TDS**- bzw. **KDS**-Strang wechselwirken.

Der nächste Schritt bestand darin, geeignete Bedingungen für die Anlagerung von **8** an den Doppelstrang aus **TDS** und **TDSa/b** zu finden.

## 5.2.2 Variation der Anlagerungsbedingungen

Parameter wie Lösungsmittel, Konzentration und Temperatur haben einen großen Einfluss auf die Assemblierung von Chromophoren an einen Templat-DNA-Strang.<sup>[184-185]</sup> Deshalb wurden mehrere Messreihen, in denen die genannten Bedingungen variieren, durchgeführt. Ziel war es, eine mittels UV/Vis-Absorption und/oder Fluoreszenzspektroskopie erkennbare Anlagerung der Fluorophore **8** an einzel- und doppelsträngige TDS zu erreichen. Diese sollte sich außerdem von der

Wechselwirkung der Farbstoffe mit dem Kontroll-Oligonukleotid unterscheiden lassen.

In allen folgenden Messungen wurden, falls nicht anders beschrieben, die Proben für die spektroskopischen Untersuchungen in bereits auf die Messtemperatur eingestellte Küvetten überführt. Emissionsspektren wurden alle mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc} = 380$  nm aufgenommen.

### Verwendung von Py- $\equiv$ -dU als Feststoff im Überschuss

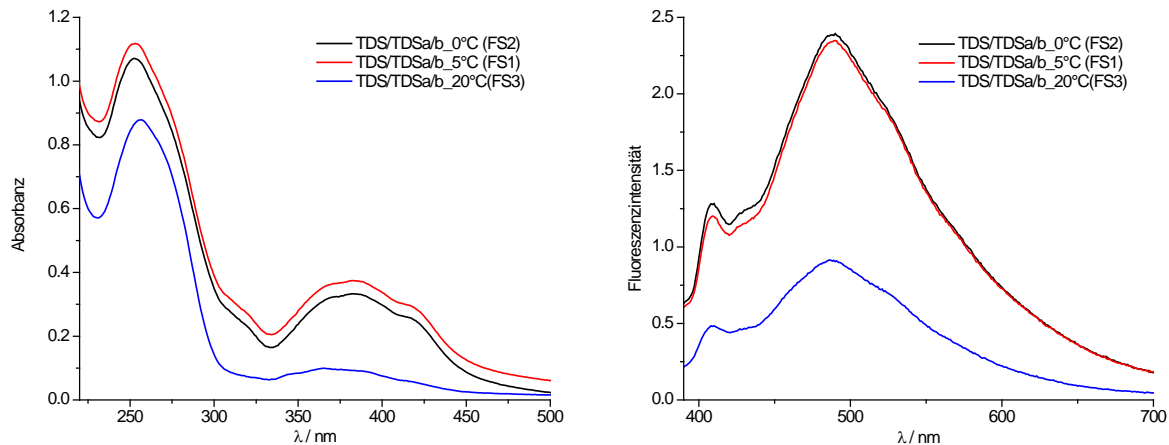
Die ersten drei Messreihen (FS1-FS3) wurden mit Py- $\equiv$ -dU im Überschuss durchgeführt. Dafür wurde Verbindung **8** in fester Form in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Eine Oligonukleotidlösung mit definierter Konzentration wurde separat in Triethylammoniumacetat (TEAA)-Puffer ( $c = 10$  mM, pH = 5.2) hergestellt und anschließend zum Feststoff gegeben (Endvolumen = 1000  $\mu$ L). In Tabelle 5 sind die DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben dargestellt. Demnach bestand jede Messreihe aus fünf unterschiedlichen Messungen (Proben). Für die Negativprobe wurde der Py- $\equiv$ -dU-Chromophor jeweils nur mit TEAA-Puffer versetzt.

**Tabelle 5:** DNA-Konzentrationen der Messreihe FS1-FS3 in TEAA-Puffer mit Py- $\equiv$ -dU als Feststoff im Überschuss.

Probe	c(DNA) [ $\mu$ M]			
	TDS	TDSa/b	KDS	KDSa/b
<b>TDS</b>	2.5	-	-	-
<b>TDS/TDSa/b</b>	2.5	3.0	-	-
<b>KDS</b>	-	-	2.5	-
<b>KDS/KDSa/b</b>	-	-	2.5	3.0
<b>Negativprobe</b>	-	-	-	-

Die Proben wurden für 15 min bei 70 °C ultraschallbehandelt, um den Feststoff in Lösung zu bringen und eine komplette Dehybridisierung der DNA-Stränge zu gewährleisten. Danach ließ man die Suspensionen auf Raumtemperatur abkühlen. Die Anlagerung der Farbstoffe an die Oligonukleotide erfolgte für Messreihe FS1 und FS2 bei 8 °C für FS3 bei Raumtemperatur innerhalb von mindestens 24 h. Anschließend wurden die Proben geschüttelt, zentrifugiert und 600  $\mu$ L des Überstands in Küvetten überführt. Die spektroskopischen Messungen wurden für FS1 bei 5 °C, für FS2 bei 0 °C und für FS3 bei 20 °C durchgeführt.

Folgende Abbildung zeigt die Absorptionsspektren (links) und die Emissionsspektren (rechts) von FS1-FS3. Aus Übersichtsgründen werden nur die **TDS/TDSa/b**-Proben abgebildet.



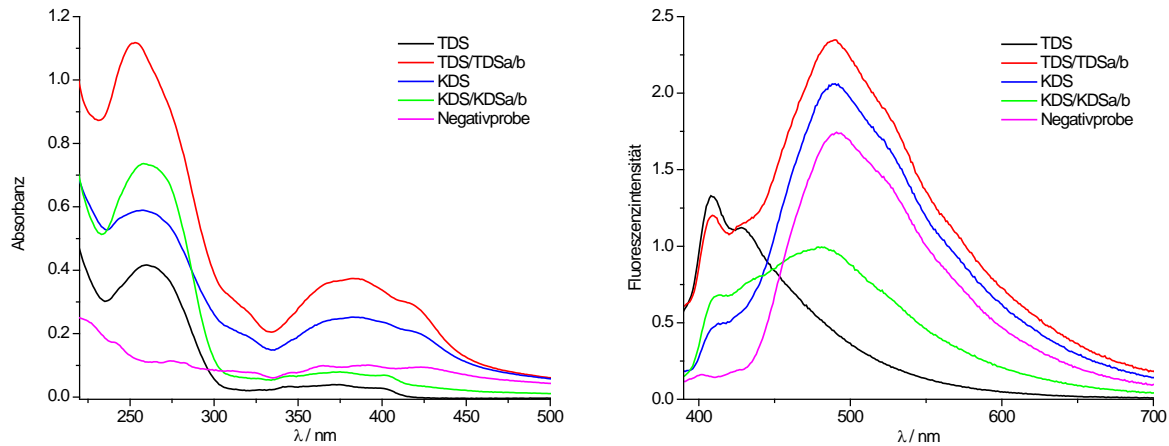
**Abb. 63:** Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Messreihen FS1-FS3 in TEAA-Puffer mit Py- $\equiv$ -dU als Feststoff im Überschuss.

Das Absorptionsspektrum von **TDS/TDSa/b** zeigt bei 5 °C und bei 0 °C eine größere Intensität als bei 20 °C. Der Peak um  $\lambda = 255$  nm kann den Oligonukleotiden sowie dem nukleosidischen Anteil der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore zugeordnet werden. Im Bereich um  $\lambda = 400$  nm ist eine weitere breite Absorptionsbande zu erkennen. Diese stammt vom Ethinylpyren. Das Spektrum bei 0 °C gleicht dem bei 5 °C. Bei 20 °C ist die Intensität deutlich geringer und es ist keine Feinaufspaltung im Bereich um  $\lambda = 400$  nm mehr erkennbar.

Die Fluoreszenzspektren bei 0 °C und 5 °C sind nahezu identisch und zeigen eine viel höhere Intensität als bei 20 °C. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei  $\lambda = 490$  nm mit einer leichten Schulter bei  $\lambda = 528$  nm. Da die Py- $\equiv$ -dU-Fluorophore in einem großen Überschuss zugegeben wurden, können sie über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen neben der Anlagerung an den Templatstrang auch miteinander aggregieren. Die breite Fluoreszenzbande zwischen  $\lambda \approx 450$  nm und 600 nm ist deshalb wahrscheinlich auf die Bildung von Py- $\equiv$ -dU-Aggregaten, die nicht angelagert werden, zurückzuführen.

Aufgrund der beobachteten Temperaturabhängigkeit von Fluoreszenz und Absorption wurden alle folgenden Messungen bei 5 °C durchgeführt, da dadurch höhere Intensitäten als bei 20 °C erreicht werden können. Zusätzlich ist die Messgenauigkeit (durch Beschlagen der Küvetten bei niedriger Temperatur) höher als bei 0 °C, bei einer relativ gleich bleibenden Absorptions- und Fluoreszenzintensität.





**Abb. 64:** Absorptions- und Fluoreszenzspektren aller Proben aus FS1 in TEAA-Puffer mit Py- $\equiv$ -dU als Feststoff im Überschuss.

Betrachtet man die Fluoreszenzspektren aller Proben aus FS1 (Abb. 64 rechts), so fällt auf, dass die Negativprobe nur ein Maximum bei  $\lambda = 490$  nm mit einer Schulter bei  $\lambda = 528$  nm zeigt. Das bestärkt die Zuordnung des Signals zu einer unspezifischen, nicht an Oligonukleotide gebundenen Py- $\equiv$ -dU-Aggregation. Die Feinaufspaltung bei  $\lambda = 409$  nm und  $\lambda = 428$  nm für die Templat-DNA-Proben (**TDS** und **TDS/TDSa/b**) deutet auf eine spezifische Wechselwirkung der Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside mit den Adeninen der Templat-Oligonukleotide hin. Die Emissionsintensität für das Maximum bei  $\lambda = 490$  nm variiert insgesamt stark. Eine mögliche Erklärung ist die zwischen den einzelnen Proben leicht schwankende Menge an **8** durch dessen Einsatz im Überschuss. Die Kontroll-DNA-Proben (**KDS** und **KDS/KDSa/b**) zeigen zwar eine leichte Emission im Bereich von  $\lambda = 413$  nm, aber keine so ausgeprägte Feinstruktur wie die Templatstränge. Das deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore mit den Kontrollsträngen hin.

Alle Proben absorbieren bei ca. 400 nm (Abb. 64 links). Für **TDS** resultiert diese vermutlich nur aus den entlang der Templat-DNA angelagerten Ethinylpyrenen (keine Fluoreszenz bei  $\lambda = 490$  nm). Für die Negativprobe ist sie allein auf eine nicht von Oligonukleotiden beeinflusste Py- $\equiv$ -dU-Aggregation zurückzuführen. Nach Optimierung der Messtemperatur wurden weitere Parameter eingestellt.

### Verwendung einer PydU-Lösung mit definierter Konzentration

In den ersten drei Messreihen FS1-FS3 wurde der Py- $\equiv$ -dU-Farbstoff als Feststoff im Überschuss eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurde in den folgenden drei

Versuchsreihen LSG1-LSG3 eine Lösung von Py- $\equiv$ -dU in THF ( $c(\text{Py-}\equiv\text{-dU}) = 1.06 \text{ mM}$ ) zur Oligonukleotidlösung bzw. zum reinen Lösungsmittel (Negativprobe) gegeben (Endvolumen = 1000  $\mu\text{L}$ ).

Eine analog den Bedingungen von FS1 durchgeführte Messreihe zeigte im Vorfeld, dass nach Ersatz des Py- $\equiv$ -dU-Feststoffes durch eine Py- $\equiv$ -dU-Lösung, bessere Ergebnisse (Feinaufspaltung und Intensität der Spektren) mit Wasser anstatt Puffer als Lösungsmittel erreicht werden konnten. Deshalb wurden alle folgenden Messungen in MilliQ-Wasser durchgeführt.

Die Versuchsreihen LSG1-LSG3 unterschieden sich durch die DNA-Konzentrationen der Gegenstränge (**TDSa/b** und **KDSa/b**) in den fertigen Lösungen. Diese sind für LSG1 in Tabelle 5, für LSG2-3 in Tabelle 6 wiedergegeben.

**Tabelle 6:** DNA-Konzentrationen der Messreihe LSG2 und LSG3

Probe	c(DNA) [ $\mu\text{M}$ ]			
	TDS	TDSa/b	KDS	KDSa/b
<b>TDS</b>	2.5	-	-	-
<b>TDS/TDSa/b</b>	2.5	2.5	-	-
<b>KDS</b>	-	-	2.5	-
<b>KDS/KDSa/b</b>	-	-	2.5	2.5
<b>Negativprobe</b>	-	-	-	-

Außerdem hatten die Proben in LSG3 eine höhere Endkonzentration des Py- $\equiv$ -dU Farbstoffes (siehe Tabelle 7). Die Messreihen LSG1-3 wurden insgesamt zweimal unter identischen Bedingungen durchgeführt (LSG1.1-LSG3.1 und LSG1.2-LSG3.2). Eine Übersicht gibt die folgende Tabelle.

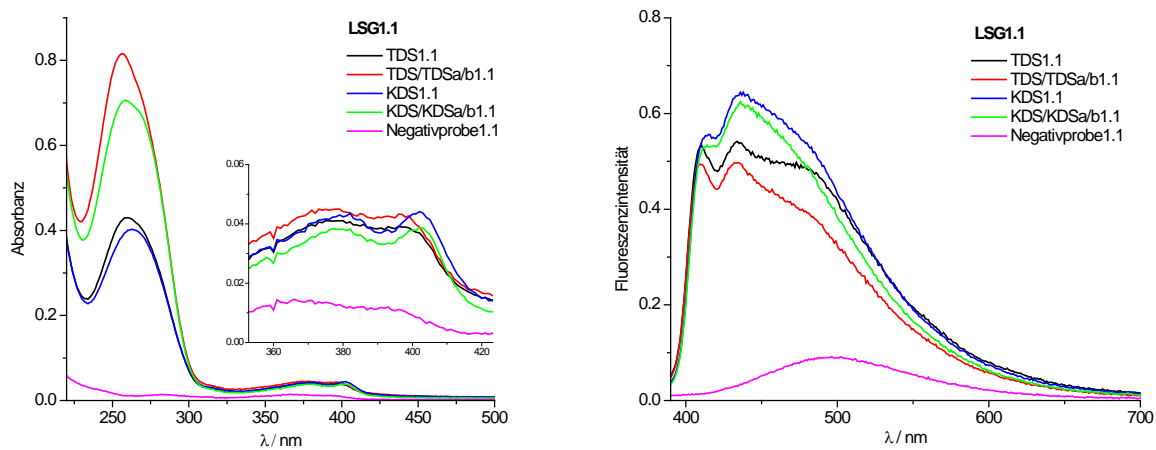
**Tabelle 7:** Übersicht über die DNA-Konzentrationen, die Farbstoffkonzentrationen und das Verhältnis von Farbstoff zu DNA-Einzel- bzw. Doppelstrang in den Messreihen LSG1-LSG3

Messreihe	c(DNA)	c(Py- $\equiv$ -dU) [ $\mu\text{M}$ ]	c(Py- $\equiv$ -dU):c(DNAss/ds)
<b>LSG1.1 / LSG1.2</b>	Tabelle 5	12.5	5:1
<b>LSG2.1 / LSG2.2</b>	Tabelle 6	12.5	5:1
<b>LSG3.1 / LSG 3.2</b>	Tabelle 6	18.75	7.5:1

Wie in obiger Tabelle gezeigt, enthielten die Proben in LSG1 und LSG2 die 5-fache, in LSG3 die 7.5-fache Menge an Chromophoren, verglichen mit den DNA-Einzel-

bzw. Doppelsträngen. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass in den Templatsträngen jede Adenin-Bindungsstelle von einem Py- $\equiv$ -dU-Nukleosid besetzt werden kann.

Nach Herstellung der Lösungen aus Py- $\equiv$ -dU und (bis auf die Negativprobe) aus Oligonukleotiden, verlief die weitere Probenvorbereitung für alle sechs Messreihen gleich. Die Proben wurden für 10 min auf 70 °C im Heizblock temperiert. In diesem wurden sie anschließend bis auf Raumtemperatur abgekühlt und danach für mind. 24 h bei 8 °C stehen gelassen, damit sich die Farbstoffe anlagern konnten. Die Spektren wurden alle bei 5 °C aufgenommen. In folgender Abbildung sind die Absorptions- sowie Emissionsspektren von LSG1.1 gezeigt.

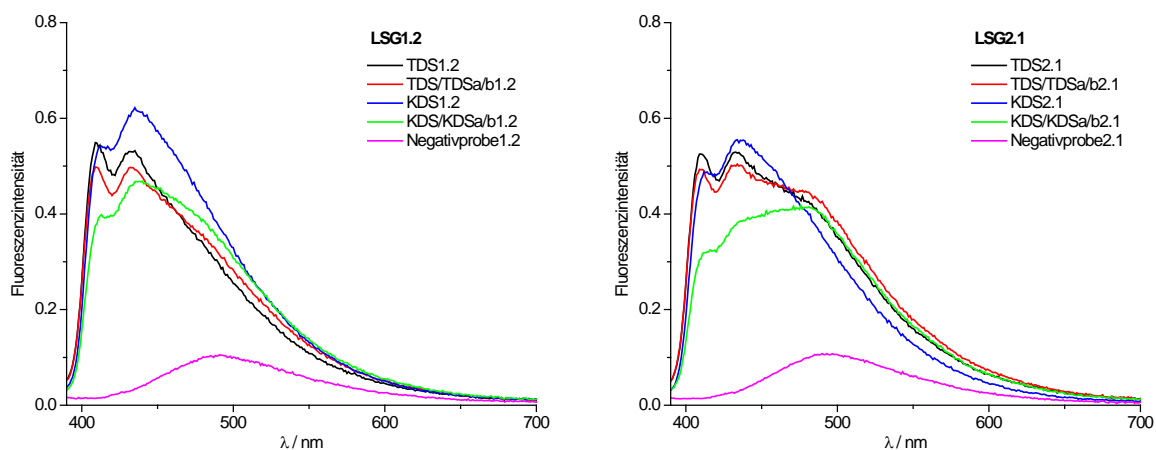


**Abb. 65:** Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von LSG1.1.

Im Bereich von  $\lambda = 400$  nm (Abb. 65 links) zeigen die Oligonukleotidproben die typische Pyrenabsorption mit Maxima bei  $\lambda = 375$  nm und 396 nm für die Templat-DNA-Proben (**TDS1.1** und **TDS/TDSa/b1.1**) und bei  $\lambda = 380$  nm und 402 nm für die Kontroll-DNA-Proben (**KDS1.1** und **KDS/KDSa/b1.1**). Die Negativprobe hat dagegen eine sehr geringe Absorption und keine erkennbare Feinaufspaltung bei diesen Wellenlängen.

Die beiden Fluoreszenzmaxima der Templat-DNA-Proben ( $\lambda_{\text{max}} = 410$  und 434 nm) besitzen ein anderes Verhältnis als die der Kontroll-DNA und sind im Vergleich zu diesen hypsochrom verschoben. Beides deutet auf eine unterschiedliche Anlagerung und Assemblierung der Chromophore am komplementären und am nicht komplementären DNA-Strang hin. Alle Oligonukleotidproben besitzen eine Schulter im Spektrum bei ca. 485 nm, diese Wellenlänge liegt nahe dem Fluoreszenzmaximum der Negativprobe. Dadurch wird die Zuordnung dieses Peaks zu einer nicht an DNA angelagerten Py- $\equiv$ -dU-Aggregation bestärkt.

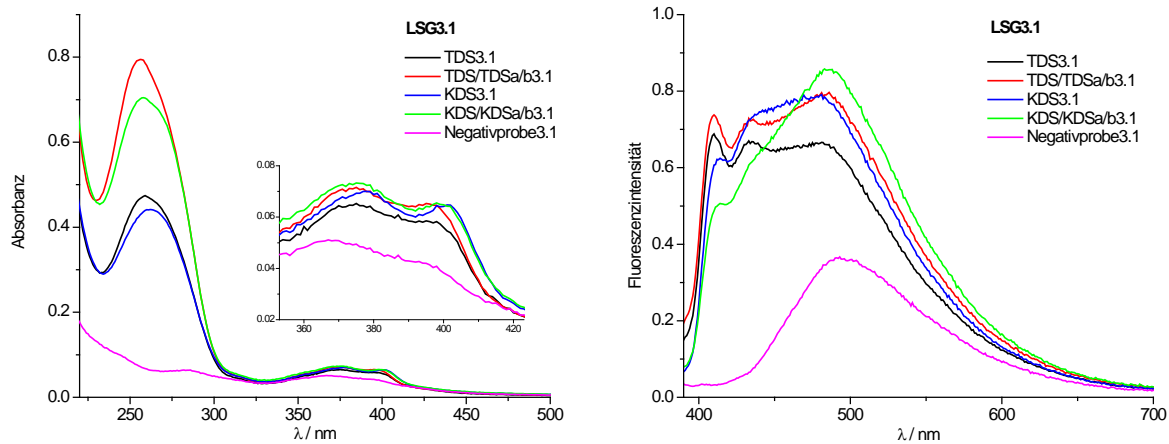
Die Absorptionsspektren von LSG1.2 und LSG2 ähneln stark dem von LSG1.1, deshalb werden sie hier nicht dargestellt. Anders ist das bei den in Abb. 66 gezeigten Fluoreszenzspektren. Bei LSG1.2 (Abb. 66 links) ist die Schulter in fast allen Proben weniger stark ausgeprägt als bei LSG1.1 (Abb. 65 rechts), obwohl die Probenpräparation gleich verlief. Diese Beobachtung könnte durch ein Gleichgewicht zwischen der an DNA angelagerten Assemblierung und der nicht angelagerten Aggregation der Fluorophore erklärt werden, welches wahrscheinlich auch Einfluss auf die Intensität der einzelnen Messungen hat. Es wird vermutet, dass dieses Gleichgewicht bei einer Messtemperatur von 5 °C noch nicht ganz eingestellt ist, oder sich trotz gleicher Durchführung der beiden Messreihen unterschiedlich eingestellt hat. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die beiden identischen Messreihen LSG2.1 und LSG2.2 gemacht werden, weshalb im Folgenden nur LSG2.1 gezeigt wird.



**Abb. 66:** Fluoreszenzspektren von LSG1.2 (links) und LSG2.1 (rechts).

Vergleicht man LSG1.1 und LSG1.2 jetzt mit LSG2.1 (Abb. 66 rechts), so zeigt sich erneut eine veränderte Einstellung des Gleichgewichts. Ob diese Änderung durch den fehlenden Überschuss an Gegensträngen in Messreihe LSG2 zustande kommt, ließ sich nicht feststellen.

Die Ausbildung eines Gleichgewichts in LSG1 und LSG2 legt die Vermutung nahe, das sich dieses durch einen Überschuss an Farbstoffen verschieben lässt. Deswegen wurde in der darauffolgenden Messreihe LSG3 (Spektren in Abb. 67) das Verhältnis zwischen Py- $\equiv$ -dU und DNA-Einzel- bzw. Doppelstrang von 5:1 auf 7.5:1 erhöht.



**Abb. 67:** Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von LSG3.1.

Die Absorptionsspektren zeigen im Bereich um  $\lambda = 400$  nm eine ähnliche Struktur wie LSG1.1 (Abb. 65). Die erhöhte Intensität kommt vermutlich durch den Überschuss an Chromophoren zustande. Anhand der Emissionsspektren von LSG3.1 lässt sich erkennen, dass die erhöhte Py- $\equiv$ -dU-Konzentration hauptsächlich einen Anstieg in der Intensität der Schulter bei  $\lambda = 485$  nm bewirkt und eher wenig Einfluss auf den hypsochromeren Wellenlängenbereich hat. Außerdem konnte die Entstehung eines gelben Niederschlags während der Probenvorbereitung beobachtet werden, welcher vermutlich auf die gesteigerte Bildung nicht mit DNA wechselwirkender Py- $\equiv$ -dU-Aggregate zurückzuführen ist. Deshalb wurde für die Konzentrationen von Chromophor und DNA in den folgenden Messungen ein Verhältnis von maximal 1:1 gewählt.

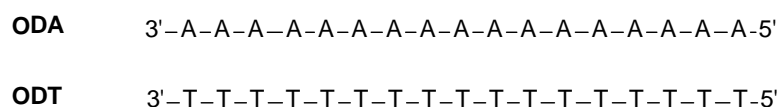
Zusammenfassend kann man sagen, dass die Messreihen FS1-FS3 und LSG1-LSG3 einen ersten Einblick in das System aus Farbstoff und Templat-DNA gegeben haben. Des Weiteren konnten wichtige Parameter wie Temperatur, Lösungsmittel und das Verhältnis von Chromophor zu DNA für zukünftige Messungen festgelegt werden. Außerdem stellte sich heraus, dass eine doppelsträngige Templat-DNA keine Vorteile gegenüber einem einzelnen Templat-Oligonukleotid zeigt (nahezu identische Spektren bei jeder Messung). Anhand der Emissionseigenschaften der Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside konnte eine klare Differenzierung zwischen An- und Abwesenheit von Oligonukleotiden gefunden werden. Für die Anlagerung der Fluorophore an das Templat-Oligonukleotid und die Wechselwirkung mit dem Kontroll-Oligonukleotid waren die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten ähnlich. Es konnten lediglich leichte Unterschiede in der Feinstruktur der Emissionsspektren

im Bereich von ca. 410-440 nm bei den genannten Proben beobachtet werden. Eine eindeutige Präferenz der ethinylpyrenmodifizierten Uridine für die komplementäre Adeninbase gegenüber der Thyminbase konnte jedoch anhand der spektroskopischen Messungen noch nicht festgestellt werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt das Templat-Oligonukleotid verändert.

### 5.2.3 Variation des Templat-DNA-Strangs

*Schenning et al.* fanden heraus, dass die Reihenfolge, in der sich wasserstoffbrückenbindungen ausbildende Chromophore entlang einer einzelsträngigen Templat-DNA anordnen, von der Länge des DNA-Strangs abhängt. Angelagert an längere Oligonukleotide besitzen die Farbstoffe außerdem insgesamt mehr Wechselwirkungen untereinander und erhöhen so die Stabilität des gebildeten Aggregats.<sup>[185]</sup>

Nun stellt sich die Frage, ob die Verlängerung der Templat-DNA-Sequenz auch Einfluss auf die Selektivität der bisher betrachteten Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside nehmen kann, damit diese sich bevorzugt an Adeninbasen gegenüber Thyminbasen anlagern. Um diese zu beantworten, wurden Messungen mit einem neuen Oligodesoxyadenosin-Templat **ODA** (Abb. 68) aus einer Sequenz von 17 Basen durchgeführt. In diesem waren die Anlagerungsstellen für das Py- $\equiv$ -dU-Fluorophor im Vergleich zu **TDS** um das 3.4-fache verlängert. Das Kontroll-Oligonukleotid **ODT** bestand aus einer Sequenz von 17 Desoxythymidinen.



**Abb. 68:** Sequenzen des Templat-DNA-Strangs **ODA** und des Kontroll-DNA-Strangs **ODT**.

### Allgemeine Bedingungen für die Messreihen LSG4-LSG10

Die folgenden experimentellen Untersuchungen wurden in insgesamt sieben Messreihen (LSG4-LSG10) durchgeführt. Jede Reihe bestand dabei (wie auch schon im vorherigen Kapitel) aus mehreren einzelnen Messungen (Proben). Die im Anschluss aufgeführten Bedingungen blieben unverändert:

- Das Endvolumen jeder Probe betrug 1000  $\mu$ L
- Absorptions- und Emissionsspektren wurden bei einer Temperatur von 5 °C aufgenommen

- Die Anregungswellenlänge der Fluoreszenzspektren war identisch mit der in Kapitel 5.2.2
- Die Py- $\equiv$ -dU-Chromophore wurden aus einer Stammlösung (in THF oder MeOH) zur Oligonukleotidlösung in H<sub>2</sub>O, oder zum reinen Lösungsmittel (Negativprobe) gegeben

### **Messreihe LSG4 und LSG5**

Die Probenpräparation sowie die Durchführung und die eventuell gemachten Beobachtungen werden für jede Messreihe anhand einer Tabelle übersichtlich dargestellt, angefangen mit LSG4 in Tabelle 8. Die Spalte: „Ident. Proben“ gibt an, wie oft die Messreihe insgesamt unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde. Bei LSG4 geschah dies zweimal, daraus ergaben sich LSG4.1 und LSG4.2.

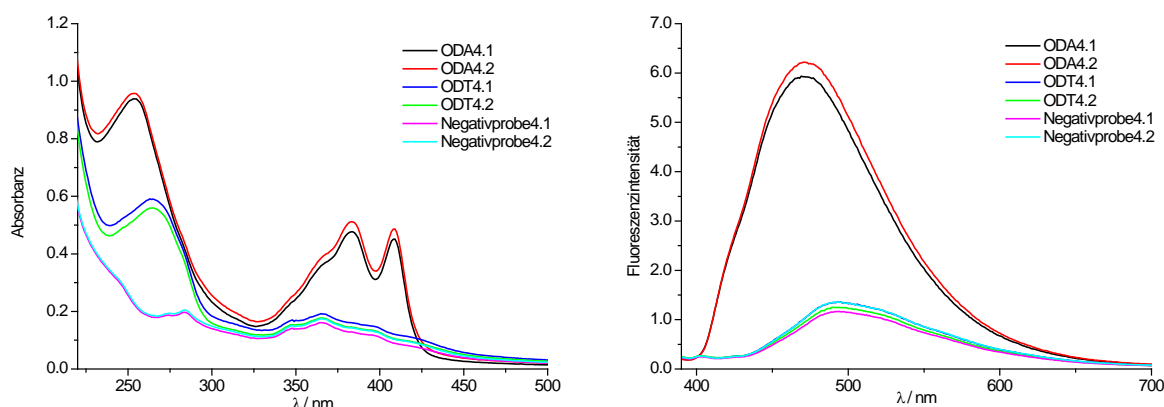
**Tabelle 8:** Probenpräparation, Durchführung und Beobachtungen bei Messreihe LSG4 (= LSG4.1 und LSG4.2)

<b>Präparation</b>	<b>Endkonzentration</b>		<b>Endvolumen</b>	<b>Verhältnis</b>	<b>Ident. Proben</b>
<b>LSG4, Probe</b>	<b>c(DNA) [<math>\mu</math>M]</b>	<b>c(Py-<math>\equiv</math>-dU) [<math>\mu</math>M]</b>	<b>V(Py-<math>\equiv</math>-dU) [<math>\mu</math>L]</b>	<b>c(Py-<math>\equiv</math>-dU):c(DNA)</b>	
<b>ODA</b>	2.5	42.5	40.3	17:1	2
<b>ODT</b>	2.5	42.5	40.3	17:1	2
<b>Negativprobe</b>	-	42.5	40.3		2

<b>Durchführung</b>	<b>LM</b>	<b>Anlagerungsbedingungen für die Farbstoffe</b>	<b>Messbedingungen</b>	<b>Beob.</b>
<b>ODA</b>		10 min bei 70 °C im	Lösung wird in	
<b>ODT</b>	Py- $\equiv$ -dU aus Stammlösung	Heizblock; Abkühlen auf RT; Anlagerung für mind.	gekühlte Küvetten überführt und vor	gelber Niederschlag (NS)
<b>Negativprobe</b>	in THF	24 h bei 8 °C	der Messung 20 min temperiert	

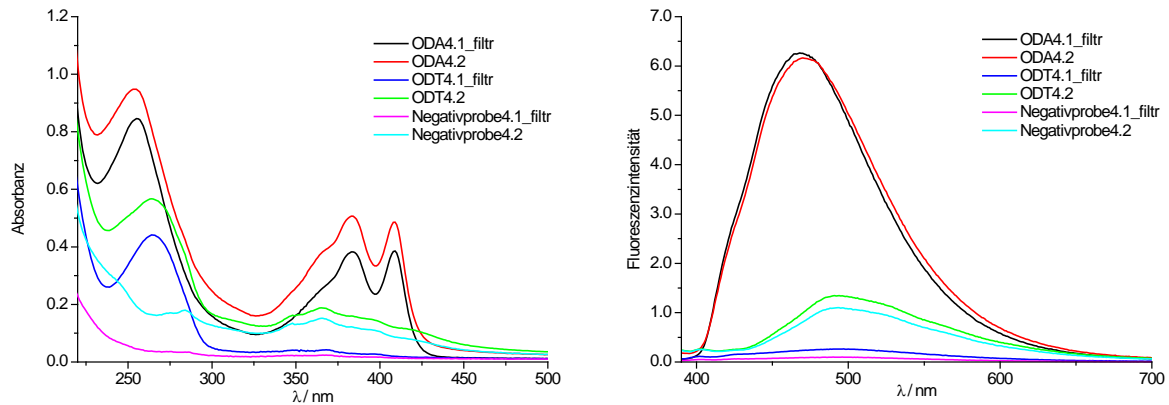
Die Absorptions- und Emissionsspektren zu Tabelle 8 sind in nachstehender Abbildung gezeigt.



**Abb. 69:** Absorptions- und Emissionsspektren von LSG4.1 und LSG4.2.

Das Absorptions- sowie Fluoreszenzverhalten der Templat-DNA-Proben unterscheidet sich drastisch von dem der Kontroll-DNA-Proben und dem der Negativproben. Während die Proben **ODA4.1** (aus LSG4.1) und **ODA4.2** (aus LSG4.2) zwei Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\max} = 384$  und  $409$  nm) in dem für Ethinylpyren typischen Bereich aufweisen, zeigen die Kontroll-DNA- sowie die Negativproben beider Messreihen keine Aufspaltung und eine deutlich geringere Intensität bei diesen Wellenlängen. Des Weiteren ist die Emissionsintensität der beiden Templat-DNA-Proben im Vergleich zu den restlichen Proben ebenfalls erhöht und das Fluoreszenzmaximum ( $\lambda_{\max} = 470$  nm) ist um ca. 20 nm hypsochrom verschoben. Die in Abb. 69 dargestellten Spektren machen deutlich, dass es jetzt eine klare Unterscheidung zwischen der spezifischen Assemblierung der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore entlang der Templatstränge und der unspezifischen Aggregation in Anwesenheit der Kontrollstränge gibt. Allerdings lässt der entstandene gelbe Niederschlag in allen Proben vermuten, dass sich die Farbstoffe nicht vollständig an die Templat-DNA-Stränge anlagern, sondern auch miteinander ohne Templat, ähnlich wie bei den Kontroll-DNA-Strängen und den Negativproben, aggregieren und ausfallen. Um dieser Annahme nachzugehen, wurden die Proben aus LSG4.1 filtriert, während die Proben aus LSG4.2 unverändert blieben. Anschließend wurden Absorption und Emission der filtrierten (LSG4.1 = **ODA4.1**, **ODT4.1** und Negativprobe4.1) und der nicht filtrierten (LSG4.2 = **ODA4.2**, **ODT4.2** und Negativprobe4.2) Proben erneut gemessen (Abb. 70). Die filtrierten Lösungen waren klar, während in den Filtern ein gelber Rückstand zurückblieb.





**Abb. 70:** Absorptions- und Emissionsspektren der filtrierten Proben (LSG4.1) und der unfiltrierten Proben (LSG4.2).

Wie zu erwarten, zeigt sich bei den Absorptionsspektren der Templat-DNA-Stränge nur ein geringer und bei den Fluoreszenzspektren gar kein Unterschied zwischen filtrierter und unfiltrierter Probe. Anscheinend sind die Py- $\equiv$ -dU-Fluorophore hier (bis auf einen kleinen Teil, der zur Absorption beiträgt) vollständig an die Oligonukleotide angelagert. Dadurch bleiben sie auch wasserlöslich und können nicht über den Filter abgetrennt werden. Im Gegensatz dazu aggregieren die Chromophore in den Kontroll-DNA-Proben und den Negativproben fast ausschließlich miteinander und fallen deshalb als unlöslicher Niederschlag aus. Bestätigt wird diese Behauptung durch das Verschwinden jeglicher Absorption oder Fluoreszenz nach Filtration dieser Proben.

Das gewählte Konzentrationsverhältnis von 17:1 (siehe Tabelle 8) ermöglicht es theoretisch, dass jede Adenin-Anlagerungsstelle in **ODA** durch ein Py- $\equiv$ -dU-Nukleosid besetzt wird. Der in LSG4 beobachtete Niederschlag lässt jedoch erkennen, dass sich nicht alle Chromophore entlang des Templat-DNA-Strangs anlagern. Um die Zahl der spezifisch am Templat assemblierenden Farbstoffe abschätzen zu können, wurden in LSG5 konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt. Die Änderung für V(Py- $\equiv$ -dU) bei den folgenden Messreihen im Vergleich zu LSG4 kommt durch eine niedrigere Konzentration der Stammlösung zustande.

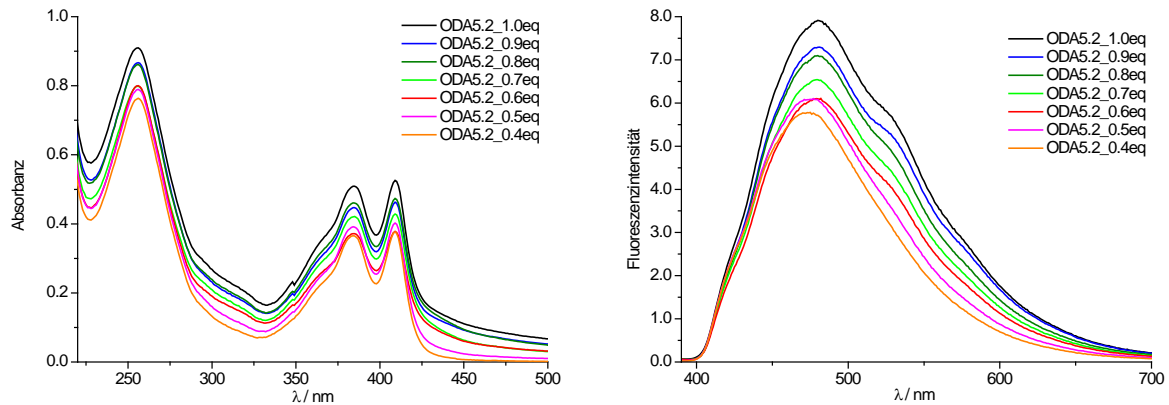
**Tabelle 9:** Probenpräparation, Durchführung und Beobachtungen bei Messreihe LSG5 (= LSG5.1 und LSG5.2). [a] Äquivalente des Farbstoffs bezogen auf die DNA-Bindungsstellen

<i>Präparation</i>	<i>Endkonzentration</i>		<i>Endvolumen</i>	<i>Verhältnis</i>	<i>Ident.</i>
LSG5, Probe	c(DNA) [ $\mu$ M]	c(Py- $\Xi$ -dU) [ $\mu$ M]	V(Py- $\Xi$ -dU) [ $\mu$ L]	c(Py- $\Xi$ -dU):c(DNA)	Proben
ODA	2.5	42.5	41.3	17:1 (1.0) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	38.3	37.1	15:1 (0.9) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	34.0	33.0	14:1 (0.8) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	29.8	28.9	12:1 (0.7) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	25.5	24.8	10:1 (0.6) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	21.3	20.6	9:1 (0.5) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	17.0	16.5	7:1 (0.4) <sup>[a]</sup>	2

<i>Durchführung</i>	<i>LM</i>	<i>Anlagerungsbedingungen für die Farbstoffe</i>	<i>Messbedingungen</i>	<i>Beob.</i>
ODA	Py- $\Xi$ -dU aus Stammlösung in THF	10 min bei 70 °C im Heizblock; Abkühlen auf RT; Anlagerung für mind. 24 h bei 8 °C	Lösung wird in gekühlte Küvetten überführt und vor der Messung 20 min temperiert	ab einem VH von 10:1 entsteht gelber NS

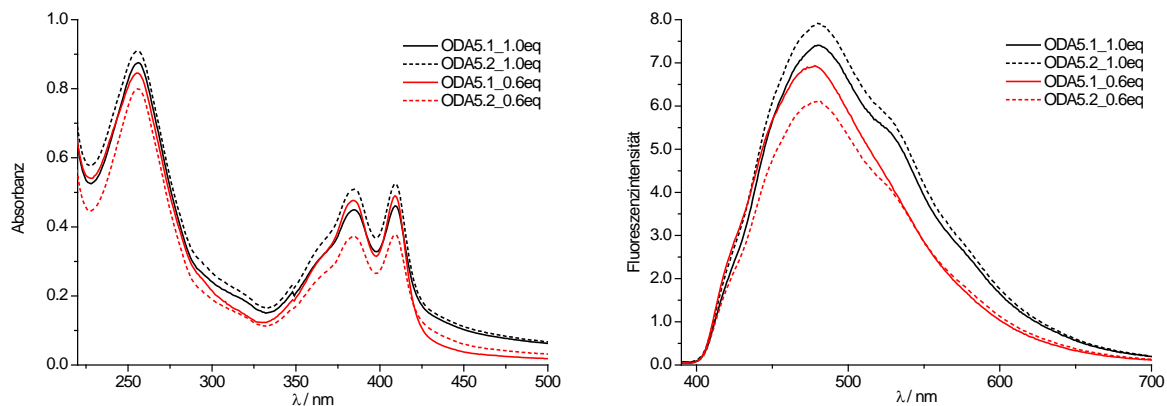
Bei einem Konzentrationsverhältnis von 17:1 in Tabelle 9 wird umgerechnet ein Äquivalent (eq) des Farbstoffs bezogen auf die DNA-Bindungsstellen eingesetzt. Bei einem Konzentrationsverhältnis von 15:1 sind es nur noch 0.9 Äquivalente usw. Von den beiden identisch durchgeführten Messreihen LSG5.1 und LSG5.2 wird letztere in folgender Abbildung gezeigt.



**Abb. 71:** Absorptions- und Emissionsspektren von LSG5.2.

Anhand der in Abb. 71 gezeigten Spektren können zwei wichtige Beobachtungen gemacht werden. Erstens nehmen weder Absorptions-, noch Fluoreszenzintensität linear mit steigender Zahl an Äquivalenten zu. Zweitens ist ab einer Zugabe von 0.6 Äquivalenten des Py- $\equiv$ -dU-Chromophors ein starker Anstieg der Absorption bei ca. 450 nm, sowie eine deutliche Schulter im Fluoreszenzspektrum bei  $\lambda = 530$  nm zu beobachten. In den Probelösungen von LSG5 war ab diesem oder einem höheren Wert an Py- $\equiv$ -dU-Äquivalenten ebenfalls ein gelber Niederschlag vorhanden. Diese Tatsachen bestätigen, dass wie auch schon bei LSG1-LSG3 (Abb. 65, Abb. 66 und Abb. 67) die Schulter im Fluoreszenzspektrum einen Hinweis auf nicht am Templatstrang entlang aggregierende Farbstoffe gibt. Genauso sind die verbreiterten und dadurch (bei ca. 450 nm) erhöhten Signale im Absorptionsspektrum ab einem Wert von 0.6 Äquivalenten ein Zeichen für die unspezifische Aggregation und das dadurch verursachte Ausfallen der Py- $\equiv$ -dU-Fluorophore.

Es sollte noch erwähnt werden, dass die Proben der unter identischen Bedingungen durchgeführten Messreihen LSG5.1 und LSG5.2 sich etwas in der Signalintensität der Spektren unterschieden. In Abb. 72 werden beispielhaft für die gesamte Messreihe die Proben mit 1.0 und mit 0.6 Äquivalenten des Py- $\equiv$ -dU-Chromophors gezeigt.



**Abb. 72:** Absorptions- und Emissionsspektren von LSG5.1 und LSG5.2 mit einem Äquivalent und mit 0.6 Äquivalenten des Py- $\epsilon$ -dU-Chromophors.

Die unterschiedlichen Intensitäten im Absorptions- sowie im Fluoreszenzspektrum der beiden Proben mit einem Äquivalent des Farbstoffs deuten wie bei LSG1-LSG3 auf ein Gleichgewicht zwischen der an DNA angelagerten Assemblierung und der nicht angelagerten Aggregation der Fluorophore in LSG5.1 und LSG5.2 hin. Dieses beeinflusst ebenfalls die Intensität der Messungen. Die in Kapitel 5.2.2 geäußerte Vermutung gilt auch hier: Wahrscheinlich ist das Gleichgewicht bei einer Messtemperatur von 5 °C noch nicht ganz, oder trotz gleicher Durchführung der beiden Messreihen, unterschiedlich eingestellt. Die beiden Proben **ODA5.1\_0.6eq** und **ODA5.2\_0.6eq** befinden sich gerade an der Untergrenze, der für die unspezifische DNA-Aggregation kritischen Farbstoff-Konzentration. Die unterschiedliche Gleichgewichtseinstellung bei diesen beiden Proben, bewirkt eine Schulter im Fluoreszenzspektrum von **ODA5.2\_0.6eq**, welche bei **ODA5.1\_0.6eq** nicht zu sehen ist.

Die Anlagerung der Py- $\epsilon$ -dU-Nukleoside an das neue Templat-Oligonukleotid **ODA** konnte mittels optischer Spektroskopie eindeutig von der Aggregation der Fluorophore im Beisein des Kontroll-Oligonukleotids **ODT** bzw. ohne Oligonukleotid differenziert werden. Um zu untersuchen, in welcher Art und Weise die Chromophore in diesen drei Fällen stapeln, wurden die Messreihen LSG6-LSG10 durchgeführt.

### **Messreihe LSG6 bis LSG10**

Die optischen sowie chiroptischen Eigenschaften der spezifisch bzw. nicht spezifisch an Oligonukleotide angelagerten Py- $\epsilon$ -dU-Aggregate werden in den folgenden Messreihen mit den Eigenschaften kovalent in DNA eingebauter Py- $\epsilon$ -dU-Moleküle

verglichen. Dadurch sollen Rückschlüsse auf die Struktur der nicht kovalenten Py- $\equiv$ -dU-Stapel getroffen werden.<sup>[191]</sup>

In den bereits in Kapitel 3.1 besprochenen kovalenten Ansätzen, lagen die ethinylpyrenmodifizierte Oligonukleotide in Pufferlösung vor. Um sie besser mit dem hier betrachteten, nicht kovalenten System vergleichen zu können, wurden die Chromophore in LSG6 bis LSG10 nicht mehr in THF sondern im protischen MeOH gelöst. Diese Stammlösung wurde dann zu einer Lösung von **ODA**, bzw. **ODT** in H<sub>2</sub>O bzw. zu reinem H<sub>2</sub>O (Negativproben) gegeben. Des Weiteren wurde fast jede der folgenden Messreihen mindestens zweimal unter identischen Bedingungen durchgeführt. Soweit die grundlegenden Tendenzen sowie die gemachten Beobachtungen und die daraus abgeleiteten Informationen auf beide Durchführungen zuträfen, wird nur eine Messreihe gezeigt. Die Bedingungen für LSG6 sind in folgender Tabelle aufgeführt.

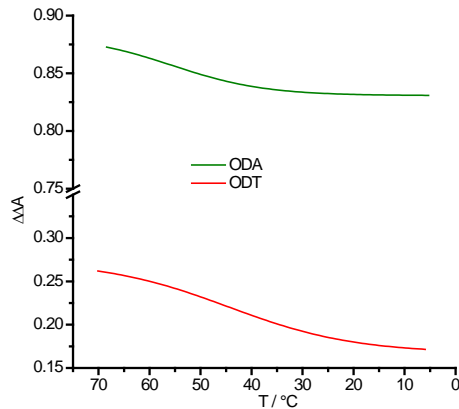
**Tabelle 10:** Probenpräparation, Durchführung und Beobachtungen bei Messreihe LSG6

<i>Präparation</i>	<i>Endkonzentration</i>		<i>Endvolumen</i>	<i>Verhältnis</i>	<i>Ident.</i>
LSG6, Probe	c(DNA) [ $\mu$ M]	c(Py- $\equiv$ -dU) [ $\mu$ M]	V(Py- $\equiv$ -dU) [ $\mu$ L]	c(Py- $\equiv$ -dU):c(DNA)	Proben
<b>ODA</b>	2.5	42.5	40.4	17:1	2
<b>ODT</b>	2.5	42.5	40.4	17:1	2
<b>Negativprobe</b>	-	42.5	40.4		2

<i>Durchführung</i>	<i>LM</i>	<i>Anlagerungsbedingungen für die Farbstoffe</i>	<i>Messbedingungen</i>	<i>Beob.</i>
<b>ODA</b>	Py- $\equiv$ -dU aus Stammlösung in MeOH	10 min bei 70 °C im Spektrometer; Anlagerung durch Abkühlen auf 5 °C mit 0.5 °C/min	Lösung befindet sich bereits in gekühlten Küvetten (5 °C)	siehe Abb. 74 rechts und Abb. 75 rechts
<b>ODT</b>				
<b>Negativprobe</b>				

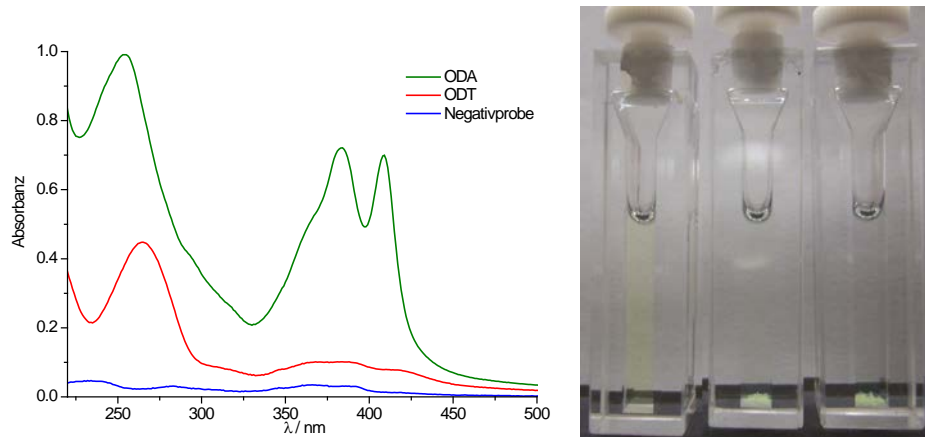
Die Proben wurden nicht mehr im Heizblock, sondern direkt im Spektrometer auf 70 °C erhitzt und anschließend mit 0.5 °C/min auf 5 °C abgekühlt. Währenddessen wurde die Absorption bei einer, für Ethinylpyren typischen Wellenlänge von  $\lambda = 384$  nm verfolgt.



**Abb. 73:** Absorptionsänderungen von Py-≡-dU bei 384 nm in Gegenwart von **ODA** und **ODT**.

Der sigmoidale Kurvenverlauf deutet auf ein DNA-ähnliches, kooperatives Verhalten der Farbstoffe sowohl in Anwesenheit von **ODA** als auch **ODT** hin. Ähnlich wie bei der Dehybridisierung doppelsträngiger DNA, können die Wendepunkte in den Kurven als "Schmelztemperaturen" der Py-≡-dU-Aggregate bei 44 °C (mit **ODT**) bzw. bei 56 °C (mit **ODA**) interpretiert werden. Die Absorptionsintensität der Chromophore ändert sich in Gegenwart von **ODT** stärker als bei **ODA**. Eine mögliche Erklärung ist die unterschiedliche Stapelung der Ethinylpyrene in diesen beiden Fällen. Während sie in den Kontroll-DNA-Proben und den Negativproben mit sinkender Temperatur langsam ausfallen, assemblieren sie in den Templat-DNA-Proben entlang von **ODA** und werden, bedingt durch die Struktur des Oligonukleotids wahrscheinlich helikal zueinander verdreht. Durch diese Verdrehung sind sie weniger effektiv gestapelt als in den ausgefallenen Aggregaten und zeigen deshalb einen geringeren Unterschied der Absorptionsintensität.

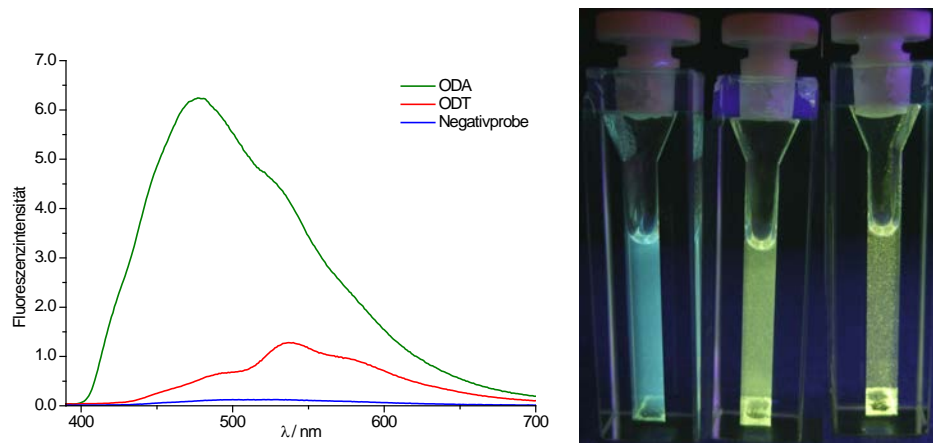
Die Absorptionsspektren in LSG6 (Abb. 74 links) ähneln stark denen aus LSG4 (Abb. 69 links). Im Beisein des Templat-Oligonukleotids absorbieren die Farbstoffe bei den beiden für Ethinylpyren charakteristischen Wellenlängen von  $\lambda = 384$  nm und 408 nm. Ein vergleichbares Spektrum war nach dem kovalenten Einbau von zwei bis fünf aufeinander folgenden Py-≡-dU-Nukleosiden in DNA-Doppelstränge zu beobachten ( $\lambda = 380$  nm und 405 nm).<sup>[113-114]</sup> Diese Tatsache unterstützt die bereits für LSG4 getroffene Annahme einer spezifischen Anlagerung der Chromophore entlang des **ODA**-Strangs. Wie bereits vermutet, verläuft diese Anlagerung in einer helikalen Art und Weise, ähnlich wie bei den kovalent mit Py-≡-dU modifizierten Duplexen. Die dadurch gebildeten, wasserlöslichen Aggregate bewirken eine gelbliche Färbung der Probenlösung (Abb. 74 rechts).



**Abb. 74** links: Absorptionsspektren von LSG6 und rechts: Fotos der zugehörigen Proben, mit Py- $\equiv$ -dU-Aggregaten in Anwesenheit von **ODA** (linke Küvette), von **ODT** (mittlere Küvette) und ohne Oligonukleotid (rechte Küvette).

Im Gegensatz dazu zeigen die Bilder der Kontroll-DNA-Probe und der Negativprobe eine farblose Lösung und, verglichen mit der Templat-DNA-Probe, eine große Menge an Niederschlag am Küvettenboden. Dieser Niederschlag wiederum deutet in Anwesenheit von **ODT** auf eine unspezifisch angelagerte und in Abwesenheit eines Oligonukleotids auf eine nicht angelagerte Stapelung der Farbstoffe hin. Beides führt zum Ausfallen der Aggregate. Die zugehörigen Absorptionsspektren zeigen, dass sich diese Aggregate in den beiden Proben stark ähneln. Beides Mal ist im Absorptionsbereich der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore eine sehr schwache und stark verbreiterte Bande (Abb. 74 links) zu sehen. Der Intensitätsunterschied kommt vermutlich durch eine geringe Wasserlöslichkeit der unspezifisch an **ODT** angelagerten Fluorophore zustande.

Das in Abb. 75 links dargestellte Emissionsspektrum der entlang von **ODA** gestapelten Farbstoffe ähnelt in seiner Intensität dem der Templat-DNA-Proben in LSG4.1 und LSG4.2 (Abb. 69 rechts). Allerdings ist das Fluoreszenzmaximum hier (in LSG6) im Vergleich um 8 nm bathochrom verschoben und besitzt einen Wert von  $\lambda_{\max} = 478$  nm. Dieser ähnelt dem Emissionsmaximum von zwei- oder mehrfach kovalent mit Py- $\equiv$ -dU modifizierten Oligonukleotiden ( $\lambda_{\max} = 485 - 494$  nm).<sup>[113-114]</sup> Verglichen mit dem Einbaueinbau von Ethinylpyren in Oligonukleotide (Fluoreszenzmaximum bei  $\lambda = 445$  nm)<sup>[111-112]</sup> ist sowohl die Emission der mit **ODA** gebildeten Aggregate als auch die kovalent an DNA gebundener Farbstoffstapel um ca. 40 nm rotverschoben.



**Abb. 75:** links: Emissionsspektren von LSG6 und rechts: Fotos der zugehörigen Fluoreszenzen, mit Py- $\equiv$ -dU-Aggregaten in Anwesenheit von **ODA** (linke Küvette), von **ODT** (mittlere Küvette) und ohne Oligonukleotid (rechte Küvette).

Die Fluoreszenz in der Kontroll-DNA-Probe wird hauptsächlich durch die Aggregation der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore gelöscht. Letztere bewirkt außerdem eine deutlich rotverschobene, excimerartige Emission bei  $\lambda = 538$  nm. In Abwesenheit eines Oligonukleotids (Negativprobe) wird die Fluoreszenz der Py- $\equiv$ -dU-Aggregate komplett gelöscht. Die im Vergleich zur Templat-DNA-Probe verschiedenen Emissionseigenschaften können auch hier wieder auf die Stapelung der Fluorophore zurückgeführt werden. Zeitaufgelöste spektroskopische Messungen von zweifach ethinylpyrenmarkierten DNA-Strängen machten deutlich, dass die kovalenten Py- $\equiv$ -dU-Stapel keine für das Chromophor typische Excimere ausbildeten. Grund hierfür ist die helikale Verdrehung zwischen den koplanar zueinander orientierten Chromophoren.<sup>[113]</sup> Da die entlang von **ODA** angeordneten Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside ebenfalls vorwiegend keine excimerartige Fluoreszenz besitzen, kann ihre Ausrichtung ähnlich interpretiert werden. Eine kleine Schulter bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 538$  nm signalisiert jedoch, dass auch in Gegenwart von **ODA** Excimere ausgebildet werden. Offensichtlich stapeln nicht alle Farbstoffe entlang des komplementären DNA-Strangs, sondern formen zu einem kleinen Teil ein nicht angelagertes Aggregat. Diese Beobachtung erklärt auch die relativ geringe Menge an Niederschlag in der Küvette der Templat DNA-Probe (vgl. Abb. 74 rechts). Zuletzt wurden noch Bilder der Fluoreszenz der drei Proben aufgenommen (Abb. 75 rechts). Nach Anregung mit Hilfe einer UV-Lampe ließen die spezifisch an **ODA** angelagerten Py- $\equiv$ -dU-Moleküle eine Blaufärbung erkennen, während die Farbstoffaggregate in Gegenwart von **ODT** und ohne ein Oligonukleotid durch die grüne Farbe der gebildeten Excimere gekennzeichnet waren.



Im Anschluss an die Absorptions- und Emissionsmessungen aus LSG6 wurde die Struktur der in den verschiedenen Proben vorliegenden Py- $\Xi$ -dU-Aggregate mit Hilfe von zwei weiteren Messreihen LSG7 und LSG8 intensiver untersucht.

Die Bedingungen für LSG7 sind in folgender Tabelle aufgeführt.

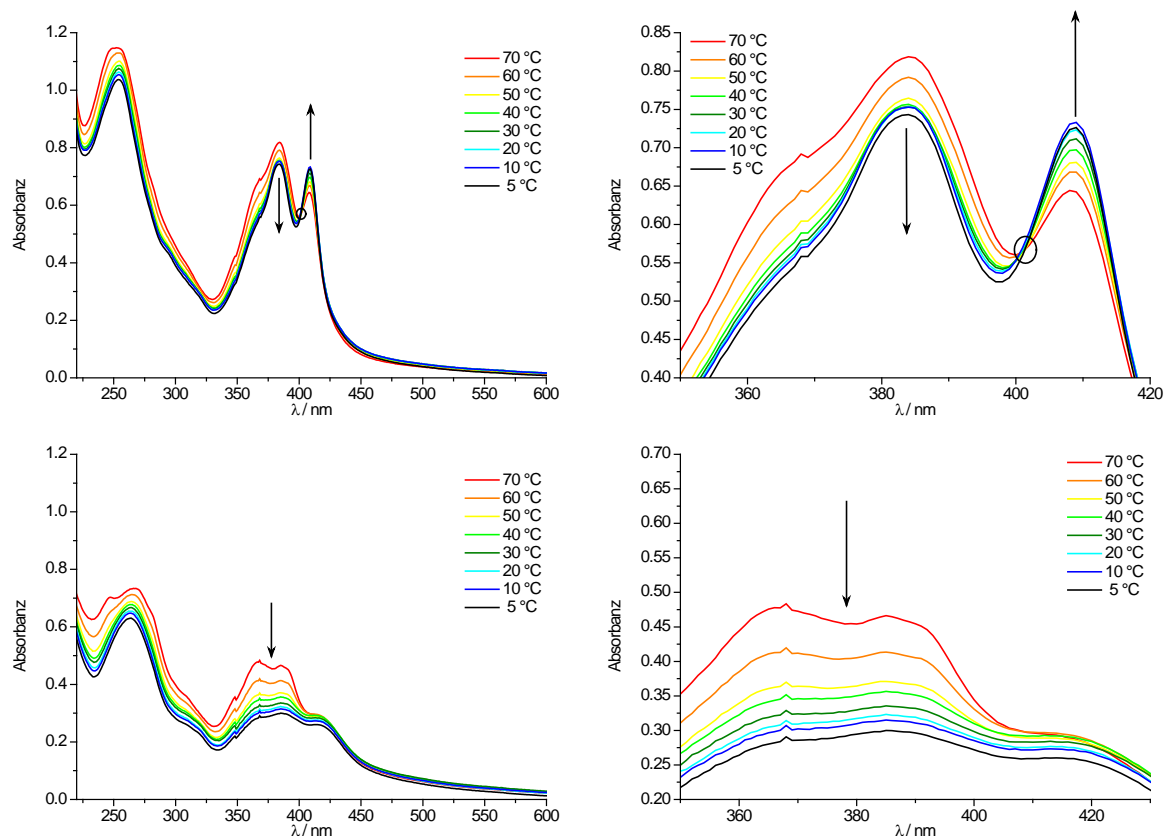
**Tabelle 11:** Probenpräparation und Durchführung bei Messreihe LSG7

<i>Präparation</i>	Endkonzentration		Endvolumen	Verhältnis	Ident.
LSG7, Probe	c(DNA) [ $\mu$ M]	c(Py- $\Xi$ -dU) [ $\mu$ M]	V(Py- $\Xi$ -dU) [ $\mu$ L]	c(Py- $\Xi$ -dU):c(DNA)	Proben
<b>ODA</b>	2.5	42.5	40.4	17:1	2
<b>ODT</b>	2.5	42.5	40.4	17:1	2
<b>Negativprobe</b>	-	42.5	40.4		2

<i>Durchführung</i>	LM	Anlagerungsbedingungen für die Farbstoffe	Messbedingungen
<b>ODA</b>	Py- $\Xi$ -dU aus Stammlösung in MeOH	10 min bei 70 °C im	Absorption wird bei jedem
<b>ODT</b>		Spektrometer; Anlagerung	Temperaturschritt gemessen; vor
<b>Negativprobe</b>		durch Abkühlen auf 5 °C in Schritten von je 10 °C	jeder Messung wird 20 min gewartet

Die Proben wurden im Spektrometer für 10 min auf 70 °C temperiert und anschließend in Schritten von jeweils 10 °C auf 5 °C abgekühlt, wobei die Absorption bei jedem Temperaturschritt gemessen wurde. Vor jeder Messung wurde 20 min gewartet, damit die Farbstoffe sich anlagern bzw. aggregieren konnten. Die temperaturabhängigen Absorptionsspektren von Py- $\Xi$ -dU in Anwesenheit von **ODA** und in Gegenwart von **ODT** sind in folgender Abbildung gezeigt.



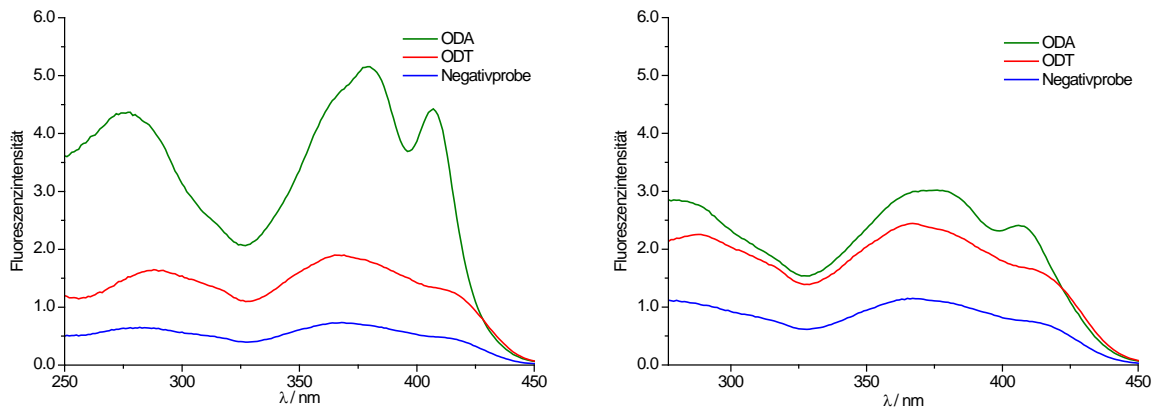
**Abb. 76:** Temperaturabhängige Absorption von Py-≡-dU in Anwesenheit von **ODA** (oben) bzw. **ODT** (unten). Links: gesamtes Spektrum; rechts: Wellenlängenbereich von Ethinylpyren.

Die beiden oberen Spektren zeigen deutlich, dass sich die Chromophore während des Abkühlvorgangs geordnet an den Templat-DNA-Strang anlagern, da mit sinkender Temperatur die Absorptionsbande bei  $\lambda = 384$  nm ebenfalls sinkt, während die Bande bei  $\lambda = 408$  nm ansteigt. Dieses Verhalten führt zu einem isosbestischen Punkt bei  $\lambda = 400$  nm. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass die Oligonukleotide (ODA) während des Abkühlvorgangs durch die einheitliche Assemblierung der Farbstoffe nur in zwei Zuständen vorliegen, entweder mit der maximalen Anzahl an Py-≡-dU-Molekülen besetzt, oder vollständig unbesetzt. Bei einer Temperatur von 5 °C besitzen die beiden Banden ein Intensitätsverhältnis von ungefähr 1:1.

Im Gegensatz dazu fällt in Anwesenheit von **ODT** (Abb. 76 unten) die Absorptionsintensität konstant mit der Temperatur. Diese Beobachtung sowie das Fehlen eines isosbestischen Punktes bestätigen die Vermutung, dass Py-≡-dU in Gegenwart des Kontroll-DNA-Strangs während des Abkühlens durch uneinheitliche Aggregation ausfällt, ohne sich spezifisch an **ODT** anzulagern. Die temperaturabhängigen Absorptionsspektren der Negativprobe besitzen zwar

insgesamt eine geringere Intensität, ähneln aber ansonsten stark den unteren Spektren in Abb. 76 und werden hier deshalb nicht abgebildet.

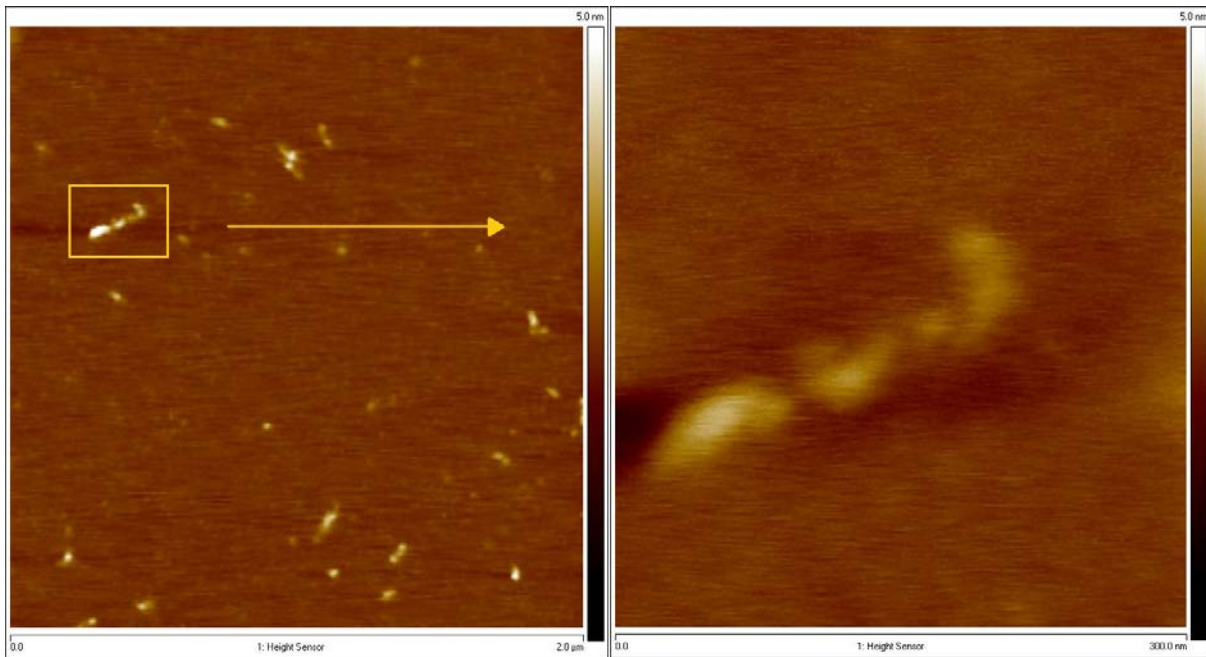
Im Anschluss an die temperaturabhängigen Messungen wurden Anregungsspektren der drei Proben aus LSG7 bei 5 °C gemessen.



**Abb. 77:** Anregungsspektren von LSG7 mit  $\lambda_{em} = 478$  nm (links) und  $\lambda_{em} = 538$  nm (rechts).

Die dargestellten Spektren der Py- $\equiv$ -dU-Chromophore in Anwesenheit von **ODA** (grün), **ODT** (rot) bzw. ohne Oligonukleotid (blau) zeigen bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 478$  nm (Abb. 77 links) einen deutlichen Unterschied in der Fluoreszenzintensität, welcher bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 538$  nm (Abb. 77 rechts) nicht vorhanden ist. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Py- $\equiv$ -dU-Aggregate in der Kontroll-DNA-Probe und der Negativprobe hauptsächlich excimerartige Fluoreszenz bei  $\lambda = 538$  nm besitzen, während sie in der Templat-DNA-Probe vorwiegend bei einer maximalen Wellenlänge von  $\lambda = 478$  nm emittieren.

Zum Schluss wurden die Templat-DNA-Probe und die Kontroll-DNA-Probe aus LSG7 mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Dazu wurde in den beiden Proben die überstehende Lösung vom gelben Niederschlag getrennt und auf eine Mica-Oberfläche aufgebracht.



**Abb. 78:** Übersichtsbild (links) und vergrößerter Bereich (rechts) des AFM Höhenprofils von Py- $\epsilon$ -dU in Gegenwart von **ODA** auf einer Mica-Oberfläche;  $c(\text{ODA}) = 2.25 \mu\text{M}$ ,  $c(\text{MgCl}) = 10\text{mM}$ .

In Abb. 78 ist das AFM-Höhenprofil von Py- $\epsilon$ -dU in Gegenwart von **ODA** zu sehen. Der vergrößerte Bereich (rechts) zeigt auf der Oberfläche mehrere Partikel von max. 74 nm Länge und einer Höhe bis zu 5 nm. Da die verwendeten Oligoadeninstränge nicht selbstkomplementär sind und lediglich eine Länge von 17 Basen besitzen, können so große Strukturen weder von einem einzelnen Strang, noch durch Selbstaggregation mehrerer Stränge ausgebildet werden. Deshalb deuten die gefundenen Erhebungen auf ein Aggregat aus **ODA**-Strang und Py- $\epsilon$ -dU-Chromophoren hin, welches sich über hydrophobe Wechselwirkungen mit weiteren DNA-Farbstoff-Aggregaten zusammen lagert. Dieses Verhalten wurde bereits von *Schenning et al* beschrieben (Kapitel 5.1)<sup>[185]</sup> und führt zu den beobachteten, relativ großen Endstrukturen. In der überstehenden Lösung der Kontroll-DNA-Probe konnten mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie keine Aggregate gefunden werden. Wie bereits vermutet, findet in Gegenwart von **ODT** eine unspezifisch angelagerte Stapelung der Py- $\epsilon$ -dU-Moleküle statt. Dadurch fallen die Komplexe aus DNA und Farbstoffen aus und können in der Lösung nicht mehr detektiert werden. Die Aggregate aus **ODA** und Py- $\epsilon$ -dU sind offensichtlich, wie vermutet, wasserlöslich.

Mit Hilfe der Messreihe LSG6 bis LSG10 sollen, wie bereits beschrieben, Rückschlüsse auf die Struktur der spezifisch oder nicht spezifisch an Oligonukleotide angelagerten Py- $\epsilon$ -dU-Stapel getroffen werden. Ein weiterer Schritt hierbei besteht darin, abzuschätzen, wie viele Py- $\epsilon$ -dU-Moleküle an **ODA** binden und ob sie dabei

einer bestimmten Verteilung folgen. Die durch Excimeremission verursachte Schulter im Fluoreszenzspektrum bei  $\lambda = 538$  nm (Abb. 75 links) gab bereits einen Hinweis darauf, dass sich nicht alle Chromophore spezifisch an das Templat-Oligonukleotid anlagern. Um die ungefähre Zahl zu bestimmen, wurden in LSG8 konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt.

**Tabelle 12:** Probenpräparation, Durchführung und Beobachtungen bei Messreihe LSG8.

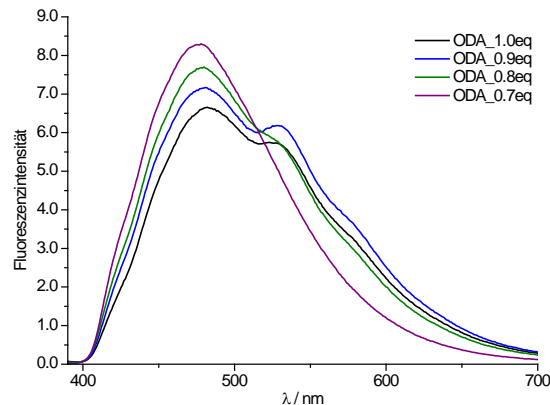
[a] Äquivalente des Farbstoffs bezogen auf die DNA-Bindungsstellen

<i>Präparation</i>	<i>Endkonzentration</i>		<i>Endvolumen</i>	<i>Verhältnis</i>	<i>Ident.</i>
LSG8, Probe	c(DNA) [ $\mu$ M]	c(Py- $\Xi$ -dU) [ $\mu$ M]	V(Py- $\Xi$ -dU) [ $\mu$ L]	c(Py- $\Xi$ -dU):c(DNA)	Proben
ODA	2.5	42.5	40.3	17:1 (1.0) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	38.3	36.3	15:1 (0.9) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	34.0	32.3	14:1 (0.8) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	29.8	28.3	12:1 (0.7) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	25.5	24.2	10:1 (0.6) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	21.3	20.2	9:1 (0.5) <sup>[a]</sup>	2
ODA	2.5	17.0	16.2	7:1 (0.4) <sup>[a]</sup>	2

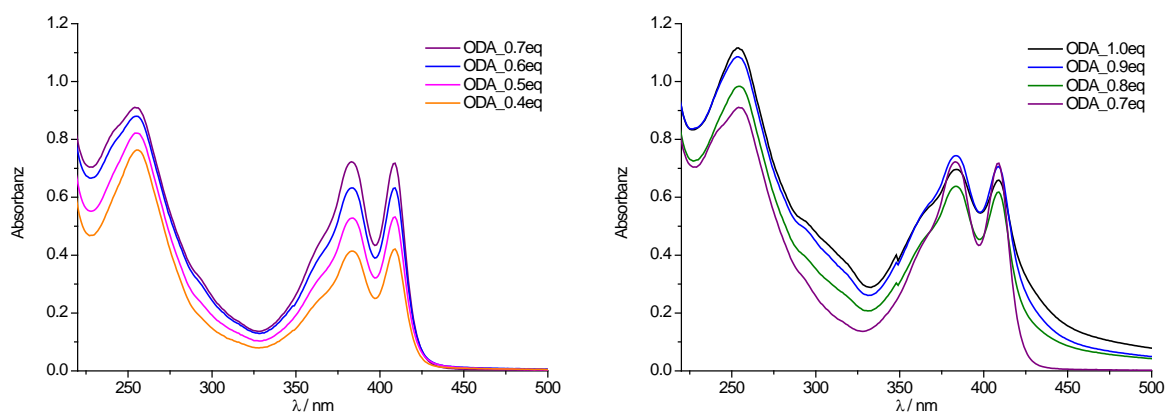
<i>Durchführung</i>	<i>LM</i>	<i>Anlagerungsbedingungen für die Farbstoffe</i>	<i>Messbedingungen</i>	<i>Beob.</i>
ODA	Py- $\Xi$ -dU aus Stammlösung in MeOH	10 min bei 70 °C im Heizblock; Abkühlen auf RT; Anlagerung für mind. 24 h bei 8 °C	Lösung wird in gekühlte Küvetten überführt und vor der Messung 20 min temperiert	ab einem VH von 14:1 entsteht gelber NS

Die Probenpräparation und die Durchführung waren identisch mit der in LSG5 (bis auf die Konzentration und das Lösungsmittel der Py- $\Xi$ -dU-Stammlösung). Die Emissionsspektren zu Tabelle 12 bei 0.7 bis 1.0 Äquivalenten des Farbstoffs sind in nachstehender Abbildung gezeigt.



**Abb. 79:** Emissionsspektren von Py- $\epsilon$ -dU in Anwesenheit von **ODA** bei 0.7 bis 1.0 Äquivalenten des Farbstoffs bezogen auf die DNA-Bindungsstellen.

Bis zu einem Wert von 0.7 Äquivalenten (die Spektren bei 0.4 - 0.6 Äquivalenten werden nicht gezeigt) ist im Fluoreszenzspektrum der Py- $\epsilon$ -dU-Aggregate in Anwesenheit von **ODA** keine signifikante Schulter bei 538 nm und kein gelber Niederschlag in den Proben (vgl. Tabelle 12) zu erkennen. Beide Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass sich ungefähr zwölf Py- $\epsilon$ -dU-Nukleoside entlang von **ODA** anlagern. Verglichen mit LSG5, in der sich maximal neun Moleküle anlagerten (vgl. Tabelle 9) ist das eine deutliche Steigerung. Anscheinend hat das Lösungsmittel der Py- $\epsilon$ -dU-Stammlösung Einfluss auf die Zahl der an **ODA** gebundenen Moleküle. Die Frage, ob bei der Anlagerung eine statistische oder clusterartige Verteilung bevorzugt wird, konnte mit Hilfe der folgenden konzentrationsabhängigen Absorptionsspektren beantwortet werden.

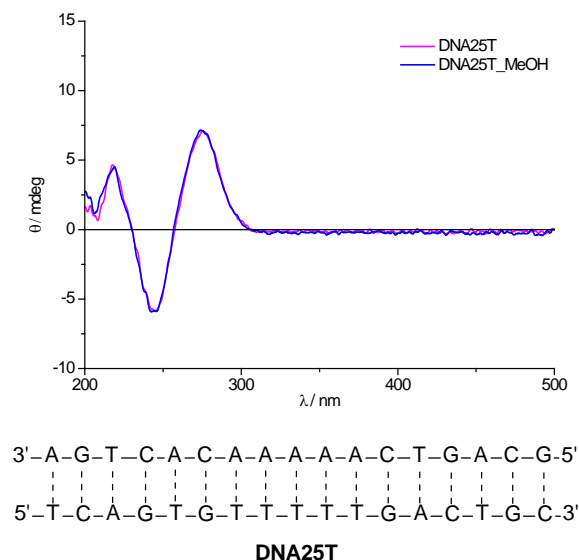


**Abb. 80:** Absorptionsspektren von Py- $\epsilon$ -dU in Anwesenheit von **ODA** bei 0.4 bis 0.7 Äquivalenten (links) und 0.7 bis 1.0 Äquivalenten (rechts) des Farbstoffs bezogen auf die DNA-Bindungsstellen.

Bei einem Wert von 0.4 bis 0.7 Äquivalenten (Abb. 80 links) des Farbstoffs ist für die Absorptionsbanden bei  $\lambda = 384$  nm und 408 nm ein Intensitätsverhältnis von annähernd 1:1 zu beobachten. In den temperaturabhängigen Absorptionsspektren

(Abb. 76 oben links) mit 1.0 Äquivalenten Py- $\equiv$ -dU ist bei einer Temperatur von 5 °C, also nachdem sich die Farbstoffe angelagert haben und überflüssige Chromophore ausgefallen sind, ein ähnliches Intensitätsverhältnis zu sehen. Deshalb wird davon ausgegangen, dass sich die Farbstoffe von Anfang an (zumindest ab 0.4 Äquivalenten) in einer helikalen Art und Weise anordnen und sich dieser Aufbau nicht aus einer rein statistischen Verteilung ergibt. Ab 0.7 Äquivalenten ändert sich das Verhältnis der Absorptionsintensitäten, was vermutlich auf die Bildung nicht angelagerter Py- $\equiv$ -dU-Aggregate zurückzuführen ist.

In den letzten beiden Messreihen wurden CD-Spektren bei einer Temperatur von 5 °C aufgenommen. Dabei diente die erste, LSG9, nur dazu, eine eventuelle Beeinflussung der Struktur der DNA-Hybride durch das in der Py- $\equiv$ -dU-Stammlösung vorhandene Methanol auszuschließen. Hierfür wurden zwei Lösungen des DNA-Doppelstrangs **DNA25T** (Sequenz siehe Abb. 81 unten) in H<sub>2</sub>O hergestellt, wobei eine der beiden 41  $\mu$ L Methanol enthielt. In den fertigen Proben ( $V = 1000 \mu$ L) betrug die Konzentration von **DNA25T** 2.5  $\mu$ M. Zur Hybridisierung des Duplexes wurden die Lösungen für 10 min auf 90 °C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die zugehörigen CD-Spektren sind in nachfolgender Abbildung dargestellt.



**Abb. 81:** CD-Spektren von **DNA25T** mit und ohne MeOH (oben) und zugehörige DNA-Sequenzen (unten).

Wie aus den annähernd identischen Spektren in obiger Abbildung ersichtlich ist, beeinflusst ein Verhältnis von H<sub>2</sub>O/MeOH von ca. 23:1 die Struktur des DNA-Duplexes nicht. Weshalb davon ausgegangen wird, dass das in den Proben von

LSG6 bis LSG10 vorhandene MeOH ( $H_2O/MeOH \approx 24:1$ ) ebenfalls keine Auswirkungen auf die Hybride aus DNA und Py- $\Xi$ -dU-Nukleosiden hat.

In der letzten Messreihe sollte die Chiralität der gebildeten Farbstoff-Aggregate bestimmt werden. Die Bedingungen für LSG10 sind in folgender Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 13:** Probenpräparation und Durchführung bei Messreihe LSG10

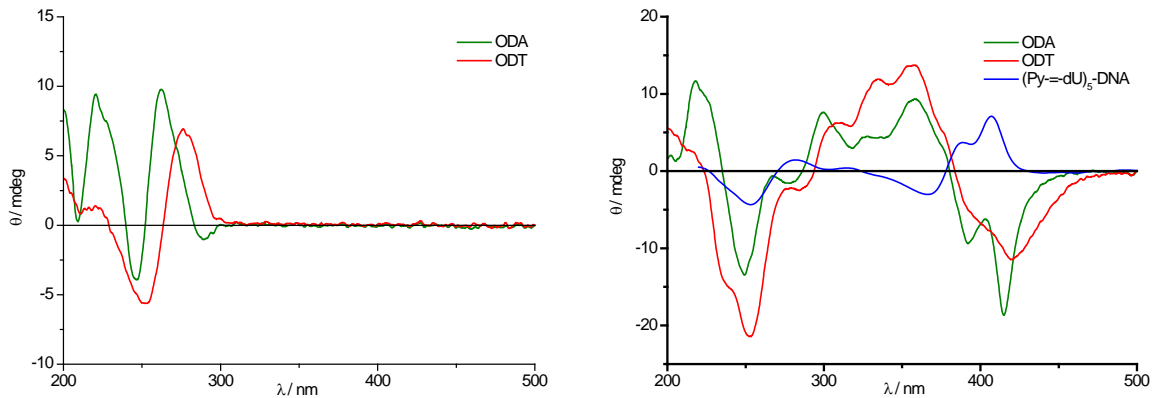
<i>Präparation</i>	<i>Endkonzentration</i>		<i>Endvolumen</i>	<i>Verhältnis</i>	<i>Ident.</i>
<b>LSG10, Probe</b>	<b>c(DNA) [<math>\mu</math>M]</b>	<b>c(Py-<math>\Xi</math>-dU) [<math>\mu</math>M]</b>	<b>V(Py-<math>\Xi</math>-dU) [<math>\mu</math>L]</b>	<b>c(Py-<math>\Xi</math>-dU):c(DNA)</b>	<b>Proben</b>
<b>ODA</b>	2.5	42.5	40.4	17:1	1
<b>ODT</b>	2.5	42.5	40.4	17:1	1
<b>ODA</b>	2.5	-	-	-	1
<b>ODT</b>	2.5	-	-	-	1

<i>Durchführung</i>	<i>LM</i>	<i>Anlagerungsbedingungen für die Farbstoffe</i>	<i>Messbedingungen</i>
<b>ODA bzw. ODT mit Py-<math>\Xi</math>-dU</b>	Py- $\Xi$ -dU aus Stammlösung in MeOH	10 min bei 70 °C im Spektrometer; Anlagerung durch Abkühlen auf 5 °C mit 0.5 °C/min	Lösung wird in gekühlte Küvetten überführt und vor der Messung 10 min temperiert
<b>ODA bzw. ODT ohne Py-<math>\Xi</math>-dU</b>	-	-	Lösung wird in gekühlte Küvetten überführt und vor der Messung 10 min temperiert

Die CD-Spektren der beiden DNA-Stränge **ODA** und **ODT** ohne Py- $\Xi$ -dU (Abb. 82 links) unterscheiden sich deutlich von denen in Anwesenheit des Farbstoffs (Abb. 82 rechts).





**Abb. 82:** CD-Spektren von **ODA** und **ODT** ohne Py-≡-dU (links) und von **ODA** und **ODT** in Anwesenheit von Py-≡-dU (rechts). Zum Vergleich wurde in blau das CD-Spektrum eines DNA-Doppelstrangs mit fünf kovalent nebeneinander eingebauten Py-≡-dU-Fluorophoren eingefügt;  $c((\text{Py}-\equiv\text{dU})_5\text{-DNA}) = 2.5 \mu\text{M}$  in Pufferlösung (10 mM  $\text{NaP}_i$ , 250 mM NaCl, pH 7).<sup>[114]</sup>

Die Py-≡-dU-Aggregate, die in Gegenwart von **ODA** bzw. **ODT** gebildet werden, besitzen ein CD-Signal im Bereich von Ethinylpyren ( $\lambda = 380 - 450 \text{ nm}$ ). Dieses ist bei den entlang von **ODA** stapelnden Fluorophoren stärker ausgeprägt und besitzt eine bessere Feinstruktur. Beide Eigenschaften sind auf die helikal verdrehte Anordnung der Chromophore entlang des Templat-Oligonukleotids zurückzuführen. Des Weiteren trägt der nukleosidische Anteil der Py-≡-dU-Moleküle in den Spektren mit **ODA** und **ODT** erheblich zur Intensität im Bereich der DNA-Signale ( $\lambda = 230 - 300 \text{ nm}$ ) bei, wie man am Unterschied zu den Spektren der reinen Oligonukleotide erkennen kann. Vergleicht man jetzt das Spektrum eines kovalent in DNA eingebauten (Py-≡-dU)<sub>5</sub>-Stapels (blaue Linie Abb. 82 rechts)<sup>[114]</sup> mit dem der monomeren, entlang von **ODA** assemblierenden Farbstoffe (grüne Linie) im Bereich von Ethinylpyren, lässt sich eine umgekehrte Chiralität beobachten. Angenommen, der kovalente Farbstoffstapel passt sich der rechtsgängigen Helix des DNA-Doppelstrangs an,<sup>[114]</sup> ergibt sich für das Aggregat aus einzelnen Py-≡-dU-Molekülen eine offensichtlich linksgängige Chiralität. Die entgegengesetzten Signale für kovalente und monomere Py-≡-dU-Aggregate im nukleosidischen Bereich von ca. 280 nm bestätigen diese Interpretation. Im Beisein des unspezifischen **ODT**-Strangs zeigen die Fluorophore eine ähnliche Chiralität wie bei **ODA**. Anscheinend besitzen die monomeren Py-≡-dU-Einheiten die intrinsische Eigenschaft, sich zu einer linksgängigen Helix zusammen zu lagern und selbst der als Templat dienende **ODA**-Strang kann dieses Verhalten nicht beeinflussen. Erst durch den kovalenten Einbau in einen DNA-Doppelstrang wird das Aggregat aus Py-≡-dU-Chromophoren dazu gezwungen, eine rechtsgängige Chiralität anzunehmen. Ähnliche Beobachtungen

wurden bereits von Reji Varghese anhand von nicht an Template angelagerten und kovalent eingebauten Nr- $\pi$ -dU-Stapeln gemacht.<sup>[117]</sup>

### 5.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wurde ein System aus Py- $\pi$ -dU-Monomeren **8** und einem, für diese als Templat dienenden Oligonukleotid untersucht. Mit Hilfe der Messreihen FS1-FS3 und LSG1-LSG3 konnten Parameter des Systems wie Temperatur, Lösungsmittel und das Verhältnis von Chromophorkonzentration zu DNA-Konzentration eingestellt werden. Obwohl LSG4 und LSG5 zeigten, dass nicht alle Chromophore spezifisch an das Templat-Oligonukleotid binden, wurde weiterhin ein Verhältnis der Konzentrationen von 1:1 gewählt. Dieses diente dazu, das beobachtete Gleichgewicht zwischen den entlang des Templats stapelnden und den ohne Templat aggregierenden Farbstoffe zu verschieben, damit möglichst viele Chromophore sich am Templat anlagern. Das in LSG4 und LSG5 eingeführte Oligodesoxyadenosin-Templat (**ODA**) machte außerdem eine Unterscheidung zwischen der Anlagerung der Py- $\pi$ -dU-Nukleoside an **ODA** und der Aggregation der Fluorophore im Beisein des unspezifischen Kontroll-Oligonukleotids (**ODT**) mittels optischer Spektroskopie möglich.

In den Messreihen LSG6-LSG10 konnten durch den Vergleich mit kovalent eingebauten Py- $\pi$ -dU-Stapeln Rückschlüsse auf die Struktur der in Anwesenheit von **ODA** bzw. **ODT** oder ohne Oligonukleotid gebildeten Chromophor-Aggregate getroffen werden. In Gegenwart von **ODA** zeigen die stapelnden Fluorophore ähnliche optische Eigenschaften, wie nach dem Einbau in DNA-Doppelstränge. Deshalb wird vermutet, dass die Anlagerung der Py- $\pi$ -dU-Nukleoside entlang des Templat-Oligonukleotids in einer geordneten Art und Weise und unter Ausbildung einer helikalen Struktur verläuft. Innerhalb dieser liegen die Chromophore wahrscheinlich von Anfang an (zumindest ab 0.4 Äquivalenten des Farbstoffs) in einer coplanaren Orientierung, sowie helikal zueinander verdreht vor. Im Gegensatz dazu deuten die optischen Eigenschaften im Beisein von **ODT** auf eine unspezifisch angelagerte und in Abwesenheit eines Oligonukleotids auf eine nicht angelagerte Stapelung der Farbstoffe hin. Im Falle von **ODT** sind die gebildeten Aggregate kaum, im Falle der Negativprobe gar nicht wasserlöslich. Beide zeigen eine stark erniedrigte Absorptionsintensität, sowie eine excimerartige Fluoreszenz.

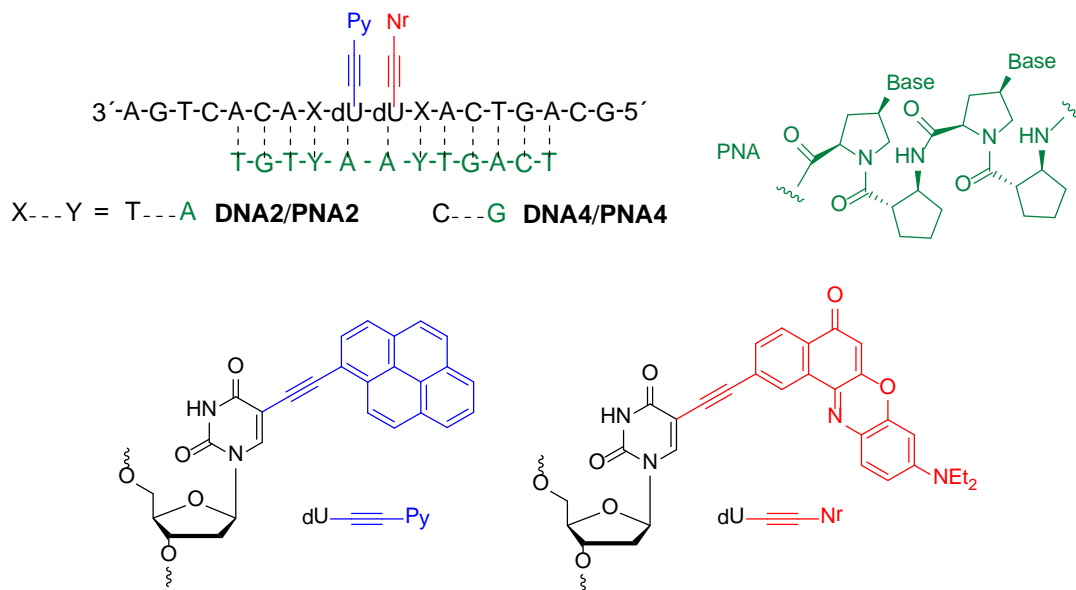
Ein klarer Unterschied zwischen den, entlang von **ODA** gebildeten und den kovalenten Farbstoff-Aggregaten besteht jedoch in der Chiralität ihrer Struktur. Alle nicht kovalenten Aggregate, sowohl in Gegenwart von **ODA** als auch in Gegenwart von **ODT**, besitzen die intrinsische Eigenschaft in einer linksgängigen Helix zu stapeln. Nach dem Einbau in einen DNA-Doppelstrang werden die Py- $\equiv$ -dU-Moleküle jedoch durch die Orientierung des Duplexes zur Ausbildung eines rechtsgängigen Chromophorstapels gezwungen.

Insgesamt ähneln sich die optischen Eigenschaften der entlang von **ODA** gebildeten und der kovalenten Py- $\equiv$ -dU-Stapel jedoch so stark, dass der nicht-kovalente Ansatz eine vielversprechende Alternative zu ethinylpyrenmodifizierten Oligonukleotiden darstellt. Ein Vorteil des nicht kovalenten Systems ist hierbei der vergleichsweise geringe praktische Aufwand, da sowohl die Synthese eines Phosphoramidit-Bausteins, als auch dessen Einfach- und vor allem Mehrfacheinbau in ein Oligonukleotid entfallen. Anwendungen für solch ein System aus Fluorophor und Templat-DNA im Bereich der Materialchemie oder der Nanoelektronik sind ebenfalls denkbar.

## 6 Zusammenfassung

### Ethynylpyren und Ethynylnilrot als Basenmodifikationen am 2'-Desoxyuridin

Um die photophysikalischen Wechselwirkungen zwischen Pyren und Nilrot zu untersuchen wurden beide Chromophore in dieser Arbeit über Acetylenbrücken mit der C5-Position von 2'-Desoxyuridin verknüpft und benachbart in Oligonukleotide eingebaut. Frühere Veröffentlichungen aus unserem Arbeitskreis konnten bereits zeigen, dass zwischen diesen beiden Fluorophoren ein Energietransfer stattfindet, der stark von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe abhängt.<sup>[122]</sup> Insgesamt wurden vier verschiedene, mit Py-≡-dU und Nr-≡-dU modifizierte Oligonukleotide synthetisiert und mit DNA- und PyrrolidinyI-PNA-Gegensträngen hybridisiert. Durch die Bildung sowohl komplementärer als auch fehlgepaarter DNA-Duplexe und PNA/DNA-Hybride konnte eine unterschiedliche relative Orientierung von Pyren und Nilrot innerhalb dieser Systeme erreicht werden. Durch den Vergleich der optischen Eigenschaften der zweifach markierten Einzelstränge, Doppelstränge und Hybride untereinander konnte der Energietransfer von Ethynylpyren auf Ethynylnilrot genauer untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass dieser neben der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der beiden Chromophore noch von zwei weiteren Faktoren beeinflusst wird. Diese sind sowohl excitonische Wechselwirkungen zwischen Ethynylpyren und den benachbarten DNA-Basen als auch Grundzustandswechselwirkungen zwischen Pyren und Nilrot. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass acpcPNA sowohl mit unmodifizierten als auch mit zweifach farbstoffmarkierten DNA-Gegensträngen stabile Hybride ausbildet, auch wenn die PNA-Stränge nur zu einem 12 Basen langen Teilbereich des jeweiligen DNA-Gegenstrangs komplementär sind. Die beiden Hybride **DNA2/PNA2** und **DNA4/PNA4** sind in diesem Teil besonders hervorzuheben, da sie nicht nur eine hohe thermische Stabilität sondern auch eine weiße Emission durch nahezu identische Beiträge von Pyren- und Nilrotfluoreszenz besitzen (siehe Abb. 83). Für diese beiden Beispiele wäre demnach eventuell eine Anwendung in der Optoelektronik denkbar.



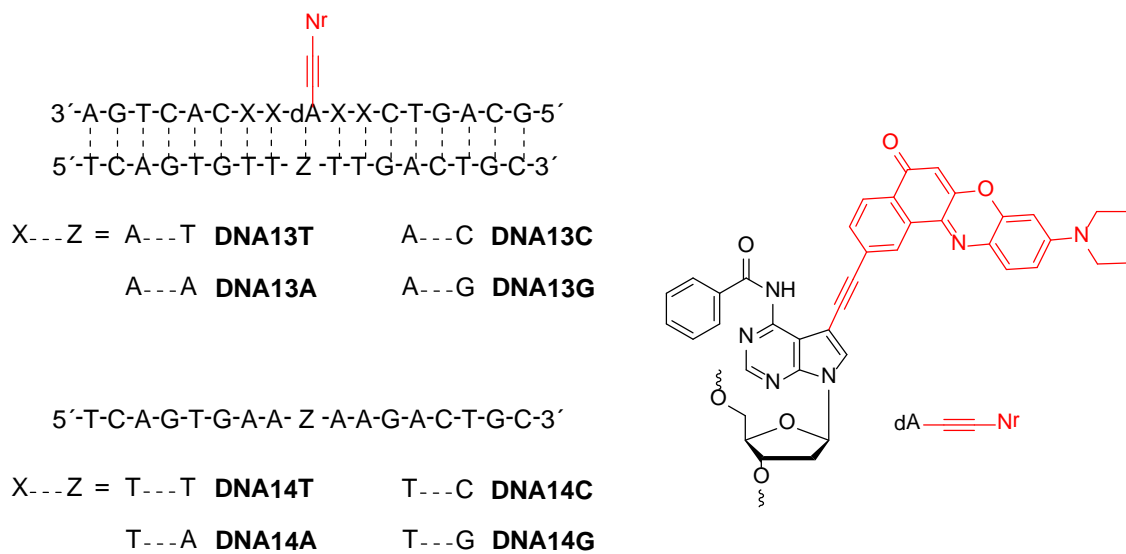
**Abb. 83:** Darstellung der Struktur von Py≡dU und Nr≡dU, sowie der Sequenzen **DNA2/PNA2** und **DNA4/PNA4**.

### Ethynylnitrot als Basenmodifikation am 7-Desazaadenin

Das bereits bekannte Nukleosid Nr≡dA konnte im zweiten Teil dieser Arbeit hergestellt und als Phosphoramiditbaustein in verschiedene Oligonukleotide eingebaut werden. Die optischen Eigenschaften der einfach modifizierten Einzel- und Doppelstränge wurden mit denen von Nr≡dU modifizierten Stränge gleicher Sequenz verglichen. Aufgrund bereits veröffentlichter Beobachtungen von Reji Varghese<sup>[121]</sup> wurde die Vermutung geäußert, dass die beiden Modifikationen im angeregten Zustand als eine Art *Bonded Exciplex* vorliegenden. Die in dieser Arbeit durchgeführten spektroskopischen Messungen lassen nun den Schluss zu, dass der Anteil des ladungstrennten Zustands bei Nr≡dA im Vergleich zu Nr≡dU wahrscheinlich deutlich erhöht ist. Zusätzlich wurden die optischen und thermischen Eigenschaften der fehlgepaarten, mit Nr≡dA modifizierten Duplexe **DNA14A** bis **DNA14G** und **DNA13A** bis **DNA13G** denen der komplementären Doppelstränge **DNA14T** und **DNA13T** gegenübergestellt (Abb. 84). Es zeigte sich, dass letztere sowohl die größten Schmelztemperaturen, als auch die niedrigsten Fluoreszenzintensitäten besitzen. Deshalb kann vermutet werden, dass der artifizielle Baustein in den komplementären Strängen die größte strukturelle Änderung erfährt, was wiederum zu einem verstärkten Anteil des ladungstrennten Zustands und dadurch zu Fluoreszenzlöschung führt. Zusätzlich zur Charakterisierung des

## 6 Zusammenfassung

Nr-≡-dA-Bausteins innerhalb der Oligonukleotide wurden Doppelstränge synthetisiert und untersucht, welche Py-≡-dU als komplementäre Base zu Nr-≡-dA enthalten. Mit Hilfe von Anregungsspektren dieser Duplexe konnte bewiesen werden, dass ein Energietransfer von Ethinylpyren auf Ethinylnilrot stattfindet, wenn sich die beiden Chromophore innerhalb der Sequenz an gegenüber voneinander liegenden Basen befinden. Weitere spektroskopische Messungen führten zu der Annahme, dass die Fluoreszenz von Ethinylnilrot wahrscheinlich durch einen direkt an den Energietransfer angeschlossenen photoinduzierten Ladungstransfer zu Ethinylpyren gelöscht wird.



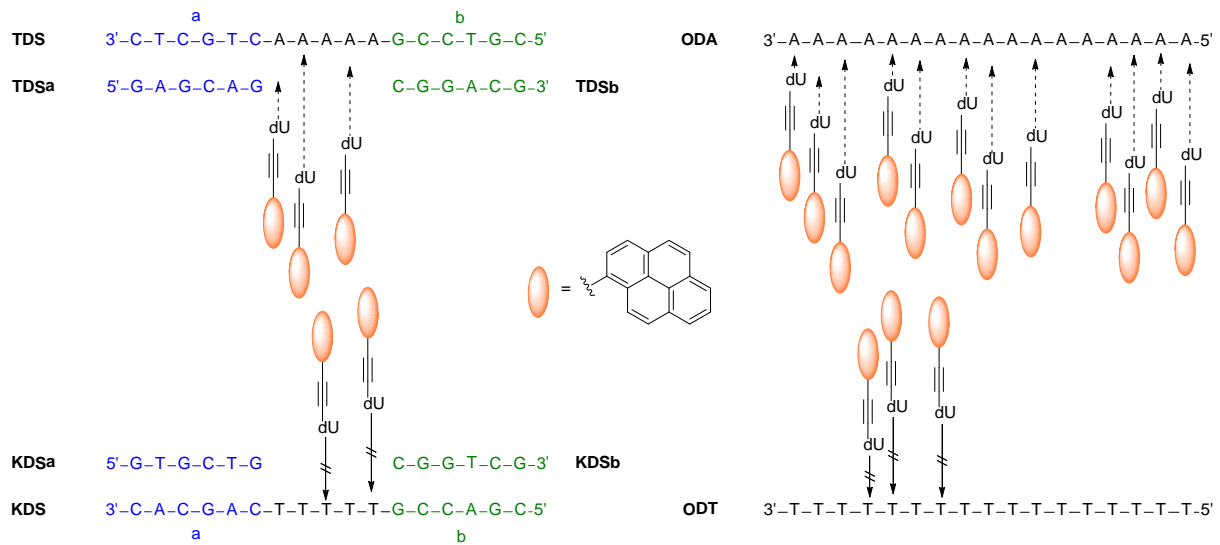
**Abb. 84:** Darstellung der Struktur von Nr-≡-dA, sowie der Sequenzen **DNA13T** bis **DNA13G** und **DNA14T** bis **DNA14G**.

### Entwicklung eines Systems aus Fluorophoren und Templat-DNA

Im dritten Teil dieser Doktorarbeit wurden nach einem Vorbild von *Schenning et al.*<sup>[184]</sup> Chromophoraggregate entlang eines einzelsträngigen DNA-Templats gebildet. Hierfür wurden im ersten Abschnitt Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside als Farbstoffe, **TDS** und **TDS/TDSa/b** als Templat-DNA-Stränge sowie **KDS** und **KDS/KDSa/b** als Kontroll-DNA-Stränge verwendet (Abb. 85). Anhand dieser Vorversuche war es möglich, Parameter des Systems wie Temperatur, Lösungsmittel und das Verhältnis von Chromophorkonzentration zu DNA-Konzentration einzustellen. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen der Anlagerung der ethinylpyrenmodifizierten 2'-Desoxyuridine an die komplementären Adeninbasen des Templat-DNA-Strangs gegenüber der Aggregation der Fluorophore im Beisein des unspezifischen Kontroll-DNA-Strangs war im zweiten Abschnitt mit Hilfe der Oligonukleotide **ODA** (Templat) und **ODT** (Kontrolle) anhand von spektroskopischer Methoden möglich (Abb. 85). Es konnte gezeigt werden, dass die aggregierenden Fluorophore in Gegenwart von **ODA** ähnliche optische Eigenschaften wie kovalent eingebaute Py- $\equiv$ -dU-Stapel besitzen. Diese Beobachtung, sowie zusätzliche konzentrationsabhängige Messungen und temperaturabhängige Absorptionsspektren ließen vermuten, dass die Anlagerung der Py- $\equiv$ -dU-Nukleoside entlang des Templat-Oligonukleotids in einer geordneten Art und Weise und unter Ausbildung einer helikalen Struktur verläuft. Außerdem liegen die Chromophore innerhalb dieser Struktur wahrscheinlich von Anfang an in einer coplanaren Orientierung, sowie helikal zueinander verdreht vor. Im Gegensatz dazu deuten die optischen Eigenschaften im Beisein von **ODT** auf eine unspezifisch angelagerte und in Abwesenheit eines Oligonukleotids (Negativprobe) auf eine nicht angelagerte Stapelung der Farbstoffe hin. Des Weiteren konnte mit Hilfe von CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass alle nicht kovalenten Aggregate die intrinsische Eigenschaft besitzen, in einer linksgängigen Helix zu stapeln. Nach dem Einbau in einen DNA-Doppelstrang werden die Py- $\equiv$ -dU-Moleküle jedoch durch die Orientierung des Duplexes zur Ausbildung eines rechtsgängigen Chromophorstapels gezwungen. Trotz der unterschiedlichen Chiralität ähneln sich die optischen Eigenschaften der entlang von **ODA** gebildeten und der kovalenten Py- $\equiv$ -dU-Stapel sehr stark. Deshalb führen die im letzten Teil dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zu dem Schluss, dass der nicht-kovalente Ansatz eine vielversprechende Alternative zu ethinylpyrenmodifizierten Oligonukleotiden darstellt,

## 6 Zusammenfassung

da bei diesem sowohl die Synthese eines Phosphoramidit-Bausteins, als auch dessen Einfach- und vor allem Mehrfacheinbau in ein Oligonukleotid entfallen.



**Abb. 85:** Schematische Darstellung der beiden Ansätze zur Untersuchung von Chromophoraggregation entlang einzelsträngiger DNA-Template.



## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Organische Synthese: Materialien, Geräte und Methoden

#### Reagenzien

Die zur Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Riedel-de Haën* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die verwendete Qualität war mindestens „zur Synthese“.

#### Lösungsmittel

Für die Säulenchromatographie wurden vorher destillierte, technische Lösungsmittel verwendet. Alle anderen verwendeten Lösungsmittel besaßen mindestens die Qualitätsstufe p.A. Trockene Lösungsmittel wurden von *Acros Organics* bezogen, unter Argon-Atmosphäre entnommen und aufbewahrt. Die HPLC wurde mit hochreinen organischen Lösungsmitteln (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage durchgeführt.

#### Synthesebedingungen

Zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden Reaktionen gegebenenfalls unter Stickstoffatmosphäre (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) oder Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,999% rein) durchgeführt.

#### Sublimationstrocknung

Nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff wurden wässrige Lösungen an der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD Plus von *Christ* getrocknet.

#### Dünnschichtchromatographie (DC)

Verwendet wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck*. Die Beschichtung bestand aus 60 F<sub>254</sub> Kieselgel mit einer Schichtdicke von 0.25 mm. Eine visuelle Auswertung erfolgt über Fluoreszenzlöschung bei  $\lambda = 254$  nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei  $\lambda = 366$  nm. Falls notwendig, erfolgte die chemische Auswertung durch Anfärben mit Schwefelsäure (3%) in Methanol und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön.

### **Flash-Säulenchromatographie (FC)**

Als stationäre Phase diente Kieselgel der Firma *Sigma-Aldrich* mit einer Korngröße von 40-63  $\mu\text{m}$ , welches in der Säule nass gepackt wurde. Chromatographiert wurde nach dem von *W.C. Still* beschriebenen Verfahren<sup>[192]</sup> mit einem Überdruck von etwa 0.3 bar. Die zu reinigende Substanz wurde entweder in der mobilen Phase gelöst, oder bei zu geringer Löslichkeit an Kieselgel adsorbiert aufgetragen.

### **Massenspektrometrie (MS)**

ESI-Massenspektren wurden durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, Abteilung Massenspektroskopie der Universität Regensburg an dem Gerät ThermoQuest (TSQ 7000) der Firma *Finnigan* gemessen. Alle anderen Massenspektren wurden am KIT, Institut für Organische Chemie an einem *Finnigan* MAT95 gemessen. Hierbei dienten EI (Elektronenstoßionisation) und FAB (Fast Atom Bombardement) als Ionisierungsverfahren.

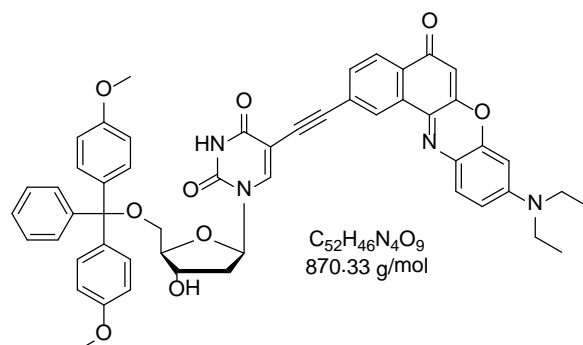
### **NMR-Spektroskopie**

Kernresonanzspektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln, entweder durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik der Universität Regensburg an dem Spektrometer *Bruker* Avance 300, oder in der NMR-Abteilung des Instituts für Organische Chemie am KIT, an einem *Bruker* Avance 300, Avance 400 oder Avance DRX 500 aufgenommen. Die Messungen wurden in üblichen NMR-Probenröhrchen ( $\varnothing = 5$  mm) mit ca. 10 mg Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel durchgeführt. Chemische Verschiebungen  $\delta$  wurden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz diente das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels.<sup>[193]</sup> Kopplungskonstanten  $J$  wurden in Hz angegeben.

## 7.2 Synthesevorschriften

### 7.2.1 Darstellung des nitro-modifizierten Uridin-Bausteins 7

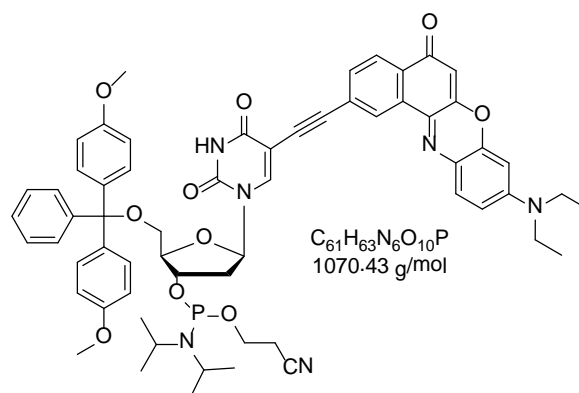
Die Synthesen von 5-Diethylamino-2-nitrosophenol-hydrochlorid (**1**)<sup>[127]</sup> und 9-(Diethylamino)-2-hydroxy-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-5-on (**2**)<sup>[128]</sup> wurden von Daniel Lachmann, Michaela Lutz und Andreas Dittmer nach Literaturvorschriften durchgeführt. 9-(Diethylamino)-2-ethinyl-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-5-on (**5**) wurde in drei Stufen,<sup>[129]</sup> 2'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-ioduridin in einer Stufe<sup>[130]</sup> nach Literaturbedingungen synthetisiert. Die letzten beiden Syntheseschritte orientierten sich an einer Vorschrift von Reji Varghese.<sup>[122]</sup> Die Ausbeuten konnten durch geänderte Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung verbessert werden.

**5'-O-[bis(4-Methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-desoxy-5-[2-[9-(diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl]ethynyl]-uridin (6)**

Es wurden 99.0 mg (0.289 mmol, 1.0 eq) Ethynylnilrot **5**, 152 mg (0.232 mmol, 0.8 eq) 5'-O-[bis(4-Methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-desoxy-5-iod-uridin, 11.0 mg (0.058 mmol, 0.2 eq) Kupferiodid und 33.0 mg (0.029 mmol, 0.1 eq) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> unter Argon-Atmosphäre mit 3.4 mL abs. DMF versetzt. Anschließend wurden 0.4 mL (292 mg, 2.89 mmol, 10.0 eq) abs. NEt<sub>3</sub> zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde insgesamt dreimal nach der „Freeze-Pump-Thaw“-Methode entgast und danach 3 h bei 60 °C unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in 20 mL DCM aufgenommen und dreimal mit je 20 mL H<sub>2</sub>O extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 20 mL DCM gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt durch FC (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Es wurden 141 mg (0.162 mmol, 70%) **6** als violetter Feststoff erhalten.

Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[122]</sup>

**5'-O-[bis(4-Methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-desoxy-5-[2-[9-(Diethylamino)-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yl]ethynyl]-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)phosphoramidit]-uridin (7)**

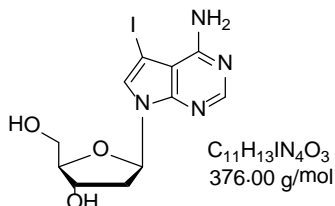


Es wurden 127 mg (0.146 mmol, 1.0 eq) **6** unter Argon-Atmosphäre in 4.0 mL abs. DCM gelöst. Die violette Lösung wurde mit 80  $\mu$ L (60.0 mg, 0.467 mmol, 3.2 eq) DIPEA und 65  $\mu$ L (69.0 mg, 0.291 mmol, 2.0 eq) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt und anschließend unter Lichtausschluss 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt auf eine Kieselgel-Säule aufgetragen und mittels FC (DCM/Aceton 8:1 + 0.1%  $NEt_3$ ) gereinigt. Nach Lyophilisation aus Benzol konnten 149 mg (0.139 mmol, 95%) **7** als violettes Pulver isoliert werden.

$^{31}P$  NMR (250 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) = 149.3.

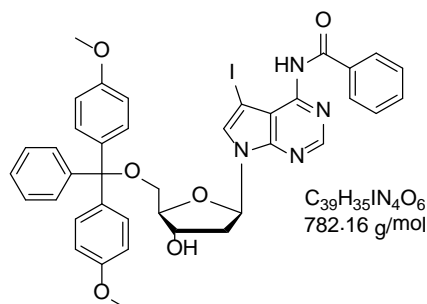
### 7.2.2 Darstellung des nitro-modifizierten Desazaadenosin-Bausteins **19**

Die Zwischenstufe **13**, der sogenannte Hoffersche Chlorzucker,<sup>[156]</sup> wurde nach einer Vorschrift von Michael Weinberger synthetisiert.<sup>[157]</sup> Die weitere Synthese bis **18** erfolgte ebenfalls nach Literaturbedingungen.<sup>[121, 133, 161]</sup> Hierbei wurde sowohl für 7-Desaza-2'-desoxy-7-iodadenosin (**16**), als auch für **17** die Durchführung geändert.

**7-(2-Desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (16)**

300 mg (0.758 mmol) 4-Chlor-7-(2-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**15**) wurden in einer Mischung aus 23.5 mL (344 mmol) 25%iger wässriger  $NH_3$ -Lösung und 23.5 mL 1,4-Dioxan gelöst. In einem verschlossenen, druckstabilen Gefäß wurde die Lösung für 15 h auf 110 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt mittels FC (DCM/MeOH 30:1) gereinigt. Anschließende Umkristallisation aus Methanol ergab 230 mg (0.611 mmol, 80%) **16** als farblosen Feststoff.

Die analytischen Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein.<sup>[133]</sup>

**N-[7-[5-O-[bis(4-Methoxyphenyl)phenylmethyl]-2-desoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-5-iod-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]-benzamid (17)**

100 mg (0.266 mmol, 1.0 eq) 7-Desaza-2'-desoxy-7-iodadenosin (**16**) wurden viermal mit je 5.0 mL abs. Pyridin coevaporiert und anschließend über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Am nächsten Tag wurden unter Argon-Atmosphäre 135 mg (0.399 mmol, 1.5 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zugegeben und das Gemisch in 1.5 mL abs. Pyridin gelöst. Die Lösung wurde mit 55  $\mu$ L (40.0 mg, 0.395 mmol, 1.5 eq) abs.  $NEt_3$  versetzt und anschließend 5 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Dann wurden 168  $\mu$ L (144 mg, 1.33 mmol, 5.0 eq) Trimethylsilylchlorid und nach einer weiteren Stunde 154  $\mu$ L (186 mg, 1.32 mmol, 5.0 eq) Benzoylchlorid zugegeben. Die Lösung wurde 2 h gerührt, im Eisbad gekühlt und mit 270  $\mu$ L  $H_2O$  versetzt. Nach 5 min wurden 530  $\mu$ L 25%ige wässrige  $NH_3$ -Lösung zugegeben und nochmals 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in 20 mL DCM aufgenommen und dreimal mit je 20 mL 5%iger wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt durch FC (DCM/MeOH 50:1 + 0.1%  $NEt_3$   $\rightarrow$  DCM/MeOH 40:1 + 0.1%  $NEt_3$ ) gereinigt. Mischfraktionen wurden in wenig DCM gelöst und aus Hexan gefällt. Insgesamt konnten so 50.0 mg (0.064 mmol, 24%) **17** als farbloses Pulver isoliert werden.

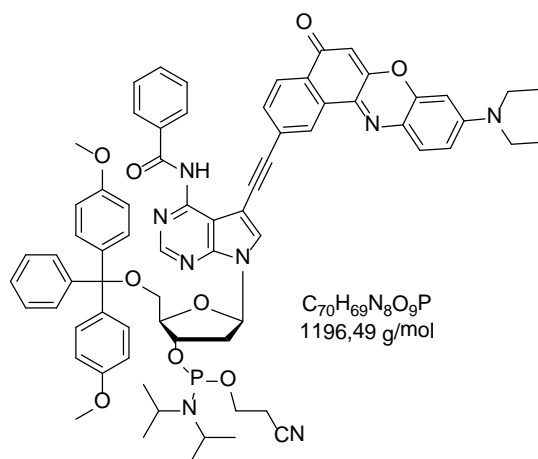
**$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 10.92 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.09 (s, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.64-7.54 (m, 3H), 7.39-7.19 (m, 9H), 6.87-6.85 (m, 4H), 6.67 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 5.40 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 1H), 4.44-4.40 (m, 1H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.24-3.13 (m, 2H), 2.70-2.63 (m, 1H), 2.36-2.31 (m, 1H).

**$^{13}C$  NMR** (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 172.5, 167.2, 158.1, 157.7, 152.0, 144.8, 135.7, 135.5, 132.2, 129.7, 129.7, 128.5, 128.4, 127.9, 127.7, 126.7, 113.2, 85.7, 85.6, 83.1, 70.8, 64.1, 55.1, 55.1, 55.0, 39.7.



**FAB-MS** m/z (%): 303.2 (100) [DMT<sup>+</sup>], 783.1 (10) [MH<sup>+</sup>]

**(2*R*,3*S*,5*R*)-5-[4-Benzamido-5-[[9-(diethylamino)-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yl]ethynyl]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl]-2-[[bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy]methyl]tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidit (**19**)**



Unter Argon-Atmosphäre wurden 124 mg (0.124 mmol, 1.0 eq) **18** in 3.0 mL abs. DCM gelöst. Es wurden 64  $\mu$ L (48.0 mg, 0.371 mmol, 3.0 eq) DIPEA und 69  $\mu$ L (73.0 mg, 0.308 mmol, 2.5 eq) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurden nochmal 70  $\mu$ L (53.0 mg, 0.410 mmol, 3.3 eq) DIPEA und 70  $\mu$ L (74.0 mg, 0.313 mmol, 2.5 eq) Phosphoramidit zugegeben. Da zwei Stunden später kein vollständiger Umsatz zu beobachten war, wurden weitere 50  $\mu$ L (38.0 mg, 0.294 mmol, 2.4 eq) DIPEA und 50  $\mu$ L (53.0 mg, 0.224 mmol, 1.8 eq) Phosphoramidit zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt auf eine Kieselgel-Säule (gepackt mit DCM/Aceton 100:1 + 0.1%  $NEt_3$ ) aufgetragen und mittels FC (DCM/Aceton 10:1 + 0.1%  $NEt_3$ ) gereinigt. Das Produkt wurde insgesamt viermal aus Benzol lyophilisiert. Es wurde ein Umsatz von 100% angenommen.

**MALDI-TOF-MS:** gefunden:  $m/z = 1198.5 [MH^+]$  (berechnet:  $m/z = 1197.5 [MH^+]$ )

## 7.3 Oligonukleotide

### 7.3.1 Allgemeines

#### Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte DNA-Stränge wurden von *Metabion international* in HPLC gereinigtem und lyophilisiertem Zustand bezogen. Sie besaßen alle eine Stoffmenge von 1.0  $\mu\text{mol}$ . Vor ihrer Verwendung wurden die Oligonukleotide in entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage gelöst und ihre Konzentration über UV/Vis-Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt.

#### Pyrrolidinyl Peptidnukleinsäure (Pyrrolidinyl-PNA)

Die verwendeten PNA-Stränge wurden von Prof. Tirayut Vilaivan an der Chulalongkorn Universität in Bangkok synthetisiert, mittels *reversed-phase* HPLC gereinigt und lyophilisiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die erhaltenen Proben in entionisiertem Wasser gelöst und ihre Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt.

#### DNA-Festphasensynthese

Die automatisierte Synthese von DNA-Oligonukleotiden wurde an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems (ABI)* durchgeführt. Das Gerät wurde mit Argon als Schutzgas betrieben. Als Träger dienten CPGs mit 1  $\mu\text{mol}$  Belegung (500 Å) von *Proligo Reagents*. Weitere Chemikalien für die Festphasensynthese stammten ebenfalls von *Proligo* und *ABI*.

#### Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Aufreinigung der synthetisierten DNA-Stränge wurde ein HPLC-System der Firma *Shimadzu* verwendet. Die analytische Trennung erfolgte hierbei über eine *Supercosil LC-318* Säule (25 cm x 4.6 mm, *Supelco*), die präparative über eine *Supercosil LC-318* Säule (25 cm x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ , *Supelco*). Zur Herstellung der Laufmittel wurden Acetonitril (*LiChrosolv*, *Merck*) und entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.5 (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min für analytische Methoden und 2.5 mL/min für präparative Methoden. Oligonukleotide mit nur einer Farbstoff-Modifikation (Nr $\equiv$ -dU,

Py- $\equiv$ -dU oder Nr- $\equiv$ -dA) wurden mit einem Gradienten von 0 - 20% B (50 min), solche mit zwei Modifikationen (Py- $\equiv$ -dU und Nr- $\equiv$ -dU) mit einem Gradienten von 0 – 30% B (50 min) durch präparative Trennung gereinigt. Zur Detektion wurden die Absorption der DNA bei  $\lambda = 260$  nm und folgende Wellenlängen genutzt:

- $\lambda_{\text{abs}}$  (Nr- $\equiv$ -dU) = 600 nm
- $\lambda_{\text{abs}}$  (Py- $\equiv$ -dU) = 400 nm
- $\lambda_{\text{abs}}$  (Nr- $\equiv$ -dA) = 600 nm

### 7.3.2 Synthese und Charakterisierung

#### Kupplungsprotokolle

Die natürlichen DNA-Basen wurden als Phosphoramidite bezogen (*Proligo*) und in abs. MeCN gelöst ( $c = 0.067$  M) in den Syntheseautomaten eingebracht. Das Phosphoramidit **10** ist kommerziell erhältlich (*Glen Research*), wurde jedoch aus Zeitgründen selbst synthetisiert. Anschließend wurde es in einer Mischung aus abs. DCM/MeCN = 1:1 ( $c = 0.141$  M) gelöst eingesetzt. Weitere Sonderbausteine **19** und **7** wurden als 0.124 M Lösung bzw. 0.100 M Lösung in abs. DCM verwendet. Im Syntheseautomaten werden natürliche und artifizielle DNA-Basen, sowie Synthesizer-Chemikalien in Pulsen zu je 16  $\mu\text{L}$  durch die Reaktionsgefäße gefördert. Ein Kupplungsprotokoll besteht aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer, in Sekunden, des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet ein schnellstmögliches Durchlaufen des Einzelschrittes. Die dabei verwendeten Reagenzien sind:

- Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan
- Wsh: Acetonitril
- Act: 0.45 M Tetrazol in Acetonitril
- Caps: Acetanhydrid in THF/ Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/ Pyridin (Cap B)
- Ox: Iod in Wasser/ THF/ Pyridin

Die Phosphoramidite von A, G, C und T wurden nach einem Standardsyntheseprotokoll in Oligonukleotide eingeführt (Tabelle 14). Dieses Standardverfahren wurde für die einzelnen Sonderbausteine nur im Bereich „\$ Coupling“ verändert.

**Tabelle 14:** Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Basen am Beispiel des Phosphoramidits von T

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

Die Kupplungszeiten der Sonderbausteine wurden im Vergleich zum Standardprotokoll von 96 s auf 1900 s (**7, 19**) bzw. 2060 s (**10**) verlängert. Tabelle 15 zeigt das Kupplungsprotokoll von **7** und **19**, während in Tabelle 16 das Kupplungsprotokoll von **10** dargestellt ist.

**Tabelle 15:** Kupplungsprotokoll für die Sonderbausteine **7** und **19** („6“ = DCM; „7“ = **7** bzw. **19**)

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
23	6 + Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	5	0
24	7 + Act	PULSE	4	800
23	6 + Act	PULSE	5	1000
4	6	PULSE	4	100
4	6	PULSE	40	0
1	Wsh	PULSE	40	0

**Tabelle 16:** Kupplungsprotokoll für den Sonderbaustein **10** („6“ = DCM; „8“ = **10**)

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
23	6 + Act	PULSE	5	0
25	8 + Act	PULSE	5	0
25	8 + Act	PULSE	5	1000
23	6 + Act	PULSE	5	1000
1	Wsh	PULSE	7	60
1	Wsh	PULSE	8	0
4	6	PULSE	20	0
1	Wsh		40	0

### Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide

Die CPG-Säulen wurden nach der DNA-Synthese im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden sie geöffnet, das CPG-Granulat in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (>25%, *trace select*, *Fluka*) versetzt. Die Abspaltung der Oligonukleotide vom CPG, erfolgte über 16 Stunden bei 45 °C. Gleichzeitig wurden auch die Schutzgruppen an den exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen entfernt. Ebenfalls im selben Schritt wurden die Cyanoethoxy-Schutzgruppen durch  $\beta$ -Eliminierung von den Phosphatbrücken abgespalten. Die Reaktionsgefäße wurden nach dem Abkühlen

zentrifugiert und die überstehende Lösung mit Hilfe eines Zentrifugenfilters von der Festen Phase getrennt. Das CPG-Granulat wurde zweimal mit je 300  $\mu\text{L}$  Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden in einem Vakuumkonzentrator *Alpha RVC* der Firma *Christ* vom Ammoniak befreit (30 min, Heizung 25 min, 35  $^{\circ}\text{C}$ , 100 mbar), in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Die so gewonnenen DNA-Stränge wurden in 300  $\mu\text{L}$  Wasser aufgenommen, filtriert und über präparative *reversed-phase* HPLC gereinigt.

### Charakterisierung der Oligonukleotide durch MALDI-TOF

MALDI-TOF-Massenspektren der synthetisierten DNA-Stränge wurden am Karlsruher Institut für Technologie an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linearen negativen Modus gemessen. Als Matrix diente eine Mischung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP, 0.3 M in Ethanol) und Diammoniumcitrat (0.1 M in Wasser) im Volumenverhältnis 2:1.

### Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen kann aus dem *Lambert-Beerschen Gesetz* über die optische Dichte bei  $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$  bestimmt werden.<sup>[194]</sup> Hierfür wurde der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_{260}$  eines unmodifizierten DNA-Strangs in Wasser über folgende Formel berechnet:

$$\varepsilon_{260} = (A \cdot \varepsilon_A + C \cdot \varepsilon_C + G \cdot \varepsilon_G + T \cdot \varepsilon_T) \cdot 0.9$$

A, C, T, G: Anzahl der entsprechenden Nucleobasen

$$\varepsilon_A: 15400 \text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$$

$$\varepsilon_C: 7300 \text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$$

$$\varepsilon_T: 8800 \text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$$

$$\varepsilon_G: 11700 \text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$$

Die Extinktionskoeffizienten ( $\varepsilon$ ) der einzelnen DNA-Basen sind für eine Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  angegeben. Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität.

Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide wurden die Extinktionskoeffizienten der artifiziellen Bausteine, bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$ , ebenfalls mit 0.9 multipliziert und zu dem Extinktionskoeffizient der DNA addiert. Es wurden folgende Werte verwendet:

$\epsilon_{\text{Nr-}\equiv\text{-dU}}$ : 28010 L(mol·cm)<sup>-1</sup>

$\epsilon_{\text{Py-}\equiv\text{-dU}}$ : 20840 L(mol·cm)<sup>-1</sup>

$\epsilon_{\text{Nr-}\equiv\text{-dA}}$ : 18700 L(mol·cm)<sup>-1</sup>

Die Absorptionsmessungen zur Bestimmung der Konzentration wurden an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure- oder UV/Vis-Modus durchgeführt.

### Hybridisierung

Der modifizierte Einzelstrang wurde, falls nicht anders angegeben, zusammen mit 1.2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (mit 250 mM NaCl) für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Im Falle einer Hybridisierung zweier modifizierter Oligonukleotide wurde je ein Äquivalent beider Stränge verwendet.

### 7.3.3 Verwendete DNA- und PNA-Stränge

Nachfolgend sind die Sequenzen, die massenspektroskopische Analytik, sowie die molaren Extinktionskoeffizienten der verwendeten PNA- und modifizierten DNA-Stränge angegeben.

#### Oligonukleotide mit Nilrot und Pyren am Uridin

**DNA1** 3' AGT-CAC-AAPy- $\equiv$ -dU-Nr- $\equiv$ -dUAA-CTG-ACG 5'

**DNA2** 3' AGT-CAC-ATPy- $\equiv$ -dU-Nr- $\equiv$ -dUTA-CTG-ACG 5'

**DNA3** 3' AGT-CAC-AGPy- $\equiv$ -dU-Nr- $\equiv$ -dUGA-CTG-ACG 5'

**DNA4** 3' AGT-CAC-ACPy- $\equiv$ -dU-Nr- $\equiv$ -dUCA-CTG-ACG 5'

Die Sequenz **DNA3** wurde von Reji Varghese synthetisiert.



**Tabelle 17:** [a] MALDI-Massen bzw. [b] ESI-Massen und  $\epsilon$ -Werte der nilrot- und pyrenmodifizierten Oligonukleotide **DNA1-DNA4**

DNA-Strang	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{260}$ [L(mol·cm) <sup>-1</sup> ]
<b>DNA1</b> <sup>[a]</sup>	6025.9	6030.0	214670
<b>DNA2</b> <sup>[a]</sup>	6007.9	6012.2	202870
<b>DNA3</b> <sup>[b]</sup>	6059.9	1514.3 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup> 2019.3 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup>	208070
<b>DNA4</b> <sup>[a]</sup>	5977.9	5981.8	200070

### Oligonukleotide mit Nilrot am Desazaadenin

**DNA13** 3' AGT-CAC-AANr- $\equiv$ -dA-AAC-TGA-CG 5'

**DNA14** 3' AGT-CAC-TTnr- $\equiv$ -dA-TTC-TGA-CG 5'

**DNA15** 3' AGT-CAC-CCnr- $\equiv$ -dA-CCC-TGA-CG 5'

**DNA16** 3' AGT-CAC-GGnr- $\equiv$ -dA-GGC-TGA-CG 5'

**Tabelle 18:** MALDI-Massen und  $\epsilon$ -Werte der nilrotmodifizierten Oligonukleotide **DNA13-DNA16**

DNA-Strang	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{260}$ [L(mol·cm) <sup>-1</sup> ]
<b>DNA13</b>	5533.5	5536.5	187560
<b>DNA14</b>	5497.5	5500.1	163800
<b>DNA15</b>	5437.5	5439.0	158400
<b>DNA16</b>	5597.5	5599.1	174240

### Oligonukleotide mit Nilrot am Uridin

**DNA17** 3' AGT-CAC-AANr- $\equiv$ -dU-AAC-TGA-CG 5'

**DNA18** 3' AGT-CAC-TTnr- $\equiv$ -dU-TTC-TGA-CG 5'

**DNA19** 3' AGT-CAC-CCnr- $\equiv$ -dU-CCC-TGA-CG 5'

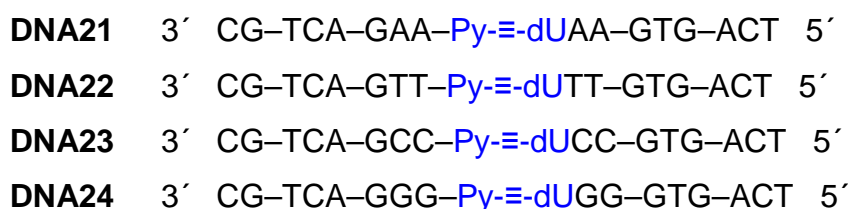
**DNA20** 3' AGT-CAC-GGnr- $\equiv$ -dU-GGC-TGA-CG 5'

Die Sequenzen **DNA17** und **DNA20** wurden von Reji Varghese synthetisiert.

**Tabelle 19:** [a] MALDI-Massen bzw. [b] ESI-Massen und  $\epsilon$ -Werte der nilrotmodifizierten Oligonukleotide **DNA17-DNA20**

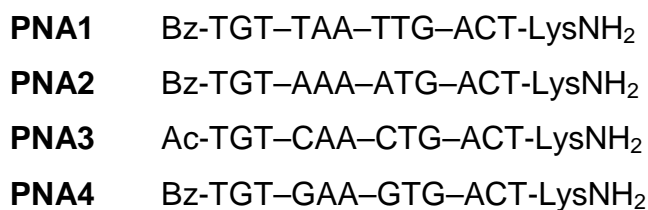
DNA-Strang	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{260}$ [L(mol·cm) <sup>-1</sup> ]
<b>DNA17</b> <sup>[b]</sup>	5511.1	1377.5 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup> 1837.1 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup>	195940
<b>DNA18</b> <sup>[a]</sup>	5475.4	5477.3	172180
<b>DNA19</b> <sup>[a]</sup>	5415.4	5418.6	166780
<b>DNA20</b> <sup>[b]</sup>	5575.4	1393.5 [M-4H <sup>+</sup> ] <sup>4-</sup> 1858.5 [M-3H <sup>+</sup> ] <sup>3-</sup>	182620

### Oligonukleotide mit Pyren am Uridin

**Tabelle 20:** MALDI-Massen und  $\epsilon$ -Werte der pyrenmodifizierten Oligonukleotide **DNA21-DNA24**

DNA-Strang	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	$\epsilon_{260}$ [L(mol·cm) <sup>-1</sup> ]
<b>DNA21</b>	5426.3	5426.6	187510
<b>DNA22</b>	5390.3	5390.3	163746
<b>DNA23</b>	5330.3	5333.3	158350
<b>DNA24</b>	5490.3	5491.5	174190

### PNA-Stränge mit Benzoylgruppe (PNA1, PNA2 und PNA4) oder Acetylgruppe (PNA3) am N-Terminus und L-Lysin am C-Terminus



**Tabelle 21:** MALDI-Massen und  $\epsilon$ -Werte von **PNA1-PNA4**

<b>PNA-Strang</b>	<b>berechnete Masse [g/mol]</b>	<b>gefundene Masse [g/mol]</b>	<b><math>\epsilon_{260}</math> [L(mol·cm)<sup>-1</sup>]</b>
<b>PNA1</b>	4300.6	4300.7	115600
<b>PNA2</b>	4318.7	4319.2	119600
<b>PNA3</b>	4208.5	4207.0	112800
<b>PNA4</b>	4350.7	4349.9	121000

### 7.3.4 Optische Spektroskopie

Für alle spektroskopischen Messungen wurden Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Für die Messungen wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel bzw. entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Soweit nicht anders angegeben, enthielten alle Oligonukleotid-Lösungen folgende Konzentrationen und wurden bei 20 °C spektroskopisch untersucht:

- $c_{(\text{DNA})}$  = 2.5  $\mu\text{M}$
- $c_{(\text{NaPi})}$  = 10 mM
- $c_{(\text{NaCl})}$  = 250 mM

#### UV/Vis Absorptionsspektroskopie

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit temperierbarem Küvettenhalter (*Cary 100 Temperature Controller*) aufgenommen. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter blieben unverändert: SBW: 2.0 nm; Average time 0.1 s; Data interval 1.0; Light source change over 350 nm.

#### Anlagerung der Farbstoffe

Die Anlagerung der Farbstoffe (Kapitel 5.2.3) wurde ebenfalls in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit temperierbarem Küvettenhalter durchgeführt.

#### Schmelztemperaturmessungen

Auch die Schmelztemperaturmessungen erfolgten in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* über einen Temperaturbereich von 20°C – 90°C, wobei die Temperatur am

Start- bzw. Endpunkt jeweils 10 min konstant gehalten wurde. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C/min und die Messdaten wurden in 0.5 °C Abständen erfasst.

### Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon* mit einem Peltiere-Element *LFI-3751* von *Wavelength Electronics* zur Temperatursteuerung durchgeführt. Falls nicht anders angegeben wurde bei 20 °C gemessen. Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: Increment: 1.0 nm; Increment time: 0.2 s.

Die Skalierung der Fluoreszenzintensität aller Fluoreszenzspektren ist in der Größenordnung „Millionen“ angegeben (z.B. Fluoreszenzintensität 1  $\equiv$  1 Mio.). Im Folgenden werden die verwendeten Anregungswellenlängen ( $\lambda_{\text{exc}}$ ), sowie die Spaltbreiten für Anregung und Emission der einzelnen Messungen nach Kapiteln geordnet aufgeführt:

#### Kapitel 3.3.2: Alle Messungen

$$\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 5 nm

#### Kapitel 5.2.2/3: Alle Messungen

$$\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 3 nm

#### Kapitel 4.2.2: Einfach modifizierte Einzel- und Doppelstränge

Nr- $\equiv$ -dU:  $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 3 nm

Nr- $\equiv$ -dA:  $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 3 nm

Py- $\equiv$ -dU:  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 3 nm

Zweifach modifizierte Doppelstränge

Nr- $\equiv$ -dA/Py- $\equiv$ -dU:  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 5 nm

Vergleich von einfach und zweifach modifizierten

Doppelsträngen

Nr-≡-dA:  $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 5 nm

Nr-≡-dA / Py-≡-dU:  $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{ nm}$

Spaltbreite für Anregung und Emission = 5 nm

### Anregungsspektren

Die Anregungsspektren wurde ebenfalls an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon* mit einem Peltiere-Element *LFI-3751* von *Wavelength Electronics* zur Temperatursteuerung gemessen.

**Kapitel 4.2.2:** Die Skalierung der Fluoreszenzintensität aller Anregungsspektren ist in der Größenordnung „Millionen“ angegeben (z.B. Fluoreszenzintensität 1 ≡ 1 Mio.). Die Spaltbreite für Anregung und Emission betrug 5 nm.

**Kapitel 5.2.3:** Die Skalierung der Fluoreszenzintensität aller Anregungsspektren ist in der Größenordnung „10 Millionen“ angegeben (z.B. Fluoreszenzintensität 1 ≡ 10 Mio.). Die Spaltbreite für Anregung und Emission betrug 3 nm.

### Zirkulardikroismus

Die Messungen erfolgten an einem *JASCO J-815* Spektropolarimeter ausgestattet mit einem *Julabo FP35-Kälte-Umwälzthermostat*. Die Hintergrundkorrektur erfolgte gegen das Lösungsmittel. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 200 nm im Abstand von 0.1 nm mit folgenden Messparametern aufgenommen: *Mode: continuous*, *Speed: 20 nm/min*, *Response: 4 s*, *Band Width: 1 nm*, *Accumulations: 2*. Zusätzlich wurden die CD-Spektren mit Hilfe einer Software von *JASCO* geglättet.

### AFM-Messungen

AFM Messungen wurden an einem *Dimension Icon Rasterkraftmikroskop* von *Veeco* im „Tapping Mode (Air-Standard)“ bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Oberflächenabtastung wurden Cantilever SNL-10 von *Veeco* mit einer Dicke von 0.5-0.7  $\mu\text{m}$ , einer Resonanzfrequenz von 40-75 kHz und einer Federkonstante von 0.58 N/m benutzt. Bei den zu messenden Proben wurde die überstehende Lösung vom Niederschlag getrennt, mit  $\text{MgCl}_2$ -Lösung versetzt ( $c_{\text{End}}(\text{MgCl}_2) = 10 \text{ mM}$ ), auf eine frisch gespaltene Mica-Oberfläche gegeben und nach ca. 3 min mit entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage abgewaschen. Die Mica-Oberfläche wurde anschließend mit einem Blasebalg getrocknet.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] W. Su, V. Bonnard, G. A. Burley, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7982-7991.
- [2] S.-i. Kawahara, T. Uchimaru, S. Murata, *Chem. Commun.* **1999**, 563-564.
- [3] Y. Ohya, K. Yabuki, M. Hashimoto, A. Nakajima, T. Ouchi, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1057-1066.
- [4] M. Heilemann, P. Tinnefeld, G. Sanchez Mosteiro, M. Garcia Parajo, N. F. Van Hulst, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6514-6515.
- [5] A. K. Tong, S. Jockusch, Z. Li, H.-R. Zhu, D. L. Akins, N. J. Turro, J. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12923-12924.
- [6] A. Ruiz-Carretero, P. G. A. Janssen, A. L. Stevens, M. Surin, L. M. Herz, A. P. H. J. Schenning, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 884-886.
- [7] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, WILEY-VCH, Weinheim, **2002**.
- [8] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- [9] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14-19.
- [10] G. G. Stokes, *Phil. Trans. R. Soc. London* **1852**, *142*, 463-562.
- [11] H. Baba, A. Nakajima, M. Aoi, K. Chihara, *J. Chem. Phys.* **1971**, *55*, 2433-2438.
- [12] P. A. Geldof, R. P. H. Rettschnick, *Chem. Phys. Lett.* **1969**, *4*, 59-61.
- [13] T. Itoh, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4541-4568.
- [14] K. Ebata, M. Masuko, H. Ohtani, M. Kashiwasake-Jibu, *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 836-839.
- [15] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *6*, 55-75.
- [16] X. Michalet, S. Weiss, M. Jäger, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1785-1813.
- [17] B. W. V. d. Meer, G. I. Coker, S.-Y. S. Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, Wiley-VCH, New York, **1991**.
- [18] M. Heilemann, R. Kasper, P. Tinnefeld, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16864-16875.
- [19] C. V. Kumar, J. Michael R. Duff, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16024-16026.
- [20] P. K. Dutta, R. Varghese, J. Nangreave, S. Lin, H. Yan, Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11985-11933.
- [21] E. C. Greyson, B. R. Stepp, X. Chen, A. F. Schwerin, I. Paci, M. B. Smith, A. Akdag, J. C. Johnson, A. J. Nozik, J. Michl, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14223-14232.
- [22] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4221-4245.
- [23] M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-70.
- [24] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- [25] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J.-Y. Tang, *Meth. Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.
- [26] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2009**, 2615-2624.
- [27] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946-2974.
- [28] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 4918-4925.
- [29] E. Meggers, L. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1092-1102.

- [30] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2090-2097.
- [31] H. Asanuma, T. Toda, K. Murayama, X. Liang, H. Kashida, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14702-14703.
- [32] H. Kashida, K. Murayama, T. Toda, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1285-1288.
- [33] H. Asanuma, K. Shirasuka, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2002**, 490-491.
- [34] H. Kashida, M. Tanaka, S. Baba, T. Sakamoto, G. Kawai, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 777-784.
- [35] H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6522-6525.
- [36] S. M. Langenegger, R. Häner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2149-2152.
- [37] S. M. Langenegger, R. Häner, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 9273-9276.
- [38] S. M. Langenegger, R. Häner, *Chem. Commun.* **2004**, *24*, 2792-2793.
- [39] V. L. Malinovskii, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4464-4467.
- [40] F. Garo, R. Häner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 916-919.
- [41] F. Würthner, *Chem. Commun.* **2004**, 1564-1579.
- [42] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [43] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2612-2614.
- [44] F. Menacher, V. Stepanenko, F. Würthner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6683-6688.
- [45] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6640-6645.
- [46] R. X.-F. Ren, N. C. Chaudhuri, P. L. Paris, S. R. IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678.
- [47] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591.
- [48] J. Gao, S. Watanabe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12748-12749.
- [49] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3923-3933.
- [50] F. Seela, M. Zulauf, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1878-1898.
- [51] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2838-2841.
- [52] C. Wanninger-Weiß, L. Valis, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 100-106.
- [53] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3372-3375.
- [54] E. Mayer-Enthart, C. Wagner, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3434-3439.
- [55] I. Bouamaied, T. N. Nguyen, T. Rühl, E. Stulz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3888-3891.
- [56] L.-A. Fendt, I. Bouamaied, S. Thöni, N. Amiot, E. Stulz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15319-15329.
- [57] T. Nguyen, A. Brewer, E. Stulz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1974-1977.
- [58] M. Nakamura, Y. Ohtoshi, K. Yamana, *Chem. Commun.* **2005**, 5163-5165.
- [59] M. Nakamura, Y. Shimomura, Y. Ohtoshi, K. Sasa, H. Hayashi, H. Nakano, K. Yamana, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1945-1951.
- [60] M. Nakamura, Y. Murakami, K. Sasa, H. Hayashi, K. Yamana, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6904-6905.
- [61] N. N. Dioubankova, A. D. Malakhov, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, P. E. Volynsky, R. G. Efremov, V. A. Korshun, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 841-847.
- [62] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.

- [63] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823.
- [64] P. E. Nielsen, G. Haaima, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 73-78.
- [65] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [66] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* **1994**, *368*, 561-563.
- [67] Vaijayanti A. Kumar, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 2021-2032.
- [68] D. Y. Cherny, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1667-1670.
- [69] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 165-170.
- [70] S. K. Kim, P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6477-6481.
- [71] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 3-7.
- [72] V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 404-412.
- [73] A. RAY, B. NORDEN, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-1060.
- [74] L. Good, P. E. Nielsen, *Nat Biotech* **1998**, *16*, 355-358.
- [75] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 109-139.
- [76] M. C. de Koning, G. A. van der Marel, M. Overhand, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 734-740.
- [77] M. Eriksson, P. E. Nielsen, L. Good, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7144-7147.
- [78] E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, A. RYTE, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2632-2635.
- [79] S. Brown, S. Thomson, J. Veal, D. Davis, *Science* **1994**, *265*, 777-780.
- [80] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat Struct Mol Biol* **1996**, *3*, 410-413.
- [81] H. Rasmussen, J. S. Kastrup, J. N. Nielsen, J. M. Nielsen, P. E. Nielsen, *Nat Struct Mol Biol* **1997**, *4*, 98-101.
- [82] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science* **1995**, *270*, 1838-1841.
- [83] B. Petersson, B. B. Nielsen, H. Rasmussen, I. K. Larsen, M. Gajhede, P. E. Nielsen, J. S. Kastrup, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1424-1430.
- [84] G. Haaima, H. Rasmussen, G. Schmidt, D. K. Jensen, J. Sandholm Kastrup, P. Wittung Stafshede, B. Norden, B. late) Ole, P. E. Nielsen, *New J. Chem.* **1999**, *23*, 833-840.
- [85] Anne B. Eldrup, Bettina B. Nielsen, G. Haaima, H. Rasmussen, Jette S. Kastrup, C. Christensen, Peter E. Nielsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 1781-1790.
- [86] V. Menchise, G. De Simone, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, R. Marchelli, D. Capasso, M. Saviano, C. Pedone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12021-12026.
- [87] S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Nordén, A. Gräslund, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544-5552.
- [88] B. Hyrup, M. Egholm, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Norden, O. Buchardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7964-7970.
- [89] B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1083-1088.
- [90] P. Lagriffoule, M. Eriksson, K. K. Jensen, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Nordén, O. Buchardt, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 912-919.
- [91] B. P. Gangamani, M. Decosta, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1409-1411.



- [92] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 177-192.
- [93] N. K. Sharma, K. N. Ganesh, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1403-1406.
- [94] N. K. Sharma, K. N. Ganesh, *Chem. Commun.* **2003**, *0*, 2484-2485.
- [95] M. D'Costa, V. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 883-886.
- [96] P. S. Lonkar, K. N. Ganesh, V. A. Kumar, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2604-2611.
- [97] E. A. Englund, Q. Xu, M. A. Witschi, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16456-16457.
- [98] G. Lowe, T. Vilaivan, M. S. Westwell, *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 321-329.
- [99] T. Vilaivan, C. Khongdeesameor, P. Harnyuttanakorn, M. S. Westwell, G. Lowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2541-2545.
- [100] P. S. Shirude, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3085-3088.
- [101] E. Lescrinier, M. Froeyen, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2975-2989.
- [102] T. Govindaraju, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5725-5734.
- [103] T. Vilaivan, G. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326-9327.
- [104] T. Vilaivan, C. Suparpprom, P. Duanglaor, P. Harnyuttanakorn, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1663-1666.
- [105] C. Suparpprom, C. Srisuwannaket, P. Sangvanich, T. Vilaivan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833-2837.
- [106] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.
- [107] V. A. Korshun, I. A. Prokhorenko, S. V. Gontarev, M. V. Skorobogatyi, K. V. Balakin, E. V. Manasova, A. D. Malakhov, Y. A. Berlin, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1461-1464.
- [108] Y. J. Seo, J. H. Ryu, B. H. Kim, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4931-4933.
- [109] M. E. Ostergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5771-5788.
- [110] A. Okamoto, Y. Ochi, I. Saito, *Chem. Commun.* **2005**, 1128-1130.
- [111] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 865-868.
- [112] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2062-2063.
- [113] A. Trifonov, M. Raytchev, I. Buchvarov, M. Rist, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19490-19495.
- [114] J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2088-2090.
- [115] J. Barbarič, *Dissertation Universität Regensburg* **2008**.
- [116] J. Jose, K. Burgess, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7835-7839.
- [117] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9040-9046.
- [118] S. Uppili, K. J. Thomas, E. M. Crompton, V. Ramamurthy, *Langmuir* **2000**, *16*, 265-274.
- [119] J. L. Meinershagen, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 448-449.
- [120] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Fujiwara, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3592-3598.
- [121] R. Varghese, P. K. Gajula, T. K. Chakraborty, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2009**, 3252-3257.
- [122] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9307-9310.
- [123] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 526-528.
- [124] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.
- [125] W. Su, M. Schuster, C. R. Bagshaw, U. Rant, G. A. Burley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2712-2715.

- [126] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [127] C. Beyer, *Dissertation Universität Regensburg* **2010**.
- [128] M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. N. Miller, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1051-1058.
- [129] J. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1684-1687.
- [130] R. H. E. Hudson, A. Ghorbani-Choghamarani, *Synlett* **2007**, 870-873.
- [131] S. Sezi, R. Varghese, T. Vilaivan, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 173-176.
- [132] C. Vilaivan, C. Srisuwannaket, C. Ananthanawat, C. Suparpprom, J. Kawakami, Y. Yamaguchi, Y. Tanaka, T. Vilaivan, *Art. DNA: PNA & XNA* **2011**, *2*, 50-59.
- [133] F. Seela, M. Zulauf, *Synthesis* **1996**, 726-730.
- [134] Z. Kazimierczuk, H. B. Cottam, G. R. Revankar, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6379-6382.
- [135] F. Seela, A. Kehne, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7556-7561.
- [136] H. D. Winkeler, F. Seela, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3119-3122.
- [137] R. G. Eason, D. M. Burkhardt, S. J. Phillips, D. P. Smith, S. S. David, *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 890-897.
- [138] E. Dias, J. L. Battiste, J. R. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4479-4480.
- [139] H. N. Poinar, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 676-684.
- [140] A. Suzuki, K. Kimura, S. Ishioroshi, I. Saito, N. Nemoto, Y. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2348-2352.
- [141] F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1781-1790.
- [142] F. Seela, H. Thomas, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 94-108.
- [143] L. E. Heystek, H.-q. Zhou, P. Dande, B. Gold, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12165-12166.
- [144] R. Wagner, M. Matteucci, J. Lewis, A. Gutierrez, C. Moulds, B. Froehler, *Science* **1993**, *260*, 1510-1513.
- [145] J. Booth, W. J. Cummins, T. Brown, *Chem. Commun.* **2004**, 2208-2209.
- [146] F. Seela, N. Ramzaeva, P. Leonard, Y. Chen, H. Debelak, E. Feiling, R. Kröschel, M. Zulauf, T. Wenzel, T. Fröhlich, M. Kostrzewa, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1421-1424.
- [147] X. Peng, H. Li, F. Seela, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5987-6000.
- [148] C. M. McKeen, L. J. Brown, J. T. G. Nicol, J. M. Mellor, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2267-2275.
- [149] A. Solinas, L. J. Brown, C. McKeen, J. M. Mellor, J. Nicol, N. Thelwell, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e96.
- [150] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.* **2004**, 1704-1705.
- [151] L. H. Thoresen, G.-S. Jiao, W. C. Haaland, M. L. Metzker, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4603-4610.
- [152] D. J. Hurley, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3749-3762.
- [153] Y. Saito, A. Suzuki, S. Ishioroshi, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4726-4729.
- [154] Y. Wang, O. Haze, J. P. Dinnocenzo, S. Farid, R. S. Farid, I. R. Gould, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6970-6981.
- [155] T. Ehrenschwender, Y. Liang, A.-N. Unterreiner, H.-A. Wagenknecht, T. J. A. Wolf, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 1197-1204.

- [156] M. Hoffer, *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2777-2781.
- [157] M. Weinberger, *Diplomarbeit Universität Regensburg* **2008**.
- [158] V. Rolland, M. Kotera, J. Lhomme, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 3505-3511.
- [159] I. Dhimitruka, J. S. Jr., *Synlett* **2004**, 335-337.
- [160] T.-M. Chin, L.-K. Huang, L.-S. Kan, *J. Chin. Chem. Soc.* **1997**, *44*, 413-416.
- [161] G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.
- [162] M.-H. Baik, J. S. Silverman, I. V. Yang, P. A. Ropp, V. A. Szalai, W. Yang, H. H. Thorp, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6437-6444.
- [163] H.-A. Wagenknecht, *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [164] M. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281-285.
- [165] E. M. LeProust, B. J. Peck, K. Spirin, H. B. McCuen, B. Moore, E. Namsaraev, M. H. Caruthers, *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, 2522-2540.
- [166] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [167] A. J. A. Cobb, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3260-3275.
- [168] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [169] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352-5358.
- [170] D. Graham, A. Grondin, C. McHugh, L. Fruk, W. E. Smith, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4785-4788.
- [171] F. Heaney, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3043-3058.
- [172] I. Singh, J. S. Vyle, F. Heaney, *Chem. Commun.* **2009**, 3276-3278.
- [173] S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue, H. L. Chappelle, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 71-76.
- [174] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1828-1830.
- [175] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2230-2231.
- [176] T. Ehrenschwender, B. R. Varga, P. Kele, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1761-1764.
- [177] F. Seela, V. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211-224.
- [178] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [179] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6859-6864.
- [180] J. J. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272-1279.
- [181] M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6257-6259.
- [182] J. Qiu, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6959-6961.
- [183] S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders, *Accounts of Chemical Research* **1993**, *26*, 469-475.
- [184] P. G. A. Janssen, J. Vandenberg, J. L. J. v. Dongen, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6078-6079.
- [185] P. G. A. Janssen, S. Jabbari-Farouji, M. Surin, X. Vila, J. C. Gielen, T. F. A. de Greef, M. R. J. Vos, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, P. C. M. Christianen, P. Leclère, R. Lazzaroni, P. van der Schoot, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1222-1231.
- [186] P. G. A. Janssen, A. Ruiz-Carretero, D. González-Rodríguez, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8103-8106.
- [187] G. Sargsyan, A. A. Schatz, J. Kubelka, M. Balaz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1020-1022.

- [188] R. Iwaura, F. J. M. Hoeben, M. Masuda, A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, T. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13298-13304.
- [189] W. Yang, P. F. Xia, M. S. Wong, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4018-4021.
- [190] A. D. Malakhov, E. V. Malakhova, S. V. Kuznitsova, I. V. Grechishnikova, I. A. Prokhorenko, M. V. Skorobogatyi, V. A. Korshun, Y. A. Berlin, *Russ J Bioorg Chem* **2000**, *26*, 34-44.
- [191] S. Sezi, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9257-9259.
- [192] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [193] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [194] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.